

("Službeni list SFRJ", broj 32/83 i "Službeni glasnik RBiH", broj 2/92) i odredbe koje se odnose na ugušćeno (kondenzirano) mlijeko i mlijeko u prahu Uputstva o načinu uzimanja uzoraka za vršenje analiza i superanaliza namirnica i predmeta opće upotrebe ("Službeni list SFRJ", broj 60/78, i "Službeni glasnik RBiH", broj 2/92).

#### Član 7.

(Primjena Pravilnika)

Mlijeko uzorkovano i analizirano u skladu s odredbama propisa navedenim u članu 6. ovog pravilnika može se stavljati na tržište 12 mjeseci od dana stupanja na snagu ovog pravilnika.

#### Član 8.

(Stupanje na snagu)

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH".

VM broj 224/13  
3. septembra 2013. godine  
Sarajevo

Predsjedavajući  
Vijeća ministara BiH  
**Vjekoslav Bevanda, s. r.**

Na osnovu člana 17. stav 2. i člana 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i člana 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine, u saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 62. sjednici održanoj 3. septembra 2013. godine, donijelo je

### **PRAVILNIK**

#### **O METODAMA UZORKOVANJA I ANALIZA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA I MLIJEKA U PRAHU NAMIJENJENOG ZA ISHRANU LJUDI**

#### **DIO PRVI - OPĆE ODREDBE**

##### Član 1.

(Predmet)

Pravilnikom o metodama uzorkovanja i analiza ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu namijenjenih za ishranu ljudi (u daljnjem tekstu: Pravilnik) propisuju se metode uzorkovanja i analiza ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu.

##### Član 2.

(Uzorkovanje)

Metode uzorkovanja ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu propisane su u Aneksu I., koji je sastavni dio ovog pravilnika.

##### Član 3.

(Analize)

Analize za provjeru kriterija navedenih u Aneksu II., koji je sastavni dio ovog pravilnika, provodit će se u skladu s postupcima opisanim u Aneksu III., koji je sastavni dio ovog pravilnika.

##### Član 4.

(Alternativne metode analize)

Kada su za fizikalno-hemijske analize određene alternativne metode, uzorak se može analizirati po jednoj od mogućih metoda, a izvještaj o ispitivanju mora sadržavati naziv upotrijebljene metode iz Aneksa III., koji je sastavni dio ovog pravilnika.

#### **DIO DRUGI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE**

##### Član 5.

(Službene kontrole)

Službene kontrole i inspekcijски nadzor provode se na način kako je to propisano važećim propisima.

##### Član 6.

(Prestanak važenja odredbi)

Danom stupanja na snagu ovoga Pravilnika prestaju važiti odredbe koje se odnose na metode uzorkovanja i fizikalno-kemijske analize ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka te metodama kemijskih i fizikalnih analiza mlijeka i mliječnih proizvoda

#### **ANEKS I.**

#### **METODE UZORKOVANJA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA I MLIJEKA U PRAHU ZA HEMIJSKE ANALIZE**

##### I. Opće odredbe

##### 1. Upravno uputstvo

##### 1.1. Osoblje

Uzorkovanje provodi ovlašteno kvalificirano lice, u skladu s posebnim propisima.

##### 1.2. Pečaćenje i označavanje uzoraka

Svaki uzorak, uzet za službenu upotrebu, mora se zapečatiti na mjestu uzimanja i označiti u skladu s posebnim propisima.

##### 1.3. Broj uzoraka

Za analizu je potrebno istovremeno pripremiti najmanje dva jednaka reprezentativna uzorka. Postupak i broj uzetih uzoraka propisan je posebnim propisima.

Uzorci se nakon uzorkovanja moraju što je moguće prije otpremiti u laboratorij.

##### 1.4. Zapisnik

Uz uzorke se prilaže zapisnik u skladu s posebnim propisima.

##### 2. Oprema za uzorkovanje

Sva oprema za uzorkovanje mora biti izrađena od prikladnog materijala odgovarajuće čvrstoće, koji ne uzrokuje promjene uzorka koje bi mogle uticati na rezultate ispitivanja, i ne smije uzrokovati promjene uzorka tokom uzorkovanja. Preporučuje se upotreba nehrđajućeg čelika.

Sve površine moraju biti glatke i bez pukotina, a svi rubovi zaobljeni. Oprema za uzorkovanje mora zadovoljavati zahtjeve propisane za svaki proizvod koji se uzorkuje.

##### 3. Spremnici za uzorkovanje

Spremnici i poklopci za uzorke moraju biti izrađeni od materijala i takve konstrukcije da primjereno štite uzorak i u njemu ne uzrokuju promjene koje bi mogle uticati na rezultate analiza ili ispitivanja. Prikladni materijali uključuju staklo, neke metale i neke vrste plastike. Spremnici bi po mogućnosti trebalo da budu neprozirni. Ako su prozirni ili propuštaju svjetlost, spremnici sa sadržajem moraju biti pohranjeni na tamnom mjestu.

Spremnici i poklopci moraju biti čisti i suhi. Oblik i volumen spremnika moraju zadovoljavati zahtjeve propisane za proizvod čiji se uzorak uzima.

Mogu se koristiti plastični spremnici za jednokratnu upotrebu, plastični spremnici, laminati uključujući aluminijsku

foliju ili prikladne plastične vrećice s odgovarajućim načinima zatvaranja.

Svi spremnici, osim plastičnih vrećica, moraju biti čvrsto zatvoreni ili prikladnim čepom ili metalnim ili plastičnim poklopcem s navojima, po potrebi s hermetičkim plastičnim zatvaračem. Svi čepovi ili zatvarači koji se koriste moraju biti netopivi, otporni na djelovanje masti i ne smiju imati sposobnost apsorpcije te ne smiju uticati na miris, aromu, svojstva ili sastav uzorka.

Čepovi moraju biti izrađeni ili prekriveni materijalima bez mirisa i koji nemaju sposobnost apsorpcije.

#### 4. Postupak uzorkovanja

Spremnici za uzorke moraju se zatvoriti odmah nakon uzorkovanja.

#### 5. Pohranjivanje uzoraka

Preporučene temperature za pohranjivanje uzoraka ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu ne smiju biti veće od 25°C. Vrijeme pohrane uzoraka prije analize uslovljeno je temperaturom na kojoj su uzorci pohranjeni.

#### 6. Prijevoz uzoraka

Uzorci se moraju što je moguće prije otpremiti u laboratorij u kojem se obavlja ispitivanje (po mogućnosti unutar 24 sata nakon uzorkovanja).

Tokom prijevoza potrebno je zaštititi uzorke od izlaganja stranim mirisima koji mogu kontaminirati uzorke, izlaganja direktnoj sunčevoj svjetlosti te izlaganja temperaturama većim od 25°C.

## II. METODA 1. UZORKOVANJA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA

### 1. Obim i oblast primjene

- ugušćeno (kondenzirano) ekstrasmasno mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) djelimično obrano mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) obrano mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno djelimično obrano mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno obrano mlijeko.

### 2. Oprema

#### 2.1. Općenito

Vidjeti tačku 2. Poglavlja I. ovog aneksa.

#### 2.2. Klipovi i mješalice

Klipovi ili mješalice, za miješanje tekućina u velikim spremnicima, moraju imati dovoljno veliku površinu kako bi izazvali odgovarajuće miješanje proizvoda bez pojave užeglog okusa. S obzirom na različite oblike i veličine spremnika, ne može se preporučiti određeni oblik klipova za sve namjene, ali klipovi moraju biti oblikovani na način da se izbjegne grebanje unutrašnje površine spremnika tokom miješanja. Prikladan materijal opisan je u tački 2. Poglavlja I. ovog aneksa.

Oblik prikladnog klipa preporučenog za miješanje tekućina u kantama ili limenkama ima sljedeće dimenzije (slika 1.): disk promjera 150 mm na kojem je, u krugu promjera 100 mm, šest probušenih rupa promjera 12,5 mm. Sredina diska pričvršćena je na metalnu šipku, čiji je drugi kraj ručke u obliku petlje. Dužina šipke, uključujući ručku, mora iznositi otprilike 1 m.

Prikladan klip za upotrebu u malim spremnicima ima približno sljedeće dimenzije (slika 2.): šipka dužine ne manje od 2 m, s diskom promjera 300 mm na kojem je, u krugu promjera 230 mm probušeno 12 rupa promjera 30 mm.

Za miješanje sadržaja velikih spremnika preporučuje se mehaničko miješanje ili miješanje čistim komprimiranim zrakom. Tokom miješanja potrebno je osigurati da su pritisak i

volumen zraka minimalni radi sprečavanja pojave užeglog okusa.

#### Napomena:

Kada je odredbama ovog pravilnika propisana upotreba »čistog komprimiranog zraka«, potrebno je upotrebljavati komprimirani zrak iz kojeg su uklonjeni svi kontaminanti (uključujući ulje, vodu i prašinu).

#### 2.3. Mješalice

Širokih oštih rubova, dovoljne dužine da dopire do dna spremnika u koji je proizvod pohranjen, jednog ruba oblikovanog po mogućnosti tako da odgovara obliku spremnika (vidjeti sliku 3.).

#### 2.4. Kutlače

Kutlača veličine i oblika prikladnih za uzimanje uzorka, grafički je prikazana na slici 4. Kutlača mora imati čvrstu ručku dužine najmanje 150 mm. Kapacitet kutlače ne smije biti manji od 50 mL. Prednost je ako je ručka savijena. Stožasti oblik šoljice omogućava dobro polaganje kutlača.

Alternativno se može upotrijebiti kutlača jednakog kapaciteta, ali naporednih strana raspodijeljenih u pet jednakih odsječaka, čime se olakšava uzorkovanje međusobno razmjernih količina pošiljki pohranjenih u više spremnika.

#### 2.5. Šipka

Okrugla, dužine približno 1 m i promjera 35 mm.

#### 2.6. Spremnici

Za poduzorkovanje kapaciteta 5 L, sa širokim otvorom.

#### 2.7. Kašika ili špatula

Širokih oštih rubova

#### 2.8. Spremnici za uzorke

Vidjeti tačku 3. Poglavlja I. ovog aneksa.

## 3. Postupak

### 3.1. Uzorkovanje ugušćenog (kondenziranog) mlijeka

Masa uzorka ne smije biti manja od 200 g.

3.1.1. Proizvod temeljito promiješati klipom ili miješalicom, ili mehaničkim miješanjem, ili prelijevanjem iz jednog spremnika u drugi, ili upotrebom čistog komprimiranog zraka (vidjeti napomenu pod tačkom 2.2.), dok proizvod ne postane dovoljno homogen.

Kutlačom uzeti uzorak odmah nakon miješanja. Ako postizanje odgovarajuće homogenosti predstavlja problem, uzorke uzeti iz različitih dijelova spremnika u kojem je proizvod pohranjen, do ukupne mase najmanje 200 grama. (Ako uzorak predstavlja smjesu poduzoraka, to je potrebno istaknuti na etiketi uzorka i u popratnom dokumentu).

3.1.2. Uzorkovanje malih pretpakovina namijenjenih za maloprodaju

Neoštećena i neotvorena pretpakovina može predstavljati uzorak. Jedna ili više pretpakovina iz iste serije ili lota može se uzeti kao uzorak na način da ukupna količina uzorka nije manja od 200 g.

3.2. Uzorkovanje ugušćenog (kondenziranog) zaslađenog mlijeka

#### 3.2.1. Općenito

Uzorkovanje iz spremnika u kojima su pohranjene velike količine ugušćenog (kondenziranog) mlijeka može biti izuzetno teško, posebno kada proizvod nije dovoljno homogeniziran i kada je jako viskozno. Probleme pri uzorkovanju može uzrokovati prisustvo velikih kristala saharoze ili laktoze ili taloženje različitih soli unutar proizvoda ili na zidovima spremnika, a uzrok problema može biti i zgrušana tvar. Ovakve okolnosti utvrdit će se kada se šipka uroni u spremnik u koji je proizvod pohranjen i izvadi nakon što je ispitana što je moguće veća dodirna površina. Ako kristali šećera nisu veći od 6 mm, oni pri uzorkovanju ne bi smjeli uzrokovati teškoće. Ako proizvod nije homogeniziran, tu činjenicu treba istaknuti na

etiketi uzorka i u popratnom dokumentu. Kako se ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno mlijeko često pohranjuje na sobnoj temperaturi, za dobivanje reprezentativnog uzorka preporučuje se uzorkovani sadržaj zagrijati na temperaturu od najmanje 20°C.

### 3.2.2. Postupak

Masa uzorka ne smije biti manja od 200 g.

- otvoreni spremnici

Prethodno temeljito očišćen i osušen poklopac otvoriti samo na jednom kraju kako bi se spriječilo da u sadržaj upadne strana tvar. Sadržaj spremnika promiješati pomoću miješalice (Slika 3.) Zidove i dno spremnika treba sastrugati lopaticom, kako bi se odstranio onaj dio proizvoda koji je na njih prionuo. Sadržaj spremnika temeljito promiješati kombinacijom kružnih i okomitih pokreta, pomoću miješalice usmjerene dijagonalno, pri čemu treba paziti da u uzorak ne uđe zrak. Miješalicu potom izvaditi, a ugušćeno (kondenzirano) mlijeko koje na nju prijanja lopaticom ili kašikom prebaciti u spremnik kapaciteta 5 L (2.6.). Miješanje i vađenje miješalice potrebno je ponavljati sve dok se ne prikupi 2 do 3 L sadržaja. Ovu količinu treba miješati sve dok ne postane homogena, a potom uzeti uzorak od najmanje 200 grama.

- zatvorene metalne bačve, začepljene na kraju ili postrance

Iz razloga opisanih u tački 3.2.1., uzorkovanje kroz rupu predviđenu za čep prikladno je samo ako se radi o ugušćenom (kondenziranom) mlijeku koje lagano teče i koje je ujednačene konzistencije. Sadržaj treba izmiješati uvođenjem šipke kroz rupu predviđenu za čep, koju se nakon ispitivanja dodirne površine i miješanja u svim smjerovima koliko je moguće, izvuče i potom uzorak pripremi na način opisan u tački 3.2.1. Alternativno se može dopustiti da sadržaj ističe u prikladni spremnik, pri čemu se treba pobrinuti da iz metalne bačve isteče što je moguće više njenog sadržaja. Nakon miješanja miješalicom, uzorak se uzima kako je opisano u tački 3.2.1.

3.2.3. Uzorkovanje malih pretpakovina namijenjenih za maloprodaju

Neoštećena i neotvorena pretpakovina može predstavljati uzorak. Jedna ili više pretpakovina iz iste serije ili lota može se uzeti kao uzorak na način da ukupna količina uzorka nije manja od 200 g.

### 3.3. Zaštita, čuvanje i prijevoz uzoraka

Vidjeti tačke 5. i 6. Poglavlja I. ovog aneksa.

## III. METODA 2. UZORKOVANJA MLIJEKA U PRAHU

### 1. Obim i oblast primjene

Ovom metodom opisuje se uzorkovanje za hemijske analize:

- punomasnog mlijeka u prahu,
- obranog mlijeka u prahu,
- djelimično obranog mlijeka u prahu,
- ekstramasnog mlijeka u prahu.

### 2. Oprema

Vidjeti tačku 2. Poglavlja I. ovog aneksa.

2.1. Sonde dovoljne dužine da mogu dosegnuti dno spremnika s proizvodom.

Prikladne su sonde koje zadovoljavaju zahtjeve iz Poglavlja IV. ovog aneksa.

### 2.2. Lopatica, kašika ili špatula širokih oštrih rubova.

### 2.3. Spremnici za uzorke

Vidjeti tačku 3. Poglavlja I. ovog aneksa.

### 3. Postupak

#### 3.1. Općenito

Tokom ili neposredno prije uzimanja uzoraka za analizu mogućnost apsorpcije vlage iz zraka potrebno je svesti na

minimum. Nakon uzorkovanja spremnik ponovo čvrsto zatvoriti.

### 3.2. Uzorkovanje

Masa uzorka koji se uzima za analizu ne smije biti manja od 200 g.

Čistu i suhu sondu utisnuti u proizvod, tako da je, ako je to potrebno, spremnik nagnut ili položen na jednu stranu. Otvor okrenuti prema dolje i upotrijebiti ravnomjernu silu prodiranja. Kada dosegne dno spremnika, sondu rotirati za 180°, izvući sadržaj i isprazniti u spremnik za uzorke. Ponoviti onoliko puta koliko je potrebno da se dobije uzorak mase najmanje 200 g. Spremnik za uzorke zatvoriti odmah nakon završenog uzorkovanja.

3.2.1. Uzorkovanje malih pretpakovina namijenjenih za maloprodaju

Neoštećena i neotvorena pretpakovina može predstavljati uzorak. Jedna ili više pretpakovina iz iste serije ili lota može se uzeti kao uzorak na način da ukupna količina uzorka nije manja od 200 g.

#### Napomena:

Kod proizvoda označenih oznakom »instant«, cijela neotvorena pretpakovina predstavlja uzorak.

### 3.3. Zaštita, čuvanje i prijevoz uzoraka

Vidjeti tačke 5. i 6. Poglavlja I. ovog aneksa.

## IV. VELIKE ZA UZORKOVANJE MLIJEKA U PRAHU IZ VELIKIH SPREMNIKA

### 1. Vrste sonda

a) Tip A: duga

b) Tip B: kratka

(vidjeti sliku 5.)

### 2. Materijali

Oštrica i tijelo sonde moraju biti izrađeni od glatkog metala, po mogućnosti nehrđajućeg čelika. Držak duge sonde mora po mogućnosti biti izrađen od nehrđajućeg čelika. Kratka sonda ima odvojivi drveni ili plastični držak s kukom u obliku bajoneta u oštrici.

### 3. Konstrukcija

3.1. Oblik, materijal i vanjski dio moraju biti takvi da omogućavaju lagano čišćenje sonde.

3.2. Istaknuti dio oštrice sonde tipa A mora biti dovoljno oštar kako bi poslužio kao strugač.

3.3. Šiljak oštrice mora biti dovoljno oštar kako bi se olakšalo uzimanje uzoraka.

### 4. Osnovne dimenzije

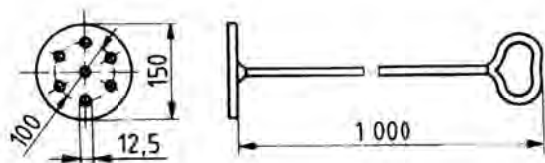
Sonde moraju biti u skladu sa sljedećim dimenzijama (dozvoljeno je odstupanje od 10 %):

	Tip A duga	Tip B kratka
Dužina oštrice	800 mm	400 mm
Debljina metala oštrice	1 do 2 mm	1 do 2 mm
Unutrašnji promjer oštrice kod šiljka	18 mm	32 mm
Unutrašnji promjer oštrice kod drška ili tijela	22 mm	28 mm
Širina otvora kod šiljka	4 mm	20 mm
Širina otvora kod drška ili tijela	14 mm	14 mm

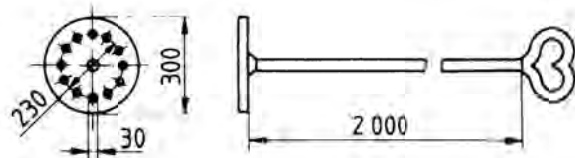
### 5. Napomena o upotrebi sondi

5.1. Kod manje sipkog praha sonde mogu se umetnuti okomito. Sonde tipa A potpuno se napune vrtnjom i mogu se izvući okomito. Sonde tipa B potpuno se napune tokom umetanja i moraju se izvući u kosom položaju kako bi se spriječili gubici na donjem kraju.

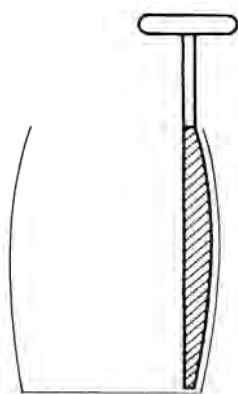
5.2. Kod sipkog praha, spremnici moraju biti nagnuti, sonde umetnute u gotovo vodoravnom položaju s otvorom prema dolje, a izvučene s otvorom prema gore.



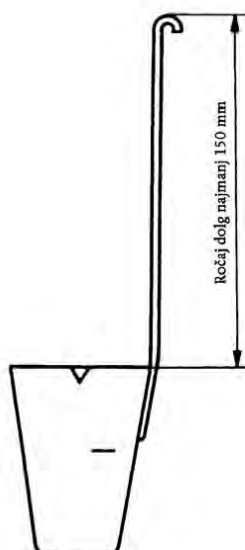
Slika 1. Preporučeni klip za limenke i kante (dimenzije u milimetrima)



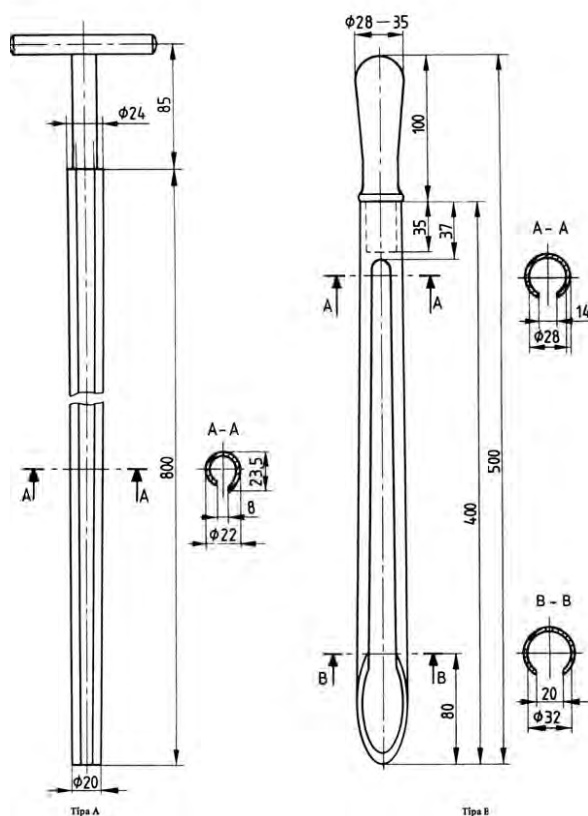
Slika 2. Preporučeni klip za male spremnike (dimenzije u milimetrima)



Slika 3. Mješalica prikladna za miješanje ugušćenog (kondenziranog) mlijeka



Slika 4. Kutlača prikladna za tekućine (kapaciteta većeg od 50 ml, s ručkom dužine najmanje 150 mm)



Slika 5. Sonde za mlijeko u prahu (sve dimenzije su u milimetrima)

## ANEKS II. PREGLED METODA ANALIZA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA I MLIJEKA U PRAHU

### I. Opće odredbe

#### II. Određivanje suhe tvari u:

- Ugušćenom (kondenziranom) ekstraprasnom mlijeku (upotrebom Metode 1, Aneks III.),
- Ugušćenom (kondenziranom) mlijeku (upotrebom Metode 1, Aneks II.),
- Ugušćenom (kondenziranom) djelimično obranom mlijeku (upotrebom Metode 1, Aneks III.),
- Ugušćenom (kondenziranom) obranom mlijeku (upotrebom Metode 1, Aneks III.),
- Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku (upotrebom Metode 1, Aneks III.),
- Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelimično obranom mlijeku (upotrebom Metode 1, Aneks III.),
- Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku (upotrebom Metode 1, Aneks III.),

#### III. Određivanje vlage u:

- Ekstraprasnom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 2, Aneks III.),
- Punomasnom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 2, Aneks III.),
- Djelimično obranom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 2, Aneks III.),
- Obranom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 2, Aneks III.),

#### IV. Određivanje masti u:

- Ugušćenom (kondenziranom) ekstraprasnom mlijeku (upotrebom Metode 3, Aneks III.),

- Ugušćenom (kondenziranom) mlijeku (upotrebom Metode 3, Aneks III.),
  - Ugušćenom (kondenziranom) djelimično obranom mlijeku (upotrebom Metode 3, Aneks III.),
  - Ugušćenom (kondenziranom) obranom mlijeku (upotrebom Metode 3, Aneks III.),
  - Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku (upotrebom metode 3, Aneks III.),
  - Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelimično obranom mlijeku (upotrebom Metode 3, Aneks III.),
  - Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku (upotrebom Metode 3, Aneks III.),
  - Ekstramasnom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 4, Aneks III.),
  - Punomasnom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 4, Aneks III.),
  - Djelimično obranom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 4, Aneks III.),
  - Obranom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 4, Aneks III.),
- V. Određivanje saharoze u:
- Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku (upotrebom Metode 5, Aneks III.),
  - Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelimično obranom mlijeku (upotrebom Metode 5, Aneks III.),
  - Ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku (upotrebom Metode 5, Aneks III.),
- VI. Određivanje mliječne kiseline i laktata u:
- Ekstramasnom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 6, Aneks III.),
  - Punomasnom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 6, Aneks III.),
  - Djelimično obranom mlijeku u prahu (upotrebom Metode 6, Aneks III.),
  - Obranom mlijeku u prahu (upotrebom metode 6, Aneks III.),
- VII. Određivanje aktivnosti fosfataze u:
- Ekstramasnom mlijeku u prahu (upotrebom metode 7 ili 8, Aneks III.),
  - Punomasnom mlijeku u prahu (upotrebom metode 7 ili 8, Aneks III.),
  - Djelimično obranom mlijeku u prahu (upotrebom metode 7 ili 8, Aneks III.),
  - Obranom mlijeku u prahu (upotrebom metode 7 ili 8, Aneks III.),

### ANEKS III.

#### METODE ANALIZA SASTAVA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLJEKA I MLJEKA U PRAHU NAMIJENJENIH ZA KONZUMACIJU

##### OPĆE ODREDBE

##### 1. PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU

1.1. Ugušćeno (kondenzirano) ekstramasno mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) djelimično obrano mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) obrano mlijeko

Protresti i preokrenuti zatvorenu limenku. Otvoriti limenku i polagano prelići mlijeko u drugi spremnik, koji se može hermetički zatvoriti, miješajući ga ponovljenim prelijevanjem. Paziti da sva mast i mlijeko koji prijanjaju na zidove i krajeve limenke budu pomiješani sa uzorkom. Zatvoriti spremnik. Ako proizvod nije homogeniziran, zagrijati spremnik u vodenom kupatilu na temperaturi 40°C. Snažno protresti svakih 15 minuta. Nakon dva sata, ukloniti spremnik iz

vodenog kupatila i ostaviti da se ohladi do sobne temperature. Ukloniti poklopac i temeljito promiješati sadržaj spremnika kašikom ili špatulom (ako se mast odvojila, uzorak se ne ispituje). Pohraniti na hladnom mjestu.

##### 1.2. Ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno djelimično obrano mlijeko

##### Ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno obrano mlijeko

Limenke: Zagrijati zatvorenu limenku u vodenom kupatilu pri temperaturi od 30-40°C približno 30 minuta. Otvoriti limenku i temeljito promiješati sadržaj špatulom ili kašikom čineći pokrete gore, dolje i kružnim pokretima kako bi se gornji i donji slojevi dobro pomiješali s ukupnim sadržajem. Paziti da ostatak mlijeka koji prijanja na zidove i krajeve limenke bude umiješan u uzorak. Koliko god je moguće, prelići sadržaj u drugi spremnik koji ima poklopac za hermetičko zatvaranje. Zatvoriti spremnik i pohraniti na hladnom mjestu.

Tube: Prerezati kraj tube i izliti sadržaj u spremnik koji ima poklopac za hermetičko zatvaranje. Zatim prerezati tubu po dužini, sastrugati sav materijal koji prijanja za unutrašnji zid i pažljivo pomiješati sa ostatkom sadržaja. Pohraniti na hladnom mjestu.

##### 1.3. Ekstramasno mlijeko u prahu

Punomasno mlijeko u prahu

Djelimično obrano mlijeko u prahu

Obrano mlijeko u prahu

Presipati mlijeko u prahu u čisti, suhi spremnik (s poklopcem za hermetičko zatvaranje) volumena dva puta većeg od volumena uzorka. Odmah zatvoriti spremnik i temeljito promiješati mlijeko u prahu ponovljenim protresanjem i okretanjem spremnika. Tokom pripreme uzorka koliko god je moguće izbjegavati izlaganje uzorka atmosferi kako bi apsorpcija vlage bila minimalna.

##### 2. REAGENSI

##### 2.1. Voda

2.1.1. Ako se voda koristi kao rastvarač, za razrjeđivanje ili za pranje, treba koristiti destiliranu ili demineraliziranu vodu istog stepena čistoće.

2.1.2. Bez navođenja bilo kakvog drugog reagensa, pojam »rastvaranje« podrazumijeva rastvaranje u vodi, »rastvor« vodeni rastvor i »razrjeđivanje« razrjeđivanje vodom.

##### 2.2. Hemikalije

Sve hemikalije koje se koriste moraju biti potvrđene analitičke čistoće, osim gdje je drugačije navedeno.

##### 3. OPREMA

##### 3.1. Spisak opreme

Spisak opreme sadrži samo opremu za specijalnu upotrebu te opremu koja zahtijeva posebnu specifikaciju.

##### 3.2. Analitička vaga

Pojam "analitička vaga" odnosi se na vagu tačnosti najmanje 0,1 mg.

##### 4. IZRAŽAVANJE REZULTATA

##### 4.1. Izračunavanje

Ako nije drugačije navedeno, rezultat mora biti izražen kao maseni udio u uzorku zapremljenom u laboratoriju.

##### 4.2. Broj značajnih brojeva

Rezultat ne smije sadržavati više značajnih brojeva nego što je opravdano preciznošću metode koja se primjenjuje.

##### 5. IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

U izvještaju o ispitivanju navodi se upotrijebljena metoda analize i dobiveni rezultati. Osim toga, navode se svi detalji postupka koji nisu opisani u metodi analize ili koji nisu obavezni, kao i sve okolnosti koje su mogle uticati na dobivene rezultate. Izvještaj o ispitivanju mora sadržavati sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

**METODA 1. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI**

(Sušionik 99°C)

**1. OBIM I OBLAST PRIMJENE**

Ovom metodom određuje se udio suhe tvari u:

- ugušćenom (kondenziranom) ekstramasnom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) djelimično obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelimično obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku.

**2. DEFINICIJA**

Udio suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) mlijeku je udio suhe tvari određen opisanom metodom.

**3. PRINCIP**Poznata količina uzorka razrjeđuje se vodom, miješa s pijeskom i suši pri temperaturi od  $99 \pm 1^\circ\text{C}$ . Masa nakon sušenja je masa suhe tvari i izračunava se kao postotak mase uzorka.**4. REAGENSI**Kremeni ili morski pijesak, tretiran hloridnom kiselinom (veličina zrnaca: 0,18-0,5 mm, koja prolaze kroz sito veličine otvora 500  $\mu\text{m}$  i zadržavaju se na situ veličine otvora 180 $\mu\text{m}$ ). Pijesak mora zadovoljavati sljedeći kontrolni test:

Zagrijavati približno 25 g pijeska u sušioniku (5.3.), dva sata, kako je opisano u tačkama 6.1. do 6.3. Dodati 5 mL vode, ponovo zagrijavati u sušioniku dva sata, ohladiti i izvagati. Razlika između dvije odvage ne smije biti veća od 0,5 mg.

Ako je potrebno, tretirati pijesak 25%-nom hloridnom kiselinom tri dana, uz povremeno miješanje. Ispirati vodom do nestanka kisele reakcije ili dok voda za ispiranje više ne sadržava hloride. Osušiti pri temperaturi od  $160^\circ\text{C}$  i ponovo testirati kako je navedeno.**5. OPREMA****5.1. Analitička vaga**

5.2. Posudice s ravnim dnom, po mogućnosti izrađene od nikla, aluminijske ili nehrđajućeg čelika. Posudice moraju imati poklopce koji se mogu čvrsto zatvoriti, ali i lako ukloniti. Primjerene dimenzije su promjer 60 do 80 mm i dubina približno 25 mm.

5.3. Sušionik za sušenje pri atmosferskom pritisku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od  $99 \pm 1^\circ\text{C}$ . Temperatura mora biti jednaka u cijelom sušioniku.

5.4. Eksikator s aktivnim silikagelom s indikatorom prisustva vode ili odgovarajućim sredstvom za sušenje.

5.5. Stakleni štapići, spljoštjeni na jednom kraju, dužine koja pristaje unutrašnjosti metalnih posudica.

5.6. Kipuće vodeno kupatilo.

**6. POSTUPAK**

6.1. U posudicu (5.2.) staviti približno 25 g pijeska (4.) i kratki stakleni štapić (5.5.).

6.2. Bez prekrivanja posudice i sadržaja poklopcem, staviti posudicu sa sadržajem i poklopac u sušionik (5.3.) i zagrijavati dva sata.

6.3. Posudicu zatvoriti poklopcem i prenijeti u eksikator (5.4.) Ostaviti da se ohladi na sobnu temperaturu i izvagati s tačnošću od 0,1 mg ( $M_0$ ).

6.4. Nagnuti posudicu kako bi se pijesak skupio na jednoj strani posudice. U prazni dio posudice staviti približno 1,5 g ugušćenog (kondenziranog) zaslađenog mlijeka, odnosno 3,0 g

ugušćenog (kondenziranog) mlijeka. Posudicu zatvoriti poklopcem i izvagati s tačnošću od 0,1 mg ( $M_1$ ).

6.5. Skinuti poklopac, dodati 5 mL vode i pomoću staklenog štapića promiješati tekućine, a zatim pijesak i tekući dio. Štapić ostaviti u mješavini.

6.6. Posudicu staviti u vodeno kupatilo (5.6.) dok voda ne ispari, što obično traje 20 minuta. Povremeno štapićem promiješati mješavinu kako bi masa bila dobro prozračena i kako se ne bi stvrdnula kad se osuši. Štapić položiti u posudicu.

6.7. Staviti posudicu i poklopac u sušionik na 1 sat i 30 minuta.

6.8. Posudicu zatvoriti poklopcem i prenijeti u eksikator (5.4.). Ostaviti da se ohladi do sobne temperature i izvagati s tačnošću od 0,1 mg.

6.9. Ponovo staviti posudicu i poklopac u sušionik, otklopiti posudicu i otkrivenu posudicu i poklopac zagrijavati još jedan sat.

6.10. Ponoviti postupak opisan u tački 6.8.

6.11. Ponavljati postupak opisan u tačkama 6.9. i 6.10. dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ako se masa poveća, pri izračunavanju (7.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je  $M_2$  (g).**7. IZRAŽAVANJE REZULTATA****7.1. Metoda izračunavanja**

Udio suhe tvari, izražen kao postotak mase uzorka, izračunava se na sljedeći način:

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

pri čemu je:

 $M_0$  = masa posudice, poklopca i pijeska nakon postupka opisanog u tački 6.3., u gramima $M_1$  = masa posudice, poklopca, pijeska i uzorka nakon postupka opisanog u tački 6.4., u gramima $M_2$  = masa posudice, poklopca, pijeska i osušenog uzorka nakon postupka opisanog u tački 6.11., u gramima**7.2. Ponovljivost**

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uslovima, ne smije biti veća od 0,2 g suhe tvari na 100 g proizvoda.

**8. IZRAČUNAVANJE UKUPNE SUHE TVARI MLIJEKA I BEZMASNE SUHE TVARI MLIJEKA**

8.1. Udio ukupne suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku izračunava se na sljedeći način:

Od udjela ukupne suhe tvari (prema Metodi 1, Aneks III.) oduzeti udio sahara (prema Metodi 5, Aneks III.).

8.2. Udio bezmasne suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku izračunava se na sljedeći način:

Od udjela ukupne suhe tvari (prema Metodi 1, Aneks III.) oduzeti udio sahara (prema Metodi 5, Aneks III.) i udio masti (prema Metodi 3, Aneks III.).

8.3. Udio bezmasne suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) mlijeku izračunava se na sljedeći način:

Od udjela ukupne suhe tvari (prema Metodi 1, Aneks III.) oduzeti udio masti (prema Metodi 3, Aneks III.).

**METODA 2. ODREĐIVANJE UDJELA VLAGE**(Sušionik  $102^\circ\text{C}$ )**1. OBIM I OBLAST PRIMJENE**

Ovom metodom određuje se gubitak mase sušenjem u:

- ekstramasnom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelimično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

## 2. DEFINICIJA

Udio vode je gubitak mase sušenjem određen opisanom metodom.

## 3. PRINCIP

Masa ostatka uzorka za analizu određuje se nakon sušenja pri atmosferskom pritisku u sušioniku pri temperaturi  $102 \pm 1^\circ\text{C}$  do konstantne mase. Gubitak mase izražava se kao postotak mase uzorka.

## 4. OPREMA

### 4.1. Analitička vaga

4.2. Posudice, po mogućnosti izrađene od nikla, aluminijske, nehrđajućeg čelika ili stakla. Posudice moraju imati poklopce koji se mogu čvrsto zatvoriti, ali i lako ukloniti. Primjerene dimenzije su promjer 60 do 80 mm i dubina približno 25 mm.

4.3. Sušionik za sušenje pri atmosferskom pritisku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od  $102 \pm 1^\circ\text{C}$ . Temperatura mora biti jednaka u cijelom sušioniku.

4.4. Eksikator s aktivnim silikagelom s indikatorom prisustva vode ili odgovarajućim sredstvom za sušenje.

## 5. POSTUPAK

5.1. Otvorenu posudicu (4.2.) s poklopcem staviti u sušionik (4.3.) i zagrijavati približno jedan sat.

5.2. Zatvorenu posudicu ostaviti da se ohladi u eksikatoru (4.4.) do sobne temperature i zatim izvagati s tačnošću od 0,1 mg ( $M_0$ ).

5.3. U posudicu dodati približno 2 g mlijeka u prahu, zatvoriti posudicu i što je brže moguće izvagati s tačnošću od 0,1 mg ( $M_1$ ).

5.4. Otvorenu posudicu s poklopcem staviti u sušionik dva sata.

5.5. Zatvorenu posudicu ostaviti da se ohladi u eksikatoru (4.4.) do sobne temperature i zatim što je brže moguće izvagati s tačnošću od 0,1 mg.

5.6. Otvorenu posudicu s poklopcem zagrijavati u sušioniku jedan sat.

5.7. Ponoviti postupak opisan u tački 5.5.

5.8. Ponavljati postupak opisan u tačkama 5.6. i 5.5. dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ako se masa poveća, pri izračunavanju (6.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je  $M_2$  (g).

## 6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

### 6.1. Metoda izračunavanja

Gubitak mase sušenjem, izražen kao postotak mase, izračunava se na sljedeći način:

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

pri čemu je:

$M_0$  = masa posudice i poklopca nakon postupka opisanog u tački 5.2., u gramima

$M_1$  = masa posudice, poklopca i uzorka nakon postupka opisanog u tački 5.3., u gramima

$M_2$  = masa posudice, poklopca i konačnog uzorka nakon postupka opisanog u tački 5.5., u gramima

### 6.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uslovima, ne smije biti veća od 0,1 g vode na 100 g proizvoda.

## METODA 3. ODREĐIVANJE UDJELA MASTI U UGUŠČENOM (KONDENZIRANOM) MLIJEKU (Metoda Röse-Gottlieb)

### 1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

Ovom se metodom određuje udio masti u:

- uguščenom (kondenziranom) ekstramasnom mlijeku,
- uguščenom (kondenziranom) mlijeku,
- uguščenom (kondenziranom) djelimično obranom mlijeku,
- uguščenom (kondenziranom) obranom mlijeku,
- uguščenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku,
- uguščenom (kondenziranom) zaslađenom djelimično obranom mlijeku,
- uguščenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku.

### 2. DEFINICIJA

Udio masti u uguščenom (kondenziranom) mlijeku je udio masti određen opisanom metodom.

### 3. PRINCIP

Udio masti određuje se ekstrakcijom masti iz amonijevog alkoholnog rastvora uzorka dietil eterom i petroleterom, isparavanjem rastvarača i vaganjem ostatka te izračunavanjem postotka mase uzorka prema Röse-Gottliebom postupku.

### 4. REAGENSI

Svi reagensi moraju zadovoljavati zahtjeve definirane sljepom probom (6.1.). Ako je potrebno, reagensi mogu biti ponovo destilirani u prisustvu približno 1 g mliječne masti na 100 mL rastvarača.

4.1. Rastvor amonijaka, približno 25% (m/m)  $\text{NH}_3$  (gustoće približno 0,91 g/mL pri  $20^\circ\text{C}$ ) ili jači rastvor poznate koncentracije.

4.2. Etanol,  $96 \pm 2\%$  (v/v) ili, ako on nije na raspolaganju, etanol denaturiran metanolom, etil metil ketonom ili petroleterom.

4.3. Dietil eter, bez peroksida.

#### Napomena 1.

Za određivanje prisustva peroksida u mali cilindar sa staklenim čepom, koji je potrebno isprati eterom, dodati 10 mL etera i 1 mL svježe pripremljenog 10%-tnog rastvora kalijevog jodida. Protresti i ostaviti da stoji jednu minutu. Žuta boja ne smije se pojaviti ni u jednom sloju.

#### Napomena 2.

Dietil eter može se očuvati bez peroksida dodatkom mokre cinkove folije koju je potrebno potpuno umočiti u razrijeđeni kiseli rastvor bakrovog sulfata jednu minutu te zatim isprati vodom. Za 1 L upotrijebiti približno 8000 mm<sup>2</sup> cinkove folije, razrezati na trake dovoljne dužine da mogu dosezati najmanje do polovine spremnika.

4.4. Petroleter, s rasponom vrenja od  $30-60^\circ\text{C}$ .

4.5. Miješani rastvarač koji se priprema neposredno prije upotrebe miješanjem jednake količine dietil etera (4.3.) i petroletera (4.4.) (u slučaju da je naznačena upotreba miješanog rastvarača, on se može zamijeniti dietil eterom ili petroleterom).

### 5. OPREMA

#### 5.1. Analitička vaga

5.2. Odgovarajuće epruvete ili tikvice za ekstrakciju s čepovima od brušenog stakla ili drugim zatvaračima otpornim na djelovanje rastvarača koji se koriste.

5.3. Tikvice tankih zidova i ravnog dna, 150-250 mL.

5.4. Sušionik za sušenje pri atmosferskom pritisku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od  $102 \pm 1^\circ\text{C}$ .

5.5. Granule za vrenje, bez masti, koje se pri upotrebi ne drobe, neporozne, npr. staklene kuglice ili komadići silicijevog

karbida (upotreba ovog materijala nije obavezna, vidjeti tačku 6.2.1.).

5.6. Sifon (odvodna cijev) koja odgovara epruvetama za ekstrakciju.

5.7. Centrifuga (nije obavezna).

## 6. POSTUPAK

### 6.1. Slijepa proba

Paralelno s određivanjem udjela masti u uzorku, provesti slijepu probu sa 10 mL vode, koristeći istu aparaturu za ekstrakciju, iste količine svih reagensa i isti postupak opisan ovom metodom, osim postupka opisanog pod tačkom 6.2.2. Ako slijepa proba prelazi 0,5 mg, provjeriti reagens te nečisti reagens ili reagens očistiti ili zamijeniti.

### 6.2. Određivanje

6.2.1. Osušiti tikvicu (5.3.) (ako je potrebno zajedno s nekoliko granula za vrenje (5.5.) kako bi se postiglo lagano vrenje tokom uklanjanja rastvarača koje slijedi) u sušioniku 30-60 minuta. Ostaviti tikvicu da se ohladi do sobne temperature i izvagati s tačnošću od 0,1 mg.

6.2.2. Promiješati pripremljeni uzorak i odmah izvagati, s tačnošću od 1 mg, 4-5 g uzorka ili 2-2,5 g zaslađenog uzorka, direktno u aparaturu za ekstrakciju. Dodati vode do 10,5 mL i pažljivo promiješati uz lagano zagrijavanje (40-50°C) dok se proizvod potpuno ne rasprši. Određivanje je potrebno ponoviti ako uzorak nije potpuno raspršen.

6.2.3. Dodati 1,5 ml amonijaka (25%) (4.1.) ili odgovarajući volumen jačeg rastvora i dobro promiješati.

6.2.4. Dodati 10 mL etanola (4.2.) i promiješati tekućine nježno, ali temeljito u nezatvorenoj aparaturi.

6.2.5. Dodati 25 mL dietil etera (4.3.) i ohladiti pod mlazom tekuće vode. Zatvoriti aparaturu, snažno protresti i okretati više puta jednu minutu.

6.2.6. Pažljivo ukloniti čep i dodati 25 mL petroletera (4.4.) koristeći prvih nekoliko mililitara za ispiranje čepa i unutrašnjosti vrata aparature, tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Zatvoriti aparaturu čepom i protresati i okretati više puta 30 sekundi. Ne smije se previše snažno protresati ako se ne provodi centrifugiranje pod tačkom 6.2.7.

6.2.7. Ostaviti aparaturu da stoji dok gornji sloj tekućine ne postane bistar i jasno se ne odijeli od donjeg vodenog sloja. Alternativno provesti odvajanje koristeći odgovarajuću centrifugu (5.7.).

#### *Napomena:*

Pri upotrebi centrifuge koju ne pokreće trofazni motor, može doći do iskrenja i stoga je potreban oprez kako bi se izbjegla eksplozija ili požar zbog eterskih para koje mogu izlaziti iz, naprimjer, napukle epruvete.

6.2.8. Ukloniti čep, isprati čep i unutrašnjost vrata tikvice s nekoliko mililitara miješanog rastvarača (4.5.) tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Pažljivo prenijeti što je moguće više supernatanta dekantiranjem ili pomoću sifona (5.6.) u pripremljenu tikvicu (6.2.1.).

#### *Napomena:*

Ako se ne upotrebljava sifon, može biti potrebno dodati malo vode kako bi se povećala površina između dva sloja i olakšalo dekantiranje.

6.2.9. Isprati vanjsku i unutrašnju stranu vrata aparature ili vrh i donji dio sifona s nekoliko mililitara miješanog rastvarača (4.5.) tako da se tekućina s vanjske strane vrata slijeva u tikvicu, a tekućina s unutrašnje strane vrata i sifona u aparaturu za ekstrakciju.

6.2.10. Provesti drugu ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u tačkama od 6.2.5. do 6.2.9. uključivo, ali koristeći samo 15 mL dietil etera i 15 mL petroletera.

6.2.11. Provesti treću ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u tački 6.2.10., ali bez zadnjeg ispiranja.

#### *Napomena:*

Treća ekstrakcija nije obavezna pri analizi uzoraka ugušćenog (kondenziranog) obranog mlijeka i ugušćenog (kondenziranog) zaslađenog obranog mlijeka.

6.2.12. Pažljivo ispariti ili ukloniti destilacijom što više rastvarača (uključujući etanol). Ako je kapacitet tikvice malen, potrebno je ukloniti nešto rastvarača, kako je navedeno, nakon svake ekstrakcije.

6.2.13. Kada se više ne osjeti miris rastvarača, tikvicu s bočne strane staviti u sušionik i zagrijavati jedan sat.

6.2.14. Izvaditi tikvicu iz sušionika, ostaviti da se ohladi do sobne temperature i izvagati s tačnošću od 0,1 mg.

6.2.15. Ponoviti postupak opisan u tačk. 6.2.13. i 6.2.14. uz zagrijavanje u trajanju od 30 do 60 minuta dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ako se masa poveća, pri izračunavanju (7.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je M1 (g).

6.2.16. Dodati 15-25 mL petroletera kako bi se potvrdilo da je ekstrahirana tvar potpuno topiva. Lagano zagrijavati i rotirati dok se mast ne otopi.

6.2.16.1. Ako je ekstrahirana tvar potpuno topiva u petroleteru, masa masti je razlika između masa određenih u tačk. 6.2.1. i 6.2.15.

6.2.16.2. Ako je prisutna bilo koja netopiva tvar, ili u slučaju sumnje, potpuno ekstrahirati mast iz tikvica ponavljajući ispiranje toplim petroleterom, tako da se prije svakog dekantiranja netopive tvari istalože. Isprati vanjski dio vrata tikvice tri puta. Zagrijavati tikvicu, postavljenu na bočnu stranu u sušioniku jedan sat. Ostaviti da se ohladi do sobne temperature kao prije (6.2.1.) i izvagati s tačnošću od 0,1 mg. Masa masti je razlika između mase određene u tački 6.2.15. i ove konačne mase.

## 7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

### 7.1. Izračunavanje

Masa ekstrahirane masti izražene u g izračunava se na sljedeći način:

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

Udio masti u uzorku, izražen kao postotak, izračunava se na sljedeći način:

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

pri čemu je:

M1 = masa tikvice M s masti nakon postupka opisanog u tački 6.2.15., u gramima

M2 = masa tikvice M nakon postupka opisanog u tački 6.2.1. ili u slučaju netopive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u tački 6.2.16.2., u gramima

B1 = masa tikvice B slijepe probe nakon postupka opisanog u tački 6.2.15., u gramima

B2 = masa tikvice B nakon postupka opisanog u tački 6.2.1. ili u slučaju netopive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u tački 6.2.16.2., u gramima

S = masa upotrijebljenog uzorka, u gramima

### 7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uslovima, ne smije biti veća od 0,05 g masti na 100 g proizvoda.



## **METODA 4. ODREĐIVANJE UDJELA MASTI U MLIJEKU U PRAHU**

### **(Metoda Röse-Gottlieb)**

#### **1. OBIM I OBLAST PRIMJENE**

Ovom metodom određuje se udio masti u:

- ekstramastnom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelimično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

#### **2. DEFINICIJA**

Udio masti u mlijeku u prahu je udio masti određen opisanom metodom.

#### **3. PRINCIP**

Udio masti određuje se ekstrakcijom masti iz amonijevog alkohalnog rastvora uzorka dietil eterom i petroleterom, isparavanjem rastvarača i vaganjem ostatka te izračunavanjem postotka mase uzorka prema Röse-Gottliebovom postupku.

#### **4. REAGENSI**

Svi reagensi moraju zadovoljavati zahtjeve definirane slijepom probom (6.1.). Ako je potrebno, reagensi mogu biti ponovo destilirani u prisustvu približno 1 g mliječne masti na 100 mL rastvarača.

4.1. Rastvor amonijaka, približno 25% (m/m)  $\text{NH}_3$  (gustoće približno 0,91 g/mL pri 20°C) ili jači rastvor poznate koncentracije.

4.2. Etanol,  $96 \pm 2\%$  (v/v) ili, ako on nije na raspolaganju, etanol denaturiran metanolom, etil metil ketonom ili petroleterom.

4.3. Dietil eter, bez peroksida.

##### *Napomena 1.*

Za određivanje prisustva peroksida u mali cilindar sa staklenim čepom, koji je potrebno isprati eterom, dodati 10 mL etera i 1 mL svježe pripremljenog 10%-tnog rastvora kalijevog jodida. Protresti i ostaviti da stoji jednu minutu. Žuta boja ne smije se pojaviti ni u jednom sloju.

##### *Napomena 2.*

Dietil eter može se očuvati bez peroksida dodatkom mokre cinkove folije koju je potrebno potpuno umočiti u razrijeđeni kiseli rastvor bakrovog sulfata jednu minutu te zatim isprati vodom. Za 1 L upotrijebiti približno 8000 mm<sup>2</sup> cinkove folije, razrezati na trake dovoljne dužine da mogu dosezati najmanje do polovine spremnika.

4.4. Petroleter, s rasponom vrenja od 30-60°C.

4.5. Miješani rastvarač koji se priprema neposredno prije upotrebe miješanjem jednake količine dietil etera (4.3.) i petroletera (4.4.) (u slučaju da je naznačena upotreba miješanog rastvarača, on se može zamijeniti dietil eterom ili petroleterom).

#### **5. OPREMA**

5.1. Analitička vaga

5.2. Odgovarajuće epruvete ili tikvice za ekstrakciju s čepovima od brušenog stakla ili drugim zatvaračima otpornim na djelovanje rastvarača koji se koriste.

5.3. Tikvice tankih zidova i ravnog dna, 150-250 mL.

5.4. Sušionik za sušenje pri atmosferskom pritisku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od  $102 \pm 1^\circ \text{C}$ .

5.5. Granule za vrenje, bez masti, koje se pri upotrebi ne drobe, neporozne, npr. staklene kuglice ili komadići silicijevog karbida (upotreba ovog materijala nije obavezna, vidjeti tačku 6.2.1.).

5.6. Vodeno kupatilo, temperature 60-70°C.

5.7. Sifon (odvodna cijev) koji odgovara epruvetama za ekstrakciju.

5.8. Centrifuga (nije obavezna).

#### **6. POSTUPAK**

6.1. Slijepa proba

Paralelno s određivanjem udjela masti u uzorku, provesti slijepu probu s 10 mL vode, koristeći istu aparaturu za ekstrakciju, iste količine svih reagensa i isti postupak opisan ovom metodom, osim postupka opisanog pod tačkom 6.2.2. Ako slijepa proba prelazi 0,5 mg, provjeriti reagens te nečisti reagens ili reagens očistiti ili zamijeniti.

#### **6.2. Određivanje**

6.2.1. Osušiti tikvicu (5.3.) (ako je potrebno zajedno s nekoliko granula za vrenje (5.5.)), kako bi se postiglo lagano vrenje tokom uklanjanja rastvarača koje slijedi) u sušioniku (5.4.) 30-60 minuta. Ostaviti tikvicu da se ohladi do sobne temperature i izvagati s tačnošću od 0,1 mg.

6.2.2. S tačnošću od 1 mg izvagati približno 1 g punomasnog mlijeka u prahu ili približno 1,5 g djelimično obranog ili obranog mlijeka u prahu, direktno u aparaturu za ekstrakciju (5.2.). Dodati 10 mL vode i pažljivo promiješati dok se mlijeko u prahu potpuno ne rasprši (za neke uzorke potrebno je zagrijavanje).

6.2.3. Dodati 1,5 mL amonijaka (25%) (4.1.) ili odgovarajući volumen jačeg rastvora i zagrijavati u vodenom kupatilu (5.6.) 15 minuta pri temperaturi 60-70°C, povremeno miješajući. Ohladiti npr. pod mlazom tekuće vode.

6.2.4. Dodati 10 mL etanola (4.2.) i promiješati tekućine pažljivo, ali temeljito u nezatvorenoj aparaturi.

6.2.5. Dodati 25 mL dietil etera (4.3.) i ohladiti pod mlazom tekuće vode. Zatvoriti aparaturu, snažno protresti i okretati više puta jednu minutu.

6.2.6. Pažljivo ukloniti čep i dodati 25 mL petroletera (4.4.) koristeći prvih nekoliko mililitara za ispiranje čepa i unutrašnjosti vrata aparature, tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Zatvoriti aparaturu čepom i protresati i okretati više puta 30 sekundi. Ne smije se previše snažno protresati ako se ne provodi centrifugiranje pod tačkom 6.2.7.

6.2.7. Ostaviti aparaturu da stoji dok gornji sloj tekućine ne postane bistar i jasno se ne odijeli od donjeg vodenog sloja. Alternativno provesti odvajanje koristeći odgovarajuću centrifugu (5.7.).

##### *Napomena:*

Pri upotrebi centrifuge koju ne pokreće trofazni motor, može doći do iskrenja i stoga je potreban oprez kako bi se izbjegla eksplozija ili požar zbog eterskih para koje mogu izlaziti iz, naprimjer, napukle epruvete.

6.2.8. Ukloniti čep, isprati čep i unutrašnjost vrata tikvice aparature s nekoliko mililitara miješanog rastvarača (4.5.) tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Pažljivo prenijeti što je moguće više supernatanta dekantiranjem ili pomoću sifona (5.7.) u pripremljenu tikvicu (6.2.1.).

##### *Napomena:*

Ako se ne upotrebljava sifon, može biti potrebno dodati malo vode kako bi se povećala površina između dva sloja i olakšalo dekantiranje.

6.2.9. Isprati vanjsku i unutrašnju stranu vrata aparature ili vrh i donji dio sifona s nekoliko mililitara miješanog rastvarača (4.5.) tako da se tekućina s vanjske strane vrata slijeva u tikvicu, a tekućina s unutrašnje strane vrata i sifona u aparaturu za ekstrakciju.

6.2.10. Provesti drugu ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u tač. od 6.2.5. do 6.2.9. uključivo, ali koristeći samo 15 mL dietil etera i 15 mL petroletera.

6.2.11. Provesti treću ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u tački 6.2.10., ali bez zadnjeg ispiranja (6.2.9.).

##### *Napomena:*

Treća ekstrakcija nije obavezna pri analizi uzoraka obranog mlijeka u prahu.

6.2.12. Pažljivo ispariti ili destilacijom ukloniti što više rastvarača (uključujući etanol). Ako je kapacitet tikvice malen, potrebno je ukloniti nešto rastvarača, kako je navedeno, nakon svake ekstrakcije.

6.2.13. Kada ne bude primjetan miris rastvarača, tikvicu s bočne strane staviti u sušionik i zagrijavati jedan sat.

6.2.14. Izvaditi tikvicu iz sušionika, ostaviti da se ohladi do sobne temperature i izvagati s tačnošću od 0,1 mg.

6.2.15. Ponoviti postupak opisan u tač. 6.2.13. i 6.2.14. uz zagrijavanje u trajanju od 30 do 60 minuta dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ako se masa poveća, pri izračunavanju (7.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je M1 (g).

6.2.16. Dodati 15-25 mL petroletera kako bi se potvrdilo da je ekstrahirana tvar potpuno topiva. Lagano zagrijavati i rotirati dok se mast ne otopi.

6.2.16.1. Ako je ekstrahirana tvar potpuno topiva u petroleteru, masa masti je razlika između masa određenih u tačkama 6.2.1. i 6.2.15.

6.2.16.2. Ako je prisutna bilo koja netopiva tvar, ili u slučaju sumnje, potpuno ekstrahirati mast iz tikvica ponovljajući ispiranje toplim petroleterom, dopuštajući da se prije svakog dekantiranja netopive tvari istalože. Isprati vanjski dio vrata tikvice tri puta. Zagrijavati tikvicu, postavljenu na bočnu stranu u sušioniku jedan sat. Ostaviti da se ohladi do sobne temperature kao prije (6.2.1.) i izvagati s tačnošću od 0,1 mg. Masa masti je razlika između mase određene u tački 6.2.15. i ove konačne mase.

## 7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

### 7.1. Izračunavanje

Masa ekstrahirane masti izražene u g izračunava se na sljedeći način:

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

Udio masti u uzorku, izražen kao postotak, izračunava se na sljedeći način:

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

pri čemu je:

M1 = masa tikvice M s masti nakon postupka opisanog u tački 6.2.15., u gramima

M2 = masa tikvice M nakon postupka opisanog u tački 6.2.1., ili u slučaju netopive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u tački 6.2.16.2., u gramima

B1 = masa tikvice B slijepe probe nakon postupka opisanog u tački 6.2.15., u gramima

B2 = masa tikvice B nakon postupka opisanog u tački 6.2.1. ili u slučaju netopive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u tački 6.2.16.2., u gramima

S = masa upotrijebljenog uzorka, u gramima

### 7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uslovima, ne smije biti veća od 0,2 g masti na 100 g proizvoda isključujući obrano mlijeko u prahu kod kojeg razlika ne smije biti veća od 0,1 g masti na 100 g proizvoda.

## METODA 5. ODREĐIVANJE UDJELA SAHAROZE (POLARIMETRIJSKA METODA)

### 1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

Ovom metodom određuje se udio saharoze u:

- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelimičnom obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku.

Uzorci ne smiju sadržavati invertni šećer.

### 2. DEFINICIJA

Udio saharoze u ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku je udio saharoze određen opisanom metodom.

### 3. PRINCIP

Ova metoda zasniva se na principu Clergetove inverzije, laganog tretiranja uzorka kiselinom koja izaziva potpunu hidrolizu saharoze te gotovo nikakvu hidrolizu laktoze ili drugih šećera.

Udio saharoze dobiva se iz promjene optičke aktivnosti rastvora.

Bistri filtrat uzorka, bez mutarotacije laktoze, priprema se na način da se rastvor tretira amonijakom, nakon čega slijedi neutralizacija i bistrenje dodavanjem rastvora cinkovog acetata i kalijevog heksacijanoferata(II). U dijelu filtrata saharoza se hidrolizira na poseban način.

Iz rotacije filtrata prije i poslije inverzije, udio saharoze izračunava se pomoću odgovarajuće formule.

### 4. REAGENSI

4.1. Rastvor cinkovog acetata, 1 mol/L.

Rastvoriti 21,9 g kristaliziranog cinkovog acetata dihidrata  $Zn(C_2H_3O_2)_2 \times 2H_2O$  i 3 mL ledene sirćetne kiseline u vodi i nadopuniti vodom do 100 mL.

4.2. Rastvor kalijevog heksacijanoferata(II), 0,25 mol/L

Rastvoriti 10,6 g kristaliziranog kalijevog heksacijanoferata(II) trihidrata  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$  u vodi i nadopuniti vodom do 100 mL.

4.3. Rastvor hloridne kiseline,  $6,35 \pm 0,20$  mol/L (20-22%) ili  $5,0 \pm 0,2$  M (16-18%).

4.4. Rastvor amonijaka,  $2,0 \pm 0,2$  mol/L (3,5%).

4.5. Rastvor sirćetne kiseline,  $2,0 \pm 0,2$  mol/L (12%).

4.6. Indikator bromtimol plavilo, 1%-tni (m/v) rastvor u etanolu.

### 5. OPREMA

5.1. Vaga tačnosti 10 mg.

5.2. Polarimetrijska cijev, 2 dm, tačno kalibrirane dužine.

5.3. Polarimetar ili saharimetar:

- a) Polarimetar s natrijevom svjetlosti ili živinom zelenom svjetlosti (svjetiljka sa živinim parama s prizmom ili specijalni Wrattenov zaslon br. 77 A), s tačnošću od najmanje 0,05 ugaonih stepeni,
- b) Saharimetar s međunarodnom šećernom ljestvicom, s bijelom svjetlosti koja prolazi kroz 15 mm filter 6%-tnog rastvora kalijevog bikromata, ili natrijeve svjetlosti, s tačnošću od najmanje  $0,1^\circ$  na međunarodnoj šećernoj ljestvici.

5.4. Vodeno kupatilo, regulirano na  $60 \pm 1^\circ C$ .

### 6. POSTUPAK

#### 6.1. Kontrolno određivanje

S ciljem standardizacije postupka, reagensa i opreme, provesti kontrolno određivanje u dva paralelna određivanja, kako je opisano u nastavku, koristeći mješavinu 100 g mlijeka i 18 g čiste saharoze ili mješavinu 110 g obranog mlijeka i 18 g čiste saharoze od kojih svaka odgovara 40 g ugušćenog (kondenziranog) mlijeka sa 45% saharoze. Izračunati udio saharoze pomoću formula navedenih u tački 7. koristeći u formuli 1. količinu odvagane mlijeka te udio masti i bjelančevina u tom mlijeku umjesto M, F i P, a u formuli 2.

umjesto M vrijednost 40,00. Srednja vrijednost dobivenih vrijednosti ne smije se razlikovati za više od 0,2% od 45,0%.

#### 6.2. Određivanje

6.2.1. Izvagati približno 40 g dobro izmiješanog uzorka u staklenu čašu od 100 mL s tačnošću od 10 mg. Dodati 50 mL vruće vode (80-90°C) i dobro promiješati.

6.2.2. Kvantitativno prenijeti mješavinu u odmjernu tikvicu od 200 mL ispirući čašu dodatnim količinama vode temperature 60°C do ukupnog volumena između 120 mL i 150 mL. Promiješati i ostaviti da se ohladi do sobne temperature.

6.2.3. Dodati 5 mL razrijeđenog rastvora amonijaka (4.4.). Ponovo promiješati i ostaviti da stoji 15 minuta.

6.2.4. Neutralizirati amonijak dodavanjem ekvivalentne količine razrijeđenog rastvora sirćetne kiseline (4.5.). Prethodno odrediti tačan broj mililitara titracijom rastvora amonijaka koristeći bromtimol plavilo kao indikator (4.6.). Promiješati.

6.2.5. Dodati 12,5 mL rastvora cinkovog acetata (4.1.) lagano miješajući rotiranjem nagnute tikvice.

6.2.6. Dodati 12,5 mL rastvora kalijevog heksacijanoferata(II) (4.2.) na isti način kao i rastvor acetata.

6.2.7. Sadržaj tikvice temperature 20°C dopuniti vodom iste temperature (20°C) do 200 mL.

#### Napomena:

Tokom bilo koje do sada opisane faze, potrebno je dodavati vodu ili reagense na način da se izbjegne stvaranje mjehurića, a iz istog je razloga potrebno miješanje obavljati rotiranjem tikvice, a ne potresanjem. Ako se prisustvo mjehurića primijeti prije nadopunjavanja do 200 mL, može ih se ukloniti privremenim spajanjem tikvice na vakuum-pumpu i rotiranjem tikvice.

6.2.8. Začepiti tikvicu suhim čepom i temeljito promiješati snažnim potresanjem.

6.2.9. Ostaviti da stoji nekoliko minuta i zatim profiltrirati preko suhog filter-papira. Prvih 25 mL filtrata baciti.

6.2.10. Direktna polarizacija: odrediti optičku rotaciju filtrata pri  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

6.2.11. Inverzija: otpipetirati 40 mL gore dobivenog filtrata u odmjernu tikvicu od 50 mL. Dodati 6,0 mL 6,35 mol/L hloridne kiseline ili 7,5 mL 5,0 mol/L hloridne kiseline (4.3.).

Tikvicu staviti u vodeno kupatilo na 60°C, 15 minuta pazeći pritom da cijeli trbušasti dio tikvice bude uronjen. Miješati kružnim pokretima prvih pet minuta pri čemu bi sadržaj tikvice trebao dostići temperaturu vodenog kupatila. Ohladiti do 20°C i dopuniti do oznake vodom temperature 20°C. Promiješati i ostaviti da stoji jedan sat na toj temperaturi.

#### 6.2.12. Invertna polarizacija

Odrediti rotaciju invertnog rastvora pri  $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . (Međutim, ako se temperatura T tekućine u polarizacijskoj cijevi razlikuje za više od 0,2°C tokom mjerenja, potrebno je provesti korekciju temperature prema tački 7.2.).

### 7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

#### 7.1. Metoda izračunavanja

Udio saharoze izračunava se na sljedeći način:

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

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

pri čemu je:

S = udio saharoze

M = masa izvaganog uzorka, u gramima

F = postotak masti u uzorku

P = postotak bjelančevina u uzorku

V = volumen na koji se uzorak razrjeđuje prije filtracije, u mL

v = korekcija za volumen taloga koji se stvara tokom bistrenja, u mL

D = direktno očitavanje polarimetra (polarizacija prije inverzije)

I = očitavanje polarimetra nakon inverzije

L = dužina polarimetrijske cijevi, u dm

Q = faktor inverzije čije su vrijednosti navedene u tački

#### 7.2.

##### Napomene:

(a) Kada se odvaga tačno 40,00 g ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i kada se upotrebljava polarimetar s natrijevom svjetlosti, ugaonim stepenima i polarimetrijskom cijevi dužine 2 dm na  $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , udio saharoze normalnog ugušćenog (kondenziranog) mlijeka ( $C = 9$ ) može se izračunati na sljedeći način:

$$S = (D - 1,25I)X(2,833 - 0,00612F - 0,00878P)$$

(b) Ako se invertna polarizacija mjeri pri temperaturi različitoj od 20°C, vrijednosti je potrebno pomnožiti sa:

$$(1 + 0,0037(T - 20))$$

#### 7.2. Vrijednosti faktora inverzije Q

Sljedećim formulama izračunavaju se tačne vrijednosti faktora inverzije Q, za različite izvore svjetlosti s korekcijama koncentracije i temperature:

Natrijeva svjetlost i polarimetar s ugaonim stepenima:

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

Živina zelena svjetlost i polarimetar s ugaonim stepenima:

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

Bijela svjetlost s dikromatskim filterom i saharimetar sa stepenima međunarodne šećerne skale:

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

U gornjim formulama:

C = postotak ukupnih šećera u invertnom rastvoru nakon polarizacije

T = temperatura invertnog rastvora pri polarimetrijskom očitavanju

##### Napomena 1.

Postotak ukupnih šećera C u invertnom rastvoru može se izračunati iz direktnog očitavanja i promjene nakon inverzije na uobičajeni način, koristeći uobičajene vrijednosti za specifične rotacije saharoze, laktoze i invertnog šećera.

Korekcija 0,0006 (C-9) itd. je tačna samo kada je C približno 9; za normalno ugušćeno (kondenzirano) mlijeko ova korekcija može se zanemariti, budući da je C blizu 9.

##### Napomena 2.

Odstupanje temperature od 20°C za 1°C predstavlja malu razliku kod direktnog očitavanja, ali odstupanje veće od 0,2°C kod invertnog očitavanja zahtijeva korekciju. Korekcija - 0,0033 (T-20) itd. je tačna samo između 18°C i 22°C.

#### 7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na

istom uzorku te pod istim uslovima, ne smije biti veća od 0,3 g saharoze na 100 g ugušćenog (kondenziranog) mlijeka.

## METODA 6. ODREĐIVANJE MLIJEČNE KISELINE I LAKTATA

### 1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

Ovom metodom određuje se udio mliječne kiseline i laktata, izraženih kao mliječna kiselina, u:

- ekstramasmom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelimično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

### 2. DEFINICIJA

Udio mliječne kiseline i laktata u mlijeku u prahu je udio mliječne kiseline i laktata, izraženih kao mliječna kiselina, određen opisanim metodom.

### 3. PRINCIP

Masti, bjelančevine i laktoza istovremeno se uklanjaju iz rastvora uzorka dodavanjem bakrovog sulfata ili kalcijevog hidroksida nakon čega slijedi filtracija.

Mliječna kiselina i laktati u filtratu prevode se u acetaldehid koncentriranom sumpornom kiselinom uz prisustvo bakrovog(II) sulfata.

Udio mliječne kiseline određuje se kolorimetrijski uz upotrebu p-hidroksidifenila.

Udio mliječne kiseline i laktata izražava se u mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari.

### 4. REAGENSI

#### 4.1. Rastvor bakrovog(II) sulfata

Rastvoriti 250 g bakrovog(II) sulfata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) u vodi i razrijediti vodom do 1000 mL.

#### 4.2. Suspenzija kalcijevog hidroksida.

4.2.1. Smrviti 300 g kalcijevog hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) u taroniku s vodom, koristeći ukupno 900 mL. Suspenzija mora biti svježije pripremljena prije upotrebe.

#### 4.2.2. Suspenzija kalcijevog hidroksida

Smrviti 300 g kalcijevog hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) u taroniku s vodom, koristeći ukupno 1400 mL. Suspenzija mora biti svježije pripremljena prije upotrebe.

#### 4.3. Sumporna kiselina – rastvor bakrovog(II) sulfata

K 300 mL sumporne kiseline, 95,9-97,0% (m/m)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , dodati 0,5 mL rastvora bakrovog(II) sulfata (4.1.).

#### 4.4. Rastvor p-hidroksidifenila ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ )

Potresanjem i laganim zagrijavanjem rastvoriti 0,75 g p-hidroksidifenila u 5 mL vodenog rastvora natrijevog hidroksida, koji sadrži 5 g NaOH na 100 mL. U odmjernoj tikvici razrijediti vodom do 50 mL. Rastvor čuvati u boci od smeđeg stakla na tamnom i hladnom mjestu. Ne upotrebljavati rastvor ako dođe do promjene boje ili zamućenja. Maksimalna trajnost rastvora je 72 sata.

#### 4.5. Standardni rastvor mliječne kiseline

Neposredno prije upotrebe rastvoriti 0,1067 g litijevog laktata ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$ ) u vodi i razrijediti u odmjernoj tikvici do 1000 mL. 1 mL ovog rastvora odgovara 0,1 mg mliječne kiseline.

#### 4.6. Standardno rekonstituirano mlijeko

Unaprijed analizirati nekoliko uzoraka mlijeka u prahu visokog kvaliteta. Za izradu baždarne krivulje izabrati uzorak s najmanjom količinom mliječne kiseline, koji sadrži najviše 30 mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari. Provesti postupak opisan u tač. 6.2.1. i 6.2.2.

### 5. OPREMA

#### 5.1. Analitička vaga

5.2. Spektrofotometar s mogućnošću očitavanja na talasnoj dužini 570 nm.

#### 5.3. Vodeno kupatilo temperature $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 5.4. Taronik i tučak.

5.5. Filter-papir (Schleicher i Schull 595, Whatman 1 ili papir jednakog kvaliteta).

5.6. Epruvete od pireksa ili jednakog kvaliteta (dimenzije 25 x 150 mm).

#### Napomena:

Sve stakleno posuđe i pribor moraju biti potpuno čisti i namijenjeni za upotrebu samo u ovom određivanju. Prije pranja stakleno posuđe i pribor koji sadrže ostatke taloga isprati koncentriranom hloridnom kiselinom.

### 6. POSTUPAK

#### 6.1. Slijepa proba

Provesti slijepu probu tako da se 30 mL vode stavi u graduiranu epruvetu od 50 mL i provesti postupak opisan u tač. 6.2.4. do 6.2.11. uključivo. Ako slijepa proba s vodom prelazi ekvivalentnu količinu od 20 mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari, potrebno je provjeriti reagense i nečiste reagense ili reagens zamijeniti. Slijepu probu provesti paralelno s analizom uzorka.

#### 6.2. Određivanje

#### Napomena:

Izbjegavati kontaminaciju nečistoćama, posebno slinom i znojem.

6.2.1. Odrediti količinu bezmasne suhe tvari a (u gramima) uzorka oduzimanjem količine masti (određene prema Metodi 4) i količine vode (određene prema Metodi 2) od 100.

6.2.2. Odvagati  $\frac{1000}{(a-10)}$  g uzorka s tačnošću od 0,1 g.

Ovu količinu uzorka dodati u 100 mL vode i temeljito promiješati.

6.2.3. 5 mL dobivenog rastvora otpipetirati u graduiranu epruvetu od 50 mL i razrijediti vodom do približno 30 mL.

6.2.4. Potresajući epruvetu polagano dodati 5 mL rastvora bakrovog(II) sulfata (4.1.) i ostaviti da stoji 10 minuta.

6.2.5. Potresajući epruvetu, polagano dodati 5 mL suspenzije kalcijevog hidroksida (4.2.1.) ili 10 mL suspenzije kalcijevog hidroksida (4.2.2.).

6.2.6. Razrijediti vodom do 50 mL, snažno protresti. Ostaviti da stoji 10 minuta, a zatim profilirati. Baciti prvi dio filtrata.

6.2.7. Otpipetirati 1 mL filtrata u epruvetu (5.6.).

6.2.8. U epruvetu dodati 6,0 mL rastvora sumporne kiseline-bakrovog(II) sulfata pomoću birete ili graduirane pipete. Promiješati.

6.2.9. Zagrijavati u kipućem vodenom kupatilu pet minuta. Ohladiti na sobnu temperaturu pod mlazom tekuće vode.

6.2.10. Dodati dvije kapi reagensa p-hidroksifenila (4.4.) i snažno protresti kako bi se reagens ravnomjerno raširio u tekućini. Staviti epruvetu u vodeno kupatilo na  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  i ostaviti 15 minuta uz povremeno potresanje.

6.2.11. Staviti epruvetu u kipuće vodeno kupatilo 90 sekundi. Ohladiti na sobnu temperaturu pod mlazom tekuće vode.

6.2.12. Izmjeriti apsorbanciju u odnosu na slijepu probu (6.1.) unutar tri sata na talasnoj dužini navedenoj u tački 5.2.

6.2.13. Ako je apsorbancija veća od najviše tačke standardne krivulje, ponoviti test koristeći odgovarajući razrijeđeni filtrat dobiven u tački 6.2.6.

### 6.3. Priprema standarda

6.3.1. Otpipetirati 5 mL rekonstituiranog mlijeka (4.6.) u pet graduiranih epruveta od 50 mL. U epruvete otpipetirati 0, 1, 2, 3 i 4 mL standardnog rastvora (4.5.) kako bi se dobio raspon standarda koji odgovaraju 0, 20, 40, 60 i 80 mg dodate mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari mlijeka u prahu.

6.3.2. Razrijediti vodom do približno 30 mL i provesti postupak opisan u tač. od 6.2.4. do 6.2.11.

6.3.3. Izmjeriti apsorbanciju standarda (6.3.1.) u odnosu na slijepu probu (6.1.) na talasnoj dužini navedenoj u tački 5.2. Unijeti u graf apsorbancije za količine mliječne kiseline iz tačke 6.3.1., odnosno 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg i 80 mg na 100 g bezmasne suhe tvari. Povuci pravac koji najbolje prolazi tačkama i izraditi standardnu krivulju pomicanjem pravca paralelno na način da prolazi kroz ishodište.

## 7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

### 7.1. Metoda izračunavanja

Preračunati apsorbanciju izmjerenu u tač. 6.2.12. ili 6.2.13. u mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari u uzorku služeći se standardnom krivuljom. Dobiveni rezultat pomnožiti s faktorom razrjeđivanja u slučaju razrjeđivanja filtrata prema tački 6.2.13.

### 7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uslovima, ne smije biti veća od 8 mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari za količine do 80 mg. Za veće vrijednosti, ova razlika ne smije biti veća od 10% najmanje vrijednosti.

## METODA 7. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE

### (Modificirani Sanders-Sagerov postupak)

#### 1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

Ovom metodom opisuje se određivanje aktivnosti fosfataze u:

- ekstramasmom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelimično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

#### 2. DEFINICIJA

Aktivnost fosfataze mlijeka u prahu je mjerilo količine prisutne aktivne alkalne fosfataze. Izražava se kao količina fenola u  $\mu\text{g}$  koji se oslobađa iz 1 mL rekonstituiranog mlijeka, određena opisanim metodom.

#### 3. PRINCIP

Aktivnost fosfataze mlijeka u prahu određuje se sposobnošću fosfataze da oslobodi fenol iz dinatrijevog fenil fosfata. Količina otpuštenog fenola, pod propisanim uslovima, određuje se spektrofotometrijskim mjerenjem boje razvijene Gibbovim reagensom.

#### 4. REAGENSI

##### 4.1. Rastvor A

Pufer barijev borat hidroksid: pH 10,6  $\pm$  0,1 pri 20°C.

Rastvoriti 25,0 g barijevog hidroksida ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ ) u vodi i razrijediti do 500 mL.

Rastvoriti 11,0 g borne kiseline ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) u vodi i razrijediti do 500 mL.

Zagrijati oba rastvora do 50°C i promiješati. Protresti i ohladiti mješavinu na sobnu temperaturu. Podesiti pH na 10,6  $\pm$  0,1 pomoću rastvora barijevog hidroksida i filtrirati. Rastvor pohraniti u dobro zatvorenoj posudi. Prije upotrebe razrijediti pufer s jednakom količinom vode.

##### 4.2. Rastvor B

Pufer za razvijanje boje

Rastvoriti 6,0 g natrijevog metaborata ( $\text{NaBO}_2$ ) (ili 12,6 g  $\text{NaBO}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) i 20,0 g natrijevog hlorida ( $\text{NaCl}$ ) u vodi i razrijediti vodom do 1000 mL.

##### 4.3. Rastvor C

Rastvor puferskog supstrata.

4.3.1. Rastvoriti 0,5 g dinatrijevog fenil fosfata ( $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) u 4,5 mL rastvora B (4.2.). Dodati 2 kapi rastvora E (4.5.) i ostaviti da stoji 30 minuta. Ekstrahirati boju sa 2,5 mL butanola (4.10). Ako je potrebno, ponoviti

ekstrakciju boje. Nakon odvajanja butanol baciti. Ova rastvor može se čuvati nekoliko dana u hladnjaku. Prije upotrebe još jednom razviti i ekstrahirati boju.

4.3.2. Otpipetirati 1 mL ovog rastvora u odmjernu tikvicu od 100 mL i dopuniti do oznake rastvorom A. Puferski rastvor pripremiti neposredno prije upotrebe.

##### 4.4. Rastvor D

Sredstvo za taloženje

Rastvoriti 3,0 g cinkovog sulfata ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) i 0,6 g bakrovog(II) sulfata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) u vodi i dopuniti vodom do 100 mL.

##### 4.5. Rastvor E

Gibbov reagens

Rastvoriti 0,040 g 2,6-dibromokinona -1,4-hloroimida ( $\text{OC}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{NCl}$ ) u 10 mL 96%-tnog etanola. Rastvor čuvati u boci od tamnog stakla u hladnjaku. Ovaj reagens baciti kada izgubi boju.

##### 4.6. Pufer za razrjeđivanje boje

Razrijediti 10 mL rastvora B (4.2.), pufera za razvijanje boje, vodom do 100 mL.

##### 4.7. Rastvor bakrovog sulfata

Rastvoriti 0,05 g bakrovog(II) sulfata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) u vodi i dopuniti vodom do 100 mL.

##### 4.8. Standardni rastvor fenola

Rastvoriti 0,200  $\pm$  0,001 g čistog fenola u vodi i dopuniti vodom do 100 mL u odmjernoj tikvici. Ovaj rastvor može se čuvati nekoliko mjeseci u hladnjaku.

Razrijediti 10 mL ovog rastvora vodom do 100 mL. Ovaj razrijeđeni rastvor sadrži 200  $\mu\text{g}$  fenola u 1 mL i može se upotrijebiti za pripremu jače razrijeđenih rastvora.

##### 4.9. Kipuća destilirana voda

##### 4.10. n-butanol.

## 5. OPREMA

### 5.1. Analitička vaga

5.2. Vodeno kupatilo, s termostatski reguliranom temperaturom od 37  $\pm$  1°C.

5.3. Spektrofotometar s mogućnošću očitavanja na talasnoj dužini 610 nm.

5.4. Filter-papir (Schleicher i Schull 597, Whatman 42 ili filter-papir jednakog kvaliteta).

### 5.5. Kipuće vodeno kupatilo.

### 5.6. Aluminijska folija.

## 6. POSTUPAK

Mjere opreza:

1. Izbjegavati direktno izlaganje sunčevoj svjetlosti.

2. Sve staklene posude i pribor, čepovi i materijal za odstranjivanje moraju biti potpuno čisti. Preporučuje se ispiranje i prokuhavanje u vodi ili obrada parom.

3. Izbjegavati upotrebu plastičnih materijala (primjerice čepova) jer mogu sadržavati fenole.

4. Slina sadrži fosfatazu stoga se kontaminacija slinom u tragovima mora pažljivo izbjegavati.

### 6.1. Priprema uzorka

6.1.1. S tačnošću od 0,1 g odvagati 10 g uzorka i rastvoriti u 90 mL vode. Temperatura za rastvaranje praha ni u kojem slučaju ne smije biti viša od 35°C.

### 6.2. Određivanje

6.2.1. U svaku od dvije epruvete staviti 1 mL rekonstituiranog mlijeka pripremljenog kako je opisano u tački 6.1.1.

6.2.2. Zagrijavati jednu od epruveta u kipućoj vodi dvije minute. Prekriti epruvetu i vodeno kupatilo (5.5.) ili, naprimjer, čašu aluminijskom folijom (5.6.) kako bi se osiguralo zagrijavanje cijele epruvete. Hladnom vodom ohladiti na sobnu temperaturu. Ovu epruvatu upotrijebiti za slijepu probu. U svim postupcima koji slijede s obje epruvete postupati jednako.

6.2.3. Dodati 10 mL rastvora C (4.3.2.). Promiješati i staviti epruvetu u vodeno kupatilo na 37°C (5.2.).

6.2.4. Inkubirati 60 minuta u vodenom kupatilu uz povremeno potresanje.

6.2.5. Epruvete odmah prebaciti u kipuće vodeno kupatilo (5.5.) i zagrijavati dvije minute, a zatim ohladiti na sobnu temperaturu hladnom vodom.

6.2.6. Dodati 1 mL rastvora D (4.4.), promiješati i filtrirati preko suhog filter-papira. Bacati prve filtrate sve dok se ne dobije bistra tekućina.

6.2.7. 5 mL svakog filtrata staviti u epruvete, dodati 5 mL rastvora B (4.2.) i 0,1 mL rastvora E (4.5.). Promiješati.

6.2.8. Ostaviti da se boja razvija 30 minuta ne izlažući tekućinu direktnoj sunčevoj svjetlosti.

6.2.9. Izmjeriti apsorbanciju rastvora uzorka u odnosu na slijepu probu, na talasnoj dužini navedenoj u tački 5.3.

6.2.10. Ponoviti određivanje ako je apsorbancija viša od apsorbancije standardnog uzorka sa 20 µg fenola pripremljenog kako je opisano u tački 7.

Ako se ta granica pređe, razrijediti odgovarajući volumen rekonstituiranog mlijeka prema tački 6.1.1. s odgovarajućim volumenom mlijeka koje je pažljivo prokuhano kako je opisano u tački 6.2.2. kako bi se inaktivirala prisutna fosfataza.

#### 7. IZRADA STANDARDNE KRIVULJE

7.1. U četiri odmjerne tikvice od 100 mL otpipetirati 1, 3, 5 i 10 mL standardnog rastvora razrijeđenog kako je opisano u tački 4.8. i dopuniti vodom do oznake. Ovi rastvori sadrže 2, 6, 10 i 20 µg fenola po mL.

7.2. U epruvete otpipetirati 1 mL vode ili 1 mL svakog standardnog rastvora (7.1.) kako bi se dobila serija uzoraka koji sadrže 0 (vrijednost slijepe probe koja se dobiva upotrebom 1 mL vode)- 2-6-10 i 20 µg fenola.

7.3. U svaku epruvetu redom otpipetirati 1 mL rastvora bakrovog(II) sulfata (4.7.), 5 mL puferskog rastvora za razrjeđivanje boje (4.6.), 3 mL vode i 0,1 mL rastvora E. Promiješati.

7.4. Ostaviti epruvete 30 minuta na sobnoj temperaturi ne izlažući ih direktnoj sunčevoj svjetlosti.

7.5. Izmjeriti apsorbanciju rastvora u svakoj epruveti, u poređenju s vrijednošću slijepe probe, na talasnoj dužini navedenoj u tački 5.3.

7.6. Izraditi standardnu krivulju unošenjem vrijednosti apsorbancije zavisno od količine fenola u µg kako je navedeno u tački 7.2.

#### 8. IZRAŽAVANJE REZULTATA

##### 8.1. Izračunavanje

8.1.1. Preračunati vrijednosti određene u tački 6.2.9. u µg fenola služeći se standardnom krivuljom.

8.1.2. Izračunati aktivnost fosfataze izraženu u µg fenola po mL rekonstituiranog mlijeka prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost fosfataze} = 2,4 \times P$$

pri čemu je:

P = količina fenola, prema tački 8.1.1., u µg

8.1.3. Ako je bilo potrebno razrjeđivanje, navedeno u tački 6.2.10., pomnožiti rezultat dobiven u tački 8.1.2. s faktorom razrjeđivanja.

##### 8.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uslovima, ne smije biti veća od 2 µg fenola oslobođenog iz 1 mL rekonstituiranog mlijeka.

#### METODA 8. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE (Aschaffenburg-Müllen-ov postupak)

##### 1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

Ovom metodom opisuje se određivanje aktivnosti fosfataze u:

- ekstrasnom mlijeku u prahu,

- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelimično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

##### 2. DEFINICIJA

Aktivnost fosfataze mlijeka u prahu je mjerilo količine alkalne fosfataze prisutne u proizvodu. Izražava se kao količina p-nitrofenola u µg koji se oslobađa iz 1 mL rekonstituiranog uzorka, pod opisanim uslovima.

##### 3. PRINCIP

Rekonstituirani uzorak razrjeđuje se puferskim supstratom pri pH 10,2 i inkubira pri temperaturi od 37°C dva sata. Alkalna fosfataza prisutna u uzorku u tim okolnostima oslobađa p-nitrofenol iz dodanog dinatrijevog p-nitrofenol fosfata. Oslobođeni p-nitrofenol određuje se direktnim uspoređivanjem sa standardnim obojenim staklima u jednostavnom komparatoru uz upotrebu reflektirane svjetlosti.

##### 4. REAGENSI

###### 4.1. Puferski rastvor natrijevog karbonata-bikarbonata

Rastvoriti 3,5 g bezvodnog natrijevog karbonata i 1,5 g natrijevog bikarbonata u vodi i razrijediti vodom do 1000 mL u odmjerne tikvici.

###### 4.2. Puferski supstrat

Rastvoriti 1,5 g dinatrijevog p-nitrofenilfosfata u puferu natrijevom karbonatu-bikarbonatu (4.1.) i razrijediti puferom (4.1.) do 1000 mL u odmjerne tikvici.

Ova rastvor stabilan je ako se čuva u hladnjaku ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) mjesec dana, ali na tako pohranjenim rastvorima mora se provesti kontrolno ispitivanje boje (vidjeti tačku 6., Mjere opreza br. 3).

###### 4.3. Rastvori za bistenje.

###### 4.3.1. Rastvor cinkovog sulfata

Rastvoriti 30,0 g cinkovog sulfata ( $\text{ZnSO}_4$ ) u vodi i razrijediti vodom do 100 mL u odmjerne tikvici.

###### 4.3.2. Rastvor kalijevog heksacijanoferrata(II)

Rastvoriti 17,2 g kalijevog heksacijanoferrata(II) trihidrata ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) i razrijediti vodom do 100 mL u odmjerne tikvici.

##### 5. OPREMA

###### 5.1. Analitička vaga

5.2. Vodeno kupatilo, s termostatski reguliranom temperaturom od  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

5.3. Komparator, sa specijalnim diskom koji sadrži standardna obojena stakla kalibrirana u µg p-nitrofenola po mL mlijeka i kivete dimenzija 2 x 25 mm.

##### 6. POSTUPAK

###### Mjere opreza:

1. Nakon upotrebe, epruvete isprazniti, isprati vodom, oprati u vrućoj vodi koja sadrži alkalni deterdžent te zatim temeljito isprati čistom vrućom tekućom vodom. Na kraju, prije upotrebe epruvete isprati vodom i osušiti.

2. Pipete temeljito isprati čistom hladnom tekućom vodom odmah nakon upotrebe, zatim isprati vodom i osušiti prije upotrebe.

3. Čepove epruveta temeljito isprati vrućom tekućom vodom odmah nakon upotrebe te zatim staviti u kipuću vodu dvije minute.

4. Rastvor puferskog supstrata (4.2.) trebalo bi da ostane stabilan najmanje mjesec dana ako se čuva u hladnjaku na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$  ili nižoj. Bilo kakva nestabilnost označena je pojavom žute boje. Dok se rezultati ispitivanja uvijek očitavaju u odnosu na prokuhani kontrolni uzorak koji sadrži isti rastvor puferskog supstrata, upotreba rastvora ne preporučuje se ako je vrijednost boje veća od 10 µg kada se očita u kiveti komparatora dužine 25 mm u odnosu na destiliranu vodu u drugoj kiveti dužine 25 mm.

5. Употребљавати посебну pipetu за сваки узорак и избјегавати контаминацију pipete slinom.

6. Tokom ispitivanja uvijek treba избјегавати излагање сунчевој свјетлости.

6.1. Priprema uzorka

Rastvoriti 10 g praha u 90 mL vode. Temperatura za rastvaranje praha ne smije biti виша од 35°C.

6.2. Određivanje

6.2.1. Otpipetirati 15 mL puferskog supstrata (4.2.) u čistu, suhu epruvetu, te dodati 2 mL rekonstituiranog uzorka (6.1.) koji se ispituje. Začepiti epruvetu, promiješati okretanjem i staviti u vodeno kupatilo на 37°C.

6.2.2. Istovremeno, u vodeno kupatilo staviti kontrolnu epruvetu koja sadrži 15 mL puferskog supstrata i 2 mL prokuhanog rekonstituiranog uzorka sličnog onome koji se ispituje.

6.2.3. Nakon dva sata изvaditi obje epruvete из воденог купатила, dodati 0,5 mL cinkovog sulfata за таложење (4.3.1.), ponovo začepiti, снажно протрести и оставити да стоји три minute. Dodati 0,5 mL калијевог хексацијаноферата(II) за таложење (4.3.2.), temeljito promiješati и филтрирати кроз набрани филтар папир и skupiti bistri filtrat u čistu epruvetu.

6.2.4. Prebaciti filtrat u 25 mm kivetu и упоредити s filtratom prokuhanog kontrolnog uzorka u komparatoru користећи посебан disk (5.3.).

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

7.1. Izračunavanje

Direktno očitање добивено u таčki 6.2.4. билежи се као  $\mu\text{g}$  p-nitrofenola по mL узорка или по mL реконституираног узорка.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno или непосредно једно за другим, на истом узorku те под истим условима, не смје бити већа од 2  $\mu\text{g}$  p-nitrofenola ослобођеног из 1 mL реконституираног млијека.

---