

32001R0213

7.2.2001

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 37/1

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 213/2001

z dnia 9 stycznia 2001 r.

ustanawiające szczegółowe zasady stosowania rozporządzenia Rady (WE) nr 1255/1999 w odniesieniu do metod analizy oraz oceny jakości mleka i przetworów mlecznych oraz zmieniające rozporządzenia (WE) nr 2771/1999 i (WE) nr 2799/1999

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając rozporządzenie Rady (WE) nr 1255/1999 z dnia 17 maja 1999 r. w sprawie wspólnej organizacji rynku mleka i przetworów mlecznych⁽¹⁾, w szczególności jego art. 10 i 15 oraz art. 26 ust. 3, art. 29 ust. 1 i art. 31 ust. 14,

a także mając na uwadze, co następuje:

(1) Rozporządzenia Komisji (EWG) nr 1216/68 i (EWG) nr 3942/92 i (WE) nr 86/94, (WE) nr 2721/95, (WE) nr 1080/96, (WE) nr 1081/96, (WE) nr 1082/96, (WE) nr 1854/96, (WE) nr 880/98 i (WE) nr 1459/98, do których pełne odniesienia znajdują się w załączniku XXVI do niniejszego rozporządzenia, określają referencyjne i rutynowe metody analizy i oceny jakości mleka i przetworów mlecznych oraz określają zakres i zasady stosowania tych metod. W celu uzyskania przejrzystości oraz w celu dostarczenia przedsiębiorcom działającym w branży jednego aktu zawierającego obowiązujące ich metody i zasady, wyżej wymienione rozporządzenia muszą zostać zmienione i zgromadzone w jednym tekście. Z tego samego powodu rozporządzenie Komisji (WE) nr 2771/1999 z dnia 16 grudnia 1999 r. ustanawiające szczegółowe zasady stosowania przepisów rozporządzenia Rady (WE) nr 1255/1999 w odniesieniu do interwencji na rynku masła i śmietany⁽²⁾ oraz (WE) nr 2799/1999 z dnia 17 grudnia 1999 r. ustanawiające szczegółowe zasady stosowania rozporządzenia (WE) nr 1255/1999 w zakresie przyznawania pomocy w odniesieniu do mleka odtuszczonego i mleka odtuszczonego w proszku przeznaczonych na paszę oraz sprzedaży mleka odtuszczonego w proszku o takim przeznaczeniu⁽³⁾ powinny zostać zmienione tak, aby załączniki do tych rozporządzeń dotyczące metod analizy mogły zostać włączone do niniejszego rozporządzenia.

(2) Skład oraz wymogi jakości w odniesieniu do mleka i przetworów mlecznych ustanowione w ramach uzgodnień przewidzianych w rozporządzeniu (WE) nr 1255/1999 muszą zostać zweryfikowane w celu zapewnienia ich bezwzględnej przestrzegania.

(3) Metody referencyjne mające zastosowanie do takich weryfikacji są często metodami publikowanymi przez międzynarodowe organizacje, takie jak CEN, IDF, ISO oraz AOAC International, i często przez nie uaktualnianymi. W niektórych przypadkach ustanowiona jest wspólnotowa metoda referencyjna, podczas gdy w innych przypadkach taka metoda referencyjna nie jest wymieniona w zasadach wspólnotowych. W celu zapewnienia jednolitego stosowania metod referencyjnych każdego roku powinien być sporządzany wykaz metod referencyjnych i tylko metody zawarte w tym wykazie, mogą być stosowane.

(4) Używanie metod rutynowych nie powinno być wykluczone. Dlatego powinny zostać określone warunki ich stosowania.

(5) Powinny również zostać ustanowione wspólne metody w celu zapewnienia jednolitej praktyki oceny wyników analiz, w ocenie sensorycznej danych produktów oraz w ponownym badaniu wyników spornych.

(6) W odniesieniu do niektórych analiz nie istnieją aktualnie zaakceptowane na szczeblu międzynarodowym zatwierdzone metody referencyjne, tak więc nie są dostępne informacje o różnicach wyników analitycznych między laboratoriami. Dlatego powinny zostać ustanowione metody wspólnotowe, potwierdzone zgodnie z międzynarodowymi regulami i stosowane jako metody referencyjne.

⁽¹⁾ Dz.U. L 160 z 26.6.1999, str. 48.

⁽²⁾ Dz.U. L 333 z 24.12.1999, str. 11.

⁽³⁾ Dz.U. L 340 z 31.12.1999, str. 3.

(7) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2571/97 z dnia 15 grudnia 1997 r. w sprawie sprzedaży masła po obniżonych cenach oraz przyznawania pomocy w odniesieniu do śmietany, masła i koncentratu masła, przeznaczonych do wykorzystania w produkcji ciast, lodów i innych środków spożywczych⁽¹⁾, ostatnio zmienione rozporządzeniem (WE) nr 635/2000⁽²⁾, przewiduje w niektórych okolicznościach, znaczenie śmietany, masła i koncentratu masła, w celu zapewnienia poprawnego końcowego wykorzystywania tych produktów. Ze względu na to, że znaczenie jest ważne, dla poprawnego działania systemu oraz w celu zapewnienia, że podmioty gospodarcze biorące w nim udział są jednakowo traktowane, powinny zostać określone wspólne metody określania niektórych z tych znaczników.

(8) Na mocy rozporządzenia Komisji (EWG) nr 3143/85 z dnia 11 listopada 1985 r. w sprawie sprzedaży po obniżonych cenach masła pochodzącego ze skupu interwencyjnego przeznaczonego do bezpośredniego spożycia w postaci koncentratu masła⁽³⁾, ostatnio zmienionego rozporządzeniem (WE) nr 101/1999⁽⁴⁾, rozporządzenia Komisji (EWG) nr 429/90 z dnia 20 lutego 1990 r. w sprawie przyznawania w formie przetargu pomocy na koncentrat masła przeznaczony do bezpośredniego spożycia we Wspólnocie⁽⁵⁾, ostatnio zmienionego rozporządzeniem (WE) nr 124/1999⁽⁶⁾, oraz rozporządzenia (WE) nr 251/97, dodawanie znaczników do koncentratu masła musi odbywać się pod nadzorem. Zgodność z wymogami dotyczącymi dodawania znaczników do koncentratu masła musi być ściśle egzekwowana tak, aby zapewnić, że produkty nie są fałszowane. Dlatego powinna zostać ustanowiona wspólna metoda wykrywania tych znaczników.

(9) Na mocy art. 9 rozporządzenia (WE) nr 1255/1999 może zostać przyznana pomoc w odniesieniu do prywatnego składowania serów z mleka owczego. W odniesieniu do tych samych produktów może być przyznawana specjalna refundacja na mocy art. 31 tego rozporządzenia. Sery z mleka owczego, mleka koziego, mleka bawolego oraz z mieszanin mleka owczego, koziego i bawolego mogą być przywożone z niektórych państw trzecich do Wspólnoty w ramach porozumień preferencyjnych. W świetle powyższych przepisów istnieje potrzeba określenia właściwych kontroli w celu zapewnienia, iż powyższe produkty nie zawierają mleka krowiego. Dlatego powinna zostać określona wspólnotowa metoda referencyjna w celu wykrywania mleka krowiego, bez uszczerbku dla stosowania metod rutynowych, pod warunkiem że są one zgodne z niektórymi kryteriami.

(10) Na mocy rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2921/90 z dnia 10 października 1990 r. w sprawie pomocy w odniesieniu do produkcji kazeiny i kazeinianów z mleka odtłuszczonego⁽⁷⁾, ostatnio zmienionego rozporządze-

niem (WE) nr 2654/1999⁽⁸⁾, musi zostać wykryty brak form bakterii *coli*. Uznana międzynarodowo metodą wykrywania form bakterii *coli* w mleku i przetworach mlecznych jest norma międzynarodowa IDF 73A: 1985. Jednakże norma ta ma zastosowanie tylko w zmodyfikowanej formie, do wykrywania form bakterii *coli* w przypadku pewnej ilości produktu. Dlatego musi zostać ustanowiona wspólnotowa metoda referencyjna wykrywania form bakterii *coli*, oparta na wyżej wymienionej normie.

(11) Rozporządzenie Rady (EWG) nr 2658/87 z dnia 23 lipca 1987 r. w sprawie nomenklatury taryfowej i statystycznej oraz w sprawie Wspólnej Taryfy Celnej⁽⁹⁾, ostatnio zmienione rozporządzeniem (WE) nr 254/2000⁽¹⁰⁾, przewiduje różne stawki celne w odniesieniu do mieszanek paszowych, objętych pozycją taryfową nr 2309, w zależności od ilości zawartych w nich przetworów mlecznych. W celu zapewnienia jednolitego stosowania omawianych zasad powinna zostać ustanowiona ogólnie obowiązująca metoda analizy zawartości laktozy, do obowiązkowego stosowania we wszystkich Państwach Członkowskich.

(12) Na mocy rozporządzenia (WE) nr 1255/1999 masło i mleko odtłuszczone w proszku przeznaczone do skupu interwencyjnego lub w przypadku mleka odtłuszczonego w proszku, na paszę dla zwierząt, muszą spełniać niektóre wymogi jakości. Powinny zostać ustanowione metody referencyjne w celu sprawdzania, czy wymienione wymogi są spełnione.

(13) Wdrożenie niektórych metod wprowadzonych po raz pierwszy w niniejszym rozporządzeniu wymagać będzie okresu dostosowawczego. Dlatego stosowanie wymienionych metod powinno być odroczone.

(14) Komitet Zarządzający ds. Mleka i Przetworów Mlecznych nie wydał opinii w terminie wyznaczonym przez jego przewodniczącego,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

ROZDZIAŁ I

PRZEPISY OGÓLNE

Artykuł 1

Zakres i dziedzina zastosowania

Niniejsze rozporządzenie ustanawia zasady stosowania metod analizy chemicznej, fizycznej i mikrobiologicznej, jak również sensorycznej oceny mleka i przetworów mlecznych, mających zastosowanie w ramach uzgodnień przewidzianych we wspólnej organizacji rynku mleka i przetworów mlecznych, określonej w rozporządzeniu (WE) nr 1255/1999. Niniejsze rozporządzenie określa również niektóre z tych metod.

⁽¹⁾ Dz.U. L 350 z 20.12.1997, str. 3.

⁽²⁾ Dz.U. L 76 z 25.3.2000, str. 9.

⁽³⁾ Dz.U. L 298 z 12.11.1985, str. 9.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 11 z 16.1.1999, str. 14.

⁽⁵⁾ Dz.U. L 45 z 21.2.1990, str. 8.

⁽⁶⁾ Dz.U. L 16 z 21.1.1999, str. 19.

⁽⁷⁾ Dz.U. L 279 z 11.10.1990, str. 22.

⁽⁸⁾ Dz.U. L 325 z 17.12.1999, str. 10.

⁽⁹⁾ Dz.U. L 256 z 7.9.1987, str. 1.

⁽¹⁰⁾ Dz.U. L 28 z 3.2.2000, str. 16.

Artykuł 2

Wykaz metod

1. Załącznik I do niniejszego rozporządzenia zawiera wykaz metod referencyjnych stosowanych w analizach, określonych w art. 1.
2. Komisja aktualizuje wykaz, przynajmniej raz w roku, zgodnie z procedurą ustanowioną w art. 42 rozporządzenia (WE) nr 1255/1999.

Artykuł 3

Metody rutynowe

Metody rutynowe mogą być wykorzystywane w celu wykonywania analiz wymaganych przez zasady wspólnotowe pod warunkiem, że metody te są odpowiednio kalibrowane i regularnie sprawdzane w porównaniu z metodami referencyjnymi.

Procedura określona w załączniku II może być stosowana w celu sprawdzenia wyników otrzymanych na podstawie metod rutynowych, które są zbliżone do wartości granicznych określonych w stosownych rozporządzeniach.

W przypadku sporu ostateczne są wyniki uzyskane w zastosowaniu metody referencyjnej.

Artykuł 4

Potwierdzenie metod referencyjnych

1. Metody referencyjne są potwierdzane, jeżeli spełniają wcześniej ustalone kryteria dokładności, dotyczące wartości granicznych powtarzalności i odtwarzalności.
2. Jeżeli metoda referencyjna ustanowiona w stosownych rozporządzeniach nie została potwierdzona, Państwa Członkowskie określają tymczasową wartość graniczną odtwarzalności.

Ta wartość graniczna jest uzyskiwana zgodnie z procedurą określoną w załączniku III lit. b). Jednakże przez pierwszych 18 miesięcy od daty wejścia w życie niniejszego rozporządzenia Państwa Członkowskie mogą stosować procedurę równorzędną.

Zgodność z wartością graniczną jest sprawdzana przynajmniej raz w roku.

3. W przypadku gdy wyniki stosowania potwierdzonych metod referencyjnych lub metod o tymczasowych wielkościach precyzji wskazują, że wartość graniczna została przekroczona, wyniki analityczne mogą być oceniane z zastosowaniem metody określonej w załączniku IV w celu ustalenia różnicy krytycznej w stosunku do danej wartości granicznej.

Artykuł 5

Dopuszczalność wyników analizy

1. Analizy są przeprowadzane w laboratoriach stosujących procedurę wewnętrznej kontroli jakości, zgodnie z procedurą określoną w załączniku V lit. a) lub procedurę równorzędną.

Szczegółowy opis stosowanych procedur musi być dostępny w laboratorium w celach konsultacji.

2. Laboratoria ustanawiają własną wewnątrzlaboratoryjną precyzję w zastosowaniu wszystkich metod, na podstawie:
 - a) procedury określonej w załączniku V lit. b); lub
 - b) opublikowanej, potwierdzonej procedury o ustalonej powtarzalności.

Zgodność z wartością graniczną powtarzalności musi być sprawdzana przynajmniej raz w roku, z zastosowaniem procedury określonej w załączniku III lit. a).

Akapitu drugiego nie stosuje się w odniesieniu do laboratoriów, które w ciągu roku brały udział w programie kontroli biegłości.

3. Laboratoryjne protokoły wyników analiz muszą zawierać informacje wystarczające dla oceny wyników przeprowadzanej zgodnie z załącznikiem IV i załącznikiem VIII.
4. Za dopuszczalne uważa się wyniki uzyskane zgodnie z kryteriami dopuszczalności opisanymi w procedurze wewnętrznej kontroli jakości, określonej w ust. 1 oraz w wewnątrzlaboratoryjnej precyzji określonej w ust. 2.

Artykuł 6

Ocena sensoryczna

1. W odniesieniu do masła procedury opisane w załączniku VI są stosowane w celu sprawdzenia sprawności osób oceniających oraz wiarygodności wyników. Procedura określona w załączniku VII ma zastosowanie jako metoda referencyjna dla oceny sensorycznej.

2. W odniesieniu do mleka i przetworów mlecznych innych niż masło metodą referencyjną, która ma być stosowana przez Państwa Członkowskie do oceny sensorycznej, jest albo norma IDF 99C/1997 albo inne porównywalne metody, które są notyfikowane Komisji.

Procedury opisane w załączniku VI mogą być stosowane w celu sprawdzenia sprawności osób oceniających oraz wiarygodności wyników.

Artykuł 7

Pobieranie próbek oraz spory dotyczące wyników analiz

1. W celu wykonania wymaganych analiz zgodnie z zasadami wspólnotowymi muszą być pobierane duplikaty próbek.
2. W przypadku gdy wyniki analiz nie zostaną zaakceptowane przez podmiot gospodarczy, stosuje się procedurę określoną w załączniku VIII.

ROZDZIAŁ II

METODY ANALIZY

Artykuł 8

Zawartość wody/suchej masy beztłuszczowej/tłuszczu w maśle

1. Metoda analizy opisana w załączniku IX jest stosowana jako metoda referencyjna w celu oznaczenia zawartości wody w maśle.
2. Metoda analizy opisana w załączniku X jest stosowana jako metoda referencyjna w celu oznaczenia zawartości suchej masy beztłuszczowej w maśle.
3. Metoda analizy opisana w załączniku XI jest stosowana jako metoda referencyjna w celu oznaczenia zawartości tłuszczu w maśle.

Artykuł 9

Znaczniki

1. Metoda analizy opisana w załączniku XII jest stosowana jako metoda referencyjna w celu oznaczenia zawartości waniliny w koncentracie masła, w maśle i w śmietanie.
2. Metoda analizy opisana w załączniku XIII jest stosowana jako metoda referencyjna w celu oznaczenia zawartości estru etylowego kwasu beta-apo-8-karotenowego w koncentracie masła i w maśle.
3. Metoda analizy opisana w załączniku XIV jest stosowana jako metoda referencyjna w celu oznaczenia zawartości beta-stosterolu lub stigmasterolu w maśle i koncentracie masła.
4. Uważa się, że znaczniki zostały dodane do koncentratu masła, masła i śmietany zgodnie z odpowiednimi przepisami Wspólnoty w przypadku, gdy uzyskane wyniki odpowiadają specyfikacjom ust. 8 załączników określonych w ust. 1, 2 i 3.

Artykuł 10

Wykrywanie kazeiny mleka krowiego

1. Metoda referencyjna analizy opisana w załączniku XV jest stosowana w celu zapewnienia, że ser, który musi być wyprodukowany wyłącznie z mleka owczego, mleka koziego lub mleka bawolego albo z mieszanin mleka owczego, koziego i bawolego, nie zawiera kazeiny mleka krowiego.

Uznaje się obecność kazeiny mleka krowiego w produkcie, jeżeli jej zawartość w próbce pobranej do analizy jest równa lub większa niż zawartość w próbce referencyjnej zawierającej 1 % mleka krowiego, jak określono w załączniku XV.

2. Rutynowe metody wykrywania kazeiny mleka krowiego w serze określone w ust. 1 mogą być stosowane pod warunkiem, że:

a) wartość graniczna wykrywania wynosi 0,5 % lub mniej;

b) nie występują fałszywie pozytywne wyniki;

c) kazeina mleka krowiego jest wykrywalna, z wymaganą czułością, również po upływie długich okresów dojrzewania, które mogą wystąpić w zwykłych warunkach handlowych.

Jeżeli wymagania przewidziane w lit. b) nie są spełnione, każda próbka dająca pozytywny wynik musi zostać poddana analizie z zastosowaniem metody referencyjnej.

Jeżeli wymagania przewidziane w lit. c) nie są spełnione w odniesieniu do jednego z rodzajów sera określonego w ust. 1, ser ten musi być poddany analizie z zastosowaniem metody referencyjnej.

Artykuł 11

Wykrywanie form bakterii coli

1. Metoda referencyjna analizy opisana w załączniku XVI jest stosowana w celu wykrywania obecności form bakterii coli w maśle, odtłuszczonym mleku w proszku, kazeinie i kazeinianach.

2. Metody rutynowe można wykorzystywać do wykrywania form bakterii coli, pod warunkiem że uzyskane wyniki są porównywalne z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu metody referencyjnej, opisanej w tym Załączniku. Metody rutynowe muszą mieć w szczególności stosowną wartość graniczną wykrywalności. Nie mogą występować wyniki fałszywie negatywne. Jeżeli nie jest możliwe wykluczenie występowania wyników fałszywie pozytywnych, każdy wynik pozytywny musi być potwierdzony z zastosowaniem metody referencyjnej.

Artykuł 12

Zawartość laktozy

Metoda oznaczania zawartości laktozy w produktach objętych kodem CN 2309 opisana jest w załączniku XVII.

Artykuł 13

Wykrywanie serwatki podpuszczkowej

1. Metoda wykrywania serwatki podpuszczkowej w odtłuszczonym mleku w proszku przeznaczonym do składowania w magazynach państwowych opisana jest w załączniku XVIII.

2. Metoda wykrywania serwatki podpuszczkowej w mleku odtłuszczonym w proszku i mieszkach, przeznaczonych na pasze dla zwierząt, opisana jest w załączniku XIX.

Artykuł 14

Wykrywanie maślanki

Metoda wykrywania maślanki w mleku odtłuszczonym w proszku opisana jest w załączniku XX.

