

**1722****ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI<sup>1)</sup>**

z dnia 8 lipca 2004 r.

**w sprawie określenia stawki opłaty za dokonanie oceny wniosku o rejestrację świadectwa dla artykułów rolno-spożywczych o szczególnym charakterze oraz za jego przekazanie do Komisji Europejskiej**

Na podstawie art. 13 ust. 11 ustawy z dnia 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych (Dz. U. z 2001 r. Nr 5, poz. 44, z późn. zm.<sup>2)</sup>) zarządza się, co następuje:

- <sup>1)</sup> Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rynki rolne, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 3 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 11 czerwca 2004 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 134, poz. 1433).
- <sup>2)</sup> Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2001 r. Nr 154, poz. 1802, z 2002 r. Nr 135, poz. 1145 i Nr 166, poz. 1360, z 2003 r. Nr 208, poz. 2020 i Nr 223, poz. 2220 i 2221 oraz z 2004 r. Nr 42, poz. 386 i Nr 96, poz. 959.

§ 1. Ustala się stawkę opłaty za dokonanie oceny wniosku o rejestrację świadectwa dla artykułów rolno-spożywczych o szczególnym charakterze oraz za jego przekazanie do Komisji Europejskiej w wysokości 300 zł.

§ 2. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi: w z. *D. Oleszczuk***1723****ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI<sup>1)</sup>**

z dnia 8 lipca 2004 r.

**w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej oraz metod analiz niektórych rodzajów mleka zagęszczonego i mleka w proszku, przeznaczonego do spożycia przez ludzi<sup>2)</sup>**

Na podstawie art. 15 pkt 2 i art. 34 pkt 2 ustawy z dnia 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artyku-

- <sup>1)</sup> Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rynki rolne, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 3 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 11 czerwca 2004 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 134, poz. 1433).
- <sup>2)</sup> Przepisy niniejszego rozporządzenia wdrażają postanowienia:
- dyrektywy 2001/114/WE z dnia 20 grudnia 2001 r. odnoszącej się do niektórych rodzajów mleka utrwalonego przez częściowe lub całkowite odwodnienie, przeznaczonego do spożycia przez ludzi (Dz. Urz. WE L 15 z 17.01.2002),
  - dyrektywy 79/1067/EWG z dnia 13 listopada 1979 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analiz do badania niektórych rodzajów mleka utrwalonego przez częściowe lub całkowite odwodnienie, przeznaczonego do spożycia przez ludzi (Dz. Urz. WE L 327 z 24.12.1979).
- Dane dotyczące ogłaszania aktów prawa Unii Europejskiej, zamieszczone w niniejszym rozporządzeniu, dotyczą ogłoszenia tych aktów w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej — wydanie specjalne.

łów rolno-spożywczych (Dz. U. z 2001 r. Nr 5, poz. 44, z późn. zm.<sup>3)</sup>) zarządza się, co następuje:

§ 1. 1. Szczegółowe wymagania w zakresie jakości handlowej niektórych rodzajów mleka zagęszczonego i mleka w proszku są określone w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

2. Metody analiz niektórych rodzajów mleka zagęszczonego i mleka w proszku są określone w załączniku nr 2 do rozporządzenia.

§ 2. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi: w z. *D. Oleszczuk*

- <sup>3)</sup> Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2001 r. Nr 154, poz. 1802, z 2002 r. Nr 135, poz. 1145 i Nr 166, poz. 1360, z 2003 r. Nr 208, poz. 2020 i Nr 223, poz. 2220 i 2221 oraz z 2004 r. Nr 42, poz. 386 i Nr 96, poz. 959.

Załączniki do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 8 lipca 2004 r. (poz. 1723)

**Załącznik nr 1****SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA W ZAKRESIE JAKOŚCI HANDLOWEJ NIEKTÓRYCH RODZAJÓW  
MLEKA ZAGĘSZCZONEGO I MLEKA W PROSZKU**

1. Mleko zagęszczone jest produktem płynnym, słodzonym albo niesłodzonym:

- 1) otrzymywanym bezpośrednio przez częściowe usunięcie wody z mleka, z mleka całkowicie albo częściowo odtłuszczonego albo mieszaniny tych produktów;
- 2) z ewentualnym dodatkiem śmietanki lub mleka w proszku, z tym że dodatek mleka w proszku nie może przekroczyć w produktach gotowych 25 % całkowitej suchej masy;
- 3) z ewentualnym dodatkiem witamin;
- 4) utrwalonym przez:
  - a) obróbkę cieplną, w tym sterylizację i UHT, w przypadku mleka zagęszczonego niesłodzonego,
  - b) dodanie sacharozy, w przypadku mleka zagęszczonego słodzonego.

2. Mleko zagęszczone niesłodzone powinno spełniać następujące wymagania w zakresie jakości handlowej:

- 1) zawartość tłuszczu:
  - a) nie mniej niż 15 % — w przypadku mleka zagęszczonego pełnotłustego,
  - b) nie mniej niż 7,5 % — w przypadku mleka zagęszczonego,
  - c) nie mniej niż 1 % i mniej niż 7,5 % — w przypadku mleka zagęszczonego częściowo odtłuszczonego,
  - d) nie więcej niż 1 % — w przypadku mleka zagęszczonego odtłuszczonego;
- 2) zawartość całkowitej suchej masy mleka:
  - a) nie mniej niż 26,5 % — w przypadku mleka zagęszczonego pełnotłustego,
  - b) nie mniej niż 25 % — w przypadku mleka zagęszczonego,
  - c) nie mniej niż 20 % — w przypadku mleka zagęszczonego częściowo odtłuszczonego,
  - d) nie mniej niż 20 % — w przypadku mleka zagęszczonego odtłuszczonego.

3. Mleko zagęszczone słodzone zawierające dodatek sacharozy, taki jak cukier półbiały, cukier biały lub

cukier rafinowany powinno spełniać następujące wymagania w zakresie jakości handlowej:

- 1) zawartość tłuszczu:
  - a) nie mniej niż 8 % — w przypadku mleka zagęszczonego słodzonego,
  - b) nie mniej niż 1 % i mniej niż 8 % — w przypadku mleka zagęszczonego częściowo odtłuszczonego słodzonego,
  - c) nie więcej niż 1 % — w przypadku mleka zagęszczonego odtłuszczonego słodzonego;
- 2) zawartość całkowitej suchej masy mleka:
  - a) nie mniej niż 28 % — w przypadku mleka zagęszczonego słodzonego,
  - b) nie mniej niż 24 % — w przypadku mleka zagęszczonego częściowo odtłuszczonego słodzonego,
  - c) nie mniej niż 24 % — w przypadku mleka zagęszczonego odtłuszczonego słodzonego.

4. W procesie technologicznym mleka zagęszczonego słodzonego dopuszcza się dodawanie laktozy w ilości nieprzekraczającej 0,03 % masy w stosunku do produktu gotowego.

5. Mleko w proszku jest produktem stałym:

- 1) otrzymywanym bezpośrednio przez usunięcie wody z mleka, z mleka całkowicie albo częściowo odtłuszczonego, ze śmietanki albo mieszaniny tych produktów;
- 2) z ewentualnym dodatkiem witamin;
- 3) utrwalonym przez odwadnianie.

6. Mleko w proszku powinno spełniać następujące wymagania w zakresie jakości handlowej:

- 1) zawartość wody — nie więcej niż 5 % masy;
- 2) zawartość tłuszczu:
  - a) nie mniej niż 42 % — w przypadku mleka w proszku kremowego (śmietanki w proszku),
  - b) nie mniej niż 26 % i mniej niż 42 % — w przypadku mleka w proszku pełnego,
  - c) więcej niż 1,5 % i mniej niż 26 % — w przypadku mleka w proszku częściowo odtłuszczonego,
  - d) nie więcej niż 1,5 % tłuszczu — w przypadku mleka w proszku odtłuszczonego.

