

ПЪРВА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 13 ноември 1979 година

**относно определяне на методи на Общността за анализ за изпитване на
някои частично или изцяло дехидратирани консервирани млека,
предназначени за консумация от човека**

(79/1067/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива на Комисията 76/118/ЕИО от 18 декември 1975 г., за сближаване на законодателствата на държавите-членки по отношение на някои видове частично и напълно дехидратирани консервирани млека за консумация от човека ¹, и по-специално член 11 от нея,

като има предвид, че съгласно член 11 от Директива 76/118/ЕИО се изисква проверка на състава на някои частично или изцяло дехидратирани консервирани млека чрез методи на Общността за анализ;

като има предвид, че е желателно да се приеме първоначална серия методи, по отношение на които са извършени проучвания;

като има предвид, че предвидените в настоящата директива мерки съответстват на становището на Постоянния комитет по храните,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки вземат всички мерки, необходими да се гарантира, че анализите за проверка на критериите, посочени в приложение I, се извършват в съответствие с методите, описани в приложение II.

Член 2

При определяне на алтернативни методи за единично определяне на проба може да се използва всеки един от методите. В протокола от изпитването, посочено в приложение II, трябва да се посочи кой метод е използван.

¹ ОВ L 24, 30.1.1976 г., стр. 49.

Член 3

Държавите-членки приемат закони, подзаконови и административни разпоредби, необходими за да се съобразят с настоящата директива в срок от 18 месеца от уведомяването ѝ. Те незабавно информират за това Комисията.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 13 ноември 1979 година.

За Комисията:

ETIENNE DAVIGNON

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

ОБХВАТ НА ПЪРВИТЕ МЕТОДИ НА ОБЩНОСТТА ЗА АНАЛИЗ, КОИТО СЛЕДВА ДА СЕ ПРИЛАГАТ В ДИРЕКТИВАТА ЗА НЯКОИ ЧАСТИЧНО ИЛИ ИЗЦЯЛО ДЕХИДРАТИРАНИ КОНСЕРВИРАНИ МЛЕКА

I. Общи разпоредби

II. Определяне на сухото вещество в:

- неподсладено кондензирано високомаслено мляко (като се използва метод 1, приложение II),
- неподсладено кондензирано мляко (използвайки метод 1, приложение II),
- неподсладено кондензирано частично обезмаслено мляко (като се използва метод 1, приложение II),
- неподсладено кондензирано обезмаслено мляко (като се използва метод 1, приложение II),
- подсладено кондензирано мляко (като се използва метод 1, приложение II),
- подсладено кондензирано частично обезмаслено мляко (като се използва метод 1, приложение II),
- подсладено кондензирано обезмаслено мляко (като се използва метод 1, приложение II).

III. Определяне на влагата в:

- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах (като се използва метод 2, приложение II),
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах (като се използва метод 2, приложение II),
- частично обезмаслено сухо мляко или частично обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 2, приложение II),
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 2, приложение II),

IV. Определяне на масленото съдържание в:

- неподсладено кондензирано високомаслено мляко (като се използва метод 3, приложение II),
- неподсладено кондензирано мляко (като се използва метод 3, приложение II),

- неподсладено кондензирано частично обезмаслено мляко (като се използва метод 3, приложение II),
- неподсладено кондензирано обезмаслено мляко (като се използва метод 3, приложение II),
- подсладено кондензирано мляко (като се използва метод 3, приложение II),
- подсладено кондензирано частично обезмаслено мляко (като се използва метод 3, приложение II),
- подсладено кондензирано обезмаслено мляко (като се използва метод 3, приложение II),
- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах (като се използва метод 4, приложение II),
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах (като се използва метод 4, приложение II),
- сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 4, приложение II),
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 4, приложение II),

V. Определяне на захарозата в:

- подсладено кондензирано мляко (като се използва метод 5, приложение II),
- подсладено кондензирано частично обезмаслено мляко (като се използва метод 5, приложение II),
- подсладено кондензирано обезмаслено мляко (като се използва метод 5, приложение II).

VI. Определяне на млечната киселина и лактатите в:

- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах (като се използва метод 6, приложение II),
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах (използвайки метод 6, приложение II),
- сухо, частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 6, приложение II),
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 6, приложение II).

VII. Определяне на фосфатазната активност в:

- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах (като се използва метод 7 или 8, приложение II),
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах (като се използва метод 7 или 8, приложение II),
- сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 7 или 8, приложение II),
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах (като се използва метод 7 или 8, приложение II).

ПРИЛОЖЕНИЕ II

МЕТОДИ НА АНАЛИЗ, СВЪРЗАНИ СЪС СЪСТАВА НА НЯКОИ ПРОДУКТИ ОТ ЧАСТИЧНО ИЛИ ИЗЦЯЛО ДЕХИДРАТИРАНО КОНСЕРВИРАНО МЛЯКО, ПРЕДНАЗНАЧЕНИ ЗА КОНСУМАЦИЯ ОТ ЧОВЕКА

ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ

1. ПОДГОТОВКА НА ПРОБА ЗА ХИМИЧЕСКИ АНАЛИЗ

1.1 Неподсладено високомаслено кондензирано мляко

Неподсладено кондензирано мляко

Неподсладено кондензирано частично обезмаслено мляко

Неподсладено кондензирано обезмаслено мляко

Затвореният бидон се разклаща и се обръща обратно, отваря се и млякото бавно се прелива в друг съд, който може да се затваря херметически. Съдържанието се размесва чрез няколкократно прехвърляне. Цялото количество мляко, останало по стените и ръбовете на бидона, и масленият слой трябва да се включат в пробата. Съдът се затваря. Ако съставките не са добре хомогенизирани, съдът се слага на водна баня при 40 °C, като се разклаща енергично на всеки 15 min. След 2 часа се изважда от водната баня и се оставя на стайна температура. Капакът се маха, съдържанието на съда се размесва с лъжица или шпатула (ако мазнината се е отделила, пробата не се изпитва). Съхранява се на хладно.

Подсладено кондензирано мляко

Подсладено кондензирано частично обезмаслено мляко

Подсладено кондензирано обезмаслено мляко

Бидони: Затвореният бидон се слага на водна баня при 30 °C - 40 °C за около 30 min. Капакът се отваря и съдържанието се размесва добре с шпатула или лъжица с движения нагоре-надолу и с въртеливи движения за получаване на хомогенна смес. В пробата трябва да се включи цялото количество мляко, включително и полепналото по стените и дъното на бидона. Съдържанието се изсипва в друг съд, снабден с херметичен капак, затваря се и се съхранява на хладно.

Туби: Краят на тубата се срязва и съдържанието се изсипва в съд, снабден с херметичен капак, след което тубата се разрязва по дължина, остъргва се целият материал, полепнал по вътрешността, и внимателно се смесва с останалото количество. Съдът се съхранява на хладно.

Сухо мляко или мляко на прах с високо съдържание на мазнини

Сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах

Сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах

Сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах

Сухото мляко се поставя в чист, сух, (херметически) се съд с вместимост, равна на двойния обем на сухото мляко. Съдът се затваря веднага, съдържанието му се размесва добре чрез разклащане и обръщане. По време на подготовката на пробата се избягва достъпът на въздух с цел намаляване до минимум абсорбцията на влага.

2. РЕАГЕНТИ

2.1 Вода

2.1.1. Когато се споменава вода за разтваряне, разреждане или измиване, се има предвид използване на дестилирана вода или деминерализирана вода, която е най-малкото еднакво чиста.

2.1.2 Винаги, когато става въпрос за „разтваряне”, „разтвор” или „разреждане” без допълнителни указания, трябва да се разбира „разтваряне във вода”, „воден разтвор” или „разреждане с вода”.

2.2. Химикали

Всички химикали трябва са реагенти с квалификация чист анализ (ч.з.а.), освен ако не е упоменато друго.

3. ОБОРУДВАНЕ

3.1. Списъци на апаратура

Списъците на апаратурата съдържат само онези негови елементи, които са със специализирана употреба и с конкретна спецификация.

3.2. Аналитична везна

Аналитична везна означава аналитична везна с разделителна способност най-малко 0,1 mg.

4. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

4.1. Изчисляване на процента

Резултатите се изчисляват в проценти от масата на пробата, освен ако не е упоменато друго.

Брой на значимите цифри

Всеки резултат се изразява със значими цифри, толкова на брой, колкото изисква точността на използвания метод за анализ.

5. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕ

В протокола от изпитването се посочват: използваният метод за

анализ, получените резултати, всички подробности относно начина на работа, неспецифицирани в метода за анализ, или такива по избор, както и условията, които може да са повлияли на получените резултати. Протоколът от изпитването трябва да съдържа цялата информация за идентифициране на пробата.