Artykuł 15

Pozostałości antymikrobiotyków

Metoda wykrywania pozostałości antybiotyków i sulfonamidów/dapsonu w mleku odtłuszczonym w proszku opisana jest w załączniku XXI.

Artykuł 16

Zawartość mleka odtłuszczonego w proszku

Metoda oznaczania zawartości mleka odtłuszczonego w proszku w mieszankach paszowych opisana jest w załączniku XXII.

Artykuł 17

Wykrywanie skrobi

Metoda wykrywania skrobi w mleku odtłuszczonym w proszku, zdenaturowanym mleku w proszku oraz w mieszankach paszowych opisana jest w załączniku XXIII.

Artykuł 18

Zawartość wilgoci w kwasowej maślanie w proszku

Metoda oznaczania zawartości wilgoci w kwasowej maślanie w proszku przeznaczonej do stosowania w paszach opisana jest w załączniku XXIV.

Artykuł 19

Wykrywanie tłuszczów obcych

Metoda wykrywania tłuszczów obcych w tłuszczach mleka opisana jest w załączniku XXV.

ROZDZIAŁ III

PRZEPISY KOŃCOWE

Artykuł 20

Zmiany w rozporządzeniu (WE) nr 2771/1999

W rozporządzeniu (WE) nr 2771/1999 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) W art. 4 ust. 1 zdanie pierwsze otrzymuje brzmienie: „Właściwe władze kontrolują jakość masła przy zastosowaniu metod opisanych w załączniku I oraz w oparciu o próbki pobierane zgodnie z zasadami określonymi w załączniku IV.”.
- 2) W załączniku I przypis 2 otrzymuje brzmienie: „Patrz załącznik I do rozporządzenia (WE) nr 213/2001.”.
- 3) Załączniki II i III skreśla się.

- 4) W załączniku IV.2 zdanie przedostatnie wyrazy „z załącznikiem III” zastępuje się wyrazami: „z załącznikiem VII do rozporządzenia (WE) nr 213/2001.”.

Artykuł 21

Zmiany w rozporządzeniu (WE) nr 2799/1999

W rozporządzeniu (WE) nr 2799/1999 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) W art. 20 ust. 1, 2, 3 i 4 otrzymują brzmienie:

„1. Zawartość mleka odtłuszczonego w proszku oraz w mieszankach i mieszankach paszowych ustala się poprzez zbadanie każdej próbki, co najmniej w dwóch egzemplarzach, z zastosowaniem metody analizy opisanej w załączniku XXII do rozporządzenia (WE) nr 213/2001, uzupełnionej o kontrole przewidziane w art. 17 ust. 3 niniejszego rozporządzenia. W razie wystąpienia rozbieżności między wynikami wymienionych kontroli wynik inspekcji na miejscu jest ostateczny.

2. Brak serwatki podpuszczkowej jest dowodzony z zastosowaniem metody opisanej w załączniku XIX do rozporządzenia (WE) nr 213/2001.

3. Zawartość skrobi w mieszankach paszowych jest oznaczana na podstawie kontroli przewidzianych w art. 17 ust. 3 niniejszego rozporządzenia, które muszą być uzupełnione zastosowaniem metody opisanej w załączniku XXIII do rozporządzenia (WE) nr 213/2001.

4. Zawartość wilgoci w kwasowej maślanie w proszku jest oznaczana z zastosowaniem metody analizy opisanej w załączniku XXIV do rozporządzenia (WE) nr 213/2001.”

- 2) Załączniki III, IV, V i VI skreśla się.

Artykuł 22

Uchylenia

Niniejszym rozporządzenia (EWG) nr 1216/68, (EWG) nr 3942/92, (WE) nr 86/94, (WE) nr 2721/95, (WE) nr 1854/96, (WE) nr 1080/96, (WE) nr 1081/96, (WE) nr 1082/96, (WE) nr 880/98 i (WE) nr 1459/98 tracą moc.

Odniesienia do uchylonych rozporządzeń należy traktować jako odniesienia do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 23

Wejście w życie

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie siódmego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Jednakże metody opisane w załącznikach III, IV.4, V, VI i VIII stosuje się 18 miesięcy po wejściu w życie niniejszego rozporządzenia.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest stosowane bezpośrednio we wszystkich Państwach Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 9 stycznia 2001 r.

W imieniu Komisji

Franz FISCHLER

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK I

(Art. 2)

WYKAZ METOD REFERENCYJNYCH

Spis treści

Min. = minimum, Maks. = maksimum, Załącznik = Załącznik do cytowanego rozporządzenia, SNF = sucha masa beztłuszczowa, FFA = wolne kwasy tłuszczowe, PV = liczba nadtlenkowa, A = wygląd, F = aromat, C = konsystencja, TBC = ogólna liczba bakterii, Therm = liczba bakterii ciepłolubnych, MS = Państwo Członkowskie, IDF = Międzynarodowa Federacja Mleczarska, ISO = Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna, IUPAC = Międz. ADPI = Amerykański Instytut Produktów Mleczarskich, SCM = mleko zagęszczone słodzone, EMC = zagęszczone mleko lub śmietana, MSNF = sucha masa beztłuszczowa mleka

CZĘŚĆ A

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
Rozporządzenie (WE) nr 2771/1999 składowanie w magazynach państwowych (Dz.U. L 333 z 24.12.1999, str. 11)	Masło niesolone	Tłuszcze mleka Woda SNF FFA (maks.) PV (maks.) Formy bakterii coli Tłuszcz nie pochodzący z mleka Znaczniki sterolu Pozostałe znaczniki: — wanilina — ester etylowy kwasu karotenowego — triglicerydy kwasu enantowego Charakterystyka sensoryczna Dyspersja w wodzie	Min. 82 % Do 16 % Do 2 % 1.2 mmole/100 g tłuszczu 0,3 meq. tlenu/1000 g tłuszczu Niewykrywalne w 1 g Niewykrywalny poprzez analizę triglicerydów Niewykrywalne Niewykrywalna Niewykrywalny Niewykrywalne Co najmniej 4 na 5 punktów dla A, G i C Co najmniej 4 punkty	Załącznik XI Załącznik IX Załącznik X Norma IDF 6B:1989 Norma IDF 74A:1991 (wersja angielska) Załącznik XVII Załącznik XXVI Załącznik XIV Załącznik XII Załącznik XIII IUPAC 2.301 sub 5 Załącznik VII Norma IDF 112A:1989	Uwaga 1 Uwaga 3
Rozporządzenie (WE) nr 2771/1999 Prywatne składowanie	Masło niesolone	Tłuszcze mleka Woda	Min. 82 % Do 16 %	Załącznik XI Załącznik IX	Uwaga 6
Rozporządzenie (WE) nr 2771/1999 Prywatne składowanie	Masło solone	Tłuszcze mleka Woda Sól	Min. 80 % Do 16 % Do 2 %	Załącznik XI Załącznik IX Norma IDF 12B: 1988	Uwaga 6

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
Rozporządzenie (WE) nr 2571/97 (Dz.U. L 350 z 20.12.1997, str. 3)	Masło niesolone	Tłuszcze mleka Woda Znaczniki: — sterole — wanilina — ester etylowy kwasu karotenowego — triglicerydy kwasu enantowego	Min. 82 % Do 16 %	Załącznik XI Załącznik IX Załącznik XIV Załącznik XII Załącznik XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Rozporządzenie (WE) nr 2571/97	Masło solone	Tłuszcze mleka Woda Sól Znaczniki: sterole wanilina ester etylowy kwasu karotenowego triglicerydy kwasu enantowego	Min. 80 % Do 16 % Do 2 %	Załącznik XI Załącznik IX Norma IDF 12B: 1988 Załącznik XIV Załącznik XII Załącznik XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Rozporządzenie (WE) nr 2571/97	Koncentrat masła	Tłuszcze mleka Wilgotność i MSNF FFA PV (maks.) Tłuszcz nie pochodzący z mleka Aromat Zapach Inne Znaczniki: — sterole — wanilina — ester etylowy kwasu karotenowego — triglicerydy kwasu enantowego	Min. 99,8 % Do 0,2 % Do 0,35 % (oleinowy) 0,5 meq. tlen/1000 g tłuszczu Brak Czysty Brak obcych zapachów Brak środków zubożających, przeciwutleniaaczy i środków konserwujących	Norma IDF 24: 1964 Norma IDF 23A: 1988 (wilgotność) Norma IDF 24: 1964 (MSNF) Norma IDF 6B: 1989 Norma IDF 74A: 1991 (wersja angielska) Załącznik XIV Załącznik XII Załącznik XIII IUPAC 2.301 sub 5	Uwaga 1

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
Rozporządzenie (WE) nr 2571/97	Śmietana	Tłuszcze mleka Znaczniki: — sterole — wanilina — ester etylowy kwasu karotenowego — triglicerydy kwasu enantowego	35 %	Norma IDF 16C: 1987 Metody zatwierdzone przez właściwe władze Załącznik XII Metody zatwierdzone przez właściwe władze IUPAC 2.301 sub 5	Uwaga 2 Uwaga 2
Rozporządzenie (EWG) nr 429/90 (Dz.U. L 45 z 21.2.1990, str. 8)	Koncentrat masła	Tłuszcze mleka SNF Znaczniki: — stigmasterol (95 %) — stigmasterol (85 %) — triglicerydy kwasu enantowego — ester etylowy kwasu masłowego i stigmasterol — lecytyna (E 322) NaCl FFA PV (maks.) Aromat Zapach Inne	Min. 96 % Do 2 % 15 g/100 kg koncentratu masła 17 g/100 kg koncentratu masła 1,1 kg/100 kg koncentratu masła Patrz Załącznik, pkt 1 lit. c) Do 0,5 % Do 0,75 % Do 0,35 % (oleinowy) Do 0,5 meq. tlen/1000 g tłuszczu Czysty Brak obcych zapachów Brak środków zubożających, przeciwutleniaczy i środków konserwujących	Metody zatwierdzone poprzez właściwe władze Metody zatwierdzone poprzez właściwe władze Załącznik XIV Załącznik XIV IUPAC 2.301 sub 5 Załącznik XIV Metody zatwierdzone przez właściwe władze Norma IDF 12B: 1988 Norma IDF 6B: 1989 Norma IDF 74A: 1991 (wersja angielska)	Uwaga 2 Uwaga 2 Uwaga 2 Uwaga 2 Uwaga 1
Rozporządzenie (EWG) nr 2191/81 (Dz.U. L 213 z 1.8.1981, str. 20)	Masło niesolone	Tłuszcze mleka Woda	Min. 82 % Do 16 %	Załącznik XI Załącznik IX	

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
Rozporządzenie (EWG) nr 2191/81	Masło solone	Tłuszcze mleka Woda Sól	Min. 80 % Do 16 % Do 2 %	Załącznik XI Załącznik IX Norma IDF 12B: 1988	
Art. 9 i tytuł II rozporządzenia (WE) nr 1255/1999	Sery wytworzone z mleka owczego i/lub koziego	Mleko krowie	< 1 %	Załącznik XV	
Rozporządzenie (EWG) nr 2921/90	Załącznik – Kazeina kwasowa	Woda Tłuszcz Kwas wolny	Do 12,00 % Do 1,75 % Do 0,30 % (mleczny)	Norma IDF 78C: 1991 Norma IDF 127A: 1988 Norma IDF 91: 1979	
Rozporządzenie (EWG) nr 2921/90	Załącznik I – Kazeina podpuszczkowa	Woda Tłuszcz Popiół	Do 12,00 % Do 1,00 % Min. 7,50 %	Norma IDF 78C: 1991 Norma IDF 127A: 1988 Norma IDF 90: 1979	
Rozporządzenie (EWG) nr 2921/90	Załącznik I – Kazeiniany	Woda Białko mleka Tłuszcz i popiół	Do 6,00 % Min. 88,00 % Do 6,00 %	Norma IDF 78C: 1991 Norma IDF 92: 1979 Norma IDF 127A: 1988, Norma IDF 98: 1979 albo	
Rozporządzenie (EWG) nr 2921/90	Załącznik II – Kazeina kwasowa	Woda Tłuszcz Kwas wolny TBC (maks.) Bakterie coli Therm.(maks.)	Do 10,00 % Do 1,50 % Do 0,20 % (mleczny) 30 000 l/g Brak w 0,1 g 5000 l/g	Norma IDF 78C: 1991 Norma IDF 127A: 1988 Norma IDF 91: 1979 Norma IDF 100B: 1991 Załącznik XVI Norma IDF 100B: 1991	Uwaga 3 Uwaga 3 Uwaga 3 i 4
Rozporządzenie (EWG) nr 2921/90	Załącznik II – Kazeina podpuszczkowa	Woda Tłuszcz Popiół TBC (maks.) Formy bakterii coli Therm. (maks.)	Do 8,00 % Do 1,00 % Min. 7,50 % 30 000 l/g Brak w 0,1 g 5000 l/g	Norma IDF 78C: 1991 Norma IDF 127A: 1988 Norma IDF 90: 1979 Norma IDF 100B: 1991 Załącznik XVI Norma IDF 100B: 1991	Uwaga 3 Uwaga 3 Uwaga 3 i 4

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
Rozporządzenie (WE) nr 322/96 (Dz.U. L 45 z 23.2.96, str. 5)	SMP (aerozol)	Tłuszcz	Do 1,0 %	Norma IDF 9C: 1987	
		Białko	31,4% (min.) suchej substancji beztłuszczowej	Norma IDF 20B: 1993	
		Woda	Do 3,5 %	Norma IDF 26A: 1993	
		Kwasowość (N/10 NaOH)	Do 19,5 ml	Norma IDF 86: 1981	
		Mleczany	Do 150 mg/100 g	Norma IDF 69B: 1987	
		Fosforan	Negatywny	Norma ISO 3356: 1975	
		Rozpuszczalność	Do 0,5 ml w 24 Code en erreur: 8eJC	Norma IDF 129A: 1988	
		Przypalone cząstki	Dysk B min. (15,0 mg)	ADPI: 1990	
		TBC	40 000 l/g	Norma IDF 100B: 1991	Uwaga 3
		Formy bakterii coli	Negatywny/0,1 g	Załącznik XVI	Uwaga 3
		Maślanka	Negatywny	Załącznik XX	
		Serwatka podpuszczkowa	Negatywny	Załącznik XVIII	
		Serwatka kwasowa	Negatywny	Metody zatwierdzone przez właściwe władze	Uwaga 2
		Środki przeciwdrobnoustrojowe		Załącznik XXI	

CZĘŚĆ B

Metody referencyjne wymienione w części B mogą być stosowane w celu analizowania produktów objętych którymkolwiek z rozporządzeń wymienionych w kolumnie 1.

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Kod CN	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
Rozporządzenie (EWG) nr 2658/87 (Dz.U. L 256 z 7.9.1987, str. 1) Rozporządzenie (WE) nr 2414/98 (Dz.U. L 299 z 10.11.1998, str. 7) Rozporządzenie (WE) nr 1374/98 (Dz.U. L 185 z 30.6.1998, str. 21) Rozporządzenie (WE) nr 2508/97 (Dz.U. L 345 z 16.12.1997, str. 31) Rozporządzenie (WE) nr 174/1999 (Dz.U. L 20 z 27.1.1999, str. 8)	Mleko i śmietana niezagęszczane i niezawierające dodatku cukru ani innego środka słodzącego	0401	Tłuszcz (≤ 6 %)	Obowiązują wartości graniczne określone w opisie do kodu CN dla każdego produktu, dodatkowo wymienionego, gdzie stosowne, w rozporządzeniu Komisji (EWG) nr 3846/87 (Dz.U. L 366 z 24.12.1987, str. 1) część 9 nomenklatury wywozowej lub w rozporządzeniu (WE) nr 1374/98 (Dz.U. L 185 z 30.6.1998, str. 21)	Norma IDF 1D: 1996	
			Tłuszcz (> 6 %)		Norma IDF 16C: 1987	

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Kod CN	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
	Mleko i śmietana zagęszczone lub zawierające dodatek cukru lub innego środka słodzącego	0402	Tłuszcze (w postaci płynnej) Tłuszcze (w postaci stałej) Białko Sacharoza (zawartość normalna) Sacharoza (zawartość niska). Substancje stałe (SCM) Substancje stałe (EMC) Woda (mleko i śmietana w proszku)		Norma IDF 13C: 1987 Norma IDF 9C: 1987 Norma IDF 20B: 1993 Norma IDF 35A: 1992 Metody zatwierdzone przez właściwe władze Norma IDF 15B: 1991 Norma IDF 21B: 1987 Norma IDF 26A: 1993	Uwaga 2
	Maślanka, sfermentowane lub zakwaszone mleko i śmietana, zagęszczone lub nie, zawierające dodatek cukru lub innego środka słodzącego	0403	Tłuszcz Białko Sacharoza (normalna zawartość) Sacharoza (zawartość niska). Woda (kwasowa maślanka w proszku) Woda (słodka maślanka w proszku) Substancje stałe (Inne produkty)		Norma IDF 1D: 1996, 9C: 1987, 16C: 1987, 22B: 1987, 126A: 1988 Norma IDF 20B: 1993 Norma IDF 35A: 1992 Metody zatwierdzone przez właściwe władze Załącznik XXIV Norma IDF 26A: 1993 Metody zatwierdzone przez właściwe władze	Uwaga 2
	Serwatka, zagęszczona lub nie lub zawierająca dodatek cukru lub innego środka słodzącego; produkty składające się z naturalnych składników mleka	0404	Tłuszcz Białko Sacharoza (normalna zawartość) Sacharoza (zawartość niska)		Norma IDF 9C: 1987, 16C: 1987, 22B: 1987 Norma IDF 20B: 1993 Norma IDF 35A: 1992 Metody zatwierdzone przez właściwe władze	Uwaga 2
		0404 90	Białko Woda Substancje stałe (Produkty zagęszczone)		Norma IDF 20B: 1993 Norma IDF 26A: 1993 Norma IDF 15B: 1991 Norma IDF 21B: 1987	
	Masło i inne tłuszcze otrzymane z mleka; produkty mleczarskie do smarowania	0405	Tłuszcz (jeżeli (85 %) Woda SNF NaCl Tłuszcz (jeżeli > 99 %) Woda (jeżeli tłuszcz < 99 %)		Załącznik XI Załącznik IX Załącznik X Norma IDF 12B: 1998 Norma IDF 24: 1964 Norma IDF 23A: 1988	
		Masło				
		Bezwodny tłuszcz mleczny				

Rozporządzenie Komisji	Produkt	Kod CN	Parametry	Wartości graniczne	Metoda referencyjna	Uwagi
	Ser i twaróg	0406	Tłuszcz Substancje stałe Substancje stałe (Ricotta) NaCl Laktoza		Norma IDF 5B: 1986 Norma IDF 4A: 1982 Norma IDF 58: 1970 Norma IDF 88A: 1988 Norma IDF 79B: 1991	
Rozporządzenie (EWG) nr 2658/87	Mieszanki paszowe	2309	Laktoza		Załącznik XVII	

Uwagi do wykazu metod referencyjnych Unii Europejskiej:

Uwaga 1: Oddzielenie tłuszczu mleka według normy IDF 6B:1989 (ochrona przed światłem).

Uwaga 2: Nie ustalono żadnej metody referencyjnej.

Uwaga 3: Próbkę ma być przygotowana zgodnie z normą IDF 122C:1996 normą IDF 73A:1985.

Uwaga 4: Inkubacja w ciągu 48 godzin w temperaturze 55 °C, należy podjąć działanie zapobiegające wysuszeniu pożywki dla bakterii.

Uwaga 5: % SNF = % substancji stałej – % tłuszczu.

Uwaga 6: Masło musi odpowiadać krajowym klasom jakości produkującego Państwa Członkowskiego, określonym w załączniku V do rozporządzenia Komisji (WE) nr 2771/1999.

Uwaga 7: Dyrektywa Komisji 84/8/EWG.

Uwaga 8: Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1758/94 (Dz.U. L 183 z 19.7.1994, str. 14).

Uwaga 9: Dyrektywa Komisji 78/633/EWG.