## METODY ANALIZ NIEKTÓRYCH RODZAJÓW MLEKA ZAGĘSZCZONEGO I MLEKA W PROSZKU

## I. PRZEPISY OGÓLNE

1. W celu przygotowania próbki mleka zagęszczonego niesłodzonego do analizy laboratoryjnej dokonuje się następujących czynności:

- 1) zamkniętą puszkę z mlekiem po wytrząśnięciu i odwróceniu otwiera się i powoli przelewa się mleko do pojemnika ze szczelnym wieczkiem, mieszając je przez kilkakrotne przelewanie;
- 2) po upewnieniu się, że cały tłuszcz i mleko przywierające do ścianek i dna puszki zostały wprowadzone do próbki, pojemnik zamyka się;
- 3) w przypadku gdy zawartość nie jest jednolita, pojemnik ogrzewa się w łaźni wodnej w temperaturze 40 °C przez dwie godziny;
- 4) pojemnik wytrząsa się energicznie co 15 minut;
- 5) pojemnik wyjmuje się z łaźni wodnej i schładza do temperatury pokojowej;
- 6) wieczko zdejmuje się, dokładnie miesza się zawartość pojemnika łyżką albo łopatką;
- 7) w przypadku gdy wydzielił się tłuszcz, nie bada się próbki;
- 8) próbkę przechowuje się w chłodnym miejscu.

2. W celu przygotowania próbki mleka zagęszczonego słodzonego do analizy laboratoryjnej dokonuje się następujących czynności:

- 1) w przypadku mleka w puszcze:
  - a) zamkniętą puszkę z mlekiem ogrzewa się w łaźni wodnej w temperaturze od 30 °C do 40 °C przez około 30 minut,
  - b) puszkę otwiera się i starannie miesza się zawartość łyżką albo łopatką ruchami w górę, w dół i okrężnie tak, aby uzyskać jednorodną mieszaninę warstwy górnej i dolnej,
  - c) po upewnieniu się, że pozostałe mleko przylegające do ścian i dna puszki zostało włączone do próbki, całą zawartość puszki przelewa się do drugiego pojemnika ze szczelnym wieczkiem,
  - d) pojemnik zamyka się i przechowuje w chłodnym miejscu;
- 2) w przypadku mleka w tubie:
  - a) koniec tuby odcina się i przelewa się jej zawartość do pojemnika ze szczelnym wieczkiem,
  - b) tubę rozcina się wzdłuż, a cały produkt przylegający do wewnętrznej powierzchni tuby zeskrobuje się i starannie miesza z zawartością pojemnika,
  - c) pojemnik przechowuje się w chłodnym miejscu.

3. W celu przygotowania próbki mleka w proszku do analizy laboratoryjnej dokonuje się następujących czynności:

- 1) mleko w proszku przenosi się do czystego, suchego pojemnika ze szczelnym wieczkiem, o pojemności dwukrotnie większej od objętości próbki;
- 2) po niezwłocznym zamknięciu pojemnika starannie miesza się jego zawartość przez wielokrotne wytrząsanie i odwracanie;
- 3) w celu zminimalizowania absorpcji wody podczas przygotowywania próbki należy unikać wystawiania próbki mleka na bezpośrednie oddziaływanie powietrza atmosferycznego.

## II. METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI SUCHEJ MASY ORAZ SUCHEJ MASY BEZTŁUSZCZOWEJ W MLEKU ZAGĘSZCZONYM (suszenie w temperaturze 99 °C)

1. Metoda oznaczania zawartości suchej masy w mleku zagęszczonym, zwana dalej „metodą”, polega na rozcieńczeniu próbki mleka zagęszczonego wodą, wymieszaniu z piaskiem i wysuszeniu w temperaturze 99 °C ± 1 °C; masa po wysuszeniu stanowi suchą masę i jest wyrażana jako ułamek masowy próbki w procentach.

2. Zawartość suchej masy w mleku zagęszczonym oznacza zawartość suchej masy oznaczoną niniejszą metodą.

3. W metodzie używa się podstawowego sprzętu laboratoryjnego oraz:

- 1) wagi analitycznej umożliwiającej ważenie z dokładnością co najmniej do 0,1 mg;
- 2) naczynek wagowych o średnicy od 60 mm do 80 mm, wysokości około 25 mm, wykonanych z metalu takiego, jak nikiel, aluminium albo stal nierdzewna, z dobrze dopasowanymi, łatwo zdejmowanymi wieczkami;
- 3) suszarki pod ciśnieniem atmosferycznym, dobrze wentylowanej, z termostatyczną regulacją temperatury 99 °C ± 1 °C, zapewniającej jednolitą temperaturę w całej suszarce;
- 4) eksykatora zawierającego świeżo aktywowany żel krzemionkowy ze wskaźnikiem zawartości wody albo równorzędny środek osuszający;
- 5) szklanych pałeczek, spłaszczonych na jednym końcu, o długości dopasowanej do wielkości naczynek wagowych;
- 6) wrzącej łaźni wodnej.

4. W metodzie wykorzystuje się wodę destylowaną, demineralizowaną albo o co najmniej równorzędnej czystości.

5. W metodzie używa się piasku kwarcowego albo piasku morskiego o wielkości ziaren od 0,18 mm do 0,5 mm, przechodzących przez sito o wielkości oczek od 180  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$ , potraktowanego kwasem chłorowodorowym, odpowiadającego następującej próbie kontrolnej:

- 1) w naczynku wagowym umieszcza się około 25 g piasku;
- 2) odkryte naczynko wagowe wraz z wieczkiem umieszcza się w suszarce i suszy przez dwie godziny;
- 3) naczynko wagowe wraz z wieczkiem przenosi się do eksykatora, schładza do temperatury pokojowej i waży z dokładnością do 0,1 mg;
- 4) dodaje się 5 ml wody, suszy ponownie w suszarce przez dwie godziny, schładza i ponownie waży;
- 5) różnica mas pomiędzy dwoma ważeniami nie może przekroczyć 0,5 mg;
- 6) w przypadku negatywnego wyniku próby kontrolnej piasek zalewa się 25 % roztworem kwasu chłorowodorowego i odstawia na 3 dni, od czasu do czasu mieszając;
- 7) płucze się wodą do zaniku odczynu kwaśnego lub gdy woda płucząca będzie wolna od chlorków;
- 8) suszy się w temperaturze 160 °C i powtarza się próbę kontrolną, o której mowa w pkt 1—5.

6. W celu oznaczenia zawartości suchej masy w mleku zagęszczonym dokonuje się następujących czynności:

- 1) w naczynku wagowym umieszcza się około 25 g piasku i szklaną pałeczkę;
- 2) odkryte naczynko wagowe wraz z wieczkiem umieszcza się w suszarce i suszy przez dwie godziny;
- 3) naczynko wagowe przykrywa się wieczkiem, przenosi do eksykatora, schładza do temperatury pokojowej i waży z dokładnością do 0,1 mg, a masę odnotowuje się jako  $m_0$ ;
- 4) przechylając naczynko wagowe, przesuwają się piasek na jedną stronę naczynka wagowego, a na wolną powierzchnię przenosi się około 1,5 g próbki mleka zagęszczonego słodzonego albo 3,0 g mleka zagęszczonego niesłodzonego, naczynko wagowe przykrywa się wieczkiem i waży z dokładnością do 0,1 mg, a masę odnotowuje się jako  $m_1$ ;
- 5) wieczko zdejmuje się, dodaje się 5 ml wody, miesza się płyną za pomocą szklanej pałeczki, a następnie miesza się piasek i część płynną; szklaną pałeczkę pozostawia się w mieszaninie;
- 6) naczynko wagowe umieszcza się we wrzącej łaźni wodnej do czasu, aż woda odparuje; czas odparowania wody powinien wynosić około 20 minut; zawartość miesza się od czasu do czasu za pomocą szklanej pałeczki, utrzymując masę dobrze napo-

wietrzoną tak, aby schnąc, nie zbrylała się; szklaną pałeczkę pozostawia się w naczynku wagowym;

- 7) przykryte wieczkiem naczynko wagowe suszy się w suszarce przez 90 minut;
- 8) naczynko wagowe przenosi się do eksykatora, schładza do temperatury pokojowej i waży z dokładnością do 0,1 mg;
- 9) naczynko wagowe ponownie umieszcza się w suszarce i po jego odkryciu suszy się je wraz z wieczkiem przez godzinę, a następnie powtarza się czynności, o których mowa w pkt 8;
- 10) czynności, o których mowa w pkt 9, powtarza się, aż różnica mas pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami będzie mniejsza niż 0,5 mg lub aż masa znacznie wzrasta;
- 11) do obliczeń przyjmuje się najniższą uzyskaną masę odnotowaną jako  $m_2$ .

7. Zawartość suchej masy w próbce oblicza się według wzoru:

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

gdzie:

- $m_0$  — oznacza masę naczynka wagowego wraz z wieczkiem, piaskiem i szklaną pałeczką, w gramach,
- $m_1$  — oznacza masę naczynka wagowego wraz z wieczkiem, piaskiem, szklaną pałeczką i próbką przed suszeniem, w gramach,
- $m_2$  — oznacza masę naczynka wagowego wraz z wieczkiem, piaskiem, szklaną pałeczką i próbką po suszeniu, w gramach

— i wyraża się jako ułamek masowy próbki w procentach.

8. Zawartość suchej masy mleka w mleku zagęszczonym słodżonym oblicza się poprzez odjęcie od suchej masy oznaczonej według niniejszej metody zawartości sacharozy oznaczonej według metody, o której mowa w części IV.

9. Zawartość suchej masy beztuszczowej mleka w mleku zagęszczonym słodżonym oblicza się poprzez odjęcie od suchej masy oznaczonej według niniejszej metody zawartości sacharozy oznaczonej według metody, o której mowa w części IV, i zawartości tłuszczu oznaczonej według metody, o której mowa w części VIII.

10. Zawartość suchej masy beztuszczowej w mleku zagęszczonym niesłodżonym oblicza się poprzez odjęcie od suchej masy oznaczonej według niniejszej metody zawartości tłuszczu oznaczonej według metody, o której mowa w części VIII.

11. Powtarzalność dla metody jest różnicą pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych równolegle albo w krótkim odstępie czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka i w tych sa-

mych warunkach, która nie powinna przekraczać 0,2 g suchej masy na 100 g produktu.

12. Z analizy laboratoryjnej sporządza się protokół, który powinien zawierać:

- 1) nazwę zastosowanej metody;
- 2) uzyskane wyniki;
- 3) wszystkie czynności niewymienione w metodzie lub uznane za nieobowiązkowe, łącznie ze szczegółami każdej okoliczności, która mogła wpłynąć na wyniki oznaczania;
- 4) informacje niezbędne do pełnego zidentyfikowania próbki.

13. Wynik zamieszczony w protokole analizy laboratoryjnej powinien spełniać kryteria powtarzalności określone dla metody.

### III. METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI WODY W MLEKU W PROSZKU (suszenie w temperaturze 102 °C)

1. Metoda oznaczania zawartości wody w mleku w proszku, zwana dalej „metodą”, polega na oznaczeniu pozostałości masy próbki po suszeniu w suszarce pod ciśnieniem atmosferycznym w temperaturze 102 °C ± 1 °C do stałej masy; ubytek masy jest wyrażany jako ułamek masowy próbki w procentach.

2. Zawartość wody w mleku w proszku oznacza ubytek masy podczas suszenia oznaczony niniejszą metodą.

3. W metodzie używa się podstawowego sprzętu laboratoryjnego oraz:

- 1) wagi analitycznej umożliwiającej ważenie z dokładnością co najmniej do 0,1 mg;
- 2) naczynek wagowych o średnicy od 60 mm do 80 mm, wysokości około 25 mm, wykonanych z metalu takiego, jak nikiel, aluminium albo stal nierdzewna, z dobrze dopasowanymi, łatwo zdejmowanymi wieczkami;
- 3) suszarki pod ciśnieniem atmosferycznym, dobrze wentylowanej, z termostatyczną regulacją temperatury 102 °C ± 1 °C, zapewniającej jednolitą temperaturę w całej suszarce;
- 4) eksykatora zawierającego świeżo aktywowany żel krzemionkowy ze wskaźnikiem zawartości wody albo równorzędny środek osuszający.

4. W celu oznaczenia zawartości wody w mleku w proszku dokonuje się następujących czynności:

- 1) odkryte naczynko wagowe umieszcza się wraz z wieczkiem w suszarce i suszy przez około godzinę;
- 2) przykryte wieczkiem naczynko wagowe przenosi się do eksykatora, schładza do temperatury pokojowej i waży z dokładnością do 0,1 mg, a masę odnotowuje się jako  $m_0$ ;

3) do naczynka wagowego przenosi się około 2 g próbki mleka w proszku, naczynko wagowe przykrywa się wieczkiem i możliwie jak najszybciej waży z dokładnością do 0,1 mg, a masę odnotowuje się jako  $m_1$ ;

4) odkryte naczynko wagowe wraz z wieczkiem umieszcza się w suszarce i suszy przez dwie godziny;

5) przykryte wieczkiem naczynko wagowe przenosi się do eksykatora, schładza do temperatury pokojowej i możliwie jak najszybciej waży z dokładnością do 0,1 mg;

6) naczynko wagowe ponownie umieszcza się w suszarce i po jego odkryciu suszy się je wraz z wieczkiem przez godzinę, a następnie powtarza się czynności, o których mowa w pkt 5;

7) czynności, o których mowa w pkt 6, powtarza się, aż ubytek masy w dwóch kolejnych ważeniach nie przekroczy 0,5 mg lub aż masa zacznie wzrastać;

8) do obliczeń przyjmuje się najniższą uzyskaną masę odnotowaną jako  $m_2$ .

5. Zawartość wody w próbce oblicza się według wzoru:

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

gdzie:

- $m_0$  — oznacza masę naczynka wagowego wraz z wieczkiem, w gramach,  
 $m_1$  — oznacza masę naczynka wagowego wraz z wieczkiem oraz próbką, w gramach,  
 $m_2$  — oznacza masę naczynka wagowego wraz z wieczkiem oraz próbką po ostatnim suszeniu, w gramach

— i wyraża się jako ułamek masowy próbki w procentach.

6. Powtarzalność dla metody jest różnicą pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych równoległe albo w krótkim odstępie czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka i w tych samych warunkach, która nie powinna przekraczać 0,1 g wody na 100 g produktu.

7. Z analizy laboratoryjnej sporządza się protokół, który powinien zawierać:

- 1) nazwę zastosowanej metody;
- 2) uzyskane wyniki;
- 3) wszystkie czynności niewymienione w metodzie lub uznane za nieobowiązkowe, łącznie ze szczegółami każdej okoliczności, która mogła wpłynąć na wyniki oznaczania;
- 4) informacje niezbędne do pełnego zidentyfikowania próbki.

8. Wynik zamieszczony w protokole analizy laboratoryjnej powinien spełniać kryteria powtarzalności określone dla metody.

#### IV. METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI SACHAROZY W MLEKU ZAGĘSZCZONYM SŁODZONYM (METODA POLARYMETRYCZNA)

1. Metoda oznaczania zawartości sacharozy w mleku zagęszczonym słodzonym, zwana dalej „metodą”, oparta jest na inwersji Clergeta i polega na potraktowaniu próbki mleka zagęszczonego słodzonego kwasem chlorowodorowym, który powoduje całkowitą hydrolizę sacharozy, a nie powoduje hydrolizy laktozy i innych cukrów. Zawartość sacharozy jest oznaczana na podstawie różnicy skręcalności optycznej roztworu przed i po inwersji. Klarowny filtrat próbki, bez mutarotacji spowodowanej przez laktozę, otrzymuje się przez potraktowanie roztworu amoniakiem, następnie neutralizację i sklarowanie go przez sukcesywne dodawanie roztworów octanu cynku i heksacyjanożelazianu(II) potasu.

2. Zawartość sacharozy w mleku zagęszczonym słodzonym oznacza zawartość sacharozy oznaczoną niniejszą metodą.

3. W metodzie używa się podstawowego sprzętu laboratoryjnego oraz:

- 1) wagi umożliwiającej ważenie z dokładnością co najmniej do 10 mg;
- 2) rurki polarymetrycznej o dokładnie wzorcowanej długości 2 dm;
- 3) polarymetru albo sacharymetru o następujących cechach:
  - a) polarymetru ze światłem sodowym albo polarymetru z zielonym światłem rtęciowym — lampa rtęciowa z pryzmatem lub specjalnym filtrem Wrattena N 77 A — z dokładnością odczytu co najmniej do 0,05 stopni kątowych,
  - b) sacharymetru z międzynarodową skalą cukrową, z białym światłem przepuszczonym przez filtr 15 mm 6 % roztworu dwuchromianu potasu albo światłem sodowym, z dokładnością odczytu co najmniej do 0,1 na międzynarodowej skali cukrowej;
- 4) łaźni wodnej o temperaturze  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

4. W metodzie wykorzystuje się wodę destylowaną, demineralizowaną albo o co najmniej równorzędnej czystości oraz następujące odczynniki odpowiadające jakości analitycznej:

- 1) roztwór octanu cynku, o stężeniu 1 mol/l, uzyskany przez rozpuszczenie w wodzie 21,9 g krystalicznego 2 · hydratu octanu cynku ( $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) i 3 ml kwasu octowego lodowatego i uzupełnienie wodą do objętości 100 ml;
- 2) roztwór heksacyjanożelazianu(II) potasu, o stężeniu 0,25 mol/l, uzyskany przez rozpuszczenie w wodzie 10,6 g krystalicznego heksacyjanożelazianu(II) potasu  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  i uzupełnienie wodą do 100 ml;
- 3) roztwór kwasu chlorowodorowego, o stężeniu  $6,35 \pm 0,20$  mol/l, czyli o stężeniu od 20 % do

22 % (m/m) lub o stężeniu  $5,0 \pm 0,2$  mol/l, czyli o stężeniu od 16 % do 18 % (m/m);

- 4) roztwór amoniaku, o stężeniu  $2,0 \pm 0,2$  mol/l, czyli o stężeniu 3,5 % (m/m);
- 5) roztwór kwasu octowego, o stężeniu  $2,0 \pm 0,2$  mol/l, czyli o stężeniu 12 % (m/m);
- 6) błękit bromotymolowy — roztwór o stężeniu 1 % (m/v) w etanolu.

5. W celu znormalizowania sposobu wykonania oznaczania, odczynników i sprzętu przeprowadza się następujące oznaczenie kontrolne:

- 1) w dwóch powtórzeniach dokonuje się czynności, o których mowa w ust. 6, z użyciem mieszaniny 100 g mleka pełnego i 18 g czystej sacharozy albo mieszaniny 110 g mleka odtłuszczonego i 18 g czystej sacharozy; każda mieszanina odpowiada 40 g mleka zagęszczonego o zawartości 45 % sacharozy;
- 2) oblicza się zawartość sacharozy przy zastosowaniu wzorów określonych w ust. 7, podstawiając:
  - a) we wzorze 1:
    - za  $m$  ilość użytego mleka,
    - za  $F$  zawartość tłuszczu w użytym mleku,
    - za  $P$  zawartość białka w użytym mleku,
  - b) we wzorze 2 za  $m$  — wartość 40,00;
- 3) średnia uzyskanych wartości powinna wynosić  $45\% \pm 0,2\%$ .

6. W celu oznaczenia zawartości sacharozy w mleku zagęszczonym słodzonym dokonuje się następujących czynności:

- 1) do szklanej zlewki o pojemności 100 ml odważa się, z dokładnością do 10 mg, około 40 g dobrze wymieszanej próbki;
- 2) dodaje się 50 ml wody o temperaturze od  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  i dokładnie miesza;
- 3) mieszaninę przenosi się ilościowo do kolby pomiarowej o pojemności 200 ml, popłukując zlewkę kilkakrotnie wodą o temperaturze  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aż objętość mieszaniny w kolbie wyniesie od 120 ml do 150 ml, następnie miesza się ją i schładza do temperatury pokojowej;
- 4) dodaje się 5 ml rozcieńczonego roztworu amoniaku, ponownie miesza i odstawia kolbę na 15 minut;
- 5) amoniak neutralizuje się przez dodanie równoważnej ilości rozcieńczonego roztworu kwasu octowego, a następnie miesza; równoważną ilość mililitrów kwasu octowego potrzebnego do neutralizacji amoniaku oznacza przez miareczkowanie roztworu amoniaku wobec błękitu bromotymolowego jako wskaźnika;

- 6) dodaje się 12,5 ml roztworu octanu cynku, ostrożnie mieszając przez obracanie lekko pochylonej kolby;
- 7) dodaje się 12,5 ml roztworu heksacyjanożelazianu(II) potasu, ostrożnie mieszając przez obracanie lekko pochylonej kolby;
- 8) zawartość kolby podgrzewa się do temperatury 20 °C i uzupełnia do 200 ml wodą o temperaturze 20 °C;
- 9) podczas wykonywania czynności, o których mowa w pkt 1—8, wodę i odczynniki dodaje się w taki sposób, aby uniknąć powstawania pęcherzyków powietrza, a zawartość miesza się przez obracanie kolby, a nie przez wytrząsanie;
- 10) w przypadku gdy w trakcie dodawania wody lub odczynników pojawią się pęcherzyki powietrza, przed uzupełnieniem zawartości kolby wodą, usuwa się je przez krótkotrwałe połączenie kolby z pompą próżniową i obracanie kolby;
- 11) kolbę zamyka się suchym korkiem, a zawartość miesza się starannie przez energiczne wytrząsanie;
- 12) kolbę odstawia się na kilka minut, a następnie przesącza się mieszaninę przez suchy sącdek z bibuły filtracyjnej, odrzucając pierwsze 25 ml filtratu;
- 13) oznacza się polaryzację bezpośrednią, czyli skręcalność optyczną filtratu w temperaturze 20 °C ± 1 °C;
- 14) przeprowadza się inwersję, wykonując następujące czynności:
  - a) do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml odmierza się pipetą 40 ml filtratu, o którym mowa w pkt 12,
  - b) dodaje się 6,0 ml roztworu kwasu chlorowodorowego, o stężeniu 6,35 mol/l, albo 7,5 ml roztworu kwasu chlorowodorowego, o stężeniu 5,0 mol/l,
  - c) kolbę umieszcza się w łaźni wodnej o temperaturze 60 °C na 15 minut w taki sposób, aby cała bańka kolby była zanurzona,
  - d) zawartość kolby miesza się ostrożnie ruchem okrężnym przez 5 minut; w tym czasie zawartość kolby powinna osiągnąć temperaturę łaźni,
  - e) kolbę schładza się do temperatury 20 °C, a następnie uzupełnia do 50 ml wodą o temperaturze 20 °C,
  - f) zawartość kolby miesza się, a następnie kolbę odstawia się na godzinę w temperaturze 20 °C;
- 15) oznacza się polaryzację po inwersji, czyli skręcalność zinwertowanego roztworu w temperaturze 20 °C ± 0,2 °C; w przypadku gdy temperatura cieczy w rurce polarymetrycznej, oznaczona jako *T*, różni się podczas pomiaru o więcej niż 0,2 °C, należy uwzględnić poprawkę temperatury zgodnie z ust. 9.

7. Zawartość sacharozy w próbce oblicza się według wzorów:

$$(1) v = \frac{m}{100} (1,08F + 1,55P)$$

$$(2) S = \frac{D-1/25I}{Q} \times \frac{V-v}{V} \times \frac{V}{Lxm} \%$$

gdzie:

- S* — oznacza zawartość sacharozy,  
*m* — oznacza masę próbki, w gramach,  
*F* — oznacza zawartość tłuszczu w próbce, w procentach,  
*P* — oznacza zawartość białka (*N* × 6,38) w próbce, w procentach,  
*v* — oznacza poprawkę na objętość osadu powstałego podczas klarowania, w mililitrach,  
*V* — oznacza objętość, do której rozcieńczono próbkę przed filtracją, w mililitrach,  
*D* — oznacza bezpośredni odczyt na skali polarymetru (polaryzacja przed inwersją),  
*I* — oznacza odczyt na skali polarymetru po inwersji,  
*L* — oznacza długość rurki polarymetrycznej, w decymetrach,  
*Q* — oznacza współczynnik inwersji określony zgodnie z ust. 10.

8. W przypadku gdy w metodzie zastosowano odważone dokładnie 40 g mleka zagęszczonego i polarymetr ze światłem sodowym, stopniami kątowymi i rurką polarymetryczną o długości 2 dm, a pomiaru dokonano w temperaturze 20 °C ± 0,1 °C, zawartość sacharozy w mleku zagęszczonym słodzonym można również obliczyć według następującego wzoru:

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

9. W przypadku gdy oznaczenia polaryzacji po inwersji dokonano w temperaturze innej niż 20 °C, wynik, o którym mowa w ust. 8, mnoży się przez:

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

gdzie *T* oznacza temperaturę zinwertowanego roztworu w rurce polarymetrycznej.

10. Wartość współczynnika inwersji *Q* dla różnych źródeł światła, z uwzględnieniem poprawek dla stężenia i temperatury, oblicza się w następujący sposób:

- 1) w przypadku światła sodowego i polarymetru ze stopniami kątowymi:

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

- 2) w przypadku zielonego światła rtęciowego i polarymetru ze stopniami kątowymi:

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

3) w przypadku białego światła z filtrem dwuchromianowym i sacharymetrem ze stopniami międzynarodowej skali cukrowej:

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

— gdzie:

C — oznacza procentową całkowitą zawartość cukrów w roztworze zinwertowanym, według odczytu polarymetrycznego,

T — oznacza temperaturę zinwertowanego roztworu podczas odczytu polarymetrycznego

— procentową całkowitą zawartość cukrów C w zinwertowanym roztworze można obliczyć na podstawie bezpośredniego odczytu i jego zmiany po inwersji w zwykły sposób, stosując normalne wartości dla skręcalności właściwej sacharozy, laktozy i cukru inwertowanego; poprawka dotycząca stężenia, taka jak 0,0006 (C - 9), jest dokładna tylko wtedy, gdy C wynosi około 9; dla mleka zagęszczonego, kiedy C jest bliskie 9, można ją pominąć,

— odchylenia temperatury od 20 °C o 1 °C stwarzają małą różnicę w odczycie bezpośrednim, ale wahania powyżej 0,2 °C przy odczycie po inwersji wymagają poprawki, która jest dokładna tylko dla temperatur w przedziale 18 °C do 22 °C.

11. Powtarzalność dla metody jest różnicą pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych równolegle albo w krótkim odstępie czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka i w tych samych warunkach, która nie powinna przekraczać 0,3 g sacharozy na 100 g mleka zagęszczonego słodzonego.

12. Z analizy laboratoryjnej sporządza się protokół, który powinien zawierać:

- 1) nazwę zastosowanej metody;
- 2) uzyskane wyniki;
- 3) wszystkie czynności niewymienione w metodzie lub uznane za nieobowiązkowe, łącznie ze szczegółami każdej okoliczności, która mogła wpłynąć na wyniki oznaczania;
- 4) informacje niezbędne do pełnego zidentyfikowania próbek.

13. Wynik zamieszczony w protokole analizy laboratoryjnej powinien spełniać kryteria powtarzalności określone dla metody.

## V. METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI KWASU MLEKOWEGO I MLECZANÓW W MLEKU W PROSZKU

1. Metoda oznaczania zawartości kwasu mlekowego i mleczanów w mleku w proszku, zwana dalej „metodą”, polega na jednoczesnym usunięciu z roztworu próbki tłuszczu, białka i laktozy poprzez dodanie siarczanu miedzi i wodorotlenku wapnia, a następnie jego przefiltrowaniu; kwas mlekowy i mleczany w filtracie

są przekształcane w aldehyd octowy przy użyciu stężonego kwasu siarkowego(VI) w obecności siarczanu(VI) miedzi(II); zawartość kwasu mlekowego oznacza się kolorymetrycznie przy użyciu p-hydroksydwufenylu; zawartość kwasu mlekowego i mleczanów jest wyrażana w miligramach kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej.

2. Zawartość kwasu mlekowego i mleczanów w mleku w proszku oznacza zawartość kwasu mlekowego i mleczanów w przeliczeniu na kwas mlekowy, oznaczoną niniejszą metodą.

3. W metodzie używa się podstawowego sprzętu laboratoryjnego oraz:

- 1) wagi analitycznej umożliwiającej ważenie z dokładnością co najmniej do 0,1 mg;
- 2) spektrofotometru odpowiedniego do odczytów przy długości fali 570 nm;
- 3) łaźni wodnej o temperaturze 30 °C ± 2 °C;
- 4) moździerza i tłuczka do moździerza;
- 5) bibuły filtracyjnej, takiej jak Schleicher i Schull 595, Whatman 1 albo równorzędnej;
- 6) probówek ze szkła pyreksowego albo równorzędnych, o średnicy 25 mm i długości 150 mm;
- 7) wrzącej łaźni wodnej.

4. Sprzęt szklany wykorzystywany w metodzie powinien być idealnie czysty i przeznaczony wyłącznie do niniejszego oznaczania; sprzęt szklany zawierający pozostałości osadu powinien być opłukany przed umyciem stężonym kwasem chlorowodorowym.

5. W metodzie wykorzystuje się wodę destylowaną, demineralizowaną albo o co najmniej równorzędnej czystości oraz następujące odczynniki odpowiadające jakości analitycznej:

- 1) roztwór siarczanu(VI) miedzi(II) otrzymywany przez rozpuszczenie w wodzie 250 g siarczanu(VI) miedzi(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) i uzupełnienie wodą do objętości 1 000 ml;
- 2) zawiesiny wodorotlenku wapnia przygotowane bezpośrednio przed użyciem w następujący sposób:
  - a) 300 g wodorotlenku wapnia ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) rozciera się w moździerzu z wodą i uzupełnienia wodą do objętości 900 ml,
  - b) 300 g wodorotlenku wapnia ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) rozciera się w moździerzu z wodą i uzupełnienia wodą do objętości 1 400 ml;
- 3) roztwór kwasu siarkowego(VI) i siarczanu(VI) miedzi(II) otrzymywany przez dodanie do 300 ml kwasu siarkowego(VI) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), o stężeniu od 95,9 % do 97,0 % (m/m), 0,5 ml roztworu siarczanu(VI) miedzi(II);
- 4) roztwór p-hydroksydwufenylu ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) przygotowany w następujący sposób:
  - a) rozpuszcza się przez wytrząsanie i łagodne ogrzewanie 0,75 g p-hydroksydwufenylu w 5 ml



wodnego roztworu wodorotlenku sodu zawierającego 5 g NaOH w 100 ml,

- b) roztwór rozcieńcza się wodą w kolbie pomiarowej do 50 ml, a następnie przechowuje się go w butelce z ciemnego szkła, w ciemnym i chłodnym miejscu,
  - c) roztworu nie stosuje się, jeżeli jego kolor ulegnie zmianie lub pojawi się zmętnienie; maksymalny okres trwałości roztworu wynosi 72 godziny;
- 5) roztwór wzorcowy kwasu mlekowego, którego 1 ml odpowiada 0,1 mg kwasu mlekowego, otrzymywany bezpośrednio przed użyciem przez rozpuszczenie w wodzie, w kolbie pomiarowej, 0,1067g mleczanu litu ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$ ) i uzupełnienie wodą do 1 000 ml;
- 6) wzorzec regenerowanego mleka przygotowany w następujący sposób:
- a) przeprowadza się analizę kilkunastu próbek wysokiej jakości mleka w proszku,
  - b) do przygotowania krzywej wzorcowej wybiera się próbkę o najniższej zawartości kwasu mlekowego, zawierającą nie więcej niż 30 mg kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej,
  - c) przeprowadza się czynności określone w ust. 8 pkt 2 i 4.

6. Równocześnie z oznaczaniem zawartości kwasu mlekowego i mleczanów w próbce, przeprowadza się próbę ślepą, umieszczając 30 ml wody w skalowanej probówce o pojemności 50 ml i wykonując kolejno czynności określone w ust. 8 pkt 7—15; w przypadku gdy wynik próby ślepej przekracza równowartość 20 mg kwasu mlekowego w 100 g suchej masy beztłuszczowej, odczynniki sprawdza się, a zanieczyszczone wymienia się.

7. Podczas oznaczania zawartości kwasu mlekowego i mleczanów w mleku w proszku należy unikać zanieczyszczenia próbki, szczególnie śliną lub potem.

8. W celu oznaczenia zawartości kwasu mlekowego i mleczanów w mleku w proszku dokonuje się następujących czynności:

- 1) oznacza się zawartość suchej masy beztłuszczowej próbki w gramach przez odjęcie od 100 zawartości tłuszczu oznaczonej przy zastosowaniu metody, o której mowa w części IX, i zawartości wody oznaczonej przy zastosowaniu metody, o której mowa w części III;

- 2) odważa się  $\frac{1\ 000}{(a-10)}$  g próbki z dokładnością do 0,1 g,

gdzie „a” jest równe zawartości suchej masy beztłuszczowej próbki oznaczonej zgodnie z pkt 1;

- 3) próbkę dodaje się do 100 ml wody i dokładnie miesza;

- 4) 5 ml otrzymanego roztworu odmierza się pipetą do skalowanej probówki o pojemności 50 ml i uzupełnia wodą do około 30 ml;

- 5) dodaje się powoli, wytrząsając, 5 ml roztworu siarczanu(VI) miedzi(II), a następnie probówkę odstawia się na 10 minut;

- 6) dodaje się powoli, wytrząsając, 5 ml zawiesiny wodorotlenku wapnia, o której mowa w ust. 5 pkt 2 lit. a, albo 10 ml zawiesiny wodorotlenku wapnia, o której mowa w ust. 5 pkt 2 lit. b;

- 7) roztwór uzupełnia się wodą do 50 ml, wytrząsa energicznie, a następnie odstawia się probówkę na 10 minut;

- 8) roztwór filtruje się; pierwszą porcję filtratu odrzuca się;

- 9) odmierza się pipetą 1 ml filtratu do probówki;

- 10) przy użyciu biurety albo wyskalowanej pipety dodaje się do probówki 6,0 ml roztworu kwasu siarkowego(VI) i siarczanu(VI) miedzi(II), a następnie roztwór miesza się;

- 11) probówkę ogrzewa się we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut, a następnie schładza do temperatury pokojowej pod bieżącą wodą;

- 12) dodaje się 2 krople odczynnika p-hydroksydwufenylny i energicznie wytrząsa tak, aby odczynnik rozprzecznić równomiernie w całej cieczy;

- 13) probówkę umieszcza się na 15 minut w łaźni wodnej w temperaturze  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , wytrząsając od czasu do czasu;

- 14) probówkę umieszcza się na 90 sekund we wrzącej łaźni wodnej, a następnie schładza do temperatury pokojowej pod bieżącą wodą;

- 15) dokonuje się pomiaru wartości absorbancji wobec próby ślepej, o której mowa w ust. 6, w ciągu trzech godzin przy długości fali 570 nm;

- 16) w przypadku gdy wartość absorbancji przekracza wartość najwyższego punktu na krzywej wzorcowej, o której mowa w ust. 9, oznaczanie powtarza się, stosując odpowiednie rozcieńczenia filtratu otrzymanego zgodnie z pkt 8.

9. Przygotowuje się krzywą wzorcową, dokonując następujących czynności:

- 1) do pięciu skalowanych probówek o pojemności 50 ml odmierza się pipetą po 5 ml mleka regenerowanego;

- 2) do probówek, o których mowa w pkt 1, odmierza się pipetą odpowiednio 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml i 4 ml roztworu wzorcowego kwasu mlekowego, aby otrzymać stężenia odpowiednio 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg i 80 mg kwasu mlekowego w 100 g suchej masy beztłuszczowej mleka w proszku;

- 3) roztwory uzupełnia się wodą do około 30 ml i dokonuje się czynności określonych w ust. 8 pkt 6—15;

- 4) dokonuje się pomiaru wartości absorbancji wzorców, o których mowa w pkt 2, wobec próby ślepej przy długości fali 570 nm;

- 5) na podstawie odczytów nanosi się na wykres wartości absorbancji dla ilości kwasu mlekowego, o których mowa w pkt 2;
- 6) przez naniesione punkty przeprowadza się najbliższą im linię prostą i wykreśla się krzywą wzorcową przez równoległe przesuwanie otrzymanej linii prostej tak, aby przechodziła przez punkt wyjściowy.

10. Zawartość kwasu mlekowego i mleczanów w mleku w proszku oblicza się, korzystając z krzywej wzorcowej, przekształcając wartość absorbancji odczytanej zgodnie z ust. 8 pkt 15 albo 16 na miligramy kwasu mlekowego w 100 g suchej masy beztłuszczowej próbki.

11. W przypadku gdy w trakcie oznaczania rozcieńczono filtrat zgodnie z ust. 8 pkt 16, otrzymany wynik absorbancji należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

12. Powtarzalność dla metody jest różnicą pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równoległe albo w krótkim odstępie czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka i w tych samych warunkach, która nie powinna przekraczać 8 mg kwasu mlekowego w 100 g suchej masy beztłuszczowej dla zawartości do 80 mg; dla wyższych wartości różnica ta nie powinna przekraczać 10 % najniższej wartości.

13. Z analizy laboratoryjnej sporządza się protokół, który powinien zawierać:

- 1) nazwę zastosowanej metody;
- 2) uzyskane wyniki;
- 3) wszystkie czynności niewymienione w metodzie lub uznane za nieobowiązkowe, łącznie ze szczegółami każdej okoliczności, która mogła wpłynąć na wyniki oznaczania;
- 4) informacje niezbędne do pełnego zidentyfikowania próbki.

14. Wynik zamieszczony w protokole analizy laboratoryjnej powinien spełniać kryteria powtarzalności określone dla metody.

## VI. METODA OZNACZANIA AKTYWNOŚCI FOSFATAZY W MLEKU W PROSZKU (ZMODYFIKOWANA METODA SANDERSA I SAGERA)

1. Metoda oznaczania aktywności fosfatazy w mleku w proszku, zwana dalej „metodą”, polega na określeniu zdolności fosfatazy do uwalniania fenolu z fenylfosforanu dwusodu; ilość uwolnionego fenolu oznaczana jest przez spektrofotometryczny pomiar barwy wywołanej przez odczynnik Gibba.

2. Aktywność fosfatazy w mleku w proszku jest miarą ilości aktywnej fosfatazy alkalicznej obecnej w produkcie, oznaczonej niniejszą metodą, i jest ona wyrażona jako ilość fenolu w  $\mu\text{g}$ , uwalnianego przez 1 ml mleka regenerowanego.

3. W metodzie używa się podstawowego sprzętu laboratoryjnego oraz:

- 1) wagi analitycznej umożliwiającej ważenie z dokładnością co najmniej do 0,1 mg;
- 2) łaźni wodnej z termostatyczną regulacją temperatury, o temperaturze  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- 3) spektrofotometru odpowiedniego do odczytów przy długości fali 610 nm;
- 4) bibuły filtracyjnej, takiej jak Schleicher i Schull 597, Whatman 42 albo równorzędnej;
- 5) wrzącej łaźni wodnej;
- 6) folii aluminiowej.

4. W metodzie wykorzystuje się wodę destylowaną, demineralizowaną albo o co najmniej równorzędnej czystości oraz następujące odczynniki odpowiadające jakości analitycznej:

- 1) roztwór A — bufor — wodorotlenek boranowo-borowy o pH  $10,6 \pm 0,1$  w temperaturze  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , przygotowany w następujący sposób:
  - a) rozpuszcza się 25,0 g 8 · hydratu wodorotlenku baru ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) w wodzie i rozcieńcza do 500 ml,
  - b) rozpuszcza się 11,0 g kwasu ortoborowego ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) w wodzie i rozcieńcza wodą do 500 ml,
  - c) roztwory, o których mowa w lit. a i b, ogrzewa się do temperatury  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , miesza się, wytrząsa, a następnie schładza do temperatury pokojowej,
  - d) pH doprowadza się do  $10,6 \pm 0,1$  przy użyciu roztworu wodorotlenku baru, następnie roztwór filtruje się i przechowuje w szczelnie zamkniętym pojemniku,
  - e) przed użyciem bufor rozcieńcza się taką samą ilością wody;
- 2) roztwór B — bufor wywołujący barwę otrzymywany przez rozpuszczenie 6,0 g metaboranu sodu ( $\text{NaBO}_2$ ) albo 12,6 g ( $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) i 20,0 g chloru sodu ( $\text{NaCl}$ ) w wodzie i rozcieńczeniu wodą do 1 000 ml;
- 3) roztwór C — roztwór substratu buforowego przygotowany w następujący sposób:
  - a) rozpuszcza się 0,5 g fenylfosforanu dwusodu ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) w 4,5 ml roztworu B; dodaje się dwie krople roztworu E, odstawia na 30 minut, a następnie wywołuje się barwę przy użyciu 2,5 ml butanolu; w przypadku gdy jest to konieczne, wywołanie barwy powtarza się; po rozdzieleniu odrzuca się butanol; roztwór można przechowywać kilka dni w chłodniarce, a przed użyciem ponownie wywołuje się barwę,
  - b) do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml odmierza się pipetą 1 ml roztworu, o którym mowa w lit. a, i uzupełnia się roztworem A,

- c) roztwór buforowy, o którym mowa w lit. b, przygotowuje się tuż przed użyciem;
  - 4) roztwór D — odczynnik strącający, otrzymywany przez rozpuszczenie w wodzie 3,0 g siarczanu(VI) cynku ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) i 0,6 g siarczanu(VI) miedzi(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) i uzupełnienie wodą do 100 ml;
  - 5) roztwór E — odczynnik Gibba otrzymywany przez rozpuszczenie 0,040 g 2,6-dwubromochinonu 1,4-chloroimidu  $\text{OC}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{NCl}$  w 10 ml 96 % etanolu; roztwór przechowuje się w ciemnej szklanej butelce w chłodziarce; w przypadku odbarwienia nie należy go używać;
  - 6) bufor rozcieńczenia barwy otrzymywany przez rozcieńczenie do 100 ml wodą 10 ml roztworu B;
  - 7) roztwór siarczanu(VI) miedzi(II) otrzymywany przez rozpuszczenie w wodzie 0,05 g siarczanu(VI) miedzi(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) i uzupełnienie wodą do 100 ml;
  - 8) roztwór wzorca fenolowego przygotowany w następujący sposób:
    - a) 0,200 g  $\pm$  0,001 g czystego fenolu rozpuszcza się w wodzie i uzupełnia wodą do 100 ml w kolbie pomiarowej,
    - b) roztwór może być przechowywany w chłodziarce przez kilkanaście miesięcy,
    - c) 10 ml roztworu rozcieńcza się wodą do 100 ml,
    - d) rozcieńczony roztwór zawiera 200  $\mu\text{g}$  fenolu w 1 ml i może być stosowany do przygotowywania bardziej rozcieńczonych roztworów;
  - 9) wodę destylowaną, przegotowaną;
  - 10) n-butanol.
5. Podczas oznaczania aktywności fosfatazy należy zachować następując środki ostrożności:
- 1) należy unikać bezpośredniego oddziaływania promieni słonecznych;
  - 2) szkło, korki i materiały służące do oznaczania powinny być idealnie czyste; zaleca się, aby były płukane i wyparzone wodą albo parą;
  - 3) należy unikać stosowania materiałów z tworzywa sztucznego takich jak korki, ponieważ mogą zawierać fenole;
  - 4) należy unikać zanieczyszczenia śliną.
6. W celu oznaczenia aktywności fosfatazy w mleku w proszku dokonuje się następujących czynności:
- 1) odważa się 10 g próbki z dokładnością do 0,1 g i rozpuszcza się ją w 90 ml wody, przy czym temperatura regeneracji proszku nie może przekroczyć 35 °C;
  - 2) do dwóch probówek odmierza się po 1 ml próbki mleka regenerowanego przygotowanego zgodnie z pkt 1;
  - 3) jedną z probówek ogrzewa się we wrzącej łaźni wodnej przez 2 minuty; probówkę i łaźnię wodną przykrywa się folią aluminiową tak, aby cała probówka była ogrzewana;
  - 4) probówkę schładza się do temperatury pokojowej w zimnej wodzie;
  - 5) probówki, o której mowa w pkt 4, używa się do przeprowadzenia próby ślepej;
  - 6) w kolejnych czynnościach obie probówki traktuje się w identyczny sposób;
  - 7) dodaje się po 10 ml roztworu C, miesza zawartość probówek, a następnie wstawia się je do łaźni wodnej o temperaturze 37 °C  $\pm$  1 °C;
  - 8) probówki inkubuje się w łaźni wodnej przez jedną godzinę, od czasu do czasu wytrząsając;
  - 9) probówki przenosi się niezwłocznie do wrzącej łaźni wodnej i ogrzewa się przez 2 minuty, a następnie schładza zimną wodą do temperatury pokojowej;
  - 10) dodaje się po 1 ml roztworu D i miesza się zawartość probówek;
  - 11) roztwory przesącza się przez suchą bibułę filtracyjną;
  - 12) odrzuca się pierwsze porcje filtratów aż do uzyskania klarownej cieczy;
  - 13) do probówek odmierza się po 5 ml każdego filtratu;
  - 14) dodaje się po 5 ml roztworu B i po 0,1 ml roztworu E, a następnie miesza się zawartości probówek;
  - 15) probówki odstawia się na 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemne miejsce, do czasu, aż pojawi się barwa;
  - 16) dokonuje się pomiaru wartości absorbancji roztworu próbki wobec próby ślepej przy długości fali 610 nm;
  - 17) w przypadku gdy wartość absorbancji roztworu znajduje się powyżej wartości próbki wzorcowej, o której mowa w ust. 7, zawierającej 20  $\mu\text{g}$  fenolu, oznaczenie powtarza się po wcześniejszym rozcieńczeniu próbki mleka regenerowanego odpowiednią objętością tego mleka ostrożnie ogrzanego do wrzenia zgodnie z pkt 3 i 4, w celu unieczynienia obecnej fosfatazy.
7. Przygotowuje się krzywą wzorcową, dokonując kolejno następujących czynności:
- 1) do czterech kolb pomiarowych o pojemności 100 ml odmierza się 1 ml, 3 ml, 5 ml i 10 ml roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 4 pkt 8, i uzupełnia wodą do 100 ml; roztwory te zawierają odpowiednio 2  $\mu\text{g}$ , 6  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  i 20  $\mu\text{g}$  fenolu w 1 ml;
  - 2) do kolejnych probówek odmierza się pipetą 1 ml wody dla próby ślepej i po 1 ml każdego roztworu wzorcowego, o których mowa w pkt 1, aby uzyskać serię próbek zawierających 0  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 6  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  i 20  $\mu\text{g}$  fenolu;

- 3) odmierza się pipetą kolejno do każdej probówki 1 ml roztworu siarczanu(VI) miedzi(II), 5 ml roztworu buforowego rozcieńczenia barwy, 3 ml wody i 0,1 ml roztworu E, a następnie miesza się zawartość probówek;
- 4) probówki odstawia się na 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemne miejsce;
- 5) dokonuje się pomiaru wartości absorbancji roztworów w każdej z probówek wobec próby ślepej przy długości fali 610 nm;
- 6) wykreśla się krzywą wzorcową, zestawiając wartości absorbancji dla ilości fenolu w  $\mu\text{g}$  określonych w pkt 2.

8. Aktywność fosfatazy w próbce oblicza się w następujący sposób:

- 1) z krzywej wzorcowej odczytuje się ilość  $\mu\text{g}$  fenolu dla wartości absorbancji uzyskanych zgodnie z ust. 6 pkt 16;
- 2) oblicza się aktywność fosfatazy, wyrażoną w  $\mu\text{g}$  fenolu na 1 ml mleka regenerowanego, według następującego wzoru:

$$\text{aktywność fosfatazy} = 2,4 \times P$$

gdzie  $P$  oznacza ilość fenolu uzyskaną zgodnie z pkt 1, w mikrogramach;

- 3) w przypadku gdy w trakcie wykonywania analizy rozcieńczano roztwór zgodnie z ust. 6 pkt 17, otrzymany wynik, o którym mowa w pkt 2, mnoży się przez współczynnik rozcieńczenia.

9. Powtarzalność dla metody jest różnicą pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń, przeprowadzonych równoległe albo w krótkim odstępie czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka i w tych samych warunkach, która nie powinna przekraczać 2  $\mu\text{g}$  fenolu uwolnionego przez 1 ml mleka regenerowanego.

10. Z analizy laboratoryjnej sporządza się protokół, który powinien zawierać:

- 1) nazwę zastosowanej metody;
- 2) uzyskane wyniki;
- 3) wszystkie czynności niewymienione w metodzie lub uznane za nieobowiązkowe, łącznie ze szczegółami każdej okoliczności, która mogła wpłynąć na wyniki oznaczania;
- 4) informacje niezbędne do pełnego zidentyfikowania próbek.

11. Wynik zamieszczony w protokole analizy laboratoryjnej powinien spełniać kryteria powtarzalności określone dla metody.

## VII. METODA OZNACZANIA AKTYWNOŚCI FOSFATAZY W MLEKU W PROSZKU (METODA ASCHAFFENBURGA I MULLENA)

1. Metoda oznaczania aktywności fosfatazy w mleku w proszku, zwana dalej „metodą”, polega na rozcieńczeniu regenerowanej próbki mleka substratem

buforowym przy pH 10,2 i inkubacji w temperaturze 37 °C przez dwie godziny; cała fosfataza alkaliczna obecna w próbce będzie w tych warunkach uwalniać p-nitrofenol z dodanego p-nitrofenylofosforanu dwusodu; uwolniony p-nitrofenol jest oznaczany przez bezpośrednie porównania z wzorcowymi szkiełkami barwnymi w komparatorze przy zastosowaniu światła odbitego.

2. Aktywność fosfatazy w mleku w proszku jest miarą ilości aktywnej fosfatazy alkalicznej obecnej w produkcie, oznaczonej niniejszą metodą, i jest ona wyrażona jako ilość p-nitrofenolu w mikrogramach, uwalnianego przez 1 ml mleka regenerowanego.

3. W metodzie używa się podstawowego sprzętu laboratoryjnego oraz:

- 1) wagi analitycznej umożliwiającej ważenie z dokładnością co najmniej do 0,1 mg;
- 2) łaźni wodnej z termostatyczną regulacją temperatury 37 °C  $\pm$  1 °C;
- 3) komparatora z krążkiem zawierającym wzorcowe szkiełka barwne wyskalowane w  $\mu\text{g}$  p-nitrofenolu w 1 ml mleka oraz naczynka o wymiarach 2 mm na 25 mm;

4. W metodzie wykorzystuje się wodę destylowaną, demineralizowaną albo o co najmniej równorzędnej czystości oraz następujące odczynniki odpowiadające jakości analitycznej:

- 1) roztwór buforowy wodorowęglanu i węglanu sodu otrzymywany przez rozpuszczenie w wodzie w kolbie pomiarowej 3,5 g bezwodnego węglanu sodu i 1,5 g wodorowęglanu sodu i uzupełnienie wodą do 1 000 ml;
- 2) substrat buforowy otrzymywany przez rozpuszczenie w kolbie pomiarowej 1,5 g p-nitrofenylofosforanu dwusodu w roztworze buforowym, o którym mowa w pkt 1, i uzupełnienie tym roztworem buforowym do 1 000 ml;
- 3) roztwory klarujące:
  - a) roztwór siarczanu(VI) cynku otrzymywany przez rozpuszczenie w kolbie pomiarowej 30,0 g siarczanu(VI) cynku ( $\text{ZnSO}_4$ ) i uzupełnienie wodą do 100 ml,
  - b) roztwór heksacyjanożelazianu(II) potasu otrzymywany przez rozpuszczenie w kolbie pomiarowej 17,2 g heksacyjanożelazianu(II) potasu  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  i uzupełnienie wodą do 100 ml.

5. Podczas oznaczania aktywności fosfatazy należy zachować następując środki ostrożności:

- 1) probówki powinny być opróżnione, wypłukane w wodzie wodociągowej, umyte w gorącej wodzie zawierającej detergent alkaliczny, starannie wypłukane w czystej gorącej wodzie wodociągowej, a następnie wypłukane w wodzie, o której mowa w ust. 4, i wysuszone przed użyciem;

- 2) pipety powinny być wyflukane w czystej, zimnej wodzie wodociągowej natychmiast po użyciu, a następnie przepłukane wodą, o której mowa w ust. 4, i wysuszone przed użyciem;
  - 3) korki probówek powinny być dokładnie wyflukane w gorącej wodzie wodociągowej tuż po użyciu a następnie zanurzone we wrzącej wodzie na 2 minuty;
  - 4) roztwór substratu buforowego jest stabilny przez co najmniej miesiąc, jeżeli jest przechowywany w chłodniarce w temperaturze 4 °C lub niższej; wszelka niestabilność jest sygnalizowana przez powstanie żółtego zabarwienia; przed użyciem roztworu powinna być przeprowadzona próba kontrolna barwy; w związku z tym, że próbę odczytuje się zawsze wobec zagotowanej próbki kontrolnej zawierającej ten sam roztwór substratu buforowego, zaleca się, aby nie używać roztworu, jeśli daje on odczyt barwny powyżej 10 µg przy odczycie w 25 mm naczynku komparatora wobec wody destylowanej w drugim 25 mm naczynku;
  - 5) należy używać oddzielnej pipety do każdej próbki i unikać zanieczyszczenia pipety śliną;
  - 6) próbki nie wystawia się na bezpośrednie oddziaływanie promieni słonecznych.
6. W celu oznaczenia aktywności fosfatazy w mleku w proszku dokonuje się następujących czynności:
- 1) rozpuszcza się 10 g mleka w proszku w 90 ml wody, przy czym temperatura podczas rozpuszczania nie może przekroczyć 35 °C;
  - 2) do czystej, suchej probówki odmierza się pipetą 15 ml substratu buforowego;
  - 3) dodaje się 2 ml regenerowanej próbki, o której mowa w pkt 1;
  - 4) probówkę zamyka się korkiem, miesza przez odwracanie i umieszcza w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C ± 1 °C;
  - 5) jednocześnie umieszcza się w łaźni wodnej probówkę kontrolną zawierającą 15 ml substratu buforowego i 2 ml ogrzanej do wrzenia próbki regenerowanej, o której mowa w pkt 1;
  - 6) po dwóch godzinach wyjmuje się obie probówki z łaźni wodnej;
  - 7) dodaje się po 0,5 ml roztworu siarczanu(VI) cynku, a następnie probówki zamyka się korkami, wytrząsa energicznie i odstawia na 3 minuty;
  - 8) dodaje się po 0,5 ml roztworu heksacyjanożelazianu(II) potasu i starannie miesza;
  - 9) otrzymane roztwory filtruje się przez karbowany sączek z bibuły filtracyjnej, a klarowne filtry zbiera się w czystych probówkach;
- 10) filtry przenosi się do 25 mm naczynek i porównuje w komparatorze filtrat próbki z filtrem zagotowanej próbki kontrolnej.
7. Aktywność fosfatazy w próbce określa się przez bezpośredni odczyt wyniku uzyskanego zgodnie z ust. 6 pkt 10 i wyraża jako ilość µg p-nitrofenolu w 1 ml próbki regenerowanej.
8. Powtarzalność dla metody jest różnicą pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych równoległe albo w krótkim odstępie czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka i w tych samych warunkach, która nie może przekraczać 2 µg p-nitrofenolu, uwolnionego przez 1 ml mleka regenerowanego.
9. Z analizy laboratoryjnej sporządza się protokół, który powinien zawierać:
- 1) nazwę zastosowanej metody;
  - 2) uzyskane wyniki;
  - 3) wszystkie czynności niewymienione w metodzie lub uznane za nieobowiązkowe, łącznie ze szczegółami każdej okoliczności, która mogła wpłynąć na wyniki oznaczania;
  - 4) informacje niezbędne do pełnego zidentyfikowania próbki.
10. Wynik zamieszczony w protokole analizy laboratoryjnej powinien spełniać kryteria powtarzalności określone dla metody.
11. W przypadku oznaczania aktywności fosfatazy w mleku w proszku może być zastosowana zmodyfikowana metoda Sandersa i Sagera albo metoda Aschaffenburga i Mullena, przy czym w protokole badań należy wskazać, która metoda została zastosowana.

#### VIII. METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU W MLEKU ZAGĘSZCZONYM (METODA RÖSE-GOTTLIEBA)

Zawartość tłuszczu w mleku zagęszczonym oznacza się zgodnie z metodą określoną w Normie PN-EN ISO 1737: 2002 Mleko zagęszczone i mleko zagęszczone słodzone — Oznaczanie zawartości tłuszczu — Metoda grawimetryczna (Metoda odwoławcza).

#### IX. METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU W MLEKU W PROSZKU (METODA RÖSE-GOTTLIEBA)

Zawartość tłuszczu w mleku w proszku oznacza się zgodnie z metodą określoną w Normie PN-EN ISO 1736: 2002 Mleko w proszku i przetwory mleczne w proszku — Oznaczanie zawartości tłuszczu — Metoda grawimetryczna (Metoda odwoławcza).