МЕТОД 1: ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА СУХО ВЕЩЕСТВО

(в сушилня при 99 °C)

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Този метод определя съдържанието на сухо вещество на:

- Неподсладено високомаслено кондензирано мляко,
- неподсладено кондензирано мляко,
- неподсладено кондензирано частично обезмаслено мляко,
- неподсладено кондензирано обезмаслено мляко,
- подсладено кондензирано мляко,
- подсладено кондензирано частично обезмаслено мляко,
- подсладено кондензирано обезмаслено мляко.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържание на сухото вещество на кондензирани млека е съдържанието на сухото вещество, определено по този специфициран метод.

3. ПРИНЦИП

Определено количество от пробата се разрежда с вода, разбърква се с пясък и се изсушава при температура 99 °C +/- 1 °C. Получената след изсушаване маса е съдържанието на сухото вещество и се изчислява като процент от масата на пробата.

4. РЕАГЕНТИ

Кварцов или морски пясък, обработен със солна киселина (размер на песъчинките от 0,18 mm до 0,5 mm, прекарани през сито 500 m и задържани в сито 180 m). Той трябва да отговаря на следното контролно изпитване:

В сушилнята се нагряват около 25 g от пясъка в продължение на 2 часа (точка 5.3), както е описано в точки от 6.1 до 6.3. Добавят се 5 ml вода, отново се нагрява в сушилнята за 2 часа, охлажда се и се

претегля. Разликата между двете маси не трябва да надвишава 0,5 mg. Ако е необходимо, пясъкът се обработва с 25% разтвор на солна киселина в продължение на 3 дни, като от време на време се разбърква. Промива се с вода до изчезване на киселинната реакция или с промиваща вода, която няма свободни хлориди. Изсушава се при 160 °C, след което изпитването се повтаря.

5. АПАРАТУРА

- 5.1. Аналитична везна.
- 5.2. Метални тигли, за предпочитане от никел, алуминий или неръждаема стомана. Тиглите трябва да са снабдени с капаци, които да се затварят плътно, но могат да бъдат отворени лесно. Подходящи размери са: диаметър от 60 mm до 80 mm и дълбочина около 25 mm.
- 5.3. Сушилня при атмосферно налягане с добра вентилация, термостатично регулирана при 99 °C +/- 1 °C. Температурата трябва да е равномерна в цялата пещ..
- 5.4. Ексикатор, съдържащ прясно активиран силикагел с индикатор за водното съдържание или еквивалентен изсушител.
- 5.5. Стъклени пръчки, сплескани в единия край, с дължина, позволяваща да влизат в металните тигли (точка 5.2).
- 5.6. Вряща водна баня.

6. ПРОЦЕДУРА

- 6.1. В тигела (точка 5.2) се поставят около 25 g пясък (точка 4) и къса стъклена пръчка (точка 5.5).
- 6.2. Без да се покрива, тигелът се поставя заедно с капака в сушилната пещ (точка 5.3) за два часа.
- 6.3. Слага се капакът на тигела и се поставят в ексикатора (точка 5.4), оставят се да се охладят до стайна температура, след което се измерва масата с точност до 0,1 mg (M_0).
- 6.4. Тигелът се наклонява на една страна и в свободната част се поставят около 1,5 g от пробата подсладено кондензирано мляко или 3 g от неподсладено кондензирано мляко. Слага се капакът. Масата се претегля с точност до 0,1 mg (M_1).
- 6.5. Капакът се маха, добавят се 5 ml вода (80 °C - 90 °C) и с помощта на стъклена пръчка течностите се смесват. След това получената течност се смесва с пясъка. Стъклената пръчка се оставя в сместа.
- 6.6. Тигелът се поставя на вряща водна баня (точка 5.6) до изпаряване на водата.
Това продължава около 20 min. С цел поддържане на доброто аериране на сместа, тя трябва от време на време да се разбърква с пръчката, така че след като се изсуши, да не бъде във формата на пита. Пръчката се оставя в тигела.
- 6.7. Тигелът и капакът се слагат в сушилната за час и половина.

- 6.8. Капакът се маха и тигелът се прехвърля в ексикатора (точка 5.4), охлажда се до стайна температура и се премерва с точност до 0,1 mg.
- 6.9. Тигелът и капакът се поставят отново в сушилната пещ, като капакът се маха и се загрява за още 1 час.
- 6.10. Повтаря се процесът от точка 6.8.
- 6.11. Повтарят се описаните процеси в точка 6.9 и 6.10, докато разликата в масите при две последователни измервания стане по-малка от 0,5 mg или докато масата започне да се увеличава. Ако се установи увеличение на масата, трябва да се използва най-малката маса, необходима за изчислението (точка 7.1). Крайната записана маса трябва да е M_2 g.

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7.1. Метод на изчисление

Съдържанието на сухото вещество, изчислено като процент от масата на пробата, се изчислява като:

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

при което:

M_0 = масата, измерена в грамове, на съда, капака му и пясъка, след процеса описан в точка 6.3;

M_1 = масата, измерена в грамове, на съда, капака му и пробата, след процеса описан в точка 6.4;

M_2 = масата, измерена в грамове, на съда, капака му и изсушената проба, след процеса описан в точка 6.11.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 0,2 g сухо вещество на 100 g продукт.

8. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА ОБЩО МЛЕЧНО СУХО ВЕЩЕСТВО И НА СУХ БЕЗМАСЛЕН ОСТАТЪК.

- 8.1. Общото съдържание на млечно сухо вещество на подсладено кондензирано мляко се представя чрез: Общото съдържание на млечно сухо вещество (получено по метод 1, приложение II) минус съдържанието на захароза (получено по метод 5, приложение II).
- 8.2. Съдържанието на сухия обезмаслен млечен остатък в подсладено кондензирано мляко се определя като:

От общото съдържание на млечно сухо вещество (получено по метод 1 приложение II) се извадят съдържанието на захарозата (получено по метод 5, приложение II) и масленото съдържание (получено по метод 3, приложение II).

- 8.3. Съдържанието на сухия безмаслен млечен остатък от неподсладено кондензирано мляко се определя като :

От общото сухо вещество (получено по метод 1, приложение II) се извади масленото съдържание (получено по метод 3, приложение II).

МЕТОД 2: ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВЛАГА

(в сушилна пещ при 102 °C)

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

С този метод се определя загубата на маса при изсушаване на:

- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах,
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах,
- сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах,
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържанието на влага е загубата на маса при сушене по начина, определен от посочения метод.

3. ПРИНЦИП

Остатъчната маса на изпитваната проба се определя след изсушаване при атмосферно налягане в сушилна пещ при температура $102\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ до получаване на константна маса. Загубата на маса се изчислява като процент от масата на пробата.

4. АПАРАТУРА

- 4.1. Аналитична везна.

- 4.2. Тигли с плоско дъно, изработени от некорозиращ материал, като никел, алуминий, неръждаема стомана или стъкло. Тиглите трябва да са снабдени с капаци, които да се затварят плътно, но могат да бъдат отворени лесно. Подходящите размери са: диаметър от 60 mm до 80 mm и дълбочина около 25 mm.

- 4.3. Сушилня при атмосферно налягане с добра вентилация, термостатично контролирана при $102\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Температурата трябва да е равномерна в цялата пещ.

- 4,4, Ексикатор, съдържащ прясно активиран силикагел с индикатор за водно съдържание или еквивалентен изсушител.

5. ПРОЦЕДУРА

- 5.1. Тигелът се отваря (точка 4.2) и се поставя заедно с капака в сушилната пещ (точка 4.3). Загрява се за около един час.
- 5.2. Тигелът се затваря с капака и се прехвърля в ексикатора (точка 4.4). Охлажда се до стайна температура и се претегля с точност до 0,1 mg (M_0).
- 5.3. В тигела се поставят около 2 g от пробата сухо мляко, затваря се с капака и се претегля с точност до 0,1 mg, колкото е възможно по-бързо (M_1).
- 5.4. Тигелът се отваря и се слага заедно с капака в пещта за два часа.
- 5.5. Поставя се капакът и тигелът се прехвърля в сушилната, оставя се да се охлади до стайна температура и се претегля с точност до 0.1 mg.
- 5.6. Тигелът се отваря и се поставя заедно с капака в пещта за 1 час.
- 5.7. Повторя се процесът описан в точка 5.5.
- 5.8. Повтарят се от точки 5.5 и 5.6, докато разликата в масите при две последователни измервания стане по-малка от 0,5 mg или докато масата започне да се увеличава. Ако се установи увеличение на масата, трябва да се използва най-малката маса, необходима за изчислението (точка 6.1). Крайната записана маса трябва да е M_2 g.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

6.1. Метод на изчисление

Загубата на масата при сушенето на пробата се изчислява в проценти по формулата.

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

където:

M_0 = измерената в грамове маса на тигела и на капака след процеса в точка 5.2;

M_1 = измерената в грамове маса на тигела и на капака и на пробата, след процеса описан в 5.3;

M_2 = измерената в грамове на тигела и на капака и пробата, след процеса описан в 5.5.

6.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 0,1 g влага на 100 g продукт.

МЕТОД 3: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАСЛЕНОТО СЪДЪРЖАНИЕ В КОНДЕНЗИРАНИ МЛЕКА (МЕТОД РОЗЕ-ГОТЛИБ)

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

С този метод се определя съдържанието на:

- Неподсладено високомаслено кондензирано мляко,
- неподсладено кондензирано мляко,
- наподсладено кондензирано частично обезмаслено мляко,
- неподсладено кондензирано обезмаслено мляко,
- подсладено кондензирано мляко,
- подсладено кондензирано частично обезмаслено мляко,
- подсладено кондензирано обезмаслено мляко.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържание на мазнини в кондензирани млека е съдържанието на мазнини, изчислено по посочения метод.

3. ПРИНЦИП

Масленото съдържание се определя чрез екстрахиране на мазнините от амонячно-алкохолен разтвор на пробата посредством диетилов или петролев етер, изпаряване на разтворителите и претегляне на утайката. Изчислява се като процент от масата на пробата съгласно метода на **Розе-Готлиб**.

4. РЕАГЕНТИ

Всички реагенти трябва да отговарят на изискванията, определени при празната проба (точка 6.1). Ако е необходимо, реагентите се редестилират в присъствието на около 1 g млечна мазнина на 100 ml разтворител.

- .4.1. Амонячен разтвор приблизително 25 % (m/m) NH_3 (с плътност 0,91 g/ml при 20 °C) или по-силен разтвор с известна концентрация.
- .4.2. Етанол 96 % +/- 2 % (o/o) или при липсващ такъв - етилов алкохол, денатуриран с метилов алкохол, етил-метилкетон или петролев етер.
- 4.3. Диетилов етер, свободен от пероксиди.

Забележка 1:

Изпитването за пероксиди се извършва, като в малък цилиндър със стъклена запушалка (предварително промит с етер) се поставят 10 ml от етера и се прибавя 1 ml прясно приготвен 10 % разтвор на калиев йодид. Сместа се разклаща и се оставя да престои 1 min. Не трябва да се появи жълто оцветяване в нито един от двата слоя.

Забележка 2:

Диетиловият етер се предпазва от образуване на пероксиди чрез поставяне в съд на мокро цинково фолио, което предварително е било потопено в разреден подкиселен разтвор на меден сулфат ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в продължение на 1 min и е било измито с вода. За 1 L диетилов етер се използва приблизително 8000 mm^2 цинково фолио, нарязано на ленти, чиято дължина трябва да стига най-малко до половината от височината на съда.

- 4.4 Петролев етер с точка на кипене от 30 до 60 °C.
- 4.5. Смесен разтворител, приготвен непосредствено преди употреба чрез смесване на равни обеми диетилов етер (точка 4.3) и петролев етер (точка 4.4). Смесеният разтворител може да се замени с диетилов или петролев етер.

5. АПАРАТУРА

- 5.1. Аналитична везна.
- 5.2. Подходящи екстракционни епруветки или колби, снабдени със запушалки от матово стъкло или други запушалки, nereагиращи на използваните разтворители.
- 5.3. Колби - тънкостенни и с плоско дъно, с вместимост от 150 ml до 250 ml.
- 5.4. Сушилна пещ при атмосферно налягане с добра вентилация, термостатично контролирана (регулирана за работа при $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 5.5. Антипенителни гранули, които не съдържат мазнини, не са порьозни и ронливи, като стъклени перли или гранули от силиконов карбид (използването на този материал е по избор - виж точка 6.2.1).
- 5.6. Сифон, който съответства на екстракционните епруветки.
- 5.7. Центрофуга (по избор).

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. Празна проба

Едновременно с определяне на масленото съдържание на пробата се провежда и т.нар. празна проба с 10 ml вода, като се използват същите съдове за екстракция, същите количества реагенти и същите процедури, както са описани в точка 6.2, с изключение на точка 6.2.2. Ако резултатът превишава 0,5 mg, реагентите трябва да се проверят и замърсеният реактив или реагенти трябва да се пречистят или сменят.

6.2. Определяне

- 6.2.1. Изсушава се колба (точка 5.3) в сушилнята (точка 5.4) за 30 min до 60 min (ако е необходимо се поставят и няколко антипенителни гранули (точка 5.5) с цел да се подпомогне разтворът да заври спокойно чрез последващо отстраняване на разтворителите). Колбата се охлажда до стайна температура, след което се претегля с точност до 0,1 mg.
- 6.2.2. Приготвената проба се размесва директно във или чрез разликата в съдовете за екстракция (точка 5.2), след което с точност до 1 mg се претеглят от 2 g до 2,5 g от пробата, ако е подсладена, или от 4 g до 5 g от пробата, ако не е подсладена, директно или чрез разликата в екстракционния апарат (точка 5.2). Добавя се вода до 10,5 ml, размесва се внимателно при леко затопляне от 40 °C до 50 °C до пълно диспергиране на продукта. Пробата трябва да е напълно диспергирана; в противен случай определянето трябва да се повтори.
- 6.2.3. Прибавя се 1,5 ml 25 % амонячен разтвор (точка 4.1) или еквивалентен обем от разтвор с по-висока концентрация и се смесват.
- 6.2.4. Прибавят се 10 ml етанол (точка 4.2) и течностите се смесват спокойно и внимателно в отворения съд.
- 6.2.5. Прибавят се 25 ml диетилов етер (точка 4.3). Охлажда се под течаща вода. Съдът се затваря, енергично се разклаща и се обръща многократно в продължение на 1 min.

Запушалката се маха внимателно, прибавят се 25 ml петролев етер (точка 4.4), като с първите няколко милилитра се промиват запушалката и отворът на съда, така че разтворителят да изтече в съда. Запушалката се поставя и съдът се разклаща и обръща в продължение на 30 сек.. Не се разклаща прекомерно силно, ако не се предвижда центрофугиране, както е описано в точка 6.2.6. Запушалката се маха внимателно, прибавят се 25 ml петролев етер (точка 4.4), като с първите няколко милилитра се промиват запушалката и отворът на съда, така че разтворителят да изтече в съда. Запушалката се поставя и съдът се разклаща и обръща в продължение на 30 сек.. Не се разклаща прекомерно силно, ако не се предвижда центрофугиране, както е описано в точка 6.2.7. Съдът се оставя в покой за 90 min - 120 min до избистряне на горния пласт и пълното му разделяне от водния слой. Разделянето на двата пласта може да се постигне и чрез центрофугиране с подходяща центрофуга (точка 5.7).

Забележка:

При използване на центрофуга, която не е снабдена с трифазен двигател, могат да се появят искри, поради което е необходимо да се вземат мерки за предпазване от експлозия или пожар в резултат на изпаряване на етера (като счупване на епруветка).

- 6.2.8. Запушалката се маха и едновременно с отвора на съда се промива с няколко милилитра от смесения разтворител (точка 4.5), при което течността трябва да се стече в съда. В колбата (точка 6.2.1) се прехвърля внимателно възможно най-голямо количество от плаващия по повърхността слой чрез декантиране или с помощта на сифон (точка 5.6).

Забележка:

В случаите, когато прехвърлянето не се извършва със сифон, може да се наложи прибавяне на малко количество вода, за да се повдигне нивото на граничещата между двата пласта повърхност, което да улесни декантирането.

6.2.9. Външната и вътрешната страна на отвора на съда или края и долната част на сифона се изплакват с няколко милилитра от смесения разтворител(точка 4.5). Утайката от външната част на съда се събира в колбата, а утайката от вътрешната част на отвора и от сифона се събира в съда за екстракция.

6.2.10. Повторно се екстрахира, като се повтаря процедурата от точка 6.2.5 - 6.2.9, но се използват само 15 ml диетилов етер и 15 ml петролев етер.

6.2.11. Екстрахира се трети път, като процедурата, описана в точка 6.2.10, се повтаря, но не се провежда крайното утаяване (точка 6.2.9).

Забележка. При анализ на проби от неподсладено обезмаслено кондензирано мляко и подсладено обезмаслено кондензирано мляко третото екстрахиране не е задължително.

6.2.12. Внимателно се изпарява или се дестилира, колкото е възможно повече от разтворителя (включително и етанола). Ако колбата е с малка вместимост, известна част от разтворителя се отстранява след всяка екстракция.

6.2.13. Когато миризмата на разтворителите не е напълно отстранена, колбата се поставя в сушилната пещ и се загрева в продължение на 1 час.

6.2.14. Колбата се изважда от пещта, охлажда се до стайна температура и се претегля с точност до 0, 1 mg.

6.2.15. Процедурите от точка 6.2.13 и 6.2.14 се повтарят, като колбата се нагрява в продължение на 30 min до 60 min, докато разликата в масите при две последователни измервания стане по-малко от 0,5 mg или докато масата започне да се увеличава. Ако се установи увеличение на масата, трябва да се използва най-малката маса, необходима за изчислението (точка 7.1). Крайната записана маса трябва да е M_1 g.

6.2.16. Прибавят се от 15 ml до 25 ml петролев етер, за да се установи, че екстрахираният материал е напълно разтворим. Затопля се умерено и разтворителят се разклаща чрез завъртане на колбата, докато цялото количество мазнина се разтвори.

6.2.16.1. Когато екстрахираният материал е напълно разтворим в петролев етер, масата на мазнината се определя от разликата между стойностите от точка 6.2.1 и 6.2.15.

6.2.16.2. Когато е налице неразтворим материал или има съмнение за такъв, мазнината се екстрахира напълно от колбата чрез три последователни промивания с топъл петролев етер и се оставя неразтвореният материал да се утаи преди всяко декантиране. Външната страна на отвора на колбата се промива трикратно. Колбата се поставя в сушилната и се нагрява в продължение на 1 час. Колбата се охлажда до стайна температура както в

точка 6.2.1 и се претегля с точност до 0,1 mg. Масата на мазнината се определя като разлика между масата, получена в точка 6.2.15, и крайната маса.

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7.1. Изчисление

Масата на екстрахираните мазнини (г) е:

$$(M_1 - M_2) - (V_1 - V_2)$$

а масленото съдържание в пробата, изразено в проценти, се определя по формулата:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (V_1 - V_2)}{S} \times 100$$

където:

M_1 = масата на колба М в грамове, заедно с мазнината, след фаза 6.2.15;

M_2 = масата на колба М в грамове, след фаза 6.2.1 или, в случай на неразтворен материал или съмнение, фаза 6.2.16.2;

V_1 = маса на колба В на празната проба, в грамове, след фаза 6.2.15;

V_2 = масата на колба В, в грамове, след фаза 6.2.1 или, в случай на неразтворен материал или съмнение за такъв, фаза 6.2.16.2;

S = масата на използваната проба в грамове.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 0,05 g мазнина в 100 g продукт.

МЕТОД 4: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАСЛЕНОТО СЪДЪРЖАНИЕ В СУХИ МЛЕКА (МЕТОД РОЗЕ-ГОТЛИБ)

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

С този метод се определя масленото съдържание на млеката в:

- Сухо високомаслено мляко или мляко на прах,
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах

- сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах,
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Маслено съдържание на сухи млека е съдържанието на мазнини, определено чрез посочения метод.

3. ПРИНЦИП

Масленото съдържание се определя гравиметрично чрез екстрахиране на мазнината от амонячно-алкохолен разтвор на мляко посредством диетилов или петролев етер, изпаряване на разтворителите и претегляне на остатъка. Изчислява се като процент от масата на пробата съгласно метода на Розе-Готлиб.

4. РЕАГЕНТИ

Всички реагенти трябва да отговарят на изискванията, определени в празната проба (точка 6.1). Ако е необходимо, реагентите може да се редестилират в присъствието на около 1 g млечна мазнина в 100 ml разтвор.

4.1. Амонячен разтвор приблизително 25 % (m/m) NH_3 (с плътност около 0,91 g/ml при 20 °C) или по-силен разтвор с известна концентрация.

4.2. Етилов алкохол 96 +/- 2 % (o/o) или етилов алкохол, денатуриран с метилов алкохол, етил-метил кетон или петролев етер.

4.3. Диетилов етер, свободен от пероксиди.

Забележка 1:

Изпитването за пероксиди се извършва, като в малък цилиндър със стъклена запушалка (предварително промит с етер) се поставят 10 ml от етера и се прибавя 1 ml прясно приготвен 10 % разтвор на калиев йодид. Сместа се разклаща и се оставя да престои 1 min. Не трябва да се появи жълто оцветяване в нито един от двата слоя.

Забележка 2:

Диетиловият етер се предпазва от образуване на пероксиди чрез добавяне на мокро цинково фолио, предварително потопено в подкиселен разреден разтвор на меден сулфат ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) за една минута и промито с вода. За 1 L диетилов етер се използва приблизително 8000 mm² цинково фолио, нарязано на ленти, чиято дължина трябва да стигне най-малко до половината от височината на съда.

4.4. Петролен етер с температура на кипене от 30 до 60 °C.

4.5. Смесен разтворител, приготвен непосредствено преди употреба чрез смесване на равни обеми диетилов (точка 4.3) и петролев етер (точка 4.4). Смесеният разтворител може да се замени с диетилов или петролев етер.

5. АПАРАТУРА

5.1. Аналитична везна.

5.2. Подходящи екстракционни епруветки или колби, снабдени със запушалки от матово стъкло или други запушалки, които не влизат в реакция с използваните разтворители.

5.3. Колби - тънкостенни и с плоско дъно, с вместимост от 150 ml до 250 ml.

5.4. Сушилня при атмосферно налягане с добра вентилация, термостатично контролирана при 102 °C +/- 1 °C.

5.5. Антипенителни гранули, които не съдържат мазнини, не са порьозни и ронливи, като стъклени перли или гранули от силиконов карбид (използването на този материал е по избор - виж точка 6.2.1).

5.6. Водна баня от 60 до 70 °C.

5.7. Сифон, който съответства на екстракционните епруветки.

5.8. Центрофуга (по избор).

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. Празна проба

Едновременно с определяне на масленото съдържание на пробата се провежда и т.нар. празна проба с 10 ml вода, като се използват същите съдове за екстракция, същите количества реагенти и същите процедури, както са описани в точка 6.2, с изключение на точка 6.2.2. Ако резултатът превишава 0,5 mg, реагентите трябва да се проверят и замърсеният реактив или реагенти трябва да се пречистят или подменят.

6.2. Определяне

6.2.1. Изсушава се колба (точка 5.3) в сушилнята (точка 5.4) за 30 min до 60 min (ако е необходимо, се поставят и няколко антипенителни гранули (точка 5.5) с цел да се подпомогне разтворът да заври умерено чрез последващо отстраняване на разтворителите). Колбата се охлажда до стайна температура, след което се претегля с точност до 0,1 mg.

6.2.2. Прецизно се претегля с точност до 1 mg директно във или чрез разлика в съдовете за екстракция (точка 5.2) около 1 g пълномаслено мляко на прах или около 1,5 g частично обезмаслено или обезмаслено мляко на прах. Прибавят се 10 ml вода и внимателно се разклаща, докато млякото на прах се разтвори напълно. За някои проби може да се наложи и загряване.

6.2.3. Прибавят се 1,5 ml 25 % амонячен разтвор (точка 4.1) или еквивалентен обем от разтвор с по-висока концентрация. Поставя се на водна баня (точка 5.6) за 15 min при 60 °C - 70 °C, като от време на време се разбърква. Охлажда се например под течаща вода.

6.2.4. Прибавят се 10 ml етанол (точка 4.2) и течностите се смесват спокойно и внимателно в отворения съд.

6.2.5. Прибавят се 25 ml диетилов етер (точка 4.3). Охлажда се под течаща вода. Съдът се затваря, енергично се разклаща и се обръща многократно в продължение на 1 min.

6.2.6. Запушалката се маха внимателно, прибавят се 25 ml петролев

етер (точка 4.4), като с първите няколко милилитра се промиват запушалката и отворът на съда, така че разтворителят да изтече в съда. Запушалката се поставя и съдът се разклаща и обръща в продължение на 30 сек.. Не се разклаща прекомерно силно, ако не се предвижда центрофугиране, както е описано в точка 6.2.7. Съдът се оставя в покой до избистряне на горния пласт и пълното му разделяне от водния слой. Разделянето на двата пласта може да се постигне и чрез центрофугиране с подходяща центрофуга (точка 5.8).

Забележка:

При използване на центрофуга, която не е снабдена с трифазен двигател, могат да се появят искри, поради което е необходимо да се вземат мерки за предпазване от експлозия или пожар в резултат на изпаряване на етера (като счупване на епруветка).

6.2.8. Запушалката се маха и едновременно с отвора на съда се промива с няколко милилитра от смесения разтворител (точка 4.5), при което течността трябва да се стече в съда. В колбата (точка 6.2.1) се прехвърля внимателно възможно най-голямо количество от плаващия по повърхността слой чрез декантиране или с помощта на сифон (точка 5.6).

6.2.9. Външната и вътрешната страна на отвора на съда или крайт и долната част на сифона се изплакват с няколко милилитра от смесения разтворител (точка 4.5). Утайката от външната част на съда се събира в колбата, а утайката от вътрешната част на отвора и от сифона се събира в съда за екстракция.

6.2.10. Повторно се екстрахира, като се повтаря процедурата от точка 6.2.5 - 6.2.9, но се използват само 15 ml диетилов етер и 15 ml петролев етер.

6.2.11. Екстрахира се трети път, като процедурата, описана в точка 6.2.10, се повтаря, но не се провежда крайното промиване (точка 6.2.9).

Забележка:

При анализ на проби от обезмаслено сухо мляко провеждането на третото екстрахиране не е задължително.

6.2.12. Внимателно се изпарява или се дестилира колкото е възможно повече от разтворителя (включително и етанола). Ако колбата е с малка вместимост, известна част от разтворителя се отстранява след всяка екстракция.

6.2.13. Когато миризмата на разтворителите не е напълно отстранена, колбата се поставя в сушилната пещ и се загрева в продължение на 60 min.

6.2.14. Колбата се изважда от пещта, охлажда се до стайна температура (точка 6.2.1) и се претегля с точност до 0,1 mg.

6.2.15. Процедурите от точка 6.2.13 и 6.2.14 се повтарят, като колбата се нагрява в продължение на 30 min до 60 min, докато разликата в масите при две последователни измервания стане по-малко от 0,5 mg или докато масата започне да се увеличава. Ако се установи увеличение на масата, трябва да се използва най-малката маса, необходима за изчислението (точка 7.1). Крайната записана маса трябва да е M1 g.

6.2.16. Прибавят се от 15 ml до 25 ml петролев етер, за да се потвърди, че екстрахираният материал е напълно разтворим. Затопля се внимателно и разтворителят се разклаща чрез завъртане на колбата, докато

цялото количество мазнина се разтвори.

6.2.16.1. Когато екстрахираният материал е напълно разтворим в петролев етер, масата на мазнината се определя от разликата между стойностите в точка 6.2.1 и 6.2.15.

6.2.16.2. При наличие на някакво неразтворимо вещество или в случай на съмнение, екстрахирайте напълно мазнината от колбата чрез неколkokратно измиване с топъл петролен етер, оставяйки неразтворения материал да се утаи преди всяко отливане. Изплакнете три пъти външната страна на гърлото на колбата.

6.2.16.2. Когато съществува неразтворим материал или има съмнение за такъв, мазнината се екстрахира напълно от колбата чрез три последователни промивания с топъл петролев етер и се оставя неразтвореният материал да се утаи преди всяко декантиране. Външната страна на отвора на колбата се промива трикратно. Колбата се поставя в сушилния в легнало положение и се нагрява в продължение на 1 час. Колбата се охлажда до стайна температура, както в точка 6.2.1, и се претегля с точност до 0,1 mg. Масата на мазнината се определя като разлика между масата, получена в точка 6.2.15, и крайната маса.

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7.1. Изчисление

Масата на екстрахираната мазнина, измерена в грамове, е:

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

Масленото съдържание в пробата, изразено в проценти, се определя по формулата:

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

където:

M_1 = масата на колба М в грамове, заедно с мазнината, след фаза 6.2.15;

M_2 = масата на колба М в грамове, след фаза 6.2.1 или, в случай на неразтворен материал или съмнение за такъв, фаза 6.2.16.2;

B_1 = масата на колба В на празната проба, в грамове, след фаза 6.2.15;

B_2 = масата на колба В, в грамове, след фаза 6.2.1 или, в случай на неразтворен материал или на съмнение за такъв, фаза 6.2.16.2;

S = масата на взетата проба за анализ в грамове.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 0,2 g мазнина в

100 g продукт, с изключение на сухо обезмаслено мляко на прах, за което разликата не трябва да превишава 0,1 g мазнина в 100 g продукт.

МЕТОД 5: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЗАХАРОЗА (ПОЛЯРИМЕТРИЧЕН МЕТОД)

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

С този метод се определя съдържанието на захароза на:

- подсладено кондензирано мляко,
- подсладено кондензирано частично обезмаслено мляко,
- подсладено кондензирано обезмаслено мляко.

Пробите не трябва да съдържат инвертна захар.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържанието на захароза в подсладено кондензирано мляко е съдържанието на захароза, определено чрез прилагане на посочения метод.

3. ПРИНЦИП

Методът се основава на принципа на инверсията на Клерже – умереното третиране на пробата с киселина, която предизвиква пълна хидролиза на захарозата, но почти не влияе на лактозата или другите захари. Съдържанието на захарозата се получава чрез промяната чрез промяната на силата на въртене на разтвора.

Прозрачният филтрат на пробата (без мутаротация на лактозата) се получава чрез третиране с амонячен разтвор, последвано от неутрализация и избистряне, чрез последователно добавяне на разтвор от цинков ацетат и калиев хексафероцианат II.

В част от филтратата захарозата се хидролизира по специфичен начин.

Съдържанието на захароза се изчислява по изменението на оптичeskото въртене на филтратата вследствие на хидролизата на захарозата, като се използва подходяща формула.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. Разтвор на цинков ацетат, 1 M: разтварят се 21.9 g кристален цинков ацетат дихидрат ($\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) и 3 ml ледена оцетна киселина се разтварят и се доливат с вода до 100 ml.

- 4.2. Разтвор на калиев хексафероцианат (II) 0,25M; разтваря се във вода 10,6 g кристален калиев хексафероцианат (II) трихидрат $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$ и се допълва до 100 ml с вода.
- 4.3. Разтвор на солна киселина 6,35 +/- 0,20M (от 20 до 22 %) или 5,0 +/- 0,2M (от 16 % до 18 %).
- 4.4. Амонячен разтвор 2,0 +/- 0,2M (3,5 %).
- 4.5. Разтвор на оцетна киселина 2,0 +/- 0,2M (12 %).
- 4.6. Разтвор на бромтимолово синьо: 1 % (m/v) в етанол.

5. АПАРАТУРА

- 5.1. Аналитична везна с разделителна способност 10 mg.
- 5.2. Поляриметрична епруветка - 2 dm с прецизно калибрирана дължина.
- 5.3. Поляриметър или захариметър:
- а) поляриметър, снабден с натриева или зелена живачна лампа (лампа на живачни пари с призма или специален екран на Wratten № 77 А), с точност на деленията на скалата най-малко 0,05 ъглови °;
 - б) глюкометър с международна захарна скала, при която се използва бяла светлина, преминаваща през филтър с дебелина 15 mm, запълнен с 6 % разтвор на калиев бихромат или натриева светлина с точност на едно деление по международната захарна скала най-малко 0,1°.
- 5.4. Водна баня, регулирана на 60 °C ± 1 °C.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. Контролно определяне

За стандартизиране на процедурата, реагентите и апаратурата, се извършват две контролни определяния, както е описано по-долу, като се използва смес от 100 g мляко и 18 g чиста захароза или смес от 110 g обезмаслено мляко и 18 g чиста захароза, като всяка една от смесите съответства на 40 g кондензирано мляко със съдържание на 45 % захароза.

Съдържанието на захар се изчислява по формулите, посочени в точка 7, като във формула 1 М, F и Р се заменят съответно с количеството на взетото мляко, съдържанието на мазнина и белтък в него, а във формула 2 М се заменя със стойността 40,00.

Получените стойности от двата анализа не трябва да се различават с повече от 0,2 % при 45 %.

6.2. Определяне

6.2.1. В бехерова чаша от 100 ml се претеглят с точност до 10 mg около 40 g от добре разбърканата проба. Прибавят се 50 ml топла вода (80 °C - 90 °C) и се разбърква добре.

6.2.2. Сместа се прехвърля в 200 ml обемна колба и чашата се изплаква последователно с вода, загрята до 60 °C до достигане на общ обем на сместа 120 ml - 150 ml. Сместа се разбърква и охлажда до стайна температура.

6.2.3. Добавят се 5 ml разреден амонячен разтвор (точка 4.4). Сместа се разбърква отново и се оставя в покой 15 min.

6.2.4. Амонякът се неутрализира чрез добавяне на еквивалентно

количество разреден разтвор на оцетна киселина (точка 4.5), което предварително се определя в милилитри чрез титриране на амонячния разтвор с оцетна киселина, използвайки като индикатор бромтимоловосиньо (точка 4.6). Сместа се разбърква.

6.2.5. Добавят се при внимателно смесване чрез въртене на наклонената колба 12,5 ml разтвор на цинков ацетат (точка 4.1).

6.2.6. Добавят се 12,5 ml разтвор на калиев хексафериоцианат (II) (точка 4.2) по същия начин, както при ацетатния разтвор.

6.2.7. Колбата се загрява така, че температурата на съдържанието ѝ да достигне 20 °C, и се долива с вода при 20 °C до 200 ml.

Забележка:

По време на описания процес добавянето на водата или реагентите трябва да се извършва по такъв начин, че да се избегне образуването на въздушни мехурчета. По същата причина и хомогенизирането се прави чрез въртене на колбата, а не чрез разклащане. Ако се появят въздушни мехурчета преди колбата да се долее до обем от 200 ml, въздухът се отстранява, като колбата се свързва с вакуумна помпа и се върти.

6.2.8. Колбата се затваря със суха запушалка и внимателно се размесва, като се разклаща енергично.

6.2.9. Колбата се оставя в покой няколко минути, след което течността се филтрира през суха филтерна хартия. Първите 25 ml от филтратата се изхвърлят.

6.2.10. Директна поляризация: определя се оптичеството въртене на филтратата при температура 20 °C +/- 1 °C.

6.2.11. Инверсия: отмерват се с пипета 40 ml от филтратата, получен по точка 6.2.9, в мерителна колба от 50 ml и се добавят 6,0 ml 6,35 M солна киселина или 7,5 ml 5,0 M солна киселина (точка 4.3).

6.2.11. Инверсия: отмерват се с пипета 40 ml от филтратата, получен по точка 6.2.9, в мерителна колба от 50 ml и се добавят 6,0 ml 6,35 M солна киселина или 7,5 ml 5,0 M солна киселина (точка 4.3).

Колбата се поставя на водна баня при температура 60 °C за 15 min, като се осигурява пълното потапяне на крушовидната част на колбата в течността на водната баня. През първите 5 min съдържанието на колбата се разбърква посредством въртеливи движения, като през това време то трябва да достигне температурата на водната баня. Охлажда се до 20 °C и се допълва до обема с вода (20 °C). Разбърква се и се оставя да престои 1 час при тази температура.

6.2.12. Инвертна поляризация

Определя се въртенето на филтратата след инверсия при температура 20 °C +/- 2 °C (поляризация след инверсия). Ако през времето на измерването температурата на течността T в поляризационната тръба се различава с повече от 0,2 °C, се правят температурните корекции съгласно точка 7.2.

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7.1. Метод на изчисление

Съдържанието на захароза се определя по формулата:

:

$$(1) v = \left(1 - \frac{M}{100}\right) \cdot 1.55P$$

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

Където:

S = съдържанието на захароза;

M = масата на претеглената проба в грамове;

F = масленото съдържание на пробата;

P. = белтъчното съдържание на пробата (N x 6.38) в проценти

V = обемът в милилитри, до който пробата е била разрежена преди филтрация;

v = корекцията в милилитри на обема на утайката, образувана по време на избистрянето;

D = отчитане на директната поляризация (поляризация преди инверсията);

I = отчитане с поляризацията след инверсията;

L = дължина в дециметри на поляриметричната тръба;

Q = коефициент на инверсия, чиито стойности са дадени по-долу.

Забележки:

а) Когато се претеглят точно 40.00 g кондензирано мляко и се използва поляриметър с натриева лампа, и отчитането се прави в ъглови градуси в поляриметрична тръба с дължина 2 dm при температура 20,0 °C +/- 0,1 °C, съдържанието на захароза в нормално кондензирано мляко (C=9) се изчислява по формулата:

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

б) ако поляризацията след инверсия се измерва при температура, различна от 20 °C, получените резултати трябва да се умножат по:

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

7.2. Стойности на коефициента на инверсия Q

Представените по-долу формули дават точните стойности за Q, при използване на различни източници на светлина с корекции за концентрация и температура:

Натриева лампа и поляриметър, градуирани в ъглови градуси:

$$Q = 0.8825 + 0.0006 (C - 9) - 0.0033 (T - 20).$$

Живачна зелена лампа със зелена светлина и поляриметър, градуирани в ъглови градуси:

$$Q = 1.0392 + 0.0007 (C - 9) - 0.0039 (T - 20).$$

Бяла светлина с филтър от бихромат и глюкомер с международна скала за захар в градуси:

$$Q = 2.549 + 0.0017 (C - 9) - 0.0095 (T - 20).$$

В горните формули:

C = общото съдържание на захарите в поляризирания инвертен разтвор (%);,

T = Температурата на инвертния разтвор при отчитане на поляризацията.

Забележка 1:

Общото съдържание на захарите C в инвертния разтвор може да се изчисли от показанията за директна поляризация и промяната на инверсията по общоприетия начин, като се използват общоприетите величини за специфично въртене на захарозата, лактозата и инвертната захар.

Корекцията 0,0006 (C - 9) и т. н. е точна само ако C е приблизително 9. За нормално кондензирано мляко тази корекция може да се пренебрегне, тъй като C е близко до 9.

Забележка 2:

Отклонението на температурата от 20 °C с 1 °C оказва малко влияние на показанията за директната поляризация, но за поляризацията след инверсия е необходима корекция, ако температурата се отклонява с повече от 0,2 °C.

Корекцията 0,0033 (T - 20) и т. н. е точна само за температурния интервал от 18 °C до 22 °C.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 0,3 g захароза в 100 g кондензирано мляко.

МЕТОД 6: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА МЛЕЧНА КИСЕЛИНА И ЛАКТАТИ

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Чрез този метод се определя съдържанието на млечната киселина и лактатите, изразено като млечна киселина, на:

- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах,

- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах,
- сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах,
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържание на млечна киселина и лактати в сухи млека е съдържанието на млечната киселина и лактатите, изразени като млечна киселина, определено чрез посочения метод.

3. ПРИНЦИП

Мазнините, белтъчините и лактозата се извличат едновременно от пробата чрез добавяне на меден сулфат и калциев хидроксид с последваща филтрация.

Посредством концентрирана сярна киселина и в присъствието на меден сулфат (II) млечната киселина и лактатите във филтрата се превръщат в ацетилдехид.

Съдържанието на млечна киселина се определя колориметрично, като се използва р-хидроксидифенил.

Съдържанието на млечна киселина и лактати се изразява в милиграми млечна киселина на 100 g сух безмаслен остатък.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. 4.1. Разтвор на меден сулфат (II): разтварят се 250 g меден сулфат (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) във вода и се разреждат до 1000 ml с вода.

4.2. Суспензия на калциев хидроксид

4.2.1. Стриват се 300 g калциев хидроксид ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) в хаван с вода, като се използват общо 900 ml. Суспензията трябва да е прясно приготвена преди използване.

4.2.2. Суспензия на калциев хидроксид: стриват се 300 g калциев хидроксид ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) в хаван с вода, като се използват общо 1400 ml. Суспензията трябва да е прясно приготвена непосредствено преди използването ѝ.

4.3. Разтвор на сярна киселина - меден сулфат (II): към 300 ml сярна киселина (от 95,9 % до 97,0 %) (m/m) се прибавят 0,5 ml разтвор на меден сулфат (II) (точка 4.1).

4.4. Разтвор на р-хидроксидифенил ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$): разтварят се 0,75 g р-хидроксидифенил посредством разклащане и слабо загряване в 5 ml воден разтвор на натриев хидроксид (NaOH), съдържащ 5 g NaOH на 100 ml. Разрежда се с вода до 50 ml в мерителна колба. Разтворът се съхранява в кафява стъклена бутилка на тъмно и хладно място. Разтворът не се използва при промяна в цвета или при помътняване. Срокът на максимална трайност е 72 час.

4.5. Стандартен разтвор на млечна киселина: разтваря се (непосредствено преди употреба) 0,1067 g литиев лактат ($\text{CH}_3\text{CHONCOOLi}$) във вода и се разрежда до 1000 ml в обемна колба. Един милилитър от този разтвор отговаря на 0,1 mg млечна киселина.

4.6. Стандартно възстановено мляко: предварително се анализират

няколко проби от висококачествено сухо мляко. За изработване на калибровъчната крива се избира пробата с най-ниско съдържание на млечна киселина - не повече от 30 mg/100 g сух безмаслен остатък. Следва се процедурата на работа, описана в точка 6.2.1 и 6.2.2.

5. АПАРАТУРА

- 5.1. Аналитична везна.
- 5.2. Спектрофотометър, подходящ за отчитане дължина на вълната 570 нанометра.
- 5.3. Водна баня при температура $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.4. Хаван и чукало.
- 5.5. Филтърна хартия (Schleicher и Schull 595, Whatman 1 или еквивалента на тях).
- 5.6. Епруветки, пирекс или еквивалентно стъкло (с размери 25 x 150 mm).

Забележка:

Всички стъклени прибори трябва да бъдат идеално чисти и предназначени за употреба само за това определяне. Остатъците от утайки трябва да се отстранят с концентрирана солна киселина преди измиване.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. Празна проба

Празната проба се извършва, като се поставят 30 ml вода в 50 ml градуирана епруетка и същата се третира, както е описано от точка 6.2.4 до точка 6.2.11. Ако стойностите на празната проба на водата превишават еквивалента от 20 mg млечна киселина на 100 g сух безмаслен остатък, реагентите трябва да бъдат проверени и замърсеният реактив или реагенти трябва да се подменят.

6.2. Определяне

Забележка. Да се избягват замърсявания с примеси, особено със слюнка и пот.

- 6.2.1. Определя се съдържанието на сухия безмаслен остатък (a) g на пробата, като от 100 се извади масленото съдържание (получено по метод 4) и съдържанието на влага (получено по метод 2).
- 6.2.2. Претеглят се $(1000/(a - 10))\text{g}$ от пробата с точност до 0,1 g. Това количество проба се добавя към 100 ml вода и се размесва внимателно.
- 6.2.3. Вземат се 5 ml от така получения разтвор с пипета и се поставят в 50 ml градуирана епруетка, след което се разрежда с вода до около 30 ml.
- 6.2.4. Добавят се (бавно при едновременно разклащане) 5 ml разтвор на меден сулфат (II) (точка 4.1) и се оставя в покой 10 min.
- 6.2.5. Добавят се (бавно, при едновременно разклащане) 5 ml суспензия на

калциев хидроксид (точка 4.2.1) или 10 ml суспензия на калциев хидроксид (точка 4.2.2).

- 6.2.6. Разрежда се с вода до 50 ml, разклаща се енергично и се оставя в покой 10 min. Филтрира се. Първата порция от филтратата се изхвърля.
- 6.2.7. С пипета се поставя в епруветка (точка 5.6) 1 ml от филтратата.
- 6.2.8. С бюрета или градуирана пипета към епруветката се добавят 6,0 ml разтвор на сярна киселина - меден сулфат (II) (точка 4.3). Разтворът се хомогенизира.
- 6.2.9. Загрява се на вряща водна баня за 5 min. Охлажда се под течаща вода до стайна температура.
- 6.2.10. Добавят се 2 капки от реактива р-хидроксидифенил (точка 4.4) и се разклаща енергично с цел равномерното разпределяне на реактива в течността. Епруветката се поставя на водна баня при температура 30 °C +/- 2 °C за 15 min, като от време на време се разклаща.
- 6.2.11. Епруветката се поставя на вряща водна баня за 90 сек.. Охлажда се под течаща вода до стайна температура.
- 6.2.12. Измерва се оптичната плътност спрямо празната проба (точка 6.1) не по-късно от 3 час при дължина на вълната, посочена в точка 5.2.
- 6.2.13. Ако оптичната плътност превишава най-високата точка на стандартната крива, изпитването се повтаря, като се използва подходящо разреждане на филтратата, получен в точка 6.2.6.

6.3. Подготовка на стандартния разтвор.

- 6.3.1. С пипета се прехвърлят 5 ml от възстановеното мляко (точка 4.6) в пет 50 ml градуирани епруветки, в които се поставят съответно по 0 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml и 4 ml от стандартния разтвор на млечна киселина (точка 4.5), така че да се получи диапазон от стандарти, отговарящ на 0 mg; 20 mg; 40 mg; 60 mg и 80 mg добавена млечна киселина на 100 g сух безмаслен остатък от сухото мляко.
- 6.3.2. Разрежда се до около 30 ml и се продължава, както е описано от точка 6.2.4 до точка 6.2.11.
- 6.3.3. Измерва се оптичната плътност на стандартите (точка 6.3.1) спрямо празната проба (точка 6.1) при дължина на вълната, посочена в точка 5.2. Чертае се диаграма на оптичните плътности в зависимост от количеството млечна киселина, представено в точка 6.3.1, т.е. 0 mg; 20 mg; 40 mg; 60 mg и 80 mg на 100 g сух безмаслен остатък. Чертае се най-подходящата непрекъсната линия през точките и се прави стандартна крива чрез движение на тази линия успоредно на самата себе си по такъв начин, че да преминава през началото.

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- 7.1. Метод на изчисляване
Измерената в точка 6.2.12 или в точка 6.2.13 оптична плътност се превръща в mg млечна киселина на 100 g сух безмаслен остатък в пробата чрез отнасяне към стандартната крива. Полученият резултат се умножава по фактора на разреждане, когато филтратът е бил

разреждан съгласно точка 6.2.13.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 8 mg млечна киселина на 100 g сух безмаслен остатък за съдържание до 80 mg. За по-високи стойности тази разлика не трябва да превишава 10 % от най-ниската стойност.

МЕТОД 7: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФОСФАТАЗНАТА АКТИВНОСТ (модификация на Сандерс и Сейгър)

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Този метод описва установяването на фосфатазната активност в:

- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах,
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах,
- сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах,
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Фосфатазната активност на сухите млека е показател за количеството на наличната алкална фосфатаза. Тя се изразява като количеството фенол в mg, освободен от 1 ml възстановено мляко, определено чрез описаната по-долу процедура.

3. ПРИНЦИП

Фосфатазната активност на сухите млека се изразява със способността на фосфатазата да освобождава фенол от динатрийфенилфосфат. Количеството освободен фенол при посочените условия се определя чрез спектрофотометрично измерване на цвета, проявен с реактива на Гиб.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. Разтвор А

Буферен бариено-боратен хидроксид: рН 10.6 ± 0.1 при 20 °C.

Разтварят се: 25.0 g бариев хидроокис ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) във вода и се разреждат до обем 500 ml.

Разтварят се 11.0 g борна киселина (H_3BO_3) във вода и се разреждат до общ обем 500 ml.

Двата разтвора се смесват и се загреват до 50 °C.

Сместа се разклаща и охлажда до стайна температура.

pH се свежда до 10.6 ± 0.1 с помощта на разтвор на бариевия хидроокис, след което сместа се филтрира.

Разтворът се съхранява в плътно затворен съд.

Преди употреба буферът се разрежда с равно количество вода.

4.2. Разтвор Б.

Цветопроявяващ буфер

Разтварят се 6,0 g натриев метаборат (NaBO_2) (или 12,6 g ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)) и 20,0 g натриев хлорид (NaCl) във вода и се разреждат с вода до 1000 ml.

4.3. Разтвор В

Разтвор на буферен субстрат

4.3.1. Разтварят се 0,5 g динатриевфенилфосфат ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в 4,5 ml от разтвор Б (точка 4.2). Добавят се две капки от разтвор Д и се оставя за 30 min. Цветът се екстрахира с 2,5 ml бутанол (точка 4.10). При необходимост цветната екстракция се повтаря. След отделянето бутанолът се изхвърля. Разтворът може да се съхранява в хладилник няколко дни. Преди употреба цветът трябва да се прояви и извлече още веднъж.

4.3.2. С пипета се прехвърля 1 ml от този разтвор в обемна колба от 100 ml и колбата се допълва до обема ѝ с разтвор А. Буферният разтвор се приготвя непосредствено преди употреба.

4.4. Разтвор Г

Утаител

Разтварят се 3,0 g цинков сулфат ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 0,6 g меден сулфат (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) във вода и се допълват с вода до 100 ml.

4.5. Разтвор Д

Реактив на Гиб

Разтварят се 0,040 g 2,6-дибромхинин 1,4-хлорамид ($\text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 \cdot \text{NCl}$) в 10 ml 96 % етанол. Разтворът се съхранява в тъмна стъклена бутилка в хладилник. При обезцветяване реактивът се изхвърля.

4.6. Цветоразредителен буфер

10 ml от разтвор Б (точка 4.2) (цветопроявяващият се буфер) се разреждат с вода до 100 ml.

4.7. Разтвор на меден сулфат

Разтваря се 0,05 g меден сулфат (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) с вода и се долива с вода до 100 ml.

4.8. Стандартен разтвор на фенол

Разтваря се 0,200 g +/- 0,001 g чист фенол и се долива в обемна колба с вода до 100 ml. Разтворът може да се съхранява в хладилник няколко месеца.

Разреждат се 10 ml от този разтвор с вода до 100 ml. Така полученият разреден разтвор съдържа 200 mg фенол в 1 ml и може да бъде използван за приготвяне на по-разредени разтвори.

4.9. Вряща дестилирана вода

4.10. N-Butanol

5. АПАРАТУРА

5.1. Аналитична везна.

5.2. Водна баня, термостатично контролирана при $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3. Спектрофотометър подходящ за отчитане на дължина на вълната 610 нанометра.

5.4. Филтърна хартия (Schleicher и Schull 597, Whatman 42 или еквивалентна филтърна хартия).

5.5. Вряща водна баня

5.6. Алюминиево фолио.

6. ПРОЦЕДУРА

Предпазни мерки:

1. Да се избягва пряко излагане на слънчева светлина.
2. Всички стъклени прибори, запушалки и преносни материали трябва да бъдат идеално чисти. Препоръчва се да се изплакват и изваряват с вода или да се третират на пара.
3. Да се избягва използването на пластмасови материали (например, запушалки), тъй като те могат да съдържат фенол.
4. Слюнката съдържа фосфатаза. Затова следва внимателно да се избягва замърсяване със следи от слюнка.

6.1. Подготовка на пробата

6.1.1. Претеглят се с точност до 0,1 g 10 g от пробата и се разтварят в 90 ml вода. Температурата на разтваряне на сухото мляко не трябва да превишава $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2. Определяне

6.2.1. Поставят се в две епруветки по 1 ml възстановено мляко, както е описано в 6.1.1.

Едната от епруветките се загрява във вряща вода за 2 минути. Епруветката и водната баня (точка 5.5) или бехеровата чаша се покриват с алуминиево фолио (точка 5.6), за да се гарантира затоплянето на цялата епруветка. Охлажда се в студена вода до стайна температура. Тази епруветка се използва за празна проба.

При всички следващи действия двете епруветки се третираат еднакво.

- 6.2.3. Прибавят се 10 ml от разтвор В (точка 4.3.2), разбърква се и епруветката се поставя на водна баня при 37 °C (точка 5.2).
- 6.2.4. Загрява се на водна баня за 60 min, като периодично се разклаща.
- 6.2.5. Епруветките веднага се прехвърлят във вряща водна баня (точка 5.5) за 2 min. Охлаждат се до стайна температура в студена вода.
- 6.2.6. Добавя се 1 ml от разтвор Г (точка 4.4), смесва се и се филтрира през суха филтърна хартия. Първите филтрати се изхвърлят до получаване на прозрачна течност.
- 6.2.7. От всеки филтрат се поставят по 5 ml в епруветките, добавят се 5 ml от разтвор Б (точка 4.2) и 0,1 ml от разтвор Д (точка 4.5). Полученият разтвор се хомогенизира.
- 6.2.8. Разтворът се оставя до проявяване на цвета при стайна температура за 30 min, но далеч от пряка слънчева светлина.
- 6.2.9. Измерва се оптичната плътност на пробата спрямо празната проба при дължина на вълната, посочена в точка 5.3.
- 6.2.10. Анализът се повтаря, ако оптичната плътност на разтвора превишава стандартната проба с 20 mg фенол, приготвена съгласно точка 7.

Ако тази граница е превишена, се разрежда подходящ обем от възстановеното мляко съгласно точка 6.1.1 с подходящ обем от свареното мляко, както е посочено в точка 6.2.2, с цел дезактивиране на алкалната фосфатаза.

7. Подготовка на стандартната крива
- 7.1. В четири 100 ml обемни колби се прехвърлят посредством пипета съответно по 1 ml; 3 ml; 5 ml и 10 ml от стандартния разтвор на фенол, разреден съгласно точка 4.8, и се доливат до марката с вода. Тези разредени разтвори съдържат съответно 2 mg; 6 mg; 10 mg и 20 mg фенол/ml.
- 7.2. Поставя се посредством пипета 1 ml вода или 1 ml от всеки стандартен разтвор (точка 7.1) в епруветките с цел получаване на серия от проби, съдържащи 0 mg (стойност на празната проба, получена чрез използване на 1 ml вода); 2 mg; 6 mg; 10 mg или 20 mg фенол.
- 7.3. Последователно във всяка епруветка посредством пипета се поставят 1 ml от разтвора меден сулфат (II) (точка 4.7), 5 ml разтвор на цветоразредителен буферен разтвор (точка 4.6), 3 ml вода и 0,1 ml от разтвор Д (точка 4.5). Полученият разтвор се разбърква.
- 7.4. Епруветките се оставят далеч от пряка слънчева светлина при стайна температура за 30 min.
- 7.5. Измерва се поглъщаемостта на разтворите във всяка една от епруветките, сравнена със стойността на празната проба при дължина на вълната, посочена в точка 5.3.

7.6. Стандартната крива се изработва чрез нанасяне на стойностите на поглъщане срещу стойностите на фенол в микрограма, както е посочено в точка 7.2.

8. Изразяване на резултатите

8.1. Изчисление

8.1.1. Стойностите се превръщат в микрограма фенол, както е посочено в точка 6.2.9, чрез нанасяне на стандартната крива.

8.1.2. Изчислява се фосфатазната активност в mg фенол/ml възстановено мляко съгласно следната формула:

Фосфатазна активност = $2,4 \times P$,

където P е количеството фенол (mg) съгласно точка 8.1.1.

8.1.3. Ако е било необходимо разреждане, както е посочено в точка 6.2.10, полученият резултат в точка 8.1.2 се умножава с фактора на разреждане.

8.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 2 mg освободен фенол на 1 ml възстановено мляко.

МЕТОД 8: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФОСФАТАЗНА АКТИВНОСТ (ПРОЦЕДУРА АШАФЕНБУРГ И МЮЛЕН)

1. ОБХВАТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

С този метод се описва начина за определяне на фосфатазната активност на:

- сухо високомаслено мляко или високомаслено мляко на прах,
- сухо пълномаслено мляко или пълномаслено мляко на прах,
- сухо частично обезмаслено мляко или частично обезмаслено мляко на прах,
- сухо обезмаслено мляко или обезмаслено мляко на прах.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Фосфатазна активност на сухи млека е показател за количеството на наличната активна алкална фосфатаза. Тя се изразява като количеството p-нитрофенол в микрограма, освободен от 1 ml проба от възстановено мляко, при описаните условия.

3. ПРИНЦИП

Пробата от възстановено мляко се разрежда с буферен субстрат при pH 10.2, и се загрява при температура 37 °C в продължение на два часа.

При тези условия, алкалната фосфатаза присъстваща в пробата, освобождава р-нитрофенол от прибавения динатриев р-нитрофенил фосфат. Освободеният р-нитрофенол се определя чрез директно сравняване със стандартни цветни стъкла в обикновен калибратор, чрез използване на отразена светлина.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. Буферен разтвор на натриев карбонат-бикарбонат.

Разтварят се 3,5 g дехидриран натриев карбонат и 1,5 g натриев бикарбонат във вода и се разреждат с вода в обемна колба до 1000 ml.

4.2. Буферен субстрат

Разтварят се 1,5 g динатриев р-нитрофенилфосфат в буферния разтвор натриев карбонат-бикарбонат (точка 4.1) и се разреждат в обемна колба с буфер (точка 4.1) до 1000 ml. Този разтвор е стабилен за срок от един месец, ако се съхранява в хладилник ($\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), но трябва да се провежда тест за контрол относно цвета на такива разтвори (точка 6 - предпазна мярка 3).

4.3. Избистрящи разтвори

4.3.1. Разтвор на цинков сулфат

Разтварят се 30,0 g цинков сулфат (ZnSO_4) и се разреждат в обемна колба с вода до 1000 ml.

4.3.2. Разтвор на калиев фeroцианат (II)

Разтварят се 17,2 g калиев фeroцианат (II) трихидрат ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) и се разреждат в обемна колба с вода до 100 ml.

5. АПАРАТУРА

5.1. Аналитична везна.

5.2. Водна баня, термостатично контролирана при $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

5.3. Уред за сравняване със стандартен образец, снабден със специален диск с цветни стъкла, калибрани в mg р-нитрофенол/ml мляко и с клетки 2 x 25 mm.

6. ПРОЦЕДУРА

Предпазни мерки:

1. След използване епруветките трябва да се изпразнят, да се изплакнат с вода, да се измият с топла вода, съдържаща алкален миеш препарат, след което да се изплакнат с чиста топла чешмяна вода, накрая да се изплакнат с вода и да се подсушат.

Пипетите трябва да се изплакнат със студена чешмяна вода веднага след употреба, последвано от изплакване с вода и подсушаване преди употреба.

2. Запушалките на епруветките трябва да се изплакнат с топла чешмяна вода веднага след употреба, след което се изваряват във вода за 2 min.

3. Разтворът на буферния субстрат (точка 4.2) може да остане стабилен най-малко един месец, ако се съхранява в хладилник при температура не по-висока от 4 °C. Нестабилността му се изразява в появата на жълто оцветяване. Макар че изпитването винаги се отчита спрямо вряща контрола, съдържаща същия разтвор на буферен субстрат, препоръчва се да не се използва разтворът, ако той дава отчитане на цвета повече от 10 mg при отчитане на 25 mm клетка в уред за сравняване със стандартен образец при използване на дестилирана вода в другата 25 mm клетка.
4. За всяка проба трябва да се използва отделна пипета, като се избягва замърсяването ѝ със слюнка.
5. Пробата не трябва да бъде излагана на директна слънчева светлина.
- 6.1. Подготовка на пробата
Разтварят се 10 g от продукта в 90 ml вода. Температурата на разтваряне не трябва да е по-висока от 35 °C.
- 6.2. Определяне
 - 6.2.1. С пипета се поставят 15 ml от буферния субстрат (точка 4.2) в чиста и суха епруветка, последвано от 2 ml от възстановената проба (точка 6.1), която ще бъде изпитвана. Епруветката се затваря със запушалка, съдържанието се хомогенизира чрез обръщане и се оставя на водна баня при 37 °C (точка 5.2).
 - 6.2.2. В същото време на водна баня се поставя контролна епруветка, съдържаща 15 ml от буферния субстрат и 2 ml от заврялата възстановена проба, подобна на изпитваната.
 - 6.2.3. Двете епруветки се махат от водната баня след 2 часа и към тях се добавя 0,5 ml цинков сулфат като утаител (точка 4.3.1). Епруветката се запушва, разклаща се енергично и се оставя в покой за 3 min. Добавят се 0,5 ml калиев фероцианат (II) утаител (точка 4.3.2), размесва се добре и се филтрира през фуния с филтърна хартия (точка 5.4). Прозрачният филтрат се събира в чиста епруветка.
 - 6.2.4. Филтратът се прехвърля в 25 mm клетка и се сравнява с филтрата на кипналата контролна проба в уреда за сравняване, като се използва специален диск (точка 5.3).
7. Изразяване на резултатите
 - 7.1. Изчисляване
Директното отчитане, получено в точка 6.2.4, се записва като mg p-нитрофенол/ml проба или на милилитър от възстановената проба.
 - 7.2. Повторяемост
Разликата между резултатите от два анализа, проведени едновременно или в бърза последователност на една и съща проба, от един и същ лаборант, при еднакви условия, не трябва да превишава 2 mg освободен p-нитрофенол на 1 ml възстановено мляко.