ZAŁĄCZNIK II

(Art. 3)

SPRAWDZANIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW Z ZASTOSOWANIEM METOD RUTYNOWYCH, ZBLIŻONYCH DO WARTOŚCI GRANICZNYCH WYMENIONYCH W ROZPORZĄDZENIACH DOTYCZĄCYCH SKŁADU I WYMOGÓW JAKOŚCI

Jeżeli m_0 jest wartością graniczną dla składu i wymogów jakości wymienionych w rozporządzeniu, ostateczną wartością graniczną L jest

$$L = m_0$$

jeżeli $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} \leq 1$

R_{Rout} : Wartość graniczna odtwarzalności w przypadku metody rutynowej

R_{Ref} : Wartość graniczna odtwarzalności w przypadku metody referencyjnej

Jeżeli m_0 jest górną wartością graniczną, a $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} > 1$, ostateczna wartość graniczna jest otrzymywana z zastosowaniem wzoru:

$$L = m_0 - [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

Jeżeli w takich samych warunkach m_0 jest dolną wartością graniczną, ostateczna wartość graniczna jest otrzymywana z zastosowaniem wzoru:

$$L = m_0 + [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

gdzie CrD_{95} jest różnicą krytyczną metody referencyjnej (patrz załącznik IV).

Jeżeli m_0 jest górną wartością graniczną, wynik końcowy otrzymany z zastosowaniem metody rutynowej, wyższy od ostatecznej wartości granicznej, musi zostać zastąpiony końcowym wynikiem otrzymanym z zastosowaniem metody referencyjnej. Ten wynik końcowy musi być oparty co najmniej na takiej samej ilości analiz/próbek jak końcowy wynik z zastosowaniem metody rutynowej.

Jeżeli m_0 jest dolną wartością graniczną, taka sama procedura musi być stosowana dla końcowego wyniku, niższego od ostatecznej wartości granicznej uzyskanej z zastosowaniem metody rutynowej.

Uwaga

Przedstawioną wyżej procedurę można stosować, o ile nie występują wykrywalne efekty matrycy.

Efekty matrycy można wykryć w następujący sposób: dla każdej próbki wykorzystanej do kalibracji jest ustalana różnica (w_i) między wynikami otrzymanymi z zastosowaniem metody referencyjnej i z zastosowaniem metody rutynowej.

Obliczenie odchylenia standardowego z zastosowaniem wzoru

$$s = \sqrt{(\sum w_i^2) / 2m}$$

m : Ilość próbek użytych do kalibracji jest porównywana ze średnią arytmetyczną odchylenia standardowego powtarzalności metody referencyjnej i rutynowej

$$s_r \sqrt{(s_{r(\text{ref})}^2 + s_{r(\text{rout})}^2) / 2}$$

Nie można wykluczyć efektu matrycy, jeżeli

$$m \bullet s^2 / s_r^2 > \text{Chi}_{f; 1-\alpha}^2$$

gdzie:

$f = m$ (f : liczba stopni swobody)

$\alpha =$ prawdopodobieństwo błędu; $\alpha = 0,05$. W takim przypadku konieczne są dodatkowe badania przed ustaleniem ostatecznej wartości granicznej.

ZAŁĄCZNIK III

(Art. 4 i 5)

a) Procedura określenia zgodności z ustalonymi wartościami granicznymi odtwarzalności (Analiza chemiczna)

Zgodność z wartościami granicznymi odtwarzalności jest sprawdzana przez porównanie wyników laboratoryjnych z wynikami doświadczonego laboratorium ⁽¹⁾, otrzymanymi z wykorzystaniem identycznych próbek. Określanie jest przeprowadzane w obu laboratoriach, a wyniki są oceniane z zastosowaniem wzoru:

$$\text{CrD}_{95}(\bar{y}_1, \bar{y}_2) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

gdzie:

CrD₉₅: różnica krytyczna (P = 0,95) \bar{y}_1 : średnia arytmetyczna dwóch wyników otrzymanych w laboratorium 1, \bar{y}_2 : średnia arytmetyczna dwóch wyników otrzymanych w laboratorium 2,

R: wartość graniczna odtwarzalności: ma być ustalona metodą interpolacji,

r: wartość graniczna powtarzalności: jeżeli precyzja zmienia się w zależności od poziomu.

Jeżeli jest przekroczona różnica krytyczna, w ciągu kolejnych dwóch miesięcy musi zostać przeprowadzone inne doświadczenie. Jeżeli wyniki drugiego doświadczenia nie są zgodne z wartością graniczną odtwarzalności, właściwe władze muszą podjąć konieczne kroki.

b) Procedura otrzymywania tymczasowej wartości granicznej odtwarzalności (analiza chemiczna)

Tymczasowa granica odtwarzalności (R_{prov}) jest otrzymywana na podstawie równania:

$$R_{\text{prov}} = \sqrt{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

gdzie:

 \bar{y}_1 : średnia dwóch wyników otrzymanych w laboratorium 1 \bar{y}_2 : średnia dwóch wyników otrzymanych w laboratorium 2 (patrz załącznik IIIa)

r: wartość graniczna powtarzalności lub tymczasowa wartość graniczna powtarzalności.

Uwagi:

1. R_{prov} może być wykorzystywane w celu obliczenia różnic krytycznych (patrz załącznik VI)
2. R_{prov} jest ustalone na 2r, jeżeli obliczona wartość dla R_{prov} jest niższa niż 2r.
3. Jeżeli wartość wyliczona jest wyższa niż 3r lub wyższa niż podwójna wartość R przewidziana w równaniu Horwitza (*), wówczas R_{prov} jest niedopuszczalnie wysokie i nie może być wykorzystane w celu obliczenia różnicy krytycznej.
4. R_{prov} powinno być oznaczone, co najmniej raz w roku, w oparciu o wyniki otrzymane w dwóch laboratoriach (patrz załącznik IV).
5. Średnia wartość R_{prov} musi być wykorzystana do wyliczania różnic krytycznych. Zasady określone w pkt 2 i 3 są stosowane w odniesieniu do średniej wartości R_{prov} .

(*) Równanie Horwitza:

$$\text{RSD}_R(\%) = 2^{1-0,5 \log_{10} C}$$

gdzie: RSD_R : względne odchylenie standardowe odtwarzalności
c: stężenie wyrażone jako ułamek dziesiętny (przykład: 10 g/100 g = 0,10) Odniesienie:

Peeler, J.T. Horwitz, W. and Albert, R. J.Ass. Off. Anal. Chem. 72(5), 784-806 (1989).

⁽¹⁾ Doświadczone laboratorium powinno być jednym z laboratoriów uczestniczących z powodzeniem bądź w potwierdzaniu metod badań, bądź w programie kontroli biegłości.

Wartość graniczna odtwarzalności (wartość R) jest otrzymywana w następujący sposób z obliczonej wartości RSD_R :

$$R = 0,0283\bar{x}RSD_R$$

\bar{x} : średnia arytmetyczna otrzymanych wyników

Niektóre obliczone wartości RSD_R (przykłady)

Stężenie	RSDR (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

Stężenie analitu 1 g/100 g wyniesie:

$$R = 0,0283 * 1 * 4 = 0,11 \text{ g/100 g.}$$

ZAŁĄCZNIK IV

(Art. 4)

OCENA WYNIKÓW ANALITYCZNYCH OTRZYMANÝCH Z ZASTOSOWANIEM POTWIERDZONYCH METOD

Jeżeli wynik analityczny wskazuje, że wartość graniczna została przekroczone, obliczana jest średnia arytmetyczna z dwóch lub więcej wyników. Stosowana jest następująca procedura:

- 1) W przypadkach gdy wynik analityczny stanowi wynik pojedynczy, musi być przeprowadzona w warunkach powtarzalności druga analiza. Jeżeli dwie analizy nie mogą być przeprowadzone w warunkach powtarzalności, musi być przeprowadzona dodatkowa podwójna analiza w warunkach powtarzalności, a wyniki wykorzystane w celu oceny zgodności z różnicą krytyczną.
- 2) Oznaczana jest wartość bezwzględna różnicy między średnią arytmetyczną wyników otrzymanych w warunkach powtarzalności oraz wartością graniczną. Wartość bezwzględna różnicy wyższa od różnicy krytycznej oznacza, że próbka poddana analizie nie spełnia wymogów.

Różnica krytyczna jest ustalana za pomocą wzoru:

$$\text{CrD}_{95}(|\bar{y}-m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

gdzie:

\bar{y} : średnia arytmetyczna otrzymanych wyników

m_0 : wartość graniczna

n : liczba analiz/próbek

Jeżeli precyzja zmienia się w zależności od poziomu, konieczne może być oznaczenie r i R przez interpolację.

Normalnie końcowy wynik odniesiony do próbki musi wykazywać zgodność z wartością graniczną.

Wynik końcowy

— w zakresie m_0 i $m_0 + \text{CrD}_{95}(\bar{y}-m_0)$ jeżeli wartość graniczna stanowi wielkość maksymalną;

— w zakresie m_0 i $m_0 - \text{CrD}_{95}(\bar{y}-m_0)$ jeżeli wartość graniczna stanowi wielkość minimalną

powinny dlatego wystąpić jedynie w drodze wyjątku.

Wyniki końcowe we wspomnianych zakresach są dopuszczalne jedynie w przypadku, gdy wystąpią nie częściej niż jeden raz na każde pięć próbek analizowanych na przesyłkę. Jeżeli mniej niż pięć próbek jest analizowanych na przesyłkę, dopuszczalny jest jeden wynik we wspomnianych zakresach. Jednakże zasada, iż tylko jeden wynik we wspomnianych zakresach jest otrzymywany na pięć analizowanych próbek, musi być przestrzegana, jeżeli przesyłki od producenta występują systematycznie.

- 3) Jeżeli końcowy wynik x jest obliczany z zastosowaniem wzoru w postaci $x = y_1 \pm y_2$ (przykład: woda + zawartość suchej masy beztłuszczowej w maśle w celu obliczenia zawartości tłuszczu), gdzie y_1 i y_2 są końcowymi wynikami jednego rodzaju analizy, wówczas całkowite wartości graniczne powtarzalności i odtwarzalności r_x i R_x końcowych wyników x są obliczane jako:

$$r_x = \sqrt{r_1^2 + r_2^2}$$

$$R_x = \sqrt{R_1^2 + R_2^2}$$

gdzie r_1 i r_2 są wartościami granicznymi powtarzalności, a R_1 i R_2 są wartościami granicznymi odtwarzalności dotyczącymi odpowiednio y_1 i y_2 .

x jest porównywany z wartością graniczną m_0 zgodnie z zasadami wymienionymi w pkt 1 i 2. Różnica krytyczna jest oznaczana z zastosowaniem wzoru:

$$\text{CrD}_{95}(|x-m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

gdzie x jest średnią arytmetyczną otrzymanych wyników x_1

- 4) Jeżeli wynik końcowy jest obliczany z zastosowaniem wzoru w postaci

$$x = \frac{y_1}{y_2}$$

(przykład: tłuszcz w suchej masie sera)

gdzie y_1 i y_2 są końcowymi wynikami jednego rodzaju analizy, wówczas całkowite wartości graniczne powtarzalności i odtwarzalności r_x i R_x mogą być obliczane jako:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{*1}^2 + r_{*2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{*1}^2 + R_{*2}^2}$$

$$\mu_x = \mu_1 | \mu_2$$

μ_1 : wartość graniczna lub docelowa dla y_1 (przykład: tłuszcz)

μ_2 : wartość graniczna lub docelowa dla y_2 (przykład: sucha masa)

$$r_{*1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0,15 \qquad r_{*2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0,15$$

gdzie:

r_1 : wartość graniczna powtarzalności, y_1

r_2 : wartość graniczna powtarzalności, y_2

$$R_{*1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0,15 \qquad R_{*2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0,15$$

gdzie:

R_1 : wartość graniczna odtwarzalności, y_1

R_2 : wartość graniczna odtwarzalności, y_2

Procedury obliczania r_x i R_x mają zastosowanie jedynie w przypadku, gdy względne wartości graniczne powtarzalności i odtwarzalności (r_{*1} , r_{*2} ; R_{*1} ; R_{*2}) są niższe lub równe 0,15.

x jest porównywany z wartością graniczną zgodnie z zasadami wymienionymi w pkt 1 i 2. Różnica krytyczna jest oznaczana z zastosowaniem wzoru:

$$CrD_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

gdzie \bar{x} jest średnią arytmetyczną wyników x otrzymanych w porządku chronologicznym (*).

(*) Uwaga: Na przykład, jeżeli są otrzymywane wyniki y_{11} , y_{12} , y_{21} i y_{22} , musi być obliczona średnia arytmetyczna z y_{11}/y_{21} i y_{12}/y_{22} .

ZAŁĄCZNIK V

KONTROLA WEWNĘTRZNA

(Art. 5)

a) Procedura wewnętrznej kontroli jakości (IQC) (analiza chemiczna)*Definicja materiału kontrolnego*

Materiał wykorzystywany do celów IQC jest poddany tej samej procedurze lub części tej samej procedury co materiały badane.

Materiałem kontrolnym może być:

- certyfikowany materiał wzorcowy,
- wewnętrzny materiał wzorcowy
- materiał potwierdzony przez badania międzylaboratoryjne,
- materiał wzbogacony.

Procedura ustanawiająca IQC

Laboratorium powinno wprowadzić IQC zgodnie z procedurą określoną w dokumencie IUPAC „Zharmonizowane wytyczne dla wewnętrznej kontroli jakości w laboratoriach analitycznych”⁽¹⁾.

IQC obejmuje włączenie materiałów kontrolnych do kolejnych faz analizy lub analizy replikacji badanych próbek. Materiały kontrolne muszą posiadać skład chemiczny podobny do składu badanych próbek i być odpowiednio stabilne w wymaganym czasie. Należy wykazać, że mogą one być odpowiednio podzielone do celów analizy na identyczne części i mają stężenie analitu właściwe dla zakresu zainteresowania.

Materiał kontrolny musi być dodany przynajmniej raz do każdej serii analitycznej, a otrzymana wartość wykreślona na karcie kontrolnej w celu pomiaru błędów w długim okresie czasu. Dodatkowo laboratorium powinno okresowo wykazywać zgodność z warunkami powtarzalności w ramach serii. Można to osiągnąć poprzez podwójne analizy kontrolnych i/lub badanych materiałów. Wyniki tych analiz powinny być porównywane z publikowanymi wartościami granicznymi powtarzalności i istniejącymi danymi na temat precyzji wewnętrznej.

W przypadku gdy wykorzystywane są materiały kontrolne, wartości otrzymane dla analiz międzyseryjnych materiału kontrolnego muszą zostać wykreślone na karcie Shewharta (ISO 8258 (1991)) wraz z właściwymi kontrolnymi wartościami granicznymi. Wartości graniczne działania muszą być wyznaczone dla:

$$x \pm 3s_t,$$

gdzie s_t jest całkowitym odchyleniem standardowym,

ostrzegawcze wartości graniczne dla:

$$x \pm 2s_t$$

Całkowite odchylenie standardowe:

$$s_t = \sqrt{s_b^2 + s_w^2/n}$$

gdzie:

- s_b : międzyseryjne odchylenie standardowe
- s_w : wewnątrzseryjne odchylenie standardowe
- n : liczba określeń

W przypadkach, w których nie są wykorzystywane materiały kontrolne (np.: z powodu braku stabilności), co najmniej jeden z badanych materiałów musi być podwójnie analizowany w każdej serii.

Różnica bezwzględna otrzymana z podwójnej analizy wewnątrz serii (patrz załącznik III) musi zostać wykreślona. Linia środkowa wynosi $1,128 s_w$, dolna wartość graniczna wynosi 0, górna wartość graniczna (wartość graniczna działania) wynosi $3,686 s_w$, gdzie s_w jest wewnątrzseryjnym odchyleniem standardowym.

Procedura kontrolna powinna obejmować materiały dolnych i górnych poziomów, gdy zakres stężenia jest znaczny.

(1) M. Thompson i R. Wood: „Pure and Applied Chemistry” 67 (4), 649-666 (1995).

Jeżeli badane materiały obejmują szeroki zakres stężeń analitów, laboratorium powinno ustalić związek między precyzją i poziomem. Jeżeli precyzja jest proporcjonalna do poziomu, kolejna kontrola powinna być oparta na precyzji relatywnej (różnica bezwzględna jest wartością procentową wartości średniej).

Wystąpienie którejkolwiek z poniższych okoliczności wskazuje na stan systemu analitycznego odbiegający od normy:

- A. aktualna wartość wykresu znajduje się poza wartościami granicznymi działania,
- B. wartość aktualna i wartość poprzednia znajdują się poza wartościami granicznymi ostrzeżenia, ale w ramach wartości granicznych działania,
- C. w przypadku wykorzystywania materiałów kontrolnych dziewięć kolejnych wartości znajduje się po tej samej stronie linii wyrażającej średnią.

Laboratorium powinno w następujący sposób zareagować na stan odbiegający od normy:

- A. wstrzymać analizy w oczekiwaniu na wyniki badań diagnostycznych i działań naprawczych, oraz
- B. odrzucić serię wyników i przystąpić do ponownej analizy badanych materiałów.

b) Procedura selekcji wewnętrznego materiału kontrolnego i określania wewnętrznych wartości granicznych precyzji (analiza chemiczna)

Dane na temat wewnątrzlaboratoryjnej precyzji mogą być określone przez analizy replikacji materiałów kontrolnych i/lub przez analizy replikacji badanych próbek.

Laboratoria powinny wykorzystywać poniższą procedurę w celu ustanowienia parametrów precyzji dla wewnątrzseryjnych i międzyseryjnych różnic w odniesieniu do kolejnego zastosowania w tworzeniu wykresów kontrolnych. Laboratoria mogą przyjąć procedury alternatywne pod warunkiem, że mogą należycie wykazać, iż zostały uzyskane wiarygodne dane dotyczące precyzji.

1. Wybór materiałów kontrolnych

W przypadku gdy laboratorium wykorzystuje materiał kontrolny, muszą zostać najpierw zebrane dane w celu określenia wartości granicznych. W miarę możliwości powinny być stosowane certyfikowane materiały wzorcowe (CMW). Potencjalne materiały kontrolne powinny być analizowane w warunkach powtarzalności w tej samej serii zawierającej właściwe CMW oraz podlegać replikacji i randomizacji. W przypadku gdy podejście takie nie jest możliwe, laboratoria powinny zabiegać o udział w kontroli biegłości i ustanowić w drodze porozumienia średnie (wartości przypisane), które mogą zostać uznane za prawdziwą średnią konwencjonalną połączoną z dużą dozą niepewności. Inne procedury obejmują przypisanie prawdziwej wartości poprzez sformułowanie lub wykorzystanie aktywowanego materiału kontrolnego.

Dodatkowo w przypadku, gdy laboratoria przeprowadzają regularnie analizy tego rodzaju i wprowadziły już kontrolę statystyczną, każde nowe materiały kontrolne (np.: wymagane z powodu wyczerpania zapasów) muszą być otrzymane z odniesieniem do analiz, które są pod kontrolą i w których wykorzystywane są materiały istniejące.

2. Ustalanie wartości granicznych

Po wybraniu materiału kontrolnego laboratorium powinno go zastosować w celu ustanowienia wewnątrzseryjnych i międzyseryjnych wielkości odnoszących się do precyzji.

Jako wymóg minimalny dla ustanowienia wewnątrzseryjnej precyzji materiał kontrolny powinien być podwójnie analizowany w 12 zdarzeniach. Podwójna analiza powinna być przeprowadzona w warunkach powtarzalności, tj. przez ten sam podmiot, z tymi samymi odczynnikami itd. Podwójna analiza materiału kontrolnego powinna być randomizowana w ramach serii analitycznej. Każda podwójna analiza powinna być podjęta innego dnia w określonym czasie, tak by odzwierciedlać uzasadnione odchylenia między seriami, z uwzględnieniem normalnych odchyleń np. odczynników, ponownej kalibracji przyrządów i jeżeli właściwe, różnych analityków.

Uwaga: Wykorzystywanie danych, które nie odzwierciedlają w pełni różnic międzyseryjnych, może spowodować zbłądną replikację analiz z powodu przyjęcia zbyt wąskich wartości granicznych. Odwrotnie, laboratorium, które przedstawia niezbyt dokładne dane dotyczące precyzji, prawdopodobnie niespełniające wyznaczonych wymogów metod referencyjnych, może wykazywać niezadowalające działanie w porównaniu z podobnymi laboratoriami i może nie prezentować danych odpowiednich do zamierzonego celu.

2.1. Określenie precyzji wewnątrzseryjnej

2.1.1. Precyzja wewnątrzseryjna w przypadku, gdy materiał kontrolny jest dostępny

Podwójne dane (minimum 12 duplikatów) powinny najpierw zostać poddane testowi Cochra na dla ekstremalnej wartości wariancji. Wymaga to porównania kwadratu maksymalnych zakresów duplikatu z sumą kwadratów zakresów.

$$C = \frac{d^2_{\max}}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

gdzie:

d_i = różnica między duplikatami.

Wartość parametru Cochra, C , jest porównywana z wartościami tabel (ISO 5725 (1994)). Jeżeli wartość może być zakwalifikowana jako wątpliwa lub odstająca, wynik powinien być zbadany w celu znalezienia wyjaśnienia, np. błędu technicznego, błędu obliczeniowego, pomyłki w wykonaniu badania, analizie nieodpowiednich próbek. W przypadku gdy z wyjaśnienia błędu technicznego wynika brak możliwości zastąpienia wątpliwego wyniku, powinien być on wyeliminowany jako przypadek rzeczywistej wartości odstającej. Jeżeli wartości wątpliwe lub odstające, które nie mogą być wyjaśnione, utrzymują się, wartości wątpliwe są przyjmowane jako poprawne, a statystyczne wartości odstające są odrzucane. Laboratorium powinno starać się o określenie wartości zastępczych.

Po uzyskaniu przez laboratorium pewności, że dane nie zawierają już wartości odstających, odchylenie standardowe wewnątrz serii s_w jest otrzymywane w następujący sposób: Dla każdej pary p duplikatów danych suma duplikatów,

$$s_i = x_{i1} + x_{i2}$$

oraz różnica duplikatów,

$$d_i = x_{i2} - x_{i1}$$

są obliczone i dodawane, aby uzyskać

$$A = \sum_{i=1}^p s_i$$

$$B = \sum_{i=1}^p d_i^2$$

$$C = \sum_{i=1}^p s_i^2$$

Prognoza wewnątrzseryjnego odchylenia standardowego wynosi:

$$s_w = \sqrt{\frac{B}{2p}}$$

Wewnętrzna precyzja wartości granicznej wynosi $2,8 s_w$.

W przypadku gdy stosowana jest metoda referencyjna, wewnętrzna precyzja wartości granicznej powinna być porównana z opublikowanymi wartościami granicznymi powtarzalności. Laboratorium powinno przestrzegać zgodności z wymogiem metody referencyjnej. Musi zostać wykryta przyczyna niespełniania tego wymogu.

Ustalone wartości graniczne powinny być uznane za tymczasowe i podlegać rewizji.

2.1.2. Precyzja wewnątrzseryjna, w przypadku gdy materiał kontrolny nie jest dostępny

Laboratorium może wybrać ustanowienie wewnątrzseryjnej precyzji przez podwójne analizy reprezentatywnych próbek badanych (minimum 12 podwójnych analiz). W przypadkach gdy nie jest możliwe stosowanie materiałów kontrolnych, np.: z powodu niestabilności, podwójne dane muszą być zebrane tą metodą.

Uwaga: Zakłada się, że analizy pokrywają relatywnie wąski zakres wartości i dlatego pojedyncza wartość może być stosowana do wszystkich próbek. W przypadkach, w którym zakres wyników jest szerszy, np.: ponad rząd wielkości i precyzja jest zależna od poziomu, laboratoria powinny zbadać wykorzystywanie względnych odchyleń standardowych.

Dane powinny być poddane badaniu Cochra, tak jak w ppkt 2.1.1. W przypadku gdy laboratorium ma pewność, że dane nie zawierają wartości odstających, odchylenie standardowe wewnątrz serii i wewnętrzna precyzja wartości granicznej mogą być ustalane jak w ppkt 2.1.1.

Odchylenie standardowe wewnątrz serii s_w może być wykorzystywane do sporządzania wykresów kontrolnych (patrz załącznik II). Wyznaczone wartości graniczne powinny być uznane za tymczasowe i podlegać rewizji.

2.2. Określenie precyzji międzyseryjnej

Wyliczenie średnich wartości ($s_1/2$) dla każdej pary i poddanie ich testowi Grubbsa (ISO 5725 (1994)). Kryteria odrzucenia/dopuszczenia dla wartości odstających lub wątpliwych są takie, jak opisane w ppkt 2.1.1. Laboratorium powinno zabiegać o określenie wartości zastępczej dla wszystkich odrzuconych wyników. Gdy laboratorium nabierze pewności, że dane nie zawierają wartości odstających, obliczane jest odchylenie standardowe między seriami s_b ,

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{4(p-1)} \left(C \cdot \frac{p-1}{p} B - \frac{A^2}{p} \right)}$$

lub 0, jeżeli wyrażenie pod pierwiastkiem kwadratowym jest ujemne.

Całkowite odchylenie standardowe s_t jest wykorzystywane do sporządzenia kart kontrolnych dla średniej n oznaczeń (patrz załącznik II). Wyznaczone wartości graniczne powinny zostać uznane za tymczasowe i podlegać rewizji.

3. Rewizja początkowych wartości granicznych.

Kontrolne wartości graniczne ustanowione zgodnie z powyższym opisem muszą być uznane za szacunki wstępne.

W celu uaktualnienia wartości granicznych wyznaczonych w oparciu o dopuszczalną precyzję wewnętrzną (ppkt 2.1.2.) należy zebrać dodatkowe duplikaty danych dotyczących badanych próbek. Przerwa poprzedzająca rewizję będzie zależała od częstotliwości analiz. Tytułem wskazówki należy stwierdzić, że dane powinny być poddane rewizji po otrzymaniu kolejnych 10 duplikatów. Wszystkie dane powinny być poddane badaniu Cochran'a, a wartości graniczne wyznaczone na nowo w oparciu o nowe wartości odchylenia standardowego. Późniejsze decyzje w sprawie ważności kontrolnych wartości granicznych muszą być podejmowane w świetle dodatkowych danych.

Rewizja wstępnych danych otrzymanych dla precyzji międzyseryjnej zależy również od częstotliwości analiz. Tytułem wskazówki należy stwierdzić, że po otrzymaniu dalszych dziesięciu danych na podstawie analiz materiału kontrolnego, przy częstotliwości jednej analizy na partię, założenia wyjściowe dotyczące odchylenia standardowego i średniej powinny zostać poddane rewizji.

Wszystkie dane powinny podlegać badaniu Grubbsa, dla wartości odstających. Średnia i odchylenie standardowe powinny zostać ponownie obliczone w oparciu o nowe dane.

Ponadto na tym etapie laboratorium powinno stosować kartę Cusum (BS S700: (1984) z poprawką 5480 (1987)) w celu zbadania wszystkich problemów, które mogą być związane np. ze starzeniem się odczynników. Każdy pojedynczy wynik wykraczający poza wartości graniczne Cusum „V-mask” musi być przedmiotem badania.

Nowe wartości graniczne (średnia i odchylenie standardowe) muszą podlegać regularnej inspekcji z zastosowaniem techniki Cusum. Wszelkie wskazania, zgodnie z którymi ważność materiału kontrolnego może być kwestionowana, muszą być starannie zbadane.

4. Informowanie o danych dotyczących precyzji

Laboratoria muszą przysyłać poniższe informacje właściwym organom krajowym:

- stosowane metody,
- wewnętrzseryjne odchylenie standardowe s_w i wewnętrzna precyzja wartości granicznej,
- międzyseryjne odchylenie standardowe s_b ,
- całkowite odchylenie standardowe s_t ,
- liczba analiz wykonanych w celu otrzymania danych dotyczących precyzji.

ZAŁĄCZNIK VI

(Art. 6)

OCENA OSÓB OCENIAJĄCYCH I WIARYGODNOŚĆ WYNIKÓW ANALIZ SENSORYCZNYCH

Jeżeli wykorzystywane są metody punktów (norma IDF 99C/1997), stosowana jest poniższa procedura.

a) Określenie „indeksu powtarzalności”

Co najmniej dziesięć próbek zostanie poddanych analizie jako ślepe duplikaty przez jedną osobę oceniającą w okresie 12 miesięcy. Zazwyczaj będzie to odbywać się w czasie kilku sesji. Wyniki dla określonych cech produktu są oceniane z zastosowaniem poniższego wzoru:

$$w_1 = 1 + \frac{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2}{n}$$

gdzie:

w_1 : indeks powtarzalności

x_{i1} : wynik pierwszej oceny próbki x_i

x_{i2} : wynik drugiej oceny próbki x_i

n : liczba próbek

Oceniane próbki powinny odzwierciedlać szeroki zakres jakości. Wartość w_1 nie powinna przekroczyć 1,5 (skala pięciopunktowa).

b) Określenie „indeksu odchyliń”

Indeks ten powinien być wykorzystywany w celu sprawdzenia, czy osoba oceniająca wykorzystuje dla oceny jakości tę samą skalę co doświadczona grupa osób oceniających. Punkty otrzymane przez osobę oceniającą są porównywane ze średnią punktów otrzymanych przez grupę osób oceniających.

Do oceny wyników ma zastosowanie poniższe równanie:

$$D_1 = 1 + \frac{\sum [(x_{i1} - \bar{x}_{i1})^2 + (x_{i2} - \bar{x}_{i2})^2]}{2n}$$

gdzie:

x_{i1} ; x_{i2} : patrz lit. a)

\bar{x}_{i1} ; \bar{x}_{i2} : średni wynik grupy osób oceniających odpowiednio w pierwszej i drugiej ocenie próbki x_i

n : liczba próbek (co najmniej dziesięć na 12 miesięcy).

Oceniane próbki powinny odzwierciedlać szeroki zakres jakości. Wartość D_1 nie powinna przekroczyć 1,5 (skala pięciopunktowa).

Państwa Członkowskie muszą zawiadamiać Komisję o wszelkich trudnościach napotkanych podczas stosowania niniejszej procedury.

c) Porównanie wyników otrzymanych w różnych regionach Państwa Członkowskiego i w różnych Państwach Członkowskich

Gdzie stosowne, badanie musi być zorganizowane co najmniej raz w roku w celu porównania wyników otrzymanych przez osoby oceniające w różnych regionach. Jeżeli występują znaczne różnice, powinny zostać podjęte konieczne kroki w celu zidentyfikowania przyczyn oraz uzyskania porównywalnych wyników.

Państwa Członkowskie mogą organizować badania w celu porównania wyników otrzymanych przez ich własne osoby oceniające i osoby oceniające z sąsiednich Państw Członkowskich. Znaczne różnice powinny prowadzić do pogłębionego badania w celu uzyskania wyników porównywalnych.

Państwa Członkowskie powinny zawiadomić Komisję o rezultatach tych porównań.

ZAŁĄCZNIK VII

(Art. 6)

SENSORYCZNA OCENA MASŁA**1. Zakres**

Celem niniejszej procedury dla sensorycznej oceny masła jest ustalenie jednolitej metody stosowanej we wszystkich Państwach Członkowskich.

2. Definicje

„Ocena sensoryczna” oznacza badanie właściwości produktu za pomocą narządów zmysłu.

„Zespół oceniający” oznacza grupę wybranych praktykujących osób oceniających, które podczas przeprowadzania oceny nie mają możliwości komunikowania się między sobą oraz nie mają możliwości wpływu jedna na drugą.

„Ocena punktowa” oznacza sensoryczną ocenę przeprowadzaną przez zespół oceniający, przy użyciu skali numerycznej. Musi być wykorzystywana nomenklatura dotycząca wad.

„Stopniowanie” oznacza klasyfikację jakościową, przeprowadzaną w oparciu o ocenę punktową.

„Dokumenty kontroli”: dokumenty służące do rejestrowania indywidualnych ocen punktowych dla każdej cechy oraz ostatecznego stopnia dla danego produktu. (Dokument ten może zostać również wykorzystany do rejestrowania składu chemicznego).

3. Pomieszczenie do przeprowadzania badań

3.1. Należy podjąć środki ostrożności, aby znajdujące się w pomieszczeniu do przeprowadzania badań osoby oceniające nie były poddawane oddziaływaniu czynników zewnętrznych.

3.2. Pomieszczenie do przeprowadzania badań musi być wolne od obcych zapachów i łatwe do utrzymania w czystości. Ściany muszą być w jasnym kolorze.

3.3. Pomieszczenie do przeprowadzania badań oraz jego oświetlenie muszą być takie, aby nie miały wpływu na cechy ocenianych produktów. Pomieszczenie musi być wyposażone we właściwy czujnik temperatury.

4. Wybór osób oceniających

Osoba oceniająca musi znać produkty z masła oraz posiadać kwalifikacje w przeprowadzaniu stopniowania sensorycznego. Jej kompetencje powinny być regularnie oceniane (co najmniej raz w roku) przez właściwe władze.

5. Wymogi dotyczące zespołu oceniającego

Liczba osób oceniających w zespole powinna być nieparzysta, w liczbie co najmniej trzech osób. Większość z nich muszą stanowić pracownicy zatrudnieni przez właściwe władze bądź upoważnione osoby niezatrudnione w branży mleczarskiej.

W celu zapewnienia najlepszego wykonania zadania przez uczestników oceny przed podjęciem tej oceny musi zostać uwzględniony szereg czynników:

- uczestnicy nie mogą cierpieć na żadną chorobę, która mogłaby wpłynąć na ich sprawność. W razie wystąpienia takiego przypadku ta osoba oceniająca powinna zostać zastąpiona w zespole przez inną osobę,
- uczestnicy muszą punktualnie przystąpić do oceny i upewnić się, że mają wystarczająco dużo czasu na jej wykonanie,
- uczestnicy nie mogą używać substancji o silnym zapachu, takich jak perfumy, płyny po goleniu, dezodoranty itd., oraz powinni unikać spożywania aromatycznych pokarmów (np. mocno przyprawionych) itd.
- uczestnicy nie mogą palić, jeść ani pić niczego poza wodą na pół godziny przed ocenianiem.

6. Ocena wartości dla każdej cechy

6.1. Przy ocenie sensorycznej należy uwzględnić trzy czynniki: wygląd, konsystencję oraz aromat.

„Wygląd” wiąże się z następującymi cechami: kolor, widoczna czystość, porost pleśni oraz dyspersja wody. Dyspersję wody bada się zgodnie z normą IDF 112A/1989.

„Konsystencja” wiąże się z następującymi cechami: twardość oraz smarowność.

Do oceny konsystencji masła mogą być stosowane metody fizyczne. Komisja przewiduje dalszą harmonizację tych metod.

„Aromat” wiąże z następującymi cechami: smak i zapach.

Znaczne odchylenie od zalecanej temperatury uniemożliwia przeprowadzenie wiarygodnej oceny konsystencji oraz aromatu. Temperatura jest parametrem najwyższej wagi.

- 6.2. Sensoryczna ocena każdej cechy musi być przeprowadzana oddzielnie. Ocena punktowa musi być dokonywana zgodnie z tabelą 1.
- 6.3. W celu osiągnięcia jednolitości w ocenie punktowej może być wskazane, aby osoby oceniające, przed rozpoczęciem przeprowadzania oceny, przyznały punkty wspólnie dla jednej lub więcej próbek referencyjnych za ich wygląd, konsystencję i aromat.
- 6.4. Ocena punktowa dopuszczalności przedstawia się, jak następuje:

	Maksymalna	Wymagana
Wygląd	5	4
Konsystencja	5	4
Aromat	5	4

W przypadku gdy nie zostaje uzyskana wymagana liczba punktów, należy koniecznie podać opis wady. Liczba punktów przyznanych przez każdą z osób oceniających dla każdej cechy musi zostać zarejestrowana w dokumencie kontroli. Produkt zostaje dopuszczony bądź odrzucony (zdyskwalifikowany) w oparciu o decyzję większości. Przypadki, w których różnice między indywidualną oceną punktową dla każdej cechy są większe niż przyległa punktacja, nie powinny występować często (nie częściej niż raz na 20 próbek). W przeciwnym przypadku kierownik zespołu oceniającego powinien sprawdzić kompetencje tego zespołu.

7. Nadzór

Kierownik zespołu oceniającego, który musi być pracownikiem właściwych władz i może być członkiem zespołu, musi być generalnie odpowiedzialny za całą procedurę. Musi on rejestrować indywidualnie przyznane liczby punktów dla każdej cechy w dokumencie kontrolnym oraz uwierzytelniać dopuszczenie bądź odrzucenie produktu.

8. Pobieranie próbek oraz przygotowanie próbki

- 8.1. — Pożądane jest, aby tożsamość próbek była ukryta podczas przeprowadzania oceny, tak aby uniknąć wszelkiego możliwego wpływu na wyniki badania.
- Powinno to zostać zorganizowane przez kierującego zespołem oceniającym, przed przeprowadzeniem oceny, podczas nieobecności innych członków zespołu.
- 8.2. W przypadku gdy sensoryczna ocena przeprowadzana jest w chłodni składowej, próbkę pobiera się za pomocą sondy do pobierania masła. W przypadku gdy sensoryczna ocena jest przeprowadzana w innym miejscu niż chłodnia składowa, musi zostać próbka o masie co najmniej 500 g.
- 8.3. Podczas przeprowadzania oceny masło powinno mieć temperaturę 10–12 °C. Za wszelką cenę należy unikać dużych odchyleń od tych wartości temperatury.

9. Nomenklatura

Patrz załączona tabela 2.

Tabela 1: Punktowa ocena masła

Wygląd			Konsystencja			Aromat + woń		
Punkty	Nr (1)	Uwagi	Punkty (klasa jakości)	Nr (1)	Uwagi	Punkty (klasa jakości)	Nr (1)	Uwagi
5		<i>Bardzo dobry</i> idealny rodzaj najwyższa jakość (gładka sucha powierzchnia)	5		<i>Bardzo dobra</i> idealny rodzaj najwyższa jakość (dobrze smarowne)	5		<i>Bardzo dobry</i> idealny rodzaj najwyższa jakość (idealnie czysta woń)
4		<i>Dobry</i> (2) Bez wyraźnych wad	4	17 18	<i>Dobra</i> (2) twarda miękka	4		<i>Dobry</i> (2) Bez wyraźnych wad
3		<i>Odpowiedni (niewielkie wady)</i>	3		<i>Odpowiednia (niewielkie wady)</i>	3		<i>Odpowiedni (niewielkie wady)</i>
	1	luźny, wilgotny		14	krucha, łamliwa, lasująca się		21	nieklarowny
	2	niejednolity, dwukolorowy		15	pastowata, ciastowata, mazista		22	obcy aromat
	3	smugowaty		16	lepka		25	kwaśny
	4	marmurkowy, nakrapiany		17	twarda		27	aromat gotowania, aromat spalinowy
	5	plamisty		18	miękka		33	aromat paszowy
	6	oddzielony olej					34	cierpki, gorzki
	7	przebarwienia					35	przesolony
	8	słaba, luźna struktura						
2		<i>Zły (wyraźne wady)</i>	2		<i>Zła (wyraźne wady)</i>	2		<i>Zły (wyraźne wady)</i>
	1	luźny, wilgotny		14	Krucha, łamliwa, lasująca się		21	nieklarowny
	3	smugowaty		15	pastowata, ciastowata, mazista		22	obcy aromat
	4	marmurkowy, nakrapiany		16	lepka		23	czerstwy
	5	plamisty		17	twarda		25	kwaśny
	6	oddzielony olej		18	miękka		32	aromat utlenienia, aromat metaliczny
	10	obce substancje					33	aromat paszowy
	11	zapleśnienia					34	cierpki, gorzki
	12	nierozpuszczona sól					35	przesolony
							36	stęchły, zgniły
							38	aromat chemikaliów
1		<i>Bardzo zły (mocne wady)</i>	1		<i>Bardzo zła (mocne wady)</i>	1		<i>Bardzo zły (mocne wady)</i>
	1	luźny, wilgotny		14	krucha, łamliwa, lasująca się		22	obcy aromat
	3	smugowaty		15	pastowata, ciastowata, mazista		24	aromat serowy, twarogowy
	4	marmurkowy, nakrapiany		16	lepka		25	kwaśny
	5	plamisty		17	twarda		26	drożdżowy
	6	oddzielony olej		18	miękka		28	spleśniały aromat
	7	przebarwiony					29	zjełczały
	9	granulowaty					30	oleisty, rybi
	10	obce substancje					31	łojowaty
	11	spleśniały					32	aromat utlenienia, aromat metaliczny
	12	nierozpuszczona sól					34	cierpki, gorzki
							36	stęchły, zgniły
							37	słodowy
							38	aromat chemikaliów

(1) Tabela 2

(2) Wady wymienione pod oceną „dobra” stanowią jedynie bardzo małe odchylenia od rodzaju idealnego

Tabela 2: Wykaz wad masła**I. Wygląd**

1. luźny, wilgotny
2. niejednolity, dwukolorowy
3. smugowaty
4. marmurkowy, nakrapiany
5. plamisty
6. oddzielony olej
7. przebarwiony
8. słaby (luźna struktura)
9. granulowany
10. substancje obce
11. zapleśniały
12. nierozpuszczona sól

II. Konsystencja

14. krucha, łamliwa, łusująca się
15. pastowata, ciastowata, mazista
16. lepka
17. twarda
18. miękka

III. Aromat i woń

20. bez aromatu
21. nieklarowny⁽¹⁾
22. obcy aromat
23. czerstwy
24. serowy, twarogowy
25. kwaśny
26. drożdżowy
27. a) aromat gotowania
b) aromat spalenizny
28. spleśniały aromat
29. zjełczały
30. oleisty, rybi
31. łojowaty
32. a) aromat utlenienia
b) aromat metaliczny
33. aromat paszowy
34. cierpki, gorzki
35. przesolony
36. stęchły, zgniły
37. słodowy
38. aromat chemikaliów

(¹) To oznaczenie powinno być używane możliwie najrzadziej i wyłącznie wtedy, gdy wada nie może być opisana bardziej dokładnie.

ZAŁĄCZNIK VIII

(art. 7)

PROCEDURA STOSOWANA W PRZYPADKACH SPORÓW DOTYCZĄCYCH WYNIKÓW ANALIZ (analizy chemiczne)

1. Dodatkowa analiza może być przeprowadzana na wniosek podmiotu w ciągu siedmiu dni roboczych od ogłoszenia wyników pierwszej analizy, pod warunkiem że zapieczone duplikaty próbek produktu są dostępne i zostały odpowiednio składowane przez właściwe władze.
2. Właściwe władze wysłają te próbki do drugiego laboratorium, na wniosek i koszt podmiotu. Laboratorium to musi być uprawnione do przeprowadzania analiz urzędowych i musi posiadać potwierdzone kompetencje do wykonywania wnioskowanych analiz. Kompetencje te powinny być udokumentowane udanym udziałem w badaniach międzylaboratoryjnych, testach biegłości lub w porównaniach między laboratoriami. Drugie laboratorium musi wykorzystywać metodę referencyjną. Wyniki otrzymane przez dwa laboratoria muszą zostać ocenione, jak następuje:

a) *Jeżeli obydwa laboratoria spełniają wymóg powtarzalności i odtwarzalności*

Średnią arytmetyczną wyników badań, otrzymanych przez obydwa laboratoria, podaje się jako wynik końcowy. Ten wynik końcowy jest oceniany z uwzględnieniem różnicy krytycznej, z zastosowaniem poniższego wzoru:

$$CrD_{95}(|\bar{Y} - m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

gdzie:

\bar{Y} : średnia arytmetyczna wszystkich wyników otrzymanych przez obydwa laboratoria

m_0 : wartość graniczna

R: odtwarzalność

r: powtarzalność

n_1 : liczba wyników otrzymanych przez laboratorium 1

n_2 : liczba wyników otrzymanych przez laboratorium 2

Uwaga. Jeżeli wynik końcowy jest obliczany za pomocą wzorów:

$$x = y_1 \pm y_2 \text{ lub } x = y_1 / y_2$$

(patrz ust. 3 i 4 załącznika IV odpowiednio) i powinny być podstawione do wzorów zamiast i.

b) *Jeżeli laboratoria spełniają wymóg powtarzalności, ale nie spełniają wymogu odtwarzalności*

Jeżeli druga analiza potwierdza pierwszą, ilość poddana analizie powinna zostać odrzucona jako niezgodna. W przeciwnym razie ilość powinna zostać dopuszczona.

c) *Jeżeli tylko jedno laboratorium spełnia wymóg powtarzalności*

Wynik końcowy laboratorium spełniającego wymóg powtarzalności należy wykorzystać do podjęcia decyzji o dopuszczeniu ilości poddawanych analizie.

d) *Jeżeli żadne z laboratoriów nie spełnia wymogu powtarzalności, ale spełniony jest wymóg odtwarzalności*

Stosuje się lit. a).

e) *Jeżeli żadne z laboratoriów nie spełnia wymogu powtarzalności ani wymogu odtwarzalności*

Ilość poddawana analizie powinna być dopuszczona, jeżeli wyniki otrzymane przez jedno z laboratoriów prowadzą do takiego wniosku.

f) *Jeżeli wyniki zostały otrzymane z zastosowaniem metod niepotwierdzonych*

Ilość poddawana analizie powinna być dopuszczona, jeżeli wyniki otrzymane przez jedno z laboratoriów prowadzą do takiego wniosku

3. Wyniki drugiej analizy muszą być notyfikowane podmiotowi przez właściwe władze możliwie najszybciej. Koszt drugiej analizy jest ponoszony przez dany podmiot, jeżeli ilość poddawana analizie jest odrzucona.
4. Jeżeli podmiot może udowodnić, w ciągu pięciu dni roboczych od momentu pobrania próbek, że procedura pobierania próbek nie została przeprowadzona prawidłowo, pobranie próbek musi zostać w miarę możliwości powtórzone. Jeżeli pobranie próbek nie może zostać powtórzone, ilość poddana analizie musi zostać dopuszczona.

ZAŁĄCZNIK IX

(art. 8)

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WODY W MAŚLE

1. Zakres i dziedzina stosowania

Niniejsza metoda referencyjna precyzuje metodę oznaczania zawartości wody w maśle.

2. Odniesienie

Norma IDF 50 C: 1995 – Mleko i przetwory mleczne – Metody pobierania próbek

3. Definicja

Zawartość wody w maśle: utrata masy po zakończeniu procesu ogrzewania określonego w niniejszej normie. Zawartość wody w maśle wyrażona jest w gramach na 100 g.

4. Zasada

Odparowywanie wody, z próbki analitycznej w obecności pumeksu, w temperaturze 102 °C w piecu suszarniczym.

5. Aparatura i materiały

Typowa aparatura laboratoryjna, w szczególności:

- 5.1. Waga analityczna o czułości 1 mg.
- 5.2. Eksykator zaopatrzony w wydajny środek osuszający (na przykład świeżo wyschnięty żel krzemionkowy ze znacznikiem higroskopijnym).
- 5.3. Piec suszarniczy, wentylowany, regulowany termostatycznie, działający w temperaturze 102 ± 2 °C na całej powierzchni roboczej.
- 5.4. Szklane, porcelanowe lub niekorodujące naczynia metalowe, o wysokości około 20 mm, o średnicy 60–80 mm.
- 5.5. Kamień pumekсовy, granulowany, myty, o średnicy 0,8–10 mm.

6. Pobieranie próbek

Patrz IDF 50 C: 1995

7. Procedura**7.1. Przygotowanie próbki badanej**

Podgrzać próbkę laboratoryjną w zamkniętym szklanym lub odpowiednim plastikowym pojemniku, który powinien być napełniony w połowie do dwóch trzecich, do temperatury, w której próbka będzie wystarczająco miękka, aby ułatwić staranne mieszanie do uzyskania stanu jednorodnego (mieszadłem mechanicznym lub ręcznie). Temperatura mieszania nie powinna normalnie przekraczać 35 °C. Schłodzić próbkę do temperatury otoczenia. Natychmiast po schłodzeniu otworzyć pojemnik z próbką i mieszać krótko (nie dłużej niż przez 10 sekund) odpowiednim przyrządem, na przykład łyżką lub łopatką, przed zważeniem.

7.2. Określenie zawartości wody

7.2.1. Umieścić w przybliżeniu 10 g pumeksu w naczyniu (ppkt 5.4).

7.2.2. Suszyć naczynie z pumeksem w piecu (ppkt 5.3) w temperaturze 102 ± 2 °C przynajmniej przez jedną godzinę.

Uwaga: Okresy suszenia wspomniane w ppkt 7.2.2, 7.2.5 i 7.2.7 rozpoczynają się, kiedy temperatura pieca osiąga 102 ± 2 °C.

7.2.3. Schłodzić naczynie w eksykatorze (ppkt 5.2) do temperatury pokoju wagowego i ważyć z dokładnością do 1 mg.

- 7.2.4. Odmierzyć wagowo do naczynia, z dokładnością do 1 mg, porcję badaną o wielkości w przybliżeniu 5 g badanej próbki.
- 7.2.5. Umieścić naczynie w piecu w temperaturze 102 ± 2 °C i pozostawić je na trzy godziny.
- 7.2.6. Schłodzić naczynie w eksykatorze do temperatury pokoju wagowego i zważyć z dokładnością do 1 mg.
- 7.2.7. Powtarzać proces suszenia przez dodatkowe jednogodzinne okresy, chłodząc i ważąc za każdym razem w sposób określony w ppkt 7.2.6 aż do uzyskania stałej masy (zmiany masy nie przekraczają 1 mg).
- W przypadku zwiększenia się masy przyjąć do obliczenia najniższą zarejestrowaną masę.

8. Sposób prezentowania wyników

8.1. Metoda obliczeń i wzór

Obliczyć zawartość wody, W, jako wartość procentową masy z zastosowaniem poniższego wzoru:

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

gdzie

m_0 mjest masą w gramach naczynia z pumeksem (ppkt 7.2.3.)

m_1 mjest masą w gramach, porcji badanej, naczynia i pumeksu przed suszeniem (ppkt 7.2.4)

m_2 mjest masą w gramach, porcji badanej, naczynia i pumeksu po suszeniu (ppkt 7.2.7)

Przedstawić wynik z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

8.2. Powtarzalność

Różnica bezwzględna między wynikami dwóch pojedynczych oznaczeń, przeprowadzonych równocześnie lub w bezpośrednim następstwie przez ten sam podmiot w tych samych warunkach na identycznym materiale badanym, nie przekracza 0,2 %.

8.3. Odtwarzalność

Różnica bezwzględna między dwoma pojedynczymi i niezależnymi wynikami, otrzymanymi przez dwa podmioty pracujące w różnych laboratoriach na identycznym materiale badanym, nie przekracza 0,3 %.

9. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno precyzować wykorzystane metody oraz podawać otrzymane wyniki. Powinno także ujmować wszystkie szczegóły operacyjne niesprecyzowane w niniejszej normie międzynarodowej lub uznane za fakultatywne, łącznie ze szczegółami dotyczącymi jakichkolwiek zdarzeń, które mogły wpłynąć na wyniki. Sprawozdanie z badań powinno podawać wszystkie informacje konieczne do pełnej identyfikacji próbki.

ZAŁĄCZNIK X

(art. 8)

MASŁO: OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SUCHEJ MASY BEZTŁUSZCZOWEJ**1. Zakres i dziedzina stosowania**

Niniejsza norma precyzuje metodę oznaczania zawartości suchej masy beztłuszczowej w maśle.

2. Odniesienie

Norma IDF 50 C: 1995 – Mleko i przetwory mleczne – Metody pobierania próbek

3. Definicja

Zawartość suchej masy beztłuszczowej w maśle: Wartość procentowa udziału w masie substancji, oznaczona przez wymienioną procedurę. Zawartość ta wyrażona jest w gramach na 100 g.

4. Zasada

Odparowywanie wody ze znanej masy masła, ekstrakcja z zastosowaniem lekkiej ropy naftowej i ważenie pozostałości.

5. Odczynnik

Lekka ropa naftowa o zakresie wrzenia między 30 i 60 °C. Odczynnik nie powinien pozostawiać więcej niż 1 mg pozostałości po odparowaniu 100 ml.

6. Aparatura i materiały

- 6.1. 6.1. Waga analityczna, o czułości 1 mg.
- 6.2. Eksykator zaopatrzony w wydajny środek wysuszający (na przykład świeżo wyschnięty żel krzemionkowy ze znacznikiem higroskopijnym).
- 6.3. Piec suszarniczy, wentylowany, regulowany termostatycznie, działający w temperaturze 102 ± 2 °C na całej powierzchni roboczej.
- 6.4. Szklane, porcelanowe lub niekorodujące naczynia metalowe, o wysokości odpływu około 20 mm, o średnicy 60–80 mm, zaopatrzone w szklany pręt do mieszania.
- 6.5. Tygiel filtracyjny, szkło spiekane, średnica pora 16–40 µm, z kolbą ssącą.

7. Pobieranie próbek

Patrz norma IDF 50 C: 1995

8. Procedura**8.1. Przygotowanie badanej próbki**

Podgrzać próbkę laboratoryjną w zamkniętym szklanym lub odpowiednim plastikowym pojemniku, który powinien być napełniony w połowie do dwóch trzecich, do temperatury, w której próbka będzie wystarczająco miękka, aby ułatwić staranne mieszanie do uzyskania stanu jednorodnego (mieszadłem mechanicznym lub ręcznie). Temperatura mieszania nie powinna normalnie przekraczać 35 °C. Schłodzić próbkę do temperatury otoczenia. Możliwie najszybciej po schłodzeniu otworzyć pojemnik z próbką i mieszać krótko (nie dłużej niż przez 10 sekund) odpowiednim przyrządem, na przykład łyżką lub łopatką, przed ważeniem.

8.2. Oznaczanie

- 8.2.1. Suszyć naczynie z prętem (ppkt 6.4) i tygłem (ppkt 6.5) w piecu (ppkt 6.3) przez jedną godzinę. Pozostawić te przedmioty do schłodzenia w eksykatorze i zważyć je razem (to znaczy naczynie, pręt i tygiel) z dokładnością do 1 mg (m_0).

Uwagi: — Z zasady wystarczającym czasem chłodzenia jest 45 minut.

— Ważne jest, aby dla każdej porcji badanej używać tego samego zestawu naczyń, pręta i tygla, jeżeli w partii analizuje się więcej niż jedną porcję badaną.

- 8.2.2. Usunąć tygiel, zarejestrować łączną wagę naczyń i pręta, z dokładnością do 1 mg (m_1).

- 8.2.3. Odmierzyć wagowo do naczyń, z dokładnością do 1 mg, porcję badaną o wielkości około 5 g z badanej próbki (ppkt 8.1) (m_2).

- 8.2.4. Umieścić naczynie (zawierające pręt i masło) w piecu w temperaturze $102 \pm 2^\circ\text{C}$ i pozostawić na noc.
- 8.2.5. Pozostawić naczynie (ppkt 8.2.3) do schłodzenia do temperatury pokojowej.
- 8.2.6. Dodać 15 ml ciepłej (w przybliżeniu 25°C) lekkiej ropy naftowej do naczynia i oddzielić możliwie najwięcej osadu przylegającego do naczynia, używając pręta szklanego. Przenieść rozpuszczalnik do tygla i pozostawić go, aż się przefiltruje do kolby ssącej.
- 8.2.7. Przeprowadzić czynności ppkt 8.2.6 jeszcze cztery razy. Jeżeli nie ma żadnych śladów tłuszczu na powierzchni naczynia, przenieść ilościowo podczas czwartego płukania możliwie najwięcej osadu do tygla. W przeciwnym razie powtarzać czynności ppkt 8.2.6 do czasu całkowitego wyeliminowania wszystkich śladów tłuszczu.
- 8.2.8. Spłukać osad w tyglu za pomocą 25 ml ciepłej ropy naftowej.
- 8.2.9. Suszyć naczynie, pręt szklany i tygiel razem w piecu w temperaturze $120 \pm 2^\circ\text{C}$ przez 30 minut.
- 8.2.10. Pozostawić w eksykatorze do schłodzenia do temperatury pokojowej i zważyć z dokładnością do 1 mg.
- 8.2.11. Powtarzać czynności ppkt 8.2.9 i 8.2.10 do czasu otrzymania stałej masy (zmiana masy nieprzekraczająca 1 mg) naczynia, pręta i tygla łącznie (m_3).

9. Sposób prezentowania wyników

9.1. Wyliczenie zawartości suchej masy beztłuszczowej

Obliczyć zawartość suchej masy beztłuszczowej, SNF, jako wartość procentową masy z zastosowaniem poniższego wzoru:

$$\text{SNF} = \frac{m_3 - m_0}{m_2 - m_1} \times 100$$

gdzie

m_0 mjest masą w gramach, pustego naczynia z prętem szklanym i tygłem (ppkt 8.2.1)

m_1 mjest masą w gramach, pustego naczynia z prętem szklanym (ppkt 8.2.2)

m_2 mjest masą w gramach, porcji badanej i naczynia z prętem szklanym (ppkt 8.2.3)

m_3 jest końcową masą w gramach, w naczyniu z prętem i tygłem zawierającym osad (ppkt 8.2.11)

Przedstawić wynik z dokładnością jednego miejsca po przecinku.

9.2. Powtarzalność

Różnica bezwzględna między wynikami dwóch pojedynczych oznaczeń, przeprowadzonych równocześnie lub w bezpośrednim następstwie przez ten sam podmiot w tych samych warunkach na identycznym materiale badanym, nie przekracza 0,1 %.

9.3. Odtwarzalność

Różnica bezwzględna między dwoma pojedynczymi i niezależnymi wynikami, otrzymanymi przez dwa podmioty pracujące w różnych laboratoriach na identycznym materiale badanym, nie przekracza 0,2 %.

10. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno precyzować wykorzystaną metodę oraz podawać otrzymane wyniki. Powinno także ujmować wszystkie szczegóły operacyjne niesprecyzowane w tej normie międzynarodowej lub uznane za fakultatywne, łącznie ze szczegółami dotyczącymi jakichkolwiek zdarzeń, które mogły wpłynąć na wyniki. Sprawozdanie z badań powinno podawać wszystkie informacje konieczne do pełnej identyfikacji próbki.

Uwaga:

Jeżeli analizie poddawane jest masło solone, dodana sól jest określona jako sucha masa beztłuszczowa. Dla oznaczenia zawartości suchej masy beztłuszczowej mleka należy odjąć od zawartości suchej masy beztłuszczowej zawartość dodanej soli.

Obliczone wielkości precyzji dla oznaczania zawartości suchej masy beztłuszczowej mleka wynoszą:

Powtarzalność: $r = 0,104 \%$

Odtwarzalność: $R = 0,206 \%$

Może zostać przyjęte, że wielkości precyzji otrzymane dla oznaczenia suchej masy beztłuszczowej są ważne dla oznaczania zawartości suchej masy beztłuszczowej mleka.

ZAŁĄCZNIK XI

(art. 8)

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU W MAŚLE

Zawartość tłuszczu jest otrzymywana pośrednio przez oznaczenie zawartości wody i zawartości suchej masy beztłuszczowej zgodnie z załącznikiem IX i załącznikiem X odpowiednio. Wartość procentowa udziału tłuszczu w masie jest równa:

$$100 - (W + \text{SNF})$$

gdzie:

W: jest wartością procentową udziału wody w masie

SNF: jest wartością procentową udziału suchej masy beztłuszczowej w wodzie

Obliczone wielkości precyzji dla oznaczania zawartości tłuszczu to:

Powtarzalność: $r = 0,22 \%$

Odtwarzalność: $R = 0,36 \%$

ZAŁĄCZNIK XII

(art. 9)

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WANILINY W KONCENTRACIE MASŁA, W MAŚLE LUB ŚMIETANIE ZA POMOCĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ HPLC**1. Zakres i dziedzina stosowania**

Niniejsza metoda opisuje procedurę ilościowego oznaczania waniliny w koncentracie masła, w maśle lub śmietanie.

2. Zasada

Ekstrakcja znanej ilości próbki za pomocą mieszaniny izopropanolu/etanolu/acetoniurylu (1:1:2). Strącenie więkości tłuszczu przez schłodzenie do temperatury w granicach między -15 °C a -20 °C, a następnie odwirowanie.

Po rozcieńczeniu w wodzie oznaczenie zawartości waniliny za pomocą chromatografii (HPLC).

3. Aparatura

Typowa aparatura laboratoryjna, w szczególności:

- 3.1. zamrażarka, działająca w amplitudzie temperatur od -15 °C do -20 °C;
- 3.2. strzykawki, o pojemności 2 ml;
- 3.3. mikrofiltry membranowe, o wielkości porów 0,45 µm, odporne na działanie roztworu zawierającego 5 % roztwór ekstrakcyjny (ppkt 4.4);
- 3.4. zestaw do wykonywania chromatografii składający się z pompy (przepływ 1,0 ml/min), iniektora (iniekcja 20 µl automatyczna lub ręczna), detektora UV (długość fali 306 nm, pełna skala 0,01 AU), rejestratora lub integratora oraz termostatu kolumny działającego przy temperaturze 25 °C;
- 3.5. kolumna analityczna (250 mm × 4,6 mm ID) z wypełnieniem materiałem LiChrospher RP 18 (Merck, 5 µm) lub równorzędnym;
- 3.6. kolumna osłonowa (ok. 20 mm × 3 mm ID) z suchym wypełnieniem materiałem Perisorb RP 18 (30–40 µm) lub równorzędnym.

4. Odczynniki

Wszystkie wykorzystane odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej.

- 4.1. Izopropanol
- 4.2. Etanol 96 % (obj.)
- 4.3. Acetonitryl
- 4.4. Roztwór ekstrakcyjny
Wymieszać izopropanol (ppkt 4.1), etanol (ppkt 4.2.) i acetonitryl (ppkt 4.3) w stosunku 1:1:2 (objętościowo).
- 4.5. Wanilina (4-hydrokso-3-metoksobenzaldehyd);
 - 4.5.1. Roztwór podstawowy waniliny (= 500 µg/ml)
Odmierzyć wagowo z dokładnością do 0,1 mg około 50 mg (CM mg) waniliny (ppkt 4.5) w kolbie pomiarowej o pojemności 100 ml, dodać 25 ml roztworu ekstrakcyjnego (ppkt 4.4) i uzupełnić wodą.
 - 4.5.2. Roztwór wzorcowy waniliny (= 10 µg/ml)
Odmierzyć pipetą 5 ml roztworu podstawowego waniliny (ppkt 4.5.1) do kolby pomiarowej o pojemności 250 ml i uzupełnić wodą.
- 4.6. Metanol, jakość HPLC
- 4.7. Kwas octowy lodowaty
- 4.8. Woda, jakość HPLC

4.9. Faza ruchoma HPLC

Zmieszać 300 ml etanolu (ppkt 4.6) z około 500 ml wody (ppkt 4.8) i 20 ml kwasu octowego (ppkt 4.7) w kolbie pomiarowej o pojemności 1000 ml, a następnie uzupełnić wodą (ppkt 4.8). Przefiltrować przez filtr 0,45 µm.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie badanej próbki.

5.1.1. Masło

Ogrzewać próbkę, aż zacznie się topić. Unikać lokalnego przegrzania powyżej 40 °C. Gdy próbka stanie się dostatecznie plastyczna, homogenizować ją przez wstrząsanie. Przed pobraniem próbki mieszać masło przez 15 sekund. Odmierzyć wagowo z dokładnością do 1 mg około 5 g (SM g) masła do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml.

5.1.2. Koncentrat masła

Bezpośrednio przed pobraniem próbki umieścić pojemnik z koncentratem masła w piecu o temperaturze 40–50 °C, dopóki nie ulegnie całkowitemu stopieniu. Rozrobić próbkę przez odwirowanie lub mieszanie, unikając tworzenia pęcherzyków powietrza na skutek zbyt energicznego mieszania. Odmierzyć wagowo ok. 4 g (SM g) koncentratu masła, z dokładnością do 1 mg, do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml.

5.1.3. Śmietana

Ogrzać próbkę w łaźni wodnej lub w inkubatorze w temperaturze 35–40 °C. Rozprowadzić tłuszcz równomiernie przez wirowanie lub w razie potrzeby przez mieszanie. Schłodzić szybko próbkę do temperatury 20 ± 2 °C. Próbkę powinna mieć jednorodny wygląd; jeżeli tak nie jest, powtórzyć procedurę. Odmierzyć wagowo 10 g (SM g) śmietany, z dokładnością do 1 g, do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml.

5.2. Przygotowanie badanego roztworu

Dodać około 75 ml roztworu ekstrakcyjnego (ppkt 4.4) do porcji badanej (ppkt 5.1.1, 5.1.2 lub 5.1.3), energicznie mieszać lub wstrząsać przez 15 minut i uzupełnić roztworem ekstrakcyjnym (ppkt 4.4). Przenieść około 10 ml tego ekstraktu do rurki z korkiem. Umieścić rurkę w zamrażarce (ppkt 3.1) i pozostawić na około 30 minut. Odwirowywać zimny ekstrakt przez 5 minut z prędkością około 2000 obr./min, a następnie niezwłocznie zdekantować. Pozostawić zdekantowany roztwór, dopóki nie osiągnie temperatury pokojowej. Pobrać pipetą 5 ml zdekantowanego roztworu do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić wodą. Przefiltrować podwielokrotność przez mikrofiltr membranowy (ppkt 3.3). Filtrat jest gotowy do oznaczania za pomocą HPLC.

5.3. Kalibracja

Pobrać pipetą 5 ml wzorcowego roztworu waniliny (ppkt 4.5.2) do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml. Dodać 5 ml roztworu ekstrakcyjnego (ppkt 4.4) i uzupełnić wodą do znaku. Roztwór ten zawiera 0,5 µg/ml waniliny.

5.4. Oznaczanie za pomocą HPLC

Pozostawić układ chromatograficzny na 30 minut w celu ustabilizowania. Dokonać iniekcji roztworu wzorcowego (ppkt 5.3). Powtarzać tę czynność, dopóki różnice między powierzchniami pików lub wysokościami pików między dwoma kolejnymi iniekcjami są mniejsze niż 2 %. W opisanych warunkach czas retencji waniliny wynosi około 9 minut. Poddać analizie roztwór wzorcowy (ppkt 5.3) w dwóch egzemplarzach przez iniekcję 20 µl. Dokonać iniekcji 20 µl roztworów badanych (ppkt 5.2). Określić powierzchnię lub wysokość otrzymanego pików waniliny. Powtórzyć podwójną iniekcję roztworu wzorcowego (ppkt 5.3) po 10 iniekcjach badanych próbek (ppkt 5.2).

6. Obliczanie wyników

Obliczyć średnią wielkość powierzchni (lub wysokość) (AC) pików waniliny powiązanych z granicznymi duplikatami iniekcji dla każdej partii roztworów badanych (łącznie cztery obszary lub wysokości).

Obliczyć współczynnik odpowiedzi (R):

$$R = AC/CM$$

gdzie CM jest masą waniliny w mg (ppkt 4.5.1).

Zawartość (w mg/kg) waniliny (C) w próbce badanej określa wzór:

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

gdzie:

AS = powierzchnia pików waniliny w badanej próbce

SM = masa badanej próbki w g (ppkt 5.1.1, 5.1.2 lub 5.1.3).

Jeżeli śmietana jest badana na obecność waniliny, stężenie znacznika musi być wyrażone w mg znacznika/kg tłuszczu mlekowego. Jest to obliczane przez mnożenie C przez 100/f. Wartość f jest procentową zawartością tłuszczu w śmietanie (m/m).

20 = współczynnik uwzględniający rozcieńczenie próbki wzorcowej i badanej

0,96 = współczynnik korygujący dla zawartości tłuszczu w pierwszym rozcieńczeniu badanej próbki

Uwaga Zamiast powierzchni pików można wykorzystać wysokości pików (patrz ppkt 8.3).

7. Dokładność metody

7.1. Powtarzalność (r)

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych w możliwie najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot z zastosowaniem tej samej aparatury na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 16 mg/kg.

7.2. Odtwarzalność (R)

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych przez podmioty gospodarcze w różnych laboratoriach z wykorzystaniem różnej aparatury na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 27 mg/kg.

8. Granice tolerancji

8.1. Z produktu zawierającego znacznik muszą być pobrane trzy próbki w celu sprawdzenia jednorodności.

8.2. Znacznik otrzymany z wanilii albo z waniliny syntetycznej:

8.2.1. Wielkość inkorporacji 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehydu wynosi 250 g na tonę koncentratu masła lub masła. Jeżeli znacznik jest śmietana, wielkość inkorporacji wynosi 250 g na tonę tłuszczu mleka.

8.2.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności inkorporacji znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z niższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

— 221,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji),

— 159,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją między 221,0 mg/kg i 159,0 mg/kg.

8.3. Znacznik otrzymany wyłącznie z ziaren wanilii lub jej integralnych ekstraktów:

8.3.1. Wielkość inkorporacji 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehydu wynosi 100 gramów na tonę koncentratu masła lub masła. Jeżeli znacznik jest śmietana, wielkość inkorporacji wynosi 100 g na tonę tłuszczu mleka.

8.3.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności wprowadzenia znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z niższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

— 79,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji),

— 54,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją między 79,0 mg/kg a 54,0 mg/kg.

9. Uwagi

9.1. Powtarzalność r jest to wartość, poniżej której można się spodziewać, że różnica bezwzględna między dwoma pojedynczymi wynikami badań otrzymanymi za pomocą tej samej metody na identycznym materiale badanym w takich samych warunkach (ta sama aparatura, to samo laboratorium i krótki odstęp czasu) będzie zawierała się w granicach określonego prawdopodobieństwa; z braku innych wskazań prawdopodobieństwo wynosi 95 %.

- 9.2. Odtwarzalność R jest to wartość, poniżej której można się spodziewać, że różnica bezwzględna między pojedynczymi wynikami badań otrzymanymi za pomocą tej samej metody na identycznym materiale badanym w różnych warunkach (różne podmioty, różna aparatura, różne laboratoria i/lub różne terminy) może zawierać się w granicach określonego prawdopodobieństwa; w braku innych wskazań prawdopodobieństwo wynosi 95 %
 - 9.3. Odzysk dodanej waniliny przy 250 mg/kg bezwodnego tłuszczu mlecznego waha się w granicach 97,0–103,8. Stwierdzona średnia zawartość waniliny wynosiła 99,9 % przy odchyleniu standardowym 2,7 %.
 - 9.4. Wzorcowy roztwór zawiera 5 % roztwór ekstrakcyjny mający wyrównać poszerzenie piku spowodowane obecnością 5 % roztworu ekstrakcyjnego w badanych próbkach. Umożliwia to kwantyfikację według wysokości pików.
 - 9.5. Analiza oparta jest na linii kalibracji liniowej z początkiem układu współrzędnych.
Przez zastosowanie odpowiednich rozcieńczeń roztworu wzorcowego (ppkt 4.5.2) liniowość powinna być sprawdzona po raz pierwszy podczas dokonywania analizy, a następnie w regularnych odstępach czasu i po zmianach lub naprawach sprzętu HPLC.
-

ZAŁĄCZNIK XIII

(art. 9)

OZNACZANIE DROGĄ SPEKTROMETRII ZAWARTOŚCI ESTRU ETYLU KWASU BETA-APO-8'-KAROTENOWEGO W KONCENTRACIE MASŁA ORAZ W MAŚLE**1. Zakres i dziedzina stosowania**

Metoda przedstawia procedurę stosowaną do ilościowego oznaczania zawartości estru etylowego kwasu beta-apo-8'-karotenowego (ester apokarotenowy) w koncentracie masła i w maśle. Ester apokarotenowy jest sumą wszystkich substancji obecnych w ekstrakcie próbek otrzymanych zgodnie z warunkami określonymi w metodzie, która polega na absorbowaniu światła przy 440 nm.

2. Zasada

Tłuszcz z masła jest rozpuszczany w lekkiej ropie naftowej, a absorbancja jest mierzona przy 440 nm. Zawartość estru apokarotenowego jest ustalona poprzez odniesienie do normy zewnętrznej.

3. Aparatura

- 3.1. Pipety – miarowe, o pojemności 0,25, 0,50, 0,75 i 1,0 ml.
- 3.2. Spektrofotometr – odpowiedni do użycia przy 440 nm (oraz 447–449 nm) i wyposażony w naczynka o długości drogi optycznej 1 cm.
- 3.3. Kolby pomiarowe: 20 ml i 100 ml.
- 3.4. Waga analityczna, czułość 0,1 mg.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej.

- 4.1. Zawiesina estru apokarotenowego (w przybliżeniu 20 %).

- 4.1.1. Ustalić zawartość zawiesiny w następujący sposób:

Odmierzyć wagowo 400 mg do kolby pomiarowej (100 ml); rozpuścić w 20 ml chloroformu (ppkt 4.4) i uzupełnić cykloheksanem (ppkt 4.5). Rozcieńczyć, przy użyciu cykloheksanu, 5 ml tego roztworu do całkowitej objętości 100 ml (roztwór A). Rozcieńczyć, przy użyciu cykloheksanu, 5,0 ml roztworu A do całkowitej objętości 100 ml. Zmierzyć absorbancję przy 447–449 nm (zmierzyć maksimum w stosunku do cykloheksanu, używając jako ślepej próby naczyniek o długości drogi optycznej 1 cm).

$$\text{Zawartość estru apokarotenowego(\%)} = \frac{A_{\max} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{\max} = absorbancja roztworu pomiarowego

A = masa próbki (g)

2 555 = wartość odniesienia A (1 %, 1 cm)

Czystość zawiesiny wynosi P (%).

Uwaga Zawiesina estru apokarotenowego jest wrażliwa na powietrze, ciepło i światło. Przechowywana może być przez okres około 12 miesięcy w zamkniętym oryginalnym pojemniku (uszczelnionym azotem) przechowywanym w chłodnym miejscu. Po otwarciu zawartość powinna być w krótkim okresie zużyta.

- 4.1.2. Wzorcowy roztwór estru apokarotenowego, w przybliżeniu 0,2 mg/ml.

Odmierzyć wagowo z dokładnością do 0,1 mg około 0,100 g zawiesinę estru apokarotenowego (ppkt 4.1.1) (Wg), rozpuścić w benzynie lakowej (ppkt 4.2), przenieść ilościowo do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić benzyną lakową do znaku.

Roztwór ten zawiera (W.P)/10 mg/ml estru apokarotenowego.

Uwaga Roztwór musi być przechowywany w chłodnym miejscu w ciemności. Wyrzucić niewykorzystany roztwór po upływie jednego miesiąca.

- 4.2. Benzyna lakowa (40–60 °C).
- 4.3. Siarczan sodu, bezwodny, granulowany, wcześniej suszony przez dwie godziny w temperaturze 102 °C.
- 4.4. Chloroform.
- 4.5. Cykloheksan.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie badanej próbki

5.1.1. Koncentrat masła

Roztopić próbkę w piecu w temperaturze około 45 °C.

5.1.2. Masło

Roztopić próbkę w piecu w temperaturze około 45 °C oraz przefiltrować reprezentatywną porcję przez filtr zawierający około 10 g bezwodnego siarczanu sodu (ppkt 4.3) w środowisku zastoniętym od silnego naturalnego lub sztucznego światła i utrzymywanym w stałej temperaturze 45 °C. Zebrać odpowiednią ilość tłuszczu masła.

5.2. Oznaczanie

Odmierzyć wagowo przybliżoną ilość 1 g koncentratu masła, z dokładnością do 1 mg (lub ekstrahowanego tłuszczu masła (ppkt 5.1.2)), (Mg). Przenieść ilościowo do kolby pomiarowej o pojemności 20 ml (Vml), wykorzystując benzynę lakową (ppkt 4.2), uzupełnić do znaku i dokładnie wymieszać.

Przenieść podwielokrotność do 1 cm naczynka i zmierzyć absorbancję przy 440 nm w stosunku do ślepej próby benzyny lakowej. Uzyskać stężenie estru apokarotenowego w roztworze poprzez odniesienie do wykresu kalibracji (C µ/ml).

5.3. Wykres kalibracji

Za pomocą pipety wkropić 0, 0,25, 0,5, 0,75 i 1,0 ml wzorcowego roztworu estru apokarotenowego (ppkt 4.1.2) do pięciu kolb pomiarowych o pojemności 100 ml. Rozcieńczyć benzyną lakową (ppkt 4.2) do pełnej objętości i wymieszać.

Zakresy przybliżonych stężeń roztworów wynoszą 0–2 µg/ml i są dokładnie obliczone przez odniesienie do stężenia roztworu wzorcowego (ppkt 4.1.2) (W.P)/10 mg/ml. Zmierzyć absorbancję przy 440 nm w stosunku do ślepej próby benzyny lakowej (ppkt 4.2).

Wykreślić wartości absorbancji na oś y, a stężenia apokarotenowego estru na oś x.

6. Obliczanie wyników

6.1. Zawartość estru apokarotenowego, wyrażona w mg/kg produktu, jest podawana jako:

$$(C.V)/M$$

$$0,82 (C.V)M$$

gdzie:

C = zawartość estru apokarotenowego, µg/ml, odczytać z wykresu kalibracji (ppkt 5.3)

V = objętość (ml) roztworu badanego (ppkt 5.2)

M = masa (g) porcji badanej (ppkt 5.2)

0,82 = współczynnik korygujący zawartość tłuszczu masła w maśle.

7. Dokładność metody

7.1. Powtarzalność

7.1.1. Analiza masła

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych w możliwie najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot wykorzystujący tę samą aparaturę na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 1,4 mg/kg.

7.1.2. Analiza koncentratu masła

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych w możliwie najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot wykorzystujący tę samą aparaturę na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 1,6 mg/kg.

7.2. Powtarzalność

7.2.1. Analiza masła

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych przez podmioty w różnych laboratoriach, wykorzystujące różną aparaturę, na identycznym materiale badanym, nie może przekraczać 4,7 mg/kg.

7.2.2. Analiza koncentratu masła

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych przez podmioty w różnych laboratoriach, wykorzystujące różną aparaturę na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 5,3 mg/kg.

7.3. Źródło danych na temat precyzji

Dane na temat precyzji zostały określone na podstawie doświadczenia przeprowadzonego w 1995 r., które obejmowało 11 laboratoriów i 12 znaczonych próbek (sześć ślepych duplikatów) dla masła oraz 12 takich znaczonych próbek (sześć ślepych duplikatów) dla koncentratu masła.

8. Granice tolerancji

8.1. Trzy próbki muszą zostać pobrane z produktu znaczonego, w celu sprawdzenia prawidłowości znaczenia produktu.

8.2. Masło

8.2.1. Proporcja wprowadzana w przypadku masła, przy uwzględnieniu absorpcji drugoplanowej, wynosi 22 mg/kg.

8.2.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności inkorporacji znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z niższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

- 18,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji),
- 13,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją między 18,0 mg/kg i 13,0 mg/kg.

8.3. Koncentrat masła

8.3.1. Wielkość inkorporacji w przypadku koncentratu masła, przy uwzględnieniu absorpcji drugoplanowej, wynosi 24 mg/kg.

8.3.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności inkorporacji znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z niższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

- 20,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji),
- 14,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją między 20,0 mg/kg i 14,0 mg/kg.

ZAŁĄCZNIK XIV

(art. 9)

OZNACZANIE SITOSTEROLU LUB STIGMASTEROLU W MASŁE LUB W KONCENTRACIE MASŁA METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ NA KOLUMNACH KAPILARNYCH.**1. ZAKRES I DZIEDZINA STOSOWANIA**

Metoda określa procedurę ilościowego oznaczania sitosterolu lub stigmasterolu w masle i w koncentracie masła. Przyjmuje się, że sitosterol stanowi sumę beta-sitosterolu i 22-dihydro-beta-sitosterolu, przy czym zakłada się, że pozostałe sitosterole są śladowe.

2. ZASADA

Masło lub koncentrat masła ulega zmydlaniu za pomocą wodorotlenku potasu w roztworze etanolu, a części nieulegające zmydleniu ekstrahuje się eterem dietylowym.

Sterole są przekształcane w etery trimetylosylilu i poddawane analizie metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych w odniesieniu do wewnętrznego wzorca/betulina.

3. APARATURA

- 3.1. Kolba do zmydlania o pojemności 150 ml połączona z chłodnicą zwrotną (połączenia szlifowe).
- 3.2. Rozdzielacze 500 ml.
- 3.3. Kolby 250 ml.
- 3.4. Lejki wyrównujące ciśnienie, 250 ml lub podobne, do zbierania odpadów eteru dietylu.
- 3.5. Kolumna szklana, 350 × 20 mm, wyposażona w zatyczkę ze szkła spiekanego.
- 3.6. Łącznia wodna lub płaszcz izolujący.
- 3.7. Fiolki reakcyjne 2 ml.
- 3.8. Chromatograf gazowy dostosowany do wykorzystania z kolumną kapilarną i wyposażony w system rozdzielający składający się z:
 - 3.8.1. komory termostatycznej dla kolumn, w której można utrzymać żadaną temperaturę z dokładnością do ± 1 °C;
 - 3.8.2. wyparki z regulowaną temperaturą;
 - 3.8.3. detektora jonizacji płomieniowej oraz wzmacniacza-konwertora;
 - 3.8.4. integratora-rejestrowanego odpowiedniego do wykorzystania ze wzmacniaczem-konwerterem (ppkt 3.8.3).
- 3.9. Kolumna kapilarna ze stopionej krzemionki całkowicie pokryta powłoką z BP1 lub równorzędna, o jednolitej grubości 0,25 mm; kolumna musi umożliwiać rozdzielenie trimetylosylilowych pochodnych lanosterolu i sitosterolu. Odpowiednie jest BP1, o długości 12 m, średnicy wewnętrznej 0,2 mm.
- 3.10. Mikrostrzykawka do chromatografii gazowej o pojemności 1 μ l z utwardzoną igłą.

4. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej. Używana woda musi być wodą destylowaną lub wodą o porównywalnym stopniu czystości.

- 4.1. Etanol, o czystości co najmniej 95 %.
- 4.2. Wodorotlenek potasu, roztwór 60 %, rozpuścić 600 g wodorotlenku potasu (co najmniej 85 %) w wodzie i uzupełnić wodą do objętości 1 litra.
- 4.3. Betulina, o czystości co najmniej 99 %.
 - 4.3.1. Roztwory betuliny w eterze dietylowym (ppkt 4.4).
 - 4.3.1.1. Stężenie roztworu betuliny używane do oznaczania sitosterolu powinno wynosić 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. Stężenie roztworu betuliny używane do oznaczania stigmasterolu powinno wynosić 0,4 mg/ml.

- 4.4. Eter dietylowy, o czystości analitycznej (bez nadtlenu lub pozostałości).
- 4.5. Siarczan sodu, bezwodny, w postaci granulatu, wcześniej suszony w temperaturze 102 °C przez dwie godziny.
- 4.6. Odczynnik sylimujący, np. TRI-SIL (produkowany przez Pierce Chemical Co., nr kat. 49001) lub równorzędny. (Ważne: TRI-SIL jest łatwopalny, toksyczny, korozyjny i prawdopodobnie rakotwórczy. Pracownicy laboratorium muszą być zaznajomieni z parametrami bezpieczeństwa TRI-SIL i stosować właściwe środki ostrożności).
- 4.7. Lanosterol
- 4.8. Sitosterol o znanej czystości nie mniejszej niż 90 % (P).

Uwaga 1: Czystość wzorcowych materiałów wykorzystywanych do kalibracji musi być ustalona metodą normalizacji. Przy założeniu, że wszystkie sterole występujące w próbce zostają wykazane na chromatogramie, całkowita powierzchnia pików stanowi 100 % składników sterolowych i że sterole wywołują taką samą reakcję detektora, liniowość systemu musi być potwierdzona przy zakresach stężeń będących przedmiotem zainteresowania.
- 4.8.1. Wzorcowy roztwór sitosterolu – przygotować roztwór zawierający, z dokładnością do 0,001 mg/ml, w przybliżeniu 0,5 mg/ml (W_1) sitosterolu (ppkt 4.8) w eterze dietylowym (ppkt 4.4).
- 4.9. Stigmasterol o znanej czystości nie mniejszej niż 90 % (P).
- 4.9.1. Wzorcowy roztwór stigmasterolu – przygotować roztwór zawierający z dokładnością do 0,001 mg/ml, w przybliżeniu 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterolu (ppkt 4.9) w eterze dietylowym (ppkt 4.4).
- 4.10. Mieszanina do badania rozdzielczości. Przygotować roztwór zawierający 0,05 mg/ml lanosterolu (ppkt 4.7) i 0,5 mg/ml sitosterolu (ppkt 4.8) w eterze dietylowym (ppkt 4.4).

5. PROCEDURA

- 5.1. Przygotowanie wzorcowych roztworów do celów chromatografii. Wewnętrzny roztwór wzorcowy (ppkt 4.3.1) musi być dodany do odpowiedniego wzorcowego roztworu sterolu jednocześnie z dodaniem go do zmydlonej próbki (patrz ppkt 5.2.2).
 - 5.1.1. Chromatograficzny wzorcowy roztwór sitosterolu: przenieść 1 ml wzorcowego roztworu sitosterolu (ppkt 4.8.1) do każdej z dwóch fiolek reakcyjnych (ppkt 3.7) i usunąć eter dietylowy strumieniem azotu. Dodać 1 ml wewnętrznego roztworu wzorcowego (ppkt 4.3.1.1) i usunąć eter dietylowy za pomocą strumienia azotu.
 - 5.1.2. Chromatograficzny wzorcowy roztwór stigmasterolu: przenieść 1 ml wzorcowego roztworu stigmasterolu (ppkt 4.9.1) do każdej z dwóch fiolek reakcyjnych (ppkt 3.7) i usunąć eter dietylowy strumieniem azotu. Dodać 1 ml wewnętrznego roztworu wzorcowego (ppkt 4.3.1.2) i usunąć eter dietylowy za pomocą strumienia azotu.
- 5.2. *Przygotowanie substancji niezmydlających się*
 - 5.2.1. Roztopić próbkę masła w temperaturze nieprzekraczającej 35 °C, rozrobić, starannie mieszając.

Odmierzyć wagowo, z dokładnością do 1 mg, w przybliżeniu 1 g masła (W_1) lub koncentratu masła (W_2) do kolby 150 ml (ppkt 3.1). Dodać 50 ml etanolu (ppkt 4.1) i 10 ml roztworu wodorotlenku potasu (ppkt 4.2). Zainstalować chłodnicę zwrotną i podgrzewać przez około 30 minut w temperaturze 75 °C. Odłączyć chłodnicę i schłodzić kolbę do temperatury zbliżonej do temperatury otoczenia.
 - 5.2.2. Dodać do kolby 1 ml wewnętrznego roztworu wzorcowego (ppkt 4.3.1.1) w przypadku określania sitosterolu lub (ppkt 4.3.1.2) w przypadku określania stigmasterolu. Starannie wymieszać. Przenieść ilościowo zawartość kolby do rozdzielacza 500 ml (ppkt 3.2), przemywając kolbę kolejno 50 ml wody i 250 ml eteru dietylowego (ppkt 4.4). Wstrząsać energicznie rozdzielaczem przez dwie minuty i pozostawić do rozdzielenia się faz. Usunąć niższą warstwę wodną i przemyć warstwę eteru, wstrząsając z czterema kolejnymi podwielokrotnościami 100 ml wody.

Uwaga 2: Aby uniknąć powstania emulsji, istotne jest, aby pierwsze dwa mycia wodą przeprowadzać ostrożnie (10 odwróceń). Trzecie mycie można prowadzić, wstrząsając energicznie przez 30 sekund. W przypadku powstania emulsji można ją rozbić, dodając w tym celu 5–10 ml etanolu. W przypadku dodania etanolu konieczne jest przeprowadzenie dwóch dodatkowych energicznych przemywań wodą.
 - 5.2.3. Przepuścić klarowną oddzieloną od mydła warstwę eteru przez szklaną kolumnę (ppkt 3.5) zawierającą 30 g bezwodnego siarczanu sodu (ppkt 4.5). Zebrać eter do kolby 250 ml (ppkt 3.3). Dodać jedną granulkę zapobiegającą wrzeniu burzliwemu i odparować prawie do sucha w łaźni wodnej lub w płaszczu izolującym, zwracając uwagę na zebranie odpadów rozpuszczalników.

Uwaga 3: Jeżeli ekstrakty próbki zostaną całkowicie wysuszone w zbyt wysokiej temperaturze, mogą wystąpić straty sterolu.

5.3. *Przygotowanie eterów trimetylo-sylilowych*

5.3.1. Przenieść pozostały w kolbie roztwór eteru do fiolki reakcyjnej 2 ml (ppkt 3.7) z 2 ml eteru dietylowego i usunąć eter za pomocą strumienia azotu. Przebrać kolbę dwoma dodatkowymi podwielokrotnościami 2 ml eteru dietylowego, przenosząc je do próbówki i usuwając za każdym razem eter za pomocą azotu.

5.3.2. Poddać próbkę sylilowaniu, dodając 1 ml TRI-SIL-u (ppkt 4.6). Zamknąć fiolkę i potrząsać energicznie w celu rozpuszczenia. Jeżeli całkowite rozpuszczenie nie nastąpi, podgrzać do temperatury 65–70 °C. Pozostawić na co najmniej pięć minut, przed wprowadzeniem do chromatografu gazowego. Poddać wzorce sylilowaniu w taki sam sposób jak próbki. Poddać sylilowaniu mieszaninę do badania rozdzielczości (ppkt 4.10) w taki sam sposób jak próbki.

Uwaga 4: Proces sylilowania musi być prowadzony w środowisku bezwodnym. Niepełne sylilowanie betuliny uwidacznia się przez pojawienie się drugiego pików usytuowanego w pobliżu pików odpowiadającego betulinie.

Obecność etanolu na etapie sylilowania będzie kolidować z procesem sylilowania. Może to być wynikiem niedostatecznego mycia na etapie ekstrakcji. Jeżeli problem utrzymuje się, na etapie ekstrakcji można wprowadzić piątę energiczne 30-sekundowe mycie.

5.4. *Analiza metodą chromatografii gazowej.*

5.4.1. Dobór warunków roboczych.

Ustawić chromatograf gazowy zgodnie z instrukcjami producenta.

Wskazówki dla warunków roboczych są następujące:

- temperatura kolumny: 265 °C
- temperatura iniektora: 265 °C
- temperatura detektora: 300 °C
- prędkość przepływu gazu nośnego: 0,6 ml/min
- ciśnienie wodoru: 84 kPa
- ciśnienie powietrza: 155 kPa
- rozdział próbki od 10:1 do 50:1, stosunek rozdziału musi być dobrany optymalnie zgodnie z instrukcją producenta i liniowością odpowiedzi detektora, a następnie potwierdzony przy zakresie stężenia będącym przedmiotem zainteresowania.

Uwaga 5: Szczególnie ważne jest regularne czyszczenie wkładki iniekcyjnej.

- ilość substancji wprowadzonej: 1 µl roztworu TMSE.

Poczekaj na osiągnięcie przez system stanu równowagi i uzyskanie jego dostatecznie stabilnej reakcji, przed rozpoczęciem jakiegokolwiek analizy.

Powyższe warunki muszą być zróżnicowane w zależności od parametrów technicznych kolumny i chromatografu gazowego, tak aby otrzymać chromatogramy spełniające poniższe wymagania:

- pik sitosterolu musi odpowiednio oddzielać się od lanosterolu. Rysunek 1 przedstawia typowy chromatogram, jaki powinna dawać sylilowana mieszanina do testu rozdzielczości (ppkt 4.10),
- czasy retencji względnej poniższych steroli powinny wynosić w przybliżeniu:
 - cholesterol: 1,0
 - stigmasterol: 1,3
 - sitosterol: 1,5
 - betulina: 2,5
- czas retencji betuliny powinien wynosić w przybliżeniu 24 minuty.

5.4.2. Procedura analityczna

Wprowadzić 1 µl sylilowanego roztworu wzorcowego (stigmasterolu lub sitosterolu) i dostosować parametry kalibracyjne integratora.

Wprowadzić następny 1 µl sylilowanego wzorcowego roztworu w celu oznaczenia współczynników odpowiedzi w odniesieniu do betuliny.

Wprowadzić 1 µl sylilowanej próbki wzorcowego roztworu i zmierzyć powierzchnie pików. Każda seria chromatograficzna musi być oddzielona przez iniekcję wzorców.

Wskazówka: sześć iniekcji próbki musi być zawartych w każdej oddzielonej serii.

Uwaga 6: Całkowanie pików stigmasterolu powinno obejmować każde ogonowanie zgodnie z pkt 1, 2 i 3 na rysunku 2b.

Całkowanie pików sitosterolu powinno obejmować powierzchnię pików 22 dihydro-beta-sitosterolu (stigmastanol), który ulega elucji bezpośrednio po sitosterolu (patrz rysunek 3b), przy ocenie sitosterolu całkowitego.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

- 6.1. Oznaczyć obszar pików sterolu i betuliny w obydwóch wzorcach oddzielających każdą partię i obliczyć R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{średnia powierzchnia pików dla sterolu we wzorcu}}{\text{średnia powierzchnia pików dla betuliny we wzorcu}}$$

Oznaczyć powierzchnię pików sterolu (stigmasterolu i sitosterolu) i pików betuliny w próbce i wyliczyć R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{powierzchnia pików sterolu w próbce}}{\text{powierzchnia pików betuliny w próbce}}$$

W_1 = zawartość sterolu we wzorcu (mg) znajdującego się w 1 ml roztworu wzorcowego (ppkt 4.8.1 lub 4.9.1)

W_2 = masa próbki (g) (ppkt 5.2.1)

P = czystość sterolu wzorcowego (ppkt 4.8 lub 4.9)

$$\text{Zawartość sterolu w próbce (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

7. DOKŁADNOŚĆ METODY

7.1 Masło

7.1.1. Powtarzalność

7.1.1.1. Stigmasterol

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych w jak najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot wykorzystujący tę samą aparaturę na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterol

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych w jak najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot wykorzystujący tę samą aparaturę na identycznym materiale badanym, nie może przekraczać 23,0 mg/kg.

7.1.2. Odtwarzalność

7.1.2.1. Stigmasterol

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych przez podmioty w różnych laboratoriach wykorzystujące różne aparatury na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterol

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych przez podmioty w różnych laboratoriach wykorzystujące różne aparatury na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 8,7 % odpowiednio do wartości średniej oznaczeń.

7.1.3. Źródło danych dotyczących precyzji

Dokładne dane zostały określone w oparciu o doświadczenie przeprowadzone w 1992 r., które obejmowało dziewięć laboratoriów i sześć próbek (trzy ślepe duplikaty) dla stigmasterolu oraz sześć próbek (trzy ślepe duplikaty) dla sitosterolu.

7.2. *Koncentrat masła*

7.2.1. *Powtarzalność*

7.2.1.1. *Stigmasterol*

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych w możliwie najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot wykorzystujący tę samą aparaturę na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. *Sitosterol*

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych w możliwie najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot wykorzystujący tę samą aparaturę na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 3,6 %, odpowiednio do wartości średniej oznaczeń.

7.2.2. *Odtwarzalność*

7.2.2.1. *Stigmasterol*

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych przez podmioty w różnych laboratoriach wykorzystujące różne aparaty na identycznym materiale badanym, nie może przekraczać 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. *Sitosterol*

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych przez podmioty w różnych laboratoriach wykorzystujące różne aparaty na identycznym materiale badanym, nie może przekraczać 8,9 % odpowiednio do wartości średniej oznaczeń.

7.2.3. *Źródło danych dotyczących precyzji*

Dane dotyczące precyzji zostały określone w oparciu o doświadczenie przeprowadzone w 1991 r., które obejmowało dziewięć laboratoriów i sześć próbek (trzy ślepe duplikaty) dla stigmasterolu oraz sześć próbek (trzy ślepe duplikaty) dla sitosterolu.

8. **GRANICE TOLERANCJI**

8.1. Trzy próbki muszą zostać pobrane z produktu znaczonego, w celu sprawdzenia prawidłowości znaczenia produktu.

8.2. *Masło*

8.2.1. *Stigmasterol*

8.2.1.1. Wielkość inkorporacji dla stigmasterolu wynosi 150 g stigmasterolu o czystości co najmniej 95 %, na tonę masła, tzn. 142,5 mg/kg, lub 170 g stigmasterolu o czystości co najmniej 85 % na tonę masła, tzn. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności inkorporacji znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z poniższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

- 116,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 95 %,
- 118,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 85 %,
- 81,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 95 %),
- 82,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 85 %).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją odpowiednio między 116,0 mg/kg i 81,0 mg/kg lub 118,0 mg/kg i 82,0 mg/kg.

8.2.2. *Sitosterol*

8.2.2.1. Wielkość inkorporacji dla sitosterolu wynosi 600 g sitosterolu o czystości co najmniej 90 %, na tonę masła, tzn. 540 mg/kg.

8.2.2.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności inkorporacji znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z poniższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

- 486,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku sitosterolu o czystości 90 %),
- 358 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku sitosterolu o czystości 90 %).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją między 486,0 mg/kg i 358,0 mg/kg.

8.3. Koncentrat masła

8.3.1. Stigmasterol

8.3.1.1. Wielkość inkorporacji dla stigmasterolu wynosi 150 g stigmasterolu o czystości co najmniej 95 %, na tonę koncentratu masła, tzn. 142,5 mg/kg, lub 170 g stigmasterolu o czystości co najmniej 85 %, na tonę masła, tzn. 144,5 mg/kg.

8.3.1.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności inkorporacji znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z poniższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

- 120,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 95 %),
- 122,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 85 %),
- 84,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 95 %),
- 86,0 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku stigmasterolu o czystości 85 %).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją odpowiednio między 120,0 mg/kg i 84,0 mg/kg lub 122,0 mg/kg i 86,0 mg/kg.

8.3.2. Sitosterol

8.3.2.1. Wielkość inkorporacji dla sitosterolu wynosi 600 g sitosterolu o czystości co najmniej 90 %, na tonę koncentratu masła, tzn. 540 mg/kg.

8.3.2.2. Wyniki dla trzech próbek, otrzymane w trakcie analizy produktu, są wykorzystywane do sprawdzenia proporcji i równomierności inkorporacji znacznika, a najniższy z wyników jest porównywany z poniższymi wartościami granicznymi (biorąc pod uwagę różnicę krytyczną dla poziomu prawdopodobieństwa 95 % (DCr_{95})):

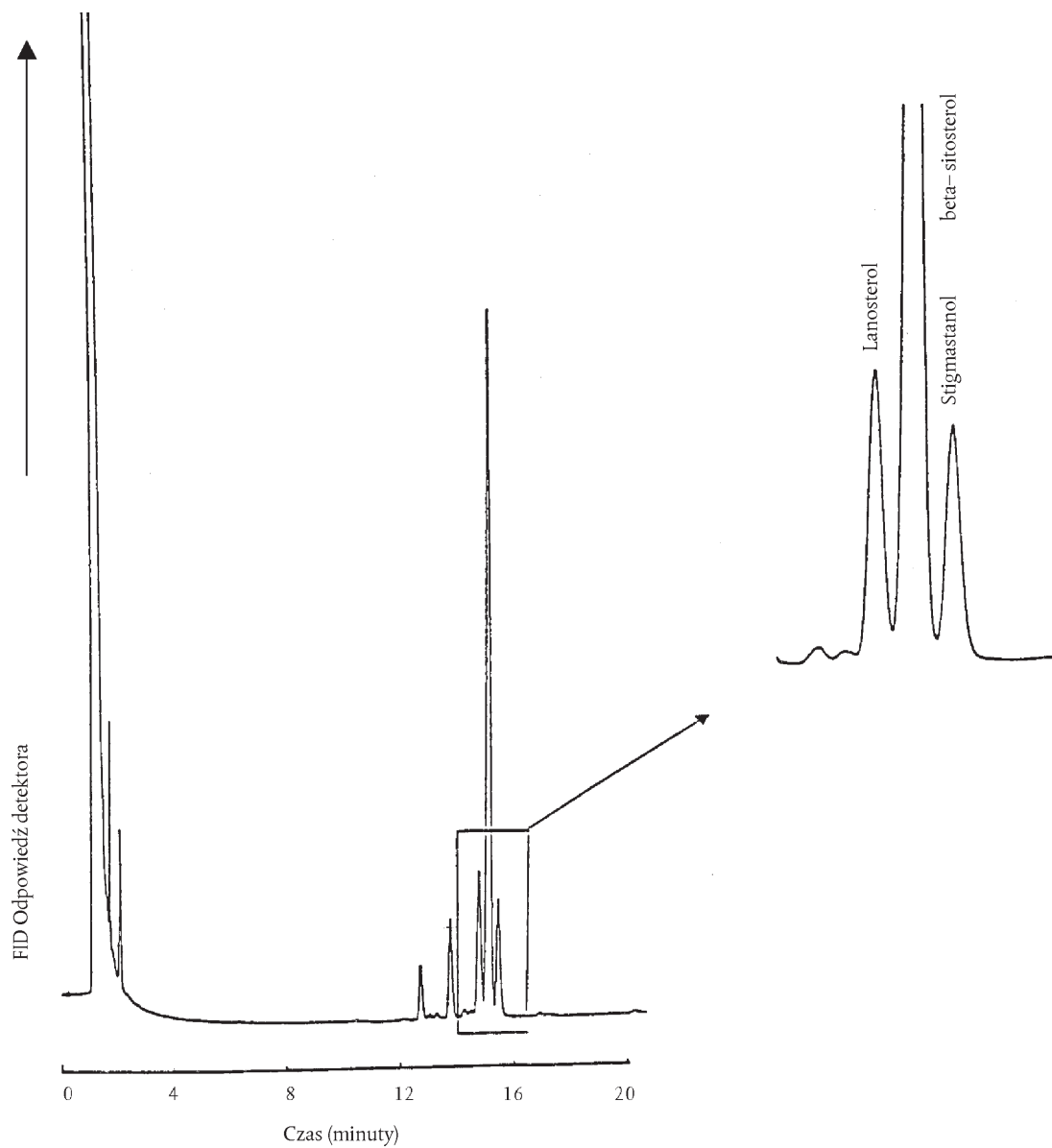
- 486,0 mg/kg (95 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku sitosterolu o czystości 90 %),
- 358 mg/kg (70 % minimalnej wielkości inkorporacji w przypadku sitosterolu o czystości 90 %).

Stężenie znacznika w próbce, która daje najniższy wynik, jest wykorzystywane w powiązaniu z interpolacją między 486,0 mg/kg i 358,0 mg/kg.

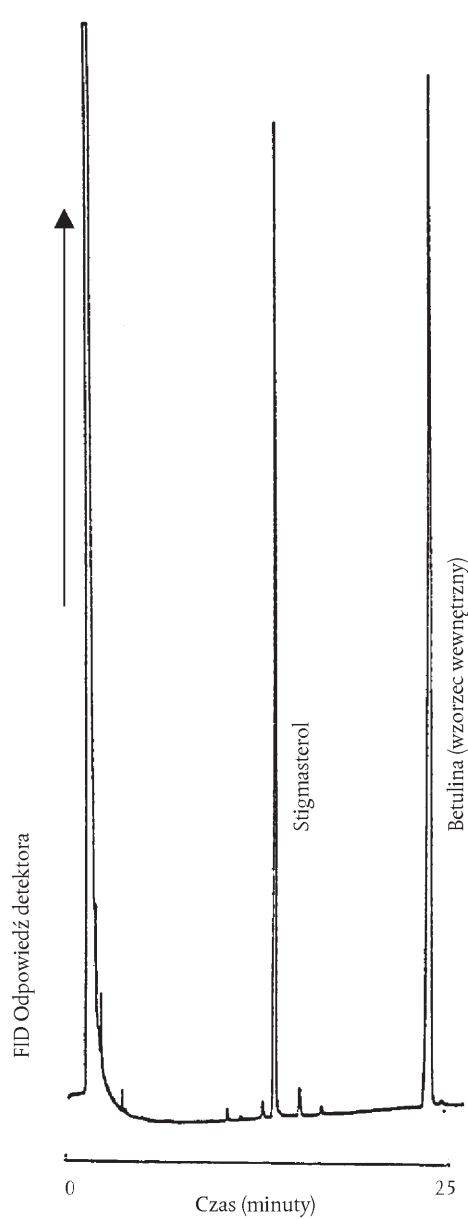
Rysunek 1

Chromatogram rozdzielczości mieszaniny badanej.

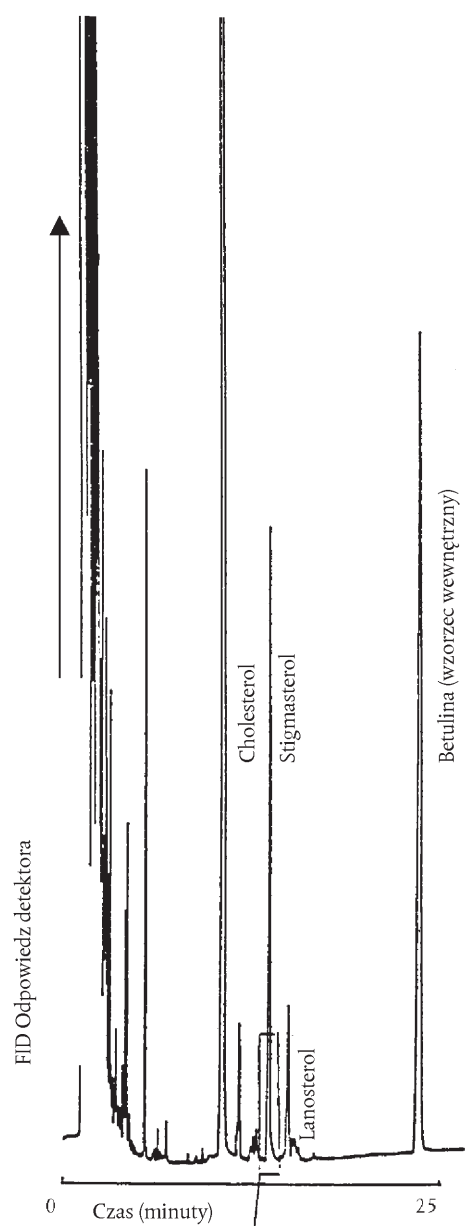
Całkowita rozdzielczość jest pożądana, tj. pik znacznika dla lanosterolu powinien wrócić do linii podstawowej przed wzniesieniem się do pików sitosterolu, jakkolwiek rozdzielczość niepełna jest dopuszczalna.



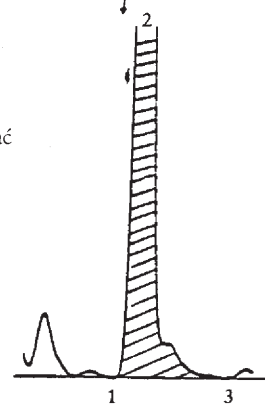
Rysunek 2a
Wzorzec stigmasterolu



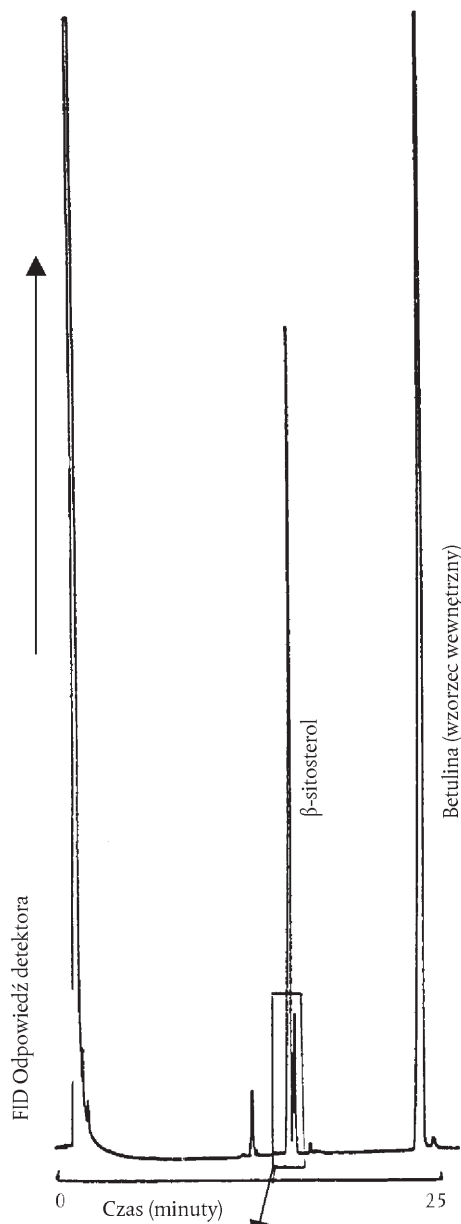
Rysunek 2b
Próbka masła zdenaturowana stigmasterolem



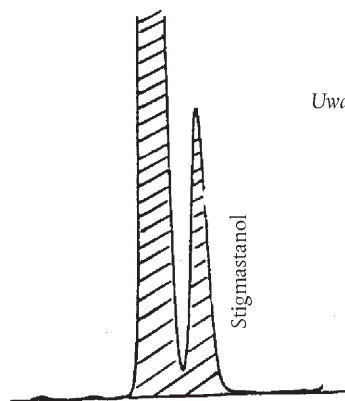
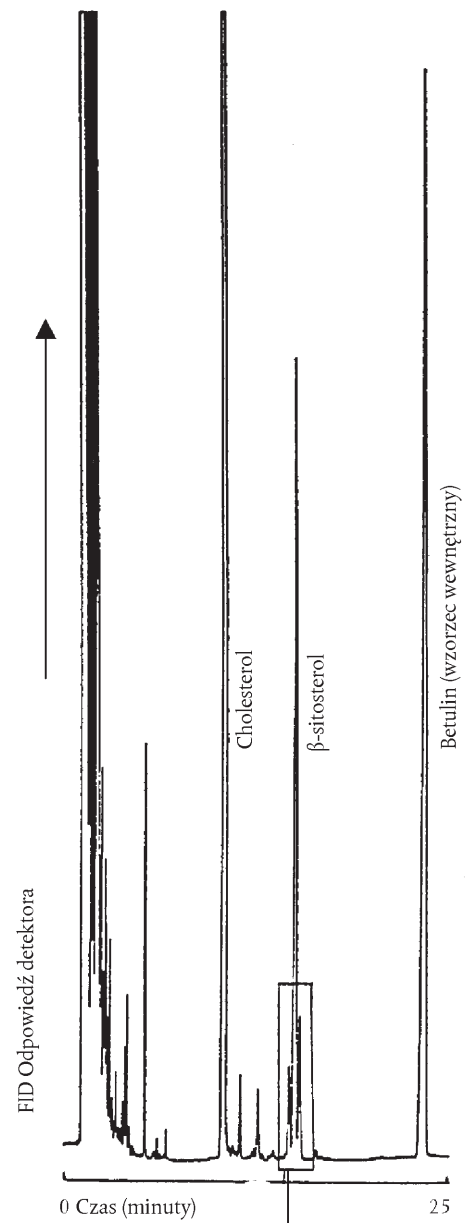
Uwaga: Całkowanie piku stigmasterolu powinno obejmować każde ogonowanie zgodnie z pkt 1, 2 i 3.



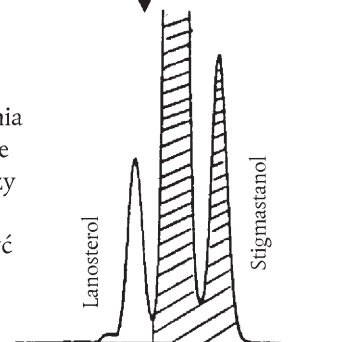
Rysunek 3a
Sitosterol wzorcowy



Rysunek 3b
Próbka masła zdenaturowana beta-sitosterolem



Uwaga: β -sitosterol często zawiera zanieczyszczenia (zidentyfikowane jako stigmastanol), które podlegają elucji zaraz po β -sitosterolu. Przy ocenie całkowitej obecności β -sitosterolu powierzchwnie obydwa pików powinny być zsumowane



ZAŁĄCZNIK XV

(art. 10)

REFERENCYJNA METODA WYKRYWANIA OBECNOŚCI MLEKA KROWIEGO I KAZEINIANÓW W SERACH WYPRODUKOWANYCH Z MLEKA OWCZEGO, MLEKA KOZIEGO, MLEKA BAWOLEGO LUB MIESZANIN MLEKA OWCZEGO, KOZIEGO I BAWOLEGO**1. Zakres**

Wykrywanie obecności mleka krowiego i kazeinianów w serach wyprodukowanych z mleka owczego, mleka koziego, mleka bawolego lub mieszanin mleka owczego, koziego i bawolego przez wyznaczenie punktu izoelektrycznego gamma-kazein po plazminolizie.

2. Dziedzina stosowania

Metoda ta jest odpowiednia dla czułego i szczególnego wykrywania obecności naturalnego oraz poddanego obróbce cieplnej mleka krowiego i kazeinianu w świeżych i dojrzałych serach wyprodukowanych z mleka owczego, mleka koziego, mleka bawolego lub też mieszanin mleka owczego, koziego i bawolego. Metoda ta nie jest odpowiednia do wykrywania mleka i fałszowania sera przez poddanie obróbce cieplnej koncentratów białkowych serwatki pochodzącej od krów.

3. Zasada metody

- 3.1. Oddzielenie kazein z sera i standardowych wzorców.
- 3.2. Rozpuszczenie oddzielonych z sera kazein i poddanie rozszczepieniu plazminy (WE.3.4.21.7).
- 3.3. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazein skażonych plazminą w obecności mocznika oraz barwienie białka.
- 3.4. Ocena zabarwionych modeli γ_3 i γ_2 – kazeiny (dowód występowania mleka krowiego) poprzez porównanie modelu otrzymanego z próbki z modelami otrzymanymi w tym samym żelu ze standardowych wzorców zawierających 0 % i 1 % mleka krowiego.

4. Odczynniki

Jeżeli nie zostało to inaczej wskazane, zastosowane muszą być środki chemiczne klasy analitycznej. Woda musi być dwukrotnie destylowana lub o równorzędnej czystości.

Uwaga: Poniższe dane szczegółowe odnoszą się do przygotowanych w laboratorium arkuszy poliakryloamidowych żeli, zawierających mocznik o wymiarach $265 \times 125 \times 0,25$ mm. W przypadku gdy stosuje się inne rodzaje i rozmiary żelu, warunki rozdzielania najprawdopodobniej muszą być odpowiednio dostosowane.

Wyznaczenie punktu izoelektrycznego

4.1. Odczynniki do produkcji żeli poliakryloamidowych zawierających mocznik.**4.1.1. Roztwór podstawowy żelu**

Rozpuścić:

4,85 g akryloamidu

0,15 g N, N'-metyleno-bis-akryloamidu (BIS)

48,05 g mocznika

15,00 g gliceryny (87 % w/w),

w wodzie oraz uzupełnić do 100 ml i przechowywać w chłodziarce w butelce z brązowego szkła.

Uwaga: Można stosować dostępny w handlu roztwór wstępnie zestawiony akryloamid/BIS zamiast przytoczonych stałych miar akryloamidów neurotoksycznych. W przypadku gdy taki roztwór zawiera 30 % w/v akryloamidu i 0,8 % w/v BIS, to zamiast stałych miar do preparatu użyta musi być objętość 16,2 ml. Okres przechowywania roztworu podstawowego wynosi najwyżej 10 dni; jeżeli jego przewodnictwo jest wyższe niż $5 \mu\text{S}$, dejonizować poprzez mieszanie przez 30 minut z 2 g Amberlitu MB-3, a następnie filtrować przez membranę $0,45 \mu\text{m}$.

- 4.1.2. **Roztwór żelu**
Przygotować roztwór żelu przez wymieszanie dodatków i amfolitów amfoterycznych z podstawowym roztworem żelu (patrz ppkt 4.1.1).
9,0 ml roztworu podstawowego
24,0 mg beta-alaniny
500 µl amfolitów pH 3,5–9,5 ⁽¹⁾
250 µl amfolitów pH 5–7 ⁽¹⁾
250 µl amfolitów pH 6–8. ⁽¹⁾
Wymieszać roztwór żelu i odgazowywać przez od dwóch do trzech minut za pomocą ultradźwięków lub w próżni.
Uwaga: Przygotować roztwór żelu bezpośrednio przed wlaniem (patrz ppkt 6.2).
- 4.1.3. **Roztwory katalityczne**
- 4.1.3.1. N, N, N', N' – tetrametyloetylenodiamina (Temed).
- 4.1.3.2. 40 % w/v nadsiarczanu amonu (PER).
Rozpuścić 800 mg PER w wodzie i uzupełnić do 2 ml.
Uwaga: Zawsze stosować świeżo przygotowany roztwór PER.
- 4.2. **Płyn kontaktowy**
Nafta lub parafina ciekła
- 4.3. **Roztwór anodowy**
Rozpuścić 5,77 g kwasu ortofosforowego (85 % w/w) w wodzie i rozcieńczyć do 100 ml.
- 4.4. **Roztwór katodowy**
Rozpuścić 2,00 g wodorotlenku sodu w wodzie i rozcieńczyć z wodą do 100 ml.

Przygotowanie próbki
- 4.5. **Odczynniki do oddzielenia białka**
- 4.5.1. Rozpuścić kwas octowy (25,0 ml kwasu octowego lodowatego uzupełnionego do 100 ml wodą)
- 4.5.2. Dichlorometan
- 4.5.3. Aceton
- 4.6. **Bufor rozpuszczający białka**
Rozpuścić:
5,75 g gliceryny (87 % w/w)
24,03 g mocznika
250 mg ditiotretolu, w wodzie i uzupełnić do 50 ml
Uwaga: Przechowywać w chłodziarce, maksymalny okres przechowywania jeden tydzień.
- 4.7. **Odczynniki dla rozszczepiania kazein plazminą**
- 4.7.1. Bufor węglanu amonu
Miareczkować 0,2 mol/l roztworu wodorowęglanu amonu (1,58 g/100 ml wody) zawierającego 0,05 mol/l kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA, 1,46 g/100 ml) z 0,2 mol/l roztworu węglanu amonu (1,92 g/100 ml wody) zawierającego 0,05 mol/l EDTA do pH 8.
- 4.7.2. Plazmina bydłęca (WE. 3.4.21.7), aktywność co najmniej 5 U/ml.
- 4.7.3. Roztwór kwasu e-aminokapronowego dla inhibitowania enzymów
Rozpuścić 2,624 g e-aminokapronowego (kwas 6-amino-n-heksanowy) w 100 ml 40 % (v/v) etanolu.

⁽¹⁾ Produkt Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) i Resolyte® pH 5–7 i pH 6–8 (BDH, Merck) okazały się szczególnie odpowiednie do uzyskania wymaganego rozdzielania γ -kazein.

- 4.8. *Wzorce*
- 4.8.1. Certyfikowane standardowe wzorce mieszaniny odtłuszczonego mleka owczego i koziego, z dodatkiem podpuszczki, zawierającego 0 % i 1 % mleka krowiego dostępne są w Instytucie Materiałów Referencyjnych i Pomiarów przy Komisji B-2440 Geel, Belgia.
- 4.8.2. Przygotowanie laboratoryjnych pośrednich wzorców mleka bawolego, z dