



**ПРАВИЛНИК****О МЕТОДАМА УЗОРКОВАЊА И АНАЛИЗА  
ЗГУСНУТОГ (КОНДЕНЗОВАНОГ) МЛИЈЕКА И  
МЛИЈЕКА У ПРАХУ НАМИЈЕЋЕНОГ ЗА ИСХРАНУ  
ЉУДИ****ДИО ПРВИ - ОПШТЕ ОДРЕДБЕ**

## Члан 1.

(Предмет)

Правилником о методама узорковања и анализа згуснутог (кондензованог) млијека и млијека у праху намијењених за исхрану људи (у даљем тексту: Правилник) прописују се методе узорковања и анализа згуснутог (кондензованог) млијека и млијека у праху.

## Члан 2.

(Узорковање)

Методе узорковања згуснутог (кондензованог) млијека и млијека у праху прописане су у Анексу I, који је саставни дио овог правилника.

## Члан 3.

(Анализе)

Анализе за провјеру критеријума наведених у Анексу II, који је саставни дио овог правилника, спроводиће се у складу са поступцима описаним у Анексу III, који је саставни дио овог правилника.

## Члан 4.

(Алтернативне методе анализе)

Када су за физикално-хемијске анализе одређене алтернативне методе, узорак се може анализирати по једној од могућих метода, а извјештај о испитивању мора садржавати назив коришћене методе из Анекса III, који је саставни дио овог правилника.

**ДИО ДРУГИ - ПРЕЛАЗНЕ И ЗАВРШНЕ ОДРЕДБЕ**

## Члан 5.

(Службене контроле)

Службене контроле и инспекцијски надзор спроводе се на начин како је то прописано важећим прописима.

## Члан 6.

(Престанак важења одредаба)

Даном ступања на снагу овог правилника престају да важе одредбе које се односе на методе узорковања и физикално-хемијске анализе згуснутог (кондензованог) млијека и млијека у праху Правилника о методама узимања узорака те методама хемијских и физикалних анализа млијека и млијечних производа ("Службени лист СФРЈ", број 32/83 и "Службени гласник РБиХ", број 2/92) и одредбе које се односе на згуснуто (кондензовано) млијеко и млијеко у праху Упуства о начину узимања узорака за вршење анализа и суперанализа намирница и предмета опште употребе ("Службени лист СФРЈ", број 60/78 и "Службени гласник РБиХ", број 2/92).

## Члан 7.

(Примјена Правилника)

Млијеко узорковано и анализирано у складу с одредбама прописа наведених у члану 6. овог правилника може се стављати на тржиште 12 мјесеци од дана ступања на снагу овог правилника.

## Члан 8.

(Ступање на снагу)

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у "Службеном гласнику БиХ".

СМ број 224/13

3. септембра 2013. године  
Сарајево

Председавајући

Савјета министара БиХ  
**Вјекослав Беванда**, с. р.**АНЕКС I****МЕТОДЕ УЗОРКОВАЊА ЗГУСНУТОГ  
(КОНДЕНЗОВАНОГ) МЛИЈЕКА И МЛИЈЕКА У  
ПРАХУ ЗА ХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ**

## I Опште одредбе

## 1. Управна упутства

## 1.1. Особље

Узорковање спроводи овлашћено квалификовано лице, у складу са посебним прописима.

## 1.2. Печаћење и означавање узорака

Сваки узорак, узет за службену употребу, мора се запечатити на мјесту узимања и означити у складу са посебним прописима.

## 1.3. Број узорака

За анализу је потребно истовремено припремити најмање два једнака репрезентативна узорка. Поступак и број узетих узорака прописан је посебним прописима.

Узорци се након узорковања морају што је могуће прије отпремити у лабораторију.

## 1.4. Записник

Уз узорке се прилаже записник у складу са посебним прописима.

## 2. Опрема за узорковање

Сва опрема за узорковање мора бити израђена од прикладног материјала одговарајуће чврстине, који не узрокује промјене узорка које би могле утицати на резултате испитивања, и не смије узроковати промјене узорака током узорковања. Препоручује се употреба нерђајућег челика.

Све површине морају бити глатке и без пукотина, а сви рубови заобљени. Опрема за узорковање мора удовољавати захтјевима прописанима за сваки производ који се узоркује.

## 3. Спремници за узорковање

Спремници и поклопци за узорке морају бити израђени од материјала и такве конструкције да примјерено штите узорак и у њему не узрокују промјене које би могле утицати на резултате анализа или испитивања. Прикладни материјали укључују стакло, неке метале и неке врсте пластике. Спремници би по могућности требало да буду непрозирни. Ако су прозирни или пропуштају свјетлост, спремници са садржајем морају се похранити на тамном мјесту.

Спремници и поклопци морају бити чисти и суви. Облик и запремина спремника морају испуњавати захтјеве прописане за производ чији се узорак узима.

Могу се користити пластични спремници за једнократну употребу, пластични спремници, ламинати укључујући алуминијску фолију или прикладне пластичне кесице с одговарајућим начинима затварања.

Сви спремници, осим пластичних кесица, морају бити чврсто затворени или прикладним чепом или металним или пластичним поклопцем са навојима, по потреби са херметичким пластичним затварачем. Сви чепови или затварачи који се користе морају бити нерастворљиви, отпорни на дјеловање масти и не смију имати способност апсорпције те не смију утицати на мирис, арому, својства или састав узорка.

Чепови морају бити израђени или прекривени материјалима без мириса и који немају способност апсорпције.

## 4. Поступак узорковања

Спремници за узорке морају се затворити одмах након узорковања.

## 5. Похрањивање узорака

Препоручене температуре за похрањивање узорака згуснутог (кондензованог) млијека и млијека у праху не смију бити веће од 25°C. Вријеме похрањивања узорака прије анализе условљено је температуром на којој су узорци похрањени.

#### 6. Превоз узорака

Узорци се морају што је могуће прије отпремити у лабораторију у којој се врши испитивање (по могућности унутар 24 сата након узорковања).

Током превоза потребно је заштитити узорке од излагања страним мирисима који могу контаминирати узорке, излагања директној сунчевој свјетлости те излагања температурама већим од 25°C.

### II МЕТОДА 1: УЗОРКОВАЊА ЗГУСНУТОГ (КОНДЕНЗОВАНОГ) МЛИЈЕКА

#### 1. Обим и област примјене

- згуснуто (кондензовано) екстра масно млијеко,
- згуснуто (кондензовано) млијеко,
- згуснуто (кондензовано) дјелимично обрано млијеко,
- згуснуто (кондензовано) обрано млијеко,
- згуснуто (кондензовано) заслађено млијеко,
- згуснуто (кондензовано) заслађено дјелимично обрано млијеко,
- згуснуто (кондензовано) заслађено обрано млијеко.

#### 2. Опрема

##### 2.1. Уопштено

Видјети тачку 2. Поглавља I овог анекса.

##### 2.2. Клипови и мјешалице

Клипови или мјешалице за мијешање течности у великим спремницима морају имати довољно велику површину како би изазвали одговарајуће мијешање производа без појаве ужеглог укуса. С обзиром на различите облике и величине спремника, не може се препоручити одређени облик клипова за све намјене, али клипови морају бити обликовани на начин да се избјегне гребање унутрашње површине спремника током мијешања. Прикладан материјал описан је у тачки 2. Поглавља I овог анекса.

Облик прикладног клипа препорученог за мијешање течности у кантама или лименкама има сљедеће димензије (Слика 1): диск пречника 150 mm на којем је, у кругу пречника 100 mm, пробушено шест рупа пречника 12,5 mm. Средина диска причвршћена је на металну шипку, чији је други крај ручке у облику петље. Дужина шипке, укључујући ручку, мора износити отприлике 1 m.

Прикладан клип за употребу у малим спремницима има сљедеће приближне димензије (Слика 2): шипка дужине не мање од 2 m, са диском пречника 300 mm на којем је, у кругу пречника 230 mm пробушено 12 рупа пречника 30 mm.

За мијешање садржаја великих спремника препоручује се механичко мијешање или мијешање чистим компримираним ваздухом. Током мијешања потребно је обезбиједити да су притисак и запремина ваздуха минимални ради спречавања појаве ужеглог укуса.

#### Напомена:

Када је одредбама овог правилника прописана употреба "чистог компримираниг ваздуха", потребно је употребљавати компримирани ваздух из којег су уклоњени сви контаминанти (укључујући уље, воду и прашину).

##### 2.3. Мјешалица

Широких оштрих рубова, довољне дужине да допире до дна спремника у којем је производ похрањен, једног

руба обликованог по могућности тако да одговара облику спремника (видјети слику 3).

#### 2.4. Кутлаче

Кутлача величине и облика прикладних за узимање узорка, графички је приказана на Слици 4. Кутлача мора имати чврсту ручку дужине најмање 150 mm. Капацитет кутлаче не смије бити мањи од 50 ml. Предност је ако је ручка савијена. Конусни облик шољице омогућава добро полагање кутлаче.

Алтернативно се може употребити кутлача подједнаког капацитета, али упоредних страна расподијелених у пет једнаких одсјечака, чиме се олакшава узорковање међусобно размјерних количина пошилака похрањених у више спремника.

#### 2.5. Шипка

Округла, дужине приближно 1 m и пречника 35 mm.

#### 2.6. Спемници

За подузорковање капацитета 5 l, са широким отвором.

#### 2.7. Кашика или шпатула

Широких оштрих рубова

#### 2.8. Спемници за узорке

Видјети тачку 3. Поглавља I овог анекса.

### 3. Поступак

#### 3.1. Узорковање згуснутог (кондензованог) млијека

Маса узорка не смије бити мања од 200 g.

3.1.1. Производ темељито промијешати клипом или мјешалицом, или механичким мијешањем, или преливањем из једног спремника у други, или употребом чистог компримираниг ваздуха (видјети напомену под тачком 2.2), док производ не постане довољно хомоген.

Кутлачом узети узорак одмах након мијешања. Уколико постизање одговарајуће хомогености представља проблем, узорке узети из различитих дијелова спремника у којем је производ похрањен, до укупне масе најмање 200 грама. (уколико узорак представља смјесу подузорака, то је потребно истакнути на етикети узорка и у попутном документу).

3.1.2. Узорковање малих претпаковина намијењених за малопродају

Неоштећена и неотворена претпаковина може представљати узорак. Једна или више претпаковина из исте серије или лота може се узети као узорак на начин да укупна количина узорка није мања од 200 g.

3.2. Узорковање згуснутог (кондензованог) заслађеног млијека

##### 3.2.1. Уопштено

Узорковање из спремника у којима су похрањене велике количине згуснутог (кондензованог) млијека може бити изузетно тешко, нарочито када производ није довољно хомогенизован и када је јако вискозан. Проблеме при узорковању може проузроковати присуство великих кристала сахарозе или лактозе или таложене различитих соли унутар производа или на зидовима спремника, а узорак проблема може бити и згрушана супстанца. Овакве околности утврдиће се када се шипка урони у спремник у којем је производ похрањен и извади након што је испитана што је могуће већа додирна површина. Ако кристали шећера нису већи од 6 mm, они при узорковању не би смјели узроковати потешкоће. Ако производ није хомогенизован, ту чињеницу треба истакнути на етикети узорка и у попутном документу. Како се згуснуто (кондензовано) заслађено млијеко често похрањује на собној температури, за добијање репрезентативног узорка

препоручује се да се узорковани садржај загрије на температуру од најмање 20°C.

### 3.2.2. Поступак

Маса узорка не смије бити мања од 200 g.

- отворени spremници

Претходно темељито очишћен и осушен поклопац отворити само на једном крају како би се спријечило да у садржај упадне страна материја. Садржај spremника промијешати помоћу мијешалице (Слика 3). Зидове и дно spremника треба састругати лопатицом, како би се одстранио онај дио производа који је на њих прионуо. Садржај spremника темељито промијешати комбинацијом кружних и окомитих покрета, помоћу мијешалице усмјерене дијагонално, при чему треба пазити да у узорак не уђе ваздух. Мијешалицу затим извадити, а згуснуто (кондензовано) млијеко које на њу приања лопатицом или кашиком пребацити у spremник капацитета 5 l (2.6). Мијешање и вађење мијешалице је потребно понављати све док се не прикупи 2 до 3 l садржаја. Ову количину треба мијешати све док не постане хомогена, а потом узети узорак од најмање 200 грама.

- затворене металне бачве, зачепљене на крају или са стране

Из разлога описаних у тачки 3.2.1, узорковање кроз рупу предвиђену за чеп прикладно је само ако се ради о згуснутом (кондензованом) млијеку које лагано тече и које је уједначене конзистенције. Садржај треба измијешати увођењем шипке кроз рупу предвиђену за чеп, коју се након испитивања додирне површине и мијешања у свим смјеровима колико је могуће, извуче и потом узорак припреми на начин описан у тачки 3.2.1. Алтернативно се може дозволити да садржај истиче у прикладни spremник, при чему се треба побринути да из металне бачве истече што је могуће више њеног садржаја. Након мијешања мијешалицом, узорак се узима како је описано у тачки 3.2.1.

3.2.3. Узорковање малих претпаковина намијењених за малопродају

Неоштећена и неотворена претпаковина може представљати узорак. Једна или више претпаковина из исте серије или лота може се узети као узорак на начин да укупна количина узорка није мања од 200 g.

### 3.3. Заштита, чување и превоз узорака

Видјети тачке 5. и 6. Поглавља I овог анекса.

## III МЕТОДА 2: УЗОРКОВАЊА МЛИЈЕКА У ПРАХУ

### 1. Обим и област примјене

Овом методом се описује узорковање за хемијске анализе:

- пуномасног млијека у праху,
- обраног млијека у праху,
- дјелимично обраног млијека у праху,
- екстра масног млијека у праху.

### 2. Опрема

Видјети тачку 2. Поглавља I овог анекса.

2.1. Сонде довољне дужине да могу досегнути дно spremника са производом.

Прикладне су сонде које испуњавају захтјеве из Поглавља IV овог анекса.

2.2. Лопатица, кашика или шпатула широких оштрих рубова.

### 2.3. Sпремници за узорке

Видјети тачку 3. Поглавља I овог анекса.

### 3. Поступак

#### 3.1. Уопштено

Током или непосредно прије узимања узорака за анализу могућност апсорпције влаге из ваздуха потребно је свести на минимум. Након узорковања spremник поново чврсто затворити.

### 3.2. Узорковање

Маса узорка који се узима за анализу не смије бити мања од 200 g.

Чисту и суву сонду утиснути у производ, тако да је, уколико је то потребно, spremник нагнут или положен на једну страну. Отвор окренути према доље и употријевити равномјерну силу продирања. Када досегне дно spremника, сонду ротирати за 180°, извући садржај и испразнити у spremник за узорке. Поновити онолико пута колико је потребно да се добије узорак масе најмање 200 g. Sпремник за узорке затворити одмах након завршеног узорковања.

3.2.1. Узорковање малих претпаковина намијењених за малопродају

Неоштећена и неотворена претпаковина може представљати узорак. Једна или више претпаковина из исте серије или лота може се узети као узорак на начин да укупна количина узорка није мања од 200 g.

#### Напомена:

Код производа означених ознаком »инстант«, цијела неотворена претпаковина представља узорак.

### 3.3. Заштита, чување и превоз узорака

Видјети тачке 5. и 6. Поглавља I овог анекса.

## IV СОНДЕ ЗА УЗОРКОВАЊЕ МЛИЈЕКА У ПРАХУ ИЗ ВЕЛИКИХ СПРЕМНИКА

### 1. Врсте сонда

- а) Тип А: дуга
- б) Тип Б: кратка  
(види слику 5)

### 2. Материјали

Оштрица и тијело сонде морају бити израђени од глатког метала, по могућности нерђајућег челика. Држак дуге сонде мора по могућности бити израђен од нерђајућег челика. Кратка сонда има одвојиву дрвену или пластичну дршку са куком у облику бајонета у оштрици.

### 3. Конструкција

3.1. Облик, материјал и спољашњи дио морају бити такви да омогућавају лагано чишћење сонде.

3.2. Истакнути дио оштрице сонде типа А мора бити довољно оштар како би послужио као стругач.

3.3. Шиљак оштрице мора бити довољно оштар како би се олакшало узимање узорака.

### 4. Основне димензије

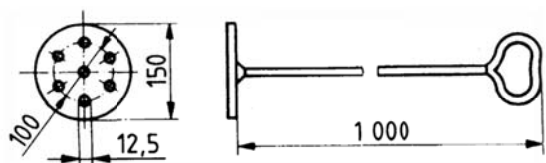
Сонде морају бити усклађене са сљедећим димензијама (дозвољено је одступање од 10 %):

	Тип А дуга	Тип Б кратка
Дужина оштрице	800 mm	400 mm
Дебљина метала оштрице	1 до 2 mm	1 до 2 mm
Унутрашњи пречник оштрице код шиљка	18 mm	32 mm
Унутрашњи пречник оштрице код дршке или тијела	22 mm	28 mm
Ширина отвора код шиљка	4 mm	20 mm
Ширина отвора код дршке или тијела	14 mm	14 mm

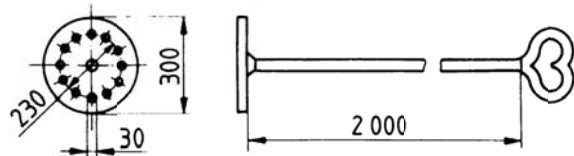
### 5. Напомена о употреби сонди

5.1. Код мање сипког праха сонде се могу уметнути окомито. Сонде типа А се потпуно напуне вртњом и могу се извући окомито. Сонде типа Б се потпуно напуне током уметања и морају се извући у косом положају како би се спријечили губици на доњем крају.

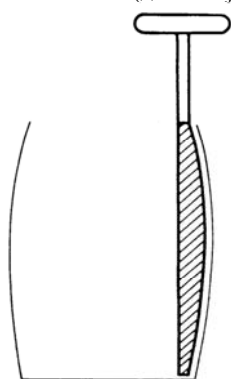
5.2. Код сипког праха, spremници морају бити нагнути, сонде уметнуте у готово водоравном положају са отвором према доље, а извучене са отвором према горе.



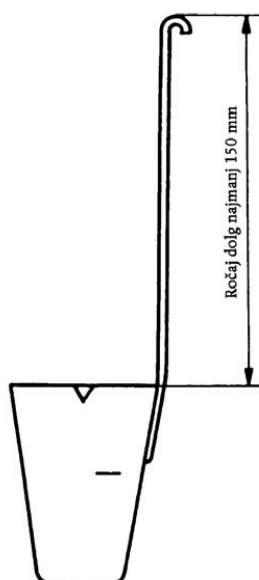
Слика 1: Препоручени клип за лименке и канте (димензије у милиметрима)



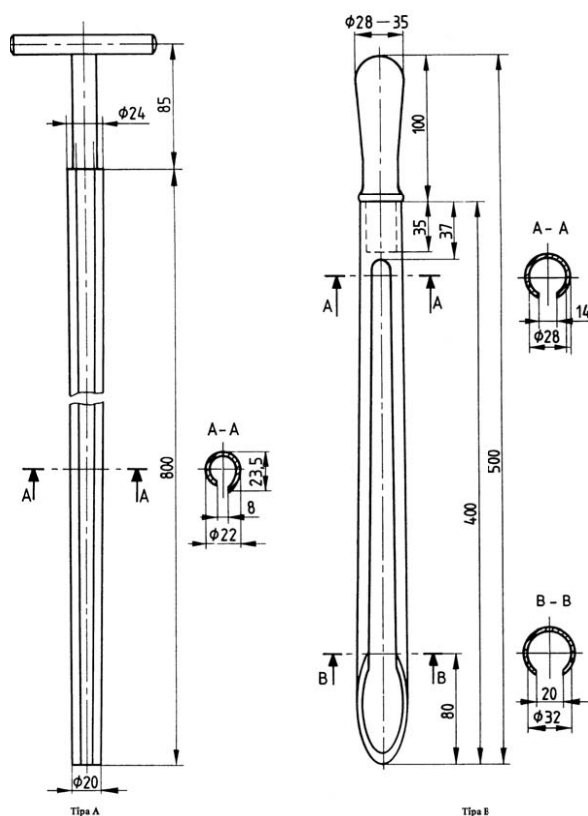
Слика 2: Препоручени клип за мале спремнике (димензије у милиметрима)



Слика 3: Мијешалица прикладна за мијешање згуснутог (кондензованог) млијека



Слика 4: Кутлача прикладна за течност (капацитета већег од 50 ml, са ручком дужине најмање 150 mm)



Слика 5: Сoнде за млијеко у праху (све димензије су у милиметрима)

## АНЕКС II ПРЕГЛЕД МЕТОДА АНАЛИЗА ЗГУСНУТОГ (КОНДЕНЗОВАНОГ) МЛИЈЕКА И МЛИЈЕКА У ПРАХУ

### I Опште одредбе

#### II Одређивање суве материје у:

- Згуснуто (кондензовано) екстра масном млијеку (коришћењем методе 1, Анекс III),
- Згуснуто (кондензовано) млијеку (употребом методе 1, Анекс II),
- Згуснуто (кондензовано) дјелимично обраном млијеку (коришћењем методе 1, Анекс III),
- Згуснуто (кондензовано) обраном млијеку (коришћењем методе 1, Анекс III),
- Згуснуто (кондензовано) заслађеном млијеку (коришћењем методе 1, Анекс III),
- Згуснуто (кондензовано) заслађеном дјелимично обраном млијеку (коришћењем методе 1, Анекс III),
- Згуснуто (кондензовано) заслађеном обраном млијеку (коришћењем методе 1, Анекс III),

#### III Одређивање влаге у:

- Екстра масном млијеку у праху (употребом методе 2, Анекс III),
- Пуномасном млијеку у праху (употребом методе 2, Анекс III),
- Дјелимично обраном млијеку у праху (употребом методе 2, Анекс III),
- Обраном млијеку у праху (употребом методе 2, Анекс III),

## IV Одређивање масти у:

- Згуснутом (кондензованом) екстра масном млијеку (коришћењем методе 3, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) млијеку (коришћењем методе 3, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) дјелимично обраном млијеку (коришћењем методе 3, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) обраном млијеку (коришћењем методе 3, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку (коришћењем методе 3, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) заслађеном дјелимично обраном млијеку (коришћењем методе 3, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) заслађеном обраном млијеку (коришћењем методе 3, Анекс III),
- Екстра масном млијеку у праху (коришћењем методе 4, Анекс III),
- Пуномасном млијеку у праху (коришћењем методе 4, Анекс III),
- Дјелимично обраном млијеку у праху (коришћењем методе 4, Анекс III),
- Обраном млијеку у праху (коришћењем методе 4, Анекс III),

## V Одређивање сахарозе у:

- Згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку (коришћењем методе 5, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) заслађеном дјелимично обраном млијеку (коришћењем методе 5, Анекс III),
- Згуснутом (кондензованом) заслађеном обраном млијеку (коришћењем методе 5, Анекс III),

## VI Одређивање млијечне киселине и лактата у:

- Екстра масном млијеку у праху (коришћењем методе 6, Анекс III),
- Пуномасном млијеку у праху (коришћењем методе 6, Анекс III),
- Дјелимично обраном млијеку у праху (коришћењем методе 6, Анекс III),
- Обраном млијеку у праху (коришћењем методе 6, Анекс III),

## VII Одређивање активности фосфатазе у:

- Екстра масном млијеку у праху (коришћењем методе 7 или 8, Анекс III),
- Пуномасном млијеку у праху (коришћењем методе 7 или 8, Анекс III),
- Дјелимично обраном млијеку у праху (коришћењем методе 7 или 8, Анекс III),
- Обраном млијеку у праху (коришћењем методе 7 или 8, Анекс III).

**АНЕКС III****МЕТОДЕ АНАЛИЗА САСТАВА ЗГУСНУТОГ (КОНДЕНЗОВАНОГ) МЛИЈЕКА И МЛИЈЕКА У ПРАХУ НАМИЈЕЊЕНИХ ЗА КОНЗУМАЦИЈУ**

## ОПШТЕ ОДРЕДБЕ

## 1. ПРИПРЕМА УЗОРКА ЗА АНАЛИЗУ

1.1. Згуснуто (кондензовано) екстра масно млијеко

Згуснуто (кондензовано) млијеко

Згуснуто (кондензовано) дјелимично обрано млијеко

Згуснуто (кондензовано) обрано млијеко

Протрести и преокренути затворену лименку. Отворити лименку и лагано прелити млијеко у други спремник, који се може херметички затворити, мијешајући га поновљеним преливањем. Пазити да сва маст и млијеко који припањају на зидове и крајеве лименке буду

помијешани са узорком. Затворити спремник. Уколико производ није хомогенизован, загријати спремник у воденом купатилу на температури 40°C. Снажно протрести сваких 15 минута. Након два сата, уклонити спремник из воденог купатила и оставити да се охлади до собне температуре. Уклонити поклопац и темељито промијешати садржај спремника кашиком или шпатулом (ако се маст одвојила, узорак се не испитује). Похранити на хладном мјесту.

1.2. Згуснуто (кондензовано) заслађено млијеко  
Згуснуто (кондензовано) заслађено дјелимично обрано млијеко

Згуснуто (кондензовано) заслађено обрано млијеко  
Лименке: Загријати затворену лименку у воденом купатилу при температури 30-40°C приближно 30 минута. Отворити лименку и темељито промијешати садржај шпатулом или кашиком чинећи покрете горе-доље и кружним покретима како би се горњи и доњи слојеви добро помијешали са укупним садржајем. Пазити да остатак млијека који припања на зидове и крајеве лименке буде умијешано у узорак. Колико год је могуће, прелити садржај у други спремник који има поклопац за херметичко затварање. Затворити спремник и похранити на хладном мјесту.

Тубе: Пререзати крај тубе и излити садржај у спремник који има поклопац за херметичко затварање. Затим пререзати тубу по дужини, састругати сав материјал који припања за унутрашњи зид и пажљиво помијешати с остатком садржаја. Похранити на хладном мјесту.

1.3. Екстра масно млијеко у праху  
Пуномасно млијеко у праху  
Дјелимично обрано млијеко у праху  
Обрано млијеко у праху

Пресипати млијеко у праху у чисти, суви спремник (са поклопцем за херметичко затварање) запремине два пута веће од запремине узорка. Одмах затворити спремник и темељито промијешати млијеко у праху поновљеним протресањем и преокретањем спремника. Током припреме узорка, колико год је могуће, избјежавати излагање узорка атмосфери како би апсорпција влаге била минимална.

## 2. РЕАГЕНСИ

## 2.1. Вода

2.1.1. Ако се вода користи као растварач, за разрјеђивање или за прање, треба користити дестиловану или деминерализовану воду истог степена чистоће.

2.1.2. Без навођења било каквог другог реагенса, појам »отапање« подразумејева отапање у води, »раствор« водени раствор и »разрјеђивање« разрјеђивање водом.

## 2.2. Хемикалије

Све хемикалије које се користе морају бити потврђене аналитичке чистоће, осим гдје је другачије наведено.

## 3. ОПРЕМА

## 3.1. Списак опреме

Попис опреме садржи само опрему за специјалну употребу те опрему која захтијева посебну спецификацију.

## 3.2. Аналитичка вага

Појам "аналитичка вага" односи се на вагу тачности најмање 0,1 mg.

## 4. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

## 4.1. Израчунавање

Ако није другачије наведено, резултат мора бити изражен као масени удио у узорку запремљеном у лабораторији.

## 4.2. Број значајних цифри

Резултат не смије садржавати више значајних цифри него што је оправдано прецизношћу методе која се примјењује.

#### 5. ИЗВЈЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

У извјештају о испитивању наводе се коришћена метода анализе и добијени резултати. Осим тога, наводе се сви детаљи поступка који нису описани у методи анализе или који нису обавезни, као и све околности које су могле утицати на добијене резултате. Извјештај о испитивању мора садржавати све информације потребне за потпуну идентификацију узорка.

#### МЕТОДА 1: ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА СУВЕ МАТЕРИЈЕ

(Сушионик 99°C)

##### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом се одређује удио суве материје у:

- згуснутом (кондензованом) екстра масном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) млијеку,
- згуснутом (кондензованом) дјелимично обраном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) обраном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном дјелимично обраном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном обраном млијеку.

##### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Удио суве материје у згуснутом (кондензованом) млијеку је удио суве материје одређен описаном методом.

##### 3. ПРИНЦИП

Позната количина узорка разрјеђује се водом, мијеша са пијеском и суши при температури од  $99 \pm 1^\circ\text{C}$ . Маса након сушења је маса суве материје и израчунава се као проценат масе узорка.

##### 4. РЕАГЕНСИ

Кремени или морски пијесак, третиран хлоридном киселином (величина зрнаца: 0,18-0,5 mm, која пролазе кроз сито величине отвора 500  $\mu\text{m}$  и задржавају се на сити величине отвора 180 $\mu\text{m}$ ). Пијесак мора удовољавати сљедећем контролном тесту:

Загријавати приближно 25 g пијеска у сушионику (5.3), два сата, како је описано у тачкама од 6.1. до 6.3. Додати 5 ml воде, поново загријавати у сушионику два сата, охладити и извагати. Разлика између двије одваге не смије бити већа од 0,5 mg.

Ако је потребно, третирати пијесак 25%-тном хлоридном киселином три дана, уз повремено мијешање. Испирати водом до нестанка киселе реакције или док вода за испирање више не садржава хлориде. Осушити при температури од  $160^\circ\text{C}$  и поново тестирати како је горе наведено.

##### 5. ОПРЕМА

5.1. Аналитичка вага

5.2. Посудице са равним дном, по могућности израђене од никла, алуминијума или нерђајућег челика. Посудице морају имати поклопце који се могу чврсто затворити, али и лако уклонити. Примјерене димензије су пречник од 60 до 80 mm и дубина приближно 25 mm.

5.3. Сушионик за сушење при атмосферском притиску с одговарајућом вентилацијом и термостатски регулисаном температуром од  $99 \pm 1^\circ\text{C}$ . Температура мора бити једнака у цијелом сушионику.

5.4. Ексикатор с активним силикагелом с индикатором присуства воде или одговарајућим средством за сушење.

5.5. Стаклени штапићи, спљоштени на једном крају, дужине која пристаје унутрашњости металних посудица.

5.6. Кључало водено купатило.

##### 6. ПОСТУПАК

6.1. У посудуцу (5.2) ставити приближно 25 g пијеска (4) и кратки стаклени штапић (5.5).

6.2. Без прекривања посудуце и садржаја поклопцем, ставити посудуцу са садржајем и поклопац у сушионик (5.3) и загријавати два сата.

6.3. Посудицу затворити поклопцем и пренијети у ексикатор (5.4) Оставити да се охлади на собну температуру и извагати са тачношћу од 0,1 mg ( $M_0$ ).

6.4. Нагнути посудуцу како би се пијесак скупио на једној страни посудуце. У празни дио посудуце ставити приближно 1,5 g згуснутог (кондензованог) заслађеног млијека односно 3,0 g згуснутог (кондензованог) млијека. Посудицу затворити поклопцем и извагати са тачношћу од 0,1 mg ( $M_1$ ).

6.5. Скинуги поклопац, додати 5 ml воде и помоћу стакленог штапића промијешати течности, а затим пијесак и течни дио. Штапић оставити у мјешавини.

6.6. Посудицу ставити у водено купатило (5.6) док вода не испари, што обично траје 20 минута. Повремено штапићем промијешати мјешавину како би маса била добро провјетрена и како се не би стврднула кад се осуши. Штапић положити у посудуцу.

6.7. Ставити посудуцу и поклопац у сушионик на 1 сат и 30 минута.

6.8. Посудицу затворити поклопцем и пренијети у ексикатор (5.4). Оставити да се охлади до собне температуре и извагати са тачношћу од 0,1 mg.

6.9. Поново ставити посудуцу и поклопац у сушионик, откловити посудуцу и откривену посудуцу и поклопац загријавати још један сат.

6.10. Поновити поступак описан у тачки 6.8.

6.11. Понављати поступак описан у тачкама 6.9. и 6.10. док разлика у маси између два узастопна вагања не буде мања од 0,5 mg или док се маса не повећа. Ако се маса повећа, при израчунању (7.1) употребити најмању забиљежену масу. Коначна забиљежена маса је  $M_2$  (g).

##### 7. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

7.1. Метода израчунавања

Удио суве материје, изражен као проценат масе узорка, израчунава се на сљедећи начин:

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

при чему је:

$M_0$  = маса посудуце, поклопца и пијеска након поступка описаног у тачки 6.3, у грамима

$M_1$  = маса посудуце, поклопца, пијеска и узорка након поступка описаног у тачки 6.4, у грамима

$M_2$  = маса посудуце, поклопца, пијеска и осушеног узорка након поступка описаног у тачки 6.11, у грамима

##### 7.2. Поновљивост

Разлика између резултата два одређивања која изводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим условима, не смије бити већа од 0,2 g суве материје на 100 g производа.

## 8. ИЗРАЧУНАВАЊЕ УКУПНЕ СУВЕ МАТЕРИЈЕ МЛИЈЕКА И БЕЗМАСНЕ СУВЕ МАТЕРИЈЕ МЛИЈЕКА

8.1. Удио укупне суве материје у згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку израчунава се на следећи начин:

Од удјела укупне суве материје (према Методи 1, Анекс III) одузети удио сахарозе (према Методи 5, Анекс III).

8.2. Удио безмасне суве материје у згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку израчунава се на следећи начин:

Од удјела укупне суве материје (према Методи 1, Анекс III) одузети удио сахарозе (према Методи 5, Анекс III) и удио масти (према Методи 3, Анекс III).

8.3. Удио безмасне суве материје у згуснутом (кондензованом) млијеку израчунава се на следећи начин:

Од удјела укупне суве материје (према Методи 1, Анекс III) одузети удио масти (према Методи 3, Анекс III).

## МЕТОДА 2: ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА ВЛАГЕ

(Сушионик 102°C)

### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом се одређује губитак масе сушењем у:

- екстра масном млијеку у праху,
- пуномасном млијеку у праху,
- дјелимично обраном млијеку у праху,
- обраном млијеку у праху.

### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Удио воде је губитак масе сушењем одређен описаном методом.

### 3. ПРИНЦИП

Маса остатка узорка за анализу одређује се након сушења при атмосферском притиску у сушионику при температури 102 ± 1°C до константне масе. Губитак масе изражава се као проценат масе узорка.

### 4. ОПРЕМА

#### 4.1. Аналитичка вага

4.2. Посудице, по могућности израђене од никла, алуминијума, нерђајућег челика или стакла. Посудице морају имати поклопце који се могу чврсто затворити, али и лако уклонити. Примјерене димензије су пречник од 60 до 80 mm и дубина приближно 25 mm.

4.3. Сушионик за сушење при атмосферском притиску с одговарајућом вентилацијом и термостатски регулисаном температуром од 102 ± 1°C. Температура мора бити једнака у цијелом сушионику.

4.4. Ексикатор с активним силикагелом с индикатором присуства воде или одговарајућим средством за сушење.

### 5. ПОСТУПАК

5.1. Отворену посуду (4.2) са поклопцем ставити у сушионик (4.3) и загријавати приближно један сат.

5.2. Затворену посуду оставити да се охлади у ексикатору (4.4) до собне температуре и затим извагати са тачношћу од 0,1 mg (M0).

5.3. У посуду додати приближно 2 g млијека у праху, затворити посуду и што је брже могуће извагати са тачношћу од 0,1 mg (M1).

5.4. Отворену посуду са поклопцем ставити у сушионик два сата.

5.5. Затворену посуду оставити да се охлади у ексикатору (4.4) до собне температуре и затим што је брже могуће извагати са тачношћу од 0,1 mg.

5.6. Отворену посуду са поклопцем загријавати у сушионику један сат.

5.7. Поновити поступак описан у тачки 5.5.

5.8. Понављати поступак описан у тачкама 5.6. и 5.5. док разлика у маси између два узастопна вагања не буде

мања од 0,5 mg или док се маса не повећа. Ако се маса повећа, при израчунању (6.1) употребити најмању забиљежену масу. Коначна забиљежена маса је M2 (g).

## 6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

### 6.1. Метода израчунавања

Губитак масе сушењем, изражен као проценат масе, израчунава се на следећи начин:

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

при чему је:

M0 = маса посудуце и поклопца након поступка описаног у тачки 5.2, у грамима

M1 = маса посудуце, поклопца и узорка након поступка описаног у тачки 5.3, у грамима

M2 = маса посудуце, поклопца и коначног узорка након поступка описаног у тачки 5.5, у грамима

### 6.2. Поновљивост

Разлика између резултата два одређивања која изводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим условима, не смије бити већа од 0,1 g воде на 100 g производа.

## МЕТОДА 3: ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА МАСТИ У ЗГУСНУТОМ (КОНДЕНЗОВАНОМ) МЛИЈЕКУ (Метода *Röse-Gottlieb*)

### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом се методом одређује удио масти у:

- згуснутом (кондензованом) екстра масном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) млијеку,
- згуснутом (кондензованом) дјелимично обраном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) обраном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном дјелимично обраном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном обраном млијеку.

### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Удио масти у згуснутом (кондензованом) млијеку је удио масти одређен описаном методом.

### 3. ПРИНЦИП

Удио масти одређује се екстракцијом масти из амонијумовог алкохолног раствора узорка диетил етером и петролетером, испаравањем раствора и вагањем остатка те израчунавањем процента масе узорка према *Röse-Gottliebovom* поступку.

### 4. РЕАГЕНСИ

Сви реагенси морају испуњавати захтјеве дефинисане слијепом пробом (6.1). Уколико је потребно, реагенси могу бити поново дестиловани у присуству приближно 1 g млијечне масти на 100 ml раствора.

4.1. Раствор амонијака, приближно 25% (m/m) NH<sub>3</sub> (густине приближно 0,91 g/ml при 20°C) или јачи раствор познате концентрације.

4.2. Етанол, 96 ± 2% (v/v) или, уколико он није на располагању, етанол денатуриран метанолом, етил-метил кетоном или петролетером.

4.3. Диетил етер, без пероксида.

#### Напомена 1:

За одређивање присуства пероксида у мали цилиндар са стакленим чепом, који је потребно испрати етером, додати 10 ml етера и 1 ml свјеже припремљене 10%-тног раствора калијум јодида. Протрести и оставити да стоји



једну минуто. Жута боја се не смије појавити нити у једном слоју.

#### *Напомена 2:*

Диетил етер може се очувати без пероксида додатком мокре цинкове фолије коју је потребно потпуно умочити у разријеђени кисели раствор бакар сулфата једну минуто те затим испрати водом. За 1 литар употријебити приближно 8000 mm<sup>2</sup> цинкове фолије, разрезати на траке довољне дужине да могу достигати најмање до половине спремника.

4.4. Петролетер, са распоном врења 30-60°C.

4.5. Мијешани растварач који се припрема нетом прије употребе мијешањем једнаке количине диетил етера (4.3) и петролетера (4.4) (у случају да је назначена употреба мијешаног растварача, она се може замијенити диетил етером или петролетером).

#### 5. ОПРЕМА

5.1. Аналитичка вага

5.2. Одговарајуће епрувете или тиквице за екстракцију са чеповима од брушеног стакла или другим затварачима отворним на дјеловање растварача који се користе.

5.3. Тиквице танких зидова и равног дна, 150-250 ml.

5.4. Сушионик за сушење при атмосферском притиску са одговарајућом вентилацијом и термостатски регулисаном температуром од 102 ± 1°C.

5.5. Грануле за врење, без масти, које се при употреби не дробе, непорозне, на примјер стаклене куглице или комадићи силицијум карбида (употреба овог материјала није обавезна, видјети тачку 6.2.1).

5.6. Сифон (одводна цијев) која одговара епруветама за екстракцију.

5.7. Центрифуга (није обавезна).

#### 6. ПОСТУПАК

6.1. Слијепа проба

Паралелно с одређивањем удјела масти у узорку, спровести слијепу пробу са 10 ml воде, користећи исту апаратуру за екстракцију, исте количине свих реагенса и исти поступак описан овом методом, осим поступка описаног под тачком 6.2.2. Ако слијепа проба прелази 0,5 mg, провјерити реагенсе те нечисти реагенс или реагенсе очистити или замијенити.

6.2. Одређивање

6.2.1. Осушити тиквицу (5.3) (ако је потребно, заједно са неколико гранула за врење (5.5) како би се постигло лагано врење током уклањања растварача које слиједи) у сушионику 30-60 минута. Оставити тиквицу да се охлади до собне температуре и извагати са тачношћу од 0,1 mg.

6.2.2. Промијешати припремљени узорак и одмах извагати, са тачношћу од 1 mg, 4-5 g узорка или 2-2,5 g заслађеног узорка, директно у апаратуру за екстракцију. Додати воде до 10,5 ml и пажљиво промијешати уз лагано загријавање (40-50°C) док се производ потпуно не расприши. Одређивање је потребно поновити ако узорак није потпуно распришен.

6.2.3. Додати 1,5 ml амонијака (25%) (4.1) или одговарајући волумен јачег раствора и добро промијешати.

6.2.4. Додати 10 ml етанола (4.2) и промијешати течности њежно, али темељито у незатвореној апаратури.

6.2.5. Додати 25 ml диетил етера (4.3) и охладити под млазом текуће воде. Затворити апаратуру, снажно протрести и окретати више пута једну минуто.

6.2.6. Пажљиво уклонити чеп и додати 25 ml петролетера (4.4) користећи првих неколико милилитара за испирање чепа и унутрашњости врата апаратуре, тако да се течност након испирања слијева у апаратуру. Затворити апаратуру чепом и протресати те окретати више пута 30

секунди. Не смије се превише снажно протресати уколико се не спроводи центрифугирање под тачком 6.2.7.

6.2.7. Оставити апаратуру да стоји док горњи слој течности не постане бистар и јасно се не одијели од доњег воденог слоја. Алтернативно спровести одвајање користећи одговарајућу центрифугу (5.7).

#### *Напомена:*

При употреби центрифуге коју не покреће трофазни мотор, може доћи до искрења и стога је потребан опрез како би се избјегла експлозија или пожар због етерских пара које могу излазити из, на примјер, напукле епрувете.

6.2.8. Уклонити чеп, испрати чеп и унутрашњост врата тиквице са неколико милилитара мијешаног растварача (4.5) тако да се течност након испирања слијева у апаратуру. Пажљиво пренијети што је могуће више супернатанта декантирањем или помоћу сифона (5.6) у припремљену тиквицу (6.2.1).

#### *Напомена:*

Ако се не употребљава сифон, може бити потребно додати мало воде како би се повећала површина између два слоја и олакшало декантирање.

6.2.9. Испрати спољну и унутрашњу страну врата апаратуре или врх и доњи дио сифона са неколико милилитара мијешаног растварача (4.5) тако да се течност са спољашње стране врата слијева у тиквицу, а течност са унутрашње стране врата и сифона у апаратуру за екстракцију.

6.2.10. Спровести другу екстракцију понављајући поступак описан у тачкама од 6.2.5. до 6.2.9, али користећи само 15 ml диетил етера и 15 ml петролетера.

6.2.11. Спровести трећу екстракцију понављајући поступак описан у тачки 6.2.10, али без задњег испирања.

#### *Напомена:*

Трећа екстракција није обавезна при анализи узорака згуснутог (кондензованог) обраног млијека и згуснутог (кондензованог) заслађеног обраног млијека.

6.2.12 Пажљиво испарити или уклонити дестилацијом што више растварача (укључујући етанол). Ако је капацитет тиквице мален, потребно је уклонити нешто растварача, како је наведено, након сваке екстракције.

6.2.13. Када се више не осјети мирис растварача, тиквицу са бочне стране ставити у сушионик и загријавати један сат.

6.2.14. Извадити тиквицу из сушионика, оставити да се охлади до собне температуре и извагати са тачношћу од 0,1 mg.

6.2.15. Поновити поступак описан у тачкама 6.2.13. и 6.2.14. уз загријавање у трајању 30-60 минута док разлика у маси између два узастопна вагања не буде мања од 0,5 mg или док се маса не повећа. Уколико се маса повећа, при израчунавању (7.1) употријебити најмању забиљежену масу. Коначна забиљежена маса је M1 (g).

6.2.16. Додати 15-25 ml петролетера како би се потврдило да је екстрахована супстанца потпуно растворљива. Лагано загријавати и ротирати док се маст не отопи.

6.2.16.1. Ако је екстрахована супстанца потпуно растворљива у петролетеру, маса масти је разлика између маса одређених у тачкама 6.2.1. и 6.2.15.

6.2.16.2. Ако је присутна било која нерастворљива супстанца, или у случају сумње, потпуно екстраховати маст из тиквице сталним испирањем топлим петролетером, тако да се прије сваког декантирања нерастворљиве супстанце исталоже. Испрати спољни дио врата тиквице три пута. Загријавати тиквицу, постављену на бочну страну у сушионику један сат. Оставити да се охлади до собне

температуре као прије (6.2.1) и извагати са тачношћу од 0,1 mg. Маса масти је разлика између масе одређене у тачки 6.2.15. и ове коначне масе.

#### 7. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

##### 7.1. Израчунавање

Маса екстраховане масти изражене у граммама израчунава се на следећи начин:

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

Удио масти у узорку, изражен као проценат, израчунава се на следећи начин:

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

при чему је:

M1 = маса тиквице М са масти након поступка описаног у тачки 6.2.15, у граммама

M2 = маса тиквице М након поступка описаног у тачки 6.2.1. или у случају нерастворљиве супстанце или сумње након поступка описаног у тачки 6.2.16.2, у граммама

B1 = маса тиквице Б слијепе пробе након поступка описаног у тачки 6.2.15, у граммама

B2 = маса тиквице Б након поступка описаног у тачки 6.2.1. или у случају нерастворљиве супстанце или сумње након поступка описаног у тачки 6.2.16.2, у граммама

S = маса употребљеног узорка, у граммама

##### 7.2. Поновљивост

Разлика између резултата двају одређивања која проводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим увјетима, не смије бити већа од 0,05 г масти на 100 г производа.

#### МЕТОДА 4: ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА МАСТИ У МЛИЈЕКУ У ПРАХУ

(Метода *Röse-Gottlieb*)

##### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом се одређује удио масти у:

- екстра масном млијеку у праху,
- пуномасном млијеку у праху,
- дјелимично обраном млијеку у праху,
- обраном млијеку у праху.

##### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Удио масти у млијеку у праху је удио масти одређен описаном методом.

##### 3. ПРИНЦИП

Удио масти одређује се екстракцијом масти из амонијумовог алкохолног раствора узорка диетил етером и петролетером, испаравањем растварача и вагањем остатка те израчунавањем процента масе узорка према *Röse-Gottliebovom* поступку.

##### 4. РЕАГЕНСИ

Сви реагенси морају испуњавати захтјеве дефинисане слијепом пробом (6.1). Уколико је потребно, реагенси могу бити поновно дестиловани у присуству приближно 1 г млијечне масти на 100 ml растварача.

4.1. Раствор амонијака, приближно 25% (m/m) NH<sub>3</sub> (густине приближно 0,91 g/ml при 20°C) или јачи раствор познате концентрације.

4.2. Етанол, 96 ± 2% (v/v) или, уколико он није на располагању, етанол денатурисан метанолом, етил метил кетоном или петролетером.

4.3. Диетил етер, без пероксида.

*Напомена 1:*

За одређивање присуства пероксида, у мали цилиндар са стакленим чепом, који је потребно испрати етером, додати 10 ml етера и 1 ml свјеже припремљеног 10%-тног раствора калијум јодида. Протрести и оставити да стоји једну минуту. Жута боја се не смије појавити нити у једном слоју.

*Напомена 2:*

Диетил етер може се очувати без пероксида додатком мокре цинкове фолије коју је потребно потпуно умочити у разријеђени кисели раствор бакар сулфата једну минуту те затим испрати водом. За 1 литар употребити приближно 8000 mm<sup>2</sup> цинкове фолије, разрезати на траке довољне дужине да могу досезати најмање до половине спремника.

4.4. Петролетер, са распоном врења од 30-60°C.

4.5. Мијешани раствор који се припрема непосредно прије употребе мијешањем једнаке количине диетил етера (4.3) и петролетера (4.4) (у случају да је назначена употреба мијешаног растварача, она се може замијенити диетил етером или петролетером).

##### 5. ОПРЕМА

5.1. Аналитичка вага

5.2. Одговарајуће епрувете или тиквице за екстракцију са чеповима од брушеног стакла или другим затварачима отпорнима на дјеловање растварача који се користе.

5.3. Тиквице танких зидова и равног дна, 150-250 ml.

5.4. Сушионик за сушење при атмосферском притиску са одговарајућом вентилацијом и термостатски регулисаном температуром од 102 ± 1°C.

5.5. Грануле за врење, без масти, које се при употреби не дробе, непорозне, на примјер стаклене куглице или комадићи силицијум карбида (употреба овог материјала није обавезна, видјети тачку 6.2.1).

5.6. Водено купатило, температуре 60-70°C.

5.7. Сифон (одводна цијев) која одговара епруветама за екстракцију.

5.8. Центрифуга (није обавезна).

##### 6. ПОСТУПАК

6.1. Слијепа проба

Паралелно са одређивањем удјела масти у узорку, извести слијепу пробу са 10 ml воде, користећи исту апаратуру за екстракцију, исте количине свих реагенса и исти поступак описан овом методом, осим поступка описаног под тачком 6.2.2. Ако слијепа проба прелази 0,5 mg, провјерити реагенсе те нечисти реагенс или реагенсе очистити или замијенити.

6.2. Одређивање

6.2.1. Осушити тиквицу (5.3) (ако је потребно заједно са неколико гранула за врење (5.5), како би се постигло лагано врење током уклањања растварача које слиједи) у сушионику (5.4) 30-60 минута. Оставити тиквицу да се охлади до собне температуре и извагати са тачношћу од 0,1 mg.

6.2.2. Са тачношћу од 1 mg извагати приближно 1 g пуномасног млијека у праху или приближно 1,5 g дјелимично обраног или обраног млијека у праху, директно у апаратуру за екстракцију (5.2). Додати 10 ml воде и пажљиво промијешати док се млијеко у праху потпуно не расприши (за неке узорке потребно је загријавање).

6.2.3. Додати 1,5 ml амонијака (25%) (4.1) или одговарајућу запремину јачег раствора и загријавати у воденом купатилу (5.6) 15 минута при температури 60-70°C, повремено мијешајући. Охладити, нпр., под млазом текуће воде.

6.2.4. Додати 10 ml етанола (4.2) и промијешати течности пажљиво, али темељито у незатвореној апаратури.

6.2.5. Додати 25 ml диетил етера (4.3.) и охладити под млазом текуће воде. Затворити апаратуру, снажно протрести и окретати више пута једну минуту.

6.2.6. Пажљиво уклонити чеп и додати 25 ml петролетера (4.4) користећи првих неколико милилитара за испирање чепа и унутрашњости врата апаратуре, тако да се течност након испирања слива у апаратуру. Затворити апаратуру чепом, протресати и окретати више пута 30 секунди. Не смије се превише снажно протресати уколико се не врши центрифугирање под тачком 6.2.7.

6.2.7. Оставити апаратуру да стоји док горњи слој течности не постане бистар и јасно се не одијели од доњег воденог слоја. Алтернативно спровести одвајање користећи одговарајућу центрифугу (5.7).

*Напомена:*

При употреби центрифуге коју не покреће трофазни мотор, може доћи до искрења и стога је потребан опрез како би се избјегла експлозија или пожар због етерских пара које могу излазити из, на примјер, напукле епрувете.

6.2.8. Уклонити чеп, испрати чеп и унутрашњост врата тиквице апаратуре са неколико милилитара мијешаног растварача (4.5) тако да се течност након испирања слива у апаратуру. Пажљиво пренијети што је могуће више супернатанта декантирањем или помоћу сифона (5.7) у припремљену тиквицу (6.2.1).

*Напомена:*

Ако се не употребљава сифон, може бити потребно додати мало воде како би се повећала површина између два слоја и олакшало декантирање.

6.2.9. Испрати спољашњу и унутрашњу страну врата апаратуре или врх и доњи дио сифона са неколико милилитара мијешаног растварача (4.5) тако да се течност са спољне стране врата слива у тиквицу, а течност са унутрашње стране врата и сифона у апаратуру за екстракцију.

6.2.10. Спровести другу екстракцију понављајући поступак описан у тачкама од 6.2.5. до 6.2.9. укључиво, али користећи само 15 ml диетил етера и 15 ml петролетера.

6.2.11. Спровести трећу екстракцију понављајући поступак описан у тачки 6.2.10, али без задњег испирања (6.2.9).

*Напомена:*

Трећа екстракција није обавезна при анализи узорак обраног млијека у праху.

6.2.12. Пажљиво испарити или дестилацијом уклонити што више растварача (укључујући етанол). Ако је капацитет тиквице мален, потребно је уклонити нешто растварача, како је наведено, након сваке екстракције.

6.2.13. Када не буде примјетан мирис растварача, тиквицу са бочне стране ставити у сушионик и загријавати један сат.

6.2.14. Извадити тиквицу из сушионика, оставити да се охлади до собне температуре и извагати са тачношћу од 0,1 mg.

6.2.15. Поновити поступак описан у тачкама 6.2.13. и 6.2.14. уз загријавање у трајању од 30 до 60 минута док разлика у маси између два узастопна вагања не буде мања од 0,5 mg или док се маса не повећа. Уколико се маса повећа, при израчунавању (7.1) употребити најмању забиљежену масу. Коначна забиљежена маса је  $M_1$  (g).

6.2.16. Додати 15-25 ml петролетера како би се потврдило да је екстрахована супстанца потпуно растворљива. Лагано загријавати и ротирати док се маст не отопи.

6.2.16.1. Уколико је екстрахована супстанца потпуно растворљива у петролетеру, маса масти је разлика између маса одређених у тачкама 6.2.1. и 6.2.15.

6.2.16.2. Ако је присутна било која нерастворљива супстанца, или у случају сумње, потпуно екстраховати маст из тиквице поновљеним испирањем топлим петролетером, дозвољавајући да се прије сваког декантирања растворљиве супстанце исталоже. Испрати спољашњи дио врата тиквице три пута. Загријавати тиквицу, постављену на бочну страну у сушионик један сат. Оставити да се охлади до собне температуре као прије (6.2.1) и извагати са тачношћу од 0,1 mg. Маса масти је разлика између масе одређене у тачки 6.2.15. и ове коначне масе.

## 7. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

### 7.1. Израчунавање

Маса екстраховане масти изражене у грамма израчунава се на сљедећи начин:

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

Удио масти у узорку, изражен као проценат, израчунава се на сљедећи начин:

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

при чему је:

$M_1$  = маса тиквице  $M$  са масти након поступка описаног у тачки 6.2.15, у грамма

$M_2$  = маса тиквице  $M$  након поступка описаног у тачки 6.2.1, или у случају нерастворљиве супстанце или сумње након поступка описаног у тачки 6.2.16.2, у грамма

$B_1$  = маса тиквице  $B$  слијепе пробе након поступка описаног у тачки 6.2.15, у грамма

$B_2$  = маса тиквице  $B$  након поступка описаног у тачки 6.2.1, или у случају нерастворљиве супстанце или сумње након поступка описаног у тачки 6.2.16.2, у грамма

$S$  = маса употребљеног узорка, у грамма

### 7.2. Поновљивост

Разлика између резултата два одређивања која изводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим условима, не смије бити већа од 0,2 g масти на 100 g производа искључујући обрано млијеко у праху код којег разлика не смије бити већа од 0,1 g масти на 100 g производа.

## МЕТОДА 5: ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА САХАРОЗЕ (ПОЛАРИМЕТРИЈСКА МЕТОДА)

### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом одређује се удио сахарозе у:

- згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном дјелимично обраном млијеку,
- згуснутом (кондензованом) заслађеном обраном млијеку.

Узорци не смију садржавати инвертни шећер.

### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Удио сахарозе у згуснутом (кондензованом) заслађеном млијеку је удио сахарозе одређен описаном методом.

### 3. ПРИНЦИП

Ова метода се заснива на принципу Клергетове инверзије, лаганог третирања узорка киселином која

изазива потпуну хидролизу сахарозе те готово никакву хидролизу лактозе или других шећера.

Удио сахарозе добија се из промјене оптичке активности раствора.

Бистри филтрат узорка, без мутаротације лактозе, припрема се на начин да се раствор третира амонијаком, након чега сlijеди неутрализација и бистрење додавањем раствора цинковог ацетата и калијум-хексацијаноферата(II). У дијелу филтрата сахароза се хидролизира на посебан начин.

Из ротације филтрата, прије и послје инверзије, удио сахарозе израчунава се помоћу одговарајуће формуле.

#### 4. РЕАГЕНСИ

4.1. Раствор цинковог ацетата, 1 mol/L.

Растворити 21,9 g кристализованог цинковог ацетата дихидрата  $Zn(C_2H_3O_2)_2 \times 2H_2O$  и 3 ml ледене сирћетне киселине у води и надопунити водом до 100 ml.

4.2. Раствор калијум-хексацијаноферата(II), 0,25 mol/L  
Растворити 10,6 g кристализованог калијум-хексацијаноферата(II) трихидрата  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$  у води и надопунити водом до 100 ml.

4.3. Раствор хлоридне киселине,  $6,35 \pm 0,20$  mol/L (20-22%) или  $5,0 \pm 0,2$  M (16-18%).

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

4.5. Раствор сирћетне киселине,  $2,0 \pm 0,2$  mol/L (12%).

4.6. Индикатор бромтимол плавило, 1%-тна (m/v) раствор у етанолу.

#### 5. ОПРЕМА

5.1. Вага тачности 10 mg.

5.2. Полариметријска цијев, 2 dm, тачно калибриране дужине.

5.3. Полариметар или сахариметар:

а) Полариметар са натријевом свјетлошћу или живином зеленом свјетлости (свјетилка са живиним парама са призмом или специјални Вратенов заслон бр. 77 А), са тачношћу од најмање 0,05 угоних степени,

б) Сахариметар са међународном шећерном скалом, са бијелом свјетлости која пролази кроз 15 mm филтер 6%-тног раствора калијум-бикромата, или натријумове свјетлости, с тачношћу од најмање  $0,1^\circ$  на међународној шећерној скали.

5.4. Водено купатило, регулисано на  $60 \pm 1^\circ C$ .

#### 6. ПОСТУПАК

6.1. Контролно одређивање

С циљем стандардизације поступка, реагенса и опреме, спровести контролно одређивање у два паралелна одређивања, како је описано у наставку, користећи мјешавину 100 g млијека и 18 g чисте сахарозе или мјешавину 110 g обраног млијека и 18 g чисте сахарозе од којих свака одговара 40 g згуснутог (кондензованог) млијека са 45% сахарозе. Израчунати удио сахарозе помоћу формула наведених у тачки 7. користећи у формули 1. количину одваганог млијека те удио масти и бјеланчевина у том млијеку умјесто М, F и P, а у формули 2. умјесто M вриједност 40,00. Средња вриједност добијених вриједности не смије се разликовати за више од 0,2% од 45,0%.

6.2. Одређивање

6.2.1. Извагати приближно 40 g добро измијешаног узорка у стаклену чашу од 100 ml са тачношћу од 10 mg. Додати 50 ml вруће воде ( $80-90^\circ C$ ) и добро промијешати.

6.2.2. Квантитативно пренијети мјешавину у одмјерну тиквицу од 200 ml испирући чашу додатним количинама воде температуре  $60^\circ C$  до укупног волумена између 120 ml и 150 ml. Промијешати и оставити да се охлади до собне температуре.

6.2.3. Додати 5 ml разријеђеног раствора амонијака (4.4). Поново промијешати и оставити да стоји 15 минута.

6.2.4. Неутрализовати амонијак додавањем еквивалентне количине разријеђеног раствора сирћетне киселине (4.5). Претходно одредити тачан број милилитара титрацијом раствора амонијака користећи бромтимол плавило као индикатор (4.6). Промијешати.

6.2.5. Додати 12,5 ml раствора цинковог ацетата (4.1) лагано мијешајући ротирањем нагнуте тиквице.

6.2.6. Додати 12,5 ml раствора калијум-хексацијаноферата(II) (4.2) на исти начин као и раствор ацетата.

6.2.7. Садржај тиквице температуре  $20^\circ C$  допунити водом исте температуре ( $20^\circ C$ ) до 200 ml.

#### Напомена:

Током било које до сада описане фазе, потребно је додати воду или реагенсе на начин да се избјегне стварање мјехурића, а из истог разлога потребно је садржај промијешати ротирањем тиквице, а не потресањем. Ако се присуство мјехурића примијети прије надопуњавања до 200 ml, могуће их је уклонити привременим спајањем тиквице на вакуум пумпу и ротирањем тиквице.

6.2.8. Зачепити тиквицу сувим чепом и добро промијешати снажним потресањем.

6.2.9. Оставити да стоји неколико минута и затим профилтрирати преко сувог филтер папира. Првих 25 ml филтрата бацити.

6.2.10. Директна поларизација: одредити оптичку ротацију филтрата при  $20 \pm 1^\circ C$ .

6.2.11. Инверзија: отпипетирати 40 ml горе добијеног филтрата у одмјерну тиквицу од 50 ml. Додати 6,0 ml  $6,35$  mol/L хлоридне киселине или 7,5 ml  $5,0$  mol/L хлоридне киселине (4.3.).

Тиквицу ставити у водену купатилу на  $60^\circ C$ , 15 минута пажећи притом да цијели трбушаста дио тиквице буде уроњен. Мијешати кружним покретима првих пет минута при чему би садржај тиквице требало да достигне температуру воденог купатила. Охладити до  $20^\circ C$  и допунити до ознаке водом температуре  $20^\circ C$ . Промијешати и оставити да стоји један сат при тој температури.

6.2.12. Инвертна поларизација

Одредити ротацију инвертног раствора при  $20 \pm 0,2^\circ C$ . (Међутим, ако се температура T течности у поларизацијској цијеви разликује за више од  $0,2^\circ C$  током мјерења, потребно је урадити корекцију температуре према тачки 7.2).

#### 7. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

7.1. Метода израчунавања

Удио сахарозе израчунава се на сљедећи начин:

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

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

при чему је:

S = удио сахарозе

M = маса изваганог узорка, у грамима

F = проценат масти у узорку

P = проценат бјеланчевина у узорку

V = запремина на коју се узорак разређује прије филтрације, у милилитрима

v = корекција за запремину талога који се ствара током бистрења, у милилитрима

D = директно читање полариметра (поларизација прије инверзије)

I = читање полариметра након инверзије

L = дужина полариметријске цијеви, у дециметрима

Q = фактор инверзије чије су вриједности наведене у тачки 7.2.

*Напомене:*

(а) Када се одваже тачно 40,00 г згуснутог (кондензованог) млијека и када се употребљава полариметар са натријумовом свјетлошћу, угаоним степенима и полариметријском цијеви дужине 2 dm на 20,0 ± 0,1°C, удио сахарозе нормалног згуснутог (кондензованог) млијека (C = 9) може се израчунати на сљедећи начин:

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

(б) Уколико се инвертна поларизација мјери при температури различитој од 20°C, потребно је помножити вриједности са:

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

7.2. Вриједности фактора инверзије Q

Сљедећим формулама се израчунавају тачне вриједности фактора инверзије Q, за различите изворе свјетлости са корекцијама концентрације и температуре:

Натријумова свјетлост и полариметар са угаоним степенима:

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

Живина зелена свјетлост и полариметар са угаоним степенима:

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

Бијела свјетлост са дихроматским филтером и сахариметар са степенима међународне шећерне скале:

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

У горњим формулама:

C = проценат укупних шећера у инвертном раствору након поларизације

T = температура инвертног раствора при полариметријском читању

*Напомена 1:*

Процент укупних шећера C у инвертном раствору може се израчунати из директног читања и промјене након инверзије на уобичајени начин, користећи уобичајене вриједности за специфичне ротације сахарозе, лактозе и инвертног шећера.

Корекција 0,0006 (C-9) итд. тачна је само када је C приближно 9; за нормално згуснуто (кондензовано) млијеко ова корекција се може занемарити, будући да је C близу 9.

*Напомена 2:*

Одступање температуре од 20°C за 1°C представља малу разлику код директног читања, међутим одступање веће од 0,2°C код инвертног читања захтијева корекцију. Корекција – 0,0033 (T-20) итд. тачна је само између 18°C и 22°C.

7.2. Поновљивост

Разлика између резултата два одређивања која изводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим условима, не смије бити већа од 0,3 г сахарозе на 100 г згуснутог (кондензованог) млијека.

## МЕТОДА 6: ОДРЕЂИВАЊЕ МЛИЈЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ И ЛАКТАТА

### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом се одређује удио млијечне киселине и лактата, изражених као млијечна киселина, у:

- екстра масном млијеку у праху,
- пуномасном млијеку у праху,
- дјелимично обраном млијеку у праху,
- обраном млијеку у праху.

### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Удио млијечне киселине и лактата у млијеку у праху је удио млијечне киселине и лактата, изражених као млијечна киселина, одређен описаном методом.

### 3. ПРИНЦИП

Масти, бјеланчевине и лактоза истовремено се уклањају из раствора узорка додавањем бакар-сулфата или калцијум-хидроксида након чега слиједи филтрација.

Млијечна киселина и лактати у филтрату преводе се у ацеталдехид концентрованом сумпорном киселином уз присуство бакар(II)-сулфата.

Удио млијечне киселине одређује се колориметријски уз употребу п-хидроксибензила.

Удио млијечне киселине и лактата изражава се у милиграмима млијечне киселине на 100 г безмасне суве материје.

### 4. РЕАГЕНСИ

#### 4.1. Раствор бакар(II)-сулфата

Растворити 250 г бакар(II)-сулфата (CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O) у води и разриједити водом до 1000 ml.

#### 4.2. Суспензија калцијум-хидроксида.

4.2.1. Смрвити 300 г калцијум-хидроксида (Ca(OH)<sub>2</sub>) у тарионику са водом, користећи укупно 900 ml. Суспензија мора бити свјеже припремљена прије употребе.

#### 4.2.2. Суспензија калцијум-хидроксида.

Смрвити 300 г калцијум-хидроксида (Ca(OH)<sub>2</sub>) у тарионику са водом, користећи укупно 1400 ml. Суспензија мора бити свјеже припремљена прије употребе.

#### 4.3. Сумпорна киселина – раствор бакар(II)-сулфата

К 300 ml сумпорне киселине, 95,9-97,0% (m/m) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, додати 0,5 ml отопине бакар(II)- сулфата (4.1).

#### 4.4. Раствор п-хидроксибензила (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH)

Потресањем и лаганим загријавањем растворити 0,75 г п-хидроксибензила у 5 ml воденог раствора натријум-хидроксида, који садржи 5 г NaOH на 100 ml. У одмјерној тиквици разриједити водом до 50 ml. Раствор чувати у боци од смеђег стакла на тамном и хладном мјесту. Не употребљавати раствор ако дође до промјене боје или замућења. Максимална трајност раствора је 72 сата.

#### 4.5. Стандардни раствор млијечне киселине

Непосредно прије употребе отопити 0,1067 г литијевог лактата (CH<sub>3</sub>CH(OH)COOLi) у води и разриједити у одмјерној тиквици до 1000 ml. 1 ml овог раствора одговара 0,1 mg млијечне киселине.

#### 4.6. Стандардно реконституисано млијеко

Унапријед анализирати неколико узорака млијека у праху високог квалитета. За израду баждарне кривуље изабрати узорак са најмањом количином млијечне киселине, који садржи највише 30 mg млијечне киселине на 100 г безмасне суве материје. Спровести поступак описан у тачкама 6.2.1. и 6.2.2.

## 5. ОПРЕМА

- 5.1. Аналитичка вага
- 5.2. Спектофотометар са могућношћу читања на таласној дужини 570 nm.
- 5.3. Водено купатило температуре  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 5.4. Тарионик и тучак.
- 5.5. Филтер папир (Schleicher и Schull 595, Whatman 1 или папир истог квалитета).
- 5.6. Епрувете од пирекса или истог квалитета (димензије 25 x 150 mm).

### Напомена:

Све стаклено посуђе и прибор морају бити потпуно чисти и намијењени за употребу само у овом одређивању. Прије прања стаклено посуђе и прибор које садрже остатке талога испрати концентрованом хлоридном киселином.

## 6. ПОСТУПАК

### 6.1. Слијепа проба

Провести слијепу пробу тако да се 30 ml воде стави у градуирану епрувету од 50 ml и спровести поступак описан у тачкама 6.2.4. до 6.2.11. Ако слијепа проба са водом прелази еквивалентну количину од 20 mg млијечне киселине на 100 g безмасне суве материје, потребно је провјерити реагенсе и нечисте реагенсе или реагенс замијенити. Слијепу пробу извести паралелно с анализом узорка.

### 6.2. Одређивање

#### Напомена:

Избјежавати контаминацију прљавштином, посебно слином и знојем.

6.2.1. Одредити количину безмасне суве материје (у грамама) узорка одузимањем количине масти (одређене према Методи 4) и количине воде (одређене према Методи 2.) од 100.

6.2.2. Одвагати  $\frac{1000}{(a-10)}$  g узорка са тачношћу од 0,1 g.

Ову количину узорка додати у 100 ml воде и темељито промијешати.

6.2.3. 5 ml добијеног раствора отпипетирати у градуирану епрувету од 50 ml и разриједити водом до приближно 30 ml.

6.2.4. Потресајући епрувету лагано додати 5 ml раствора бакар(II)-сулфата (4.1) и оставити да стоји 10 минута.

6.2.5. Потресајући епрувету лагано додати 5 ml суспензије калцијум-хидроксида (4.2.1) или 10 ml суспензије калцијум-хидроксида (4.2.2).

6.2.6. Разриједити водом до 50 ml, снажно протрести. Оставити стајати 10 минута, а затим профильтрирати. Бацити први дио филтрата.

6.2.7. Отпипетирати 1 ml филтрата у епрувету (5.6).

6.2.8. У епрувету додати 6,0 ml раствора сумпорне киселине бакар(II)-сулфата помоћу бирете или градуиране пипете. Промијешати.

6.2.9. Загријавати у кључалом воденом купатилу пет минута. Охладити на собну температуру под млазом текуће воде.

6.2.10. Додати двије капи реагенса п-хидроксифенила (4.4) и снажно протрести како би се реагенс равномерно раширио у течности. Ставити епрувету у водено купатило на  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  и оставити 15 минута уз повремено потресање.

6.2.11. Ставити епрувету у кључало водено купатило 90 секунди. Охладити на собну температуру под млазом текуће воде.

6.2.12. Измјерити апсорбацију у односу на слијепу пробу (6.1) унутар три сата на таласној дужини наведеној у тачки 5.2.

6.2.13. Уколико је апсорбација већа од највише тачке стандардне кривуље, поновити тест користећи одговарајући разријеђени филтрат добијен у тачки 6.2.6.

### 6.3. Припрема стандарда

6.3.1. Отпипетирати 5 ml реконституираног млијека (4.6) у пет градуираних епрувета од 50 ml. У епрувете отпипетирати 0, 1, 2, 3 и 4 ml стандардног раствора (4.5) како би се добио распон стандарда који одговарају 0, 20, 40, 60 и 80 mg додате млијечне киселине на 100 g безмасне суве материје млијека у праху.

6.3.2. Разриједити водом до приближно 30 ml и спровести поступак описан у тачкама од 6.2.4. до 6.2.11.

6.3.3. Измјерити апсорбацију стандарда (6.3.1) у односу на слијепу пробу (6.1) на таласној дужини наведеној у тачки 5.2. Унијети у граф апсорбације за количине млијечне киселине из тачке 6.3.1, односно 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg и 80 mg на 100 g безмасне суве материје. Повући правац који најбоље пролази тачкама и израдити стандардну кривуљу помицањем правца паралелно на начин да пролази кроз изходиште полазну тачку.

## 7. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

### 7.1. Метода израчунавања

Прерачунати апсорбацију измјерену у тачкама 6.2.12. или 6.2.13. у mg млијечне киселине на 100 g безмасне суве материје у узорку служећи се стандардном кривуљом. Добијени резултат помножити са фактором разријеђивања у случају разријеђивања филтрата према тачки 6.2.13.

### 7.2. Поновљивост

Разлика између резултата два одређивања која изводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим условима, не смије бити већа од 8 mg млијечне киселине на 100 g безмасне суве материје за количине до 80 mg. За веће вриједности, ова разлика не смије бити већа од 10% најмање вриједности.

## МЕТОДА 7: ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ ФОСФАТАЗЕ

### (Модификовани Сандерс-Сагероов поступак)

#### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом се описује одређивање активности фосфатазе у:

- екстра масном млијеку у праху,
- пуномасном млијеку у праху,
- дјелимично обраном млијеку у праху,
- обраном млијеку у праху.

#### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Активност фосфатазе млијека у праху је мјерило количине присутне активне алкалне фосфатазе. Изражава се као количина фенола у  $\mu\text{g}$  који се ослобађа из 1 ml реконституисаног млијека, одређена описаном методом.

#### 3. ПРИНЦИП

Активност фосфатазе млијека у праху одређује се способношћу фосфатазе да ослободи фенол из динатријум-фенил фосфата. Количина отпуштеног фенола, под прописаним условима, одређује се спектрофотометријским мјерењем боје развијене Гибовим реагенсом.

#### 4. РЕАГЕНСИ

##### 4.1. Раствор А

Пуфер-баријум-борат хидроксид: рН  $10,6 \pm 0,1$  при  $20^\circ\text{C}$ .

Растворити 25,0 g баријум-хидроксида ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) у води и разриједити до 500 ml.

Отопити 11,0 g борне киселине ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) у води и разриједити до 500 ml.

Загријати оба раствора до  $50^\circ\text{C}$  и промијешати. Протрести и охладити мјешавину на собну температуру. Подесити рН на  $10,6 \pm 0,1$  помоћу раствора баријум-хидроксида и филтрирати. Раствор похранити у добро затвореној посуди. Прије употребе разриједити пуфер са једнаком количином воде.

#### 4.2. Раствор Б

Пуфер за развијање боје

Растворити 6,0 g натријум-метабората ( $\text{NaBO}_2$ ) (или 12,6 g  $\text{NaBO}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) и 20,0 g натријум-хлорида ( $\text{NaCl}$ ) у води и разриједити водом до 1000 ml.

#### 4.3. Раствор Ц

Раствор пуферског супстрата.

4.3.1. Растворити 0,5 g динатријум-фенил фосфата ( $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) у 4,5 ml раствора Б (4.2). Додати двије капи раствора Е (4.5) и оставити да стоји 30 минута. Екстраховати боју са 2,5 ml бутанола (4.10). Уколико је потребно поновити екстракцију боје. Након одвајања бутанол бацити. Овај раствор се може чувати неколико дана у фрижидеру. Прије употребе још једном развити и екстраховати боју.

4.3.2. Отпипетирати 1 ml овог раствора у одмјерну тиквицу од 100 ml и допунити до ознаке раствором А. Пуферски раствор припремити непосредно прије употребе.

#### 4.4. Раствор Д

Средство за таложење

Растворити 3,0 g цинк-сулфата ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) и 0,6 g бакар(II)-сулфата ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) у води и допунити водом до 100 ml.

#### 4.5. Раствор Е

Гибов реагенс

Растворити 0,040 g 2,6-дибромокинона -1,4-хлороимида ( $\text{OC}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{NCl}$ ) у 10 ml 96%-тног етанола. Раствор чувати у боци од тамног стакла у фрижидеру. Овај реагенс бацити када изгуби боју.

#### 4.6. Пуфер за разријивање боје

Разриједити 10 ml раствора Б (4.2), пуфера за развијање боје, водом до 100 ml.

#### 4.7. Раствор бакар-сулфата

Растворити 0,05 g бакар(II)-сулфата ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) у води и допунити водом до 100 ml.

#### 4.8. Стандардни раствор фенола

Растворити  $0,200 \pm 0,001$  g чистог фенола у води и допунити водом до 100 ml у одмјерној тиквици. Овај раствор се може чувати неколико мјесеци у фрижидеру.

Разриједити 10 ml овог раствора водом до 100 ml. Овај разријеђени раствор садржи 200  $\mu\text{g}$  фенола у 1 ml и може се употријевити за припрему јаче разријеђених раствора.

#### 4.9. Кључала дестилована вода

#### 4.10. n-бутанол.

### 5. ОПРЕМА

#### 5.1. Аналитичка вага

5.2. Водено купатило, са термостатски регулисаном температуром од  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

5.3. Спектофотометар са могућношћу читања на таласној дужини 610 nm.

5.4. Филтер папир (Schleicher and Schull 597, Whatman 42 или филтер папир истог квалитета).

#### 5.5. Јучало водено купатило.

#### 5.6. Алуминијска фолија.

### 6. ПОСТУПАК

Мјере опреза:

1. Избјежавати директно излагање сунчевој свјетлости.

2. Све стаклено посуђе и прибор, чепови и материјал за одстрањивање морају бити потпуно чисти. Препоручује се испирање и прокувавање у води или обрада паром.

3. Избјежавати употребу пластичних материјала (на примјер чепова) јер могу садржавати феноле.

4. Слина садржи фосфатазу, стога се контаминација слином у траговима мора пажљиво избјежавати.

#### 6.1. Припрема узорка

6.1.1. Са тачношћу од 0,1 g одвагати 10 g узорка и растворити у 90 ml воде. Температура за растварања праха ни у којем случају не смије бити виша од  $35^\circ\text{C}$ .

#### 6.2. Одређивање

6.2.1. У сваку од двије епрувете ставити 1 ml реконституисаног млијека припремљеног како је описано у тачки 6.1.1.

6.2.2. Загријавати једну од епрувета у кључалој води два минута. Прекрити епрувету и водено купатило (5.5) или, на примјер, чашу алуминијском фолијом (5.6) како би се обезбиједило загријавање цијеле епрувете. Хладном водом охладити на собну температуру. Ову епрувету употријевити за слијепу пробу. У свим поступцима који слиједу с обје епрувете поступати једнако.

6.2.3. Додати 10 ml раствора Ц (4.3.2). Промијешати и ставити епрувету у водено купатило на  $37^\circ\text{C}$  (5.2).

6.2.4. Инкубирати 60 минута у воденом купатилу уз повремено потресање.

6.2.5. Епрувете одмах пребацити у кључало водено купатило (5.5) и загријавати два минута, а затим охладити на собну температуру хладном водом.

6.2.6. Додати 1 ml раствора Д (4.4), промијешати и филтрирати преко сувог филтер папира. Бацати прве филtrate све док се не добије бистра течност.

6.2.7. 5 ml сваког филтрата ставити у епрувете, додати 5 ml раствора Б (4.2.) и 0,1 ml раствора Е (4.5). Промијешати.

6.2.8. Оставити да се боја развија 30 минута не излажући течност директној сунчевој свјетлости.

6.2.9. Измјерити апсорбацију раствора узорка у односу на слијепу пробу, на таласној дужини наведеној у тачки 5.3.

6.2.10. Поновити одређивање ако је апсорбација виша од апсорбације стандардног узорка са 20  $\mu\text{g}$  фенола припремљеног како је описано у тачки 7.

Ако се та граница пређе, разриједити одговарајући волумен реконституисаног млијека према тачки 6.1.1. одговарајућим волуменом млијека које је пажљиво прокувано како је описано у тачки 6.2.2. како би се инактивирала присутна фосфатаза.

### 7. ИЗРАДА СТАНДАРДНЕ КРИВУЉЕ

7.1. У четири одмјерне тиквице од 100 ml отпипетирати 1, 3, 5 и 10 ml стандардног раствора разријеђеног како је описано у тачки 4.8. и допунити водом до ознаке. Ови раствори садрже 2, 6, 10 и 20  $\mu\text{g}$  фенола по ml.

7.2. У епрувете отпипетирати 1 ml воде или 1 ml сваког стандардног раствора (7.1) како би се добила серија узорака који садрже 0 (вриједност слијепе пробе која се добија употребом 1 ml воде)- 2-6-10 и 20  $\mu\text{g}$  фенола.

7.3. У сваку епрувету редом отпипетирати 1 ml раствора бакар(II)-сулфата (4.7), 5 ml пуферског раствора за разријеђивање боје (4.6), 3 ml воде и 0,1 ml раствора Е. Промијешати.

7.4. Оставити епрувете 30 минута на собној температури не излажући их директној сунчевој свјетлости.

7.5. Измјерити апсорбацију раствора у свакој епрувети, у поређењу са вриједношћу слијепе пробе, на таласној дужини наведеној у тачки 5.3.

7.6. Израдити стандардну кривуљу уношењем вриједности апсорбације зависно од количине фенола у  $\mu\text{g}$  како је наведено у тачки 7.2.

#### 8. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

##### 8.1. Израчунавање

8.1.1. Прерачунати вриједности одређене у тачки 6.2.9. у  $\mu\text{g}$  фенола служећи се стандардном кривуљом.

8.1.2. Израчунати активност фосфатазе изражену у  $\mu\text{g}$  фенола по ml реконституисаног млијека према следећој формули:

$$\text{Активност фосфатазе} = 2,4 \times P$$

при чему је:

$P$  = количина фенола, према тачки 8.1.1, у  $\mu\text{g}$

8.1.3. Ако је било потребно разрјеђивање наведено у тачки 6.2.10, помножити резултат добијен у тачки 8.1.2. са фактором разрјеђивања.

##### 8.2. Поновљивост

Разлика између резултата два одређивања која изводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим условима, не смије бити већа од 2  $\mu\text{g}$  фенола ослобођеног из 1 ml реконституисаног млијека.

### МЕТОДА 8: ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ ФОСФАТАЗЕ

#### (Aschaffenburg-Müllener поступак)

##### 1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом се описује одређивање активности фосфатазе у:

- екстра масном млијеку у праху,
- пуномасном млијеку у праху,
- дјелимично обраном млијеку у праху,
- обраном млијеку у праху.

##### 2. ДЕФИНИЦИЈА

Активност фосфатазе млијека у праху је мјерило количине алкалне фосфатазе присутне у производу. Изражава се као количина п-нитрофенола у  $\mu\text{g}$  који се ослобађа из 1 ml реконституисаног узорка, под описаним условима.

##### 3. ПРИНЦИП

Реконституисани узорак разрјеђује се пуферским супстратом при рН 10,2 и инкубира при температури од 37°C два сата. Алкална фосфатаза присутна у узорку у тим околностима ослобађа п-нитрофенол из додатог динатријум п-нитрофенол фосфата. Ослобођени п-нитрофенол одређује се директним упоређивањем са стандардним обојеним стаклима у једноставном компаратору уз употребу рефлектоване свјетлости.

##### 4. РЕАГЕНСИ

###### 4.1. Пуферски раствор натријум-карбонат бикарбоната.

Растворити 3,5 g безводног натријум-карбоната и 1,5 g натријум-бикарбоната у води и разриједити водом до 1000 ml у одмјерној тиквици.

###### 4.2. Пуферски супстрат

Растворити 1,5 g динатријум п-нитрофенилфосфата у пуфер натријум-карбонат-бикарбонату (4.1) и разриједити пуфером (4.1) до 1000 ml у одмјерној тиквици.

Овај раствор је стабилан ако се чува у фрижидеру ( $\leq 4^\circ\text{C}$ ) мјесец дана, али на тако похрањеним растворима мора се спровести контролно испитивање боје (видјети тачку 6, Мјере опреза бр. 3).

###### 4.3. Раствори за бистрење.

###### 4.3.1. Раствор цинк-сулфата

Растворити 30,0 g цинк-сулфата ( $\text{ZnSO}_4$ ) у води и разриједити водом до 100 ml у одмјерној тиквици.

###### 4.3.2. Раствор калијум-хексацијаноферата(II)

Растворити 17,2 g калијум-хексацијаноферата(II) трихидрата ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) и разриједити водом до 100 ml у одмјерној тиквици.

##### 5. ОПРЕМА

###### 5.1. Аналитичка вага

5.2. Водено купатило, са термостатски регулисаном температуром од  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

5.3. Компаратор, са специјалним диском који садржи стандардна обојена стакла калибрирана у  $\mu\text{g}$  п-нитрофенола по ml млијека и кивете димензија 2 x 25 mm.

##### 6. ПОСТУПАК

###### Мјере опреза:

1. Након употребе, епрувете испразнити, испрати водом, опрати у врућој води која садржи алкални детерцент те затим темељито испрати чистом врућом текућом водом. На крају, прије употребе, епрувете испрати водом и осушити.

2. Пипете темељито испрати чистом хладном текућом водом одмах након употребе, затим испрати водом и осушити прије употребе.

3. Чепове епрувета темељито испрати врућом текућом водом одмах након употребе те затим ставити у кипућу воду двије минуте.

4. Раствор пуферског супстрата (4.2) требало би да остане стабилан најмање мјесец дана ако се чува у фрижидеру на температури од 4°C или нижој. Било каква нестабилност означена је појавом жуте боје. Док се резултати испитивања увијек читавају у односу на прокувани контролни узорак који садржи исти раствор пуферског супстрата, употреба раствора се не препоручује ако је вриједност боје већа од 10  $\mu\text{g}$  када се чита у кивети компаратора дужине 25 mm у односу на дестиловану воду у другој кивети дужине 25 mm.

5. Употребљавати посебну пипету за сваки узорак и избјежавати контаминацију пипете слином.

6. Током испитивања увијек треба избјежавати излагање сунчевој свјетлости.

###### 6.1. Припрема узорка

Растворити 10 g праха у 90 ml воде. Температура за растварање праха не смије бити виша од 35°C.

###### 6.2. Одређивање

6.2.1. Отпипетирати 15 ml пуферског супстрата (4.2.) у чисту, суву епрувету, те додати 2 ml реконституисаног узорка (6.1) који се испитује. Зачепити епрувету, промијешати окретањем и ставити у водено купатило на 37°C.

6.2.2. Истовремено у водено купатило ставити контролну епрувету која садржи 15 ml пуферског супстрата и 2 ml прокуваног реконституисаног узорка сличног ономе који се испитује.

6.2.3. Након два сата извадити обје епрувете из воденог купатила, додати 0,5 ml цинк-сулфата за таложње (4.3.1), поновно зачепити, снажно протрести и оставити да стоји три минута. Додати 0,5 ml калијум-хексацијаноферата(II) за таложње (4.3.2), темељито промијешати и филтрирати кроз набрани филтер папир и скупити бистри филтрат у чисту епрувету.

6.2.4. Пребацити филтрат у 25 mm кивету и успоредити са филтратом прокуваног контролног узорка у компаратору користећи посебан диск (5.3).



## 7. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

### 7.1. Израчунавање

Директно читање добијено у тачки 6.2.4. биљежи се као  $\mu\text{g}$  п-нитрофенола по ml узорка или по ml реконституисаног узорка.

### 7.2. Поновљивост

Разлика између резултата два одређивања која изводи исти аналитичар, истовремено или непосредно једно за другим, на истом узорку те под истим условима, не смије бити већа од  $2 \mu\text{g}$  п-нитрофенола ослобођеног из 1 ml реконституисаног млијека.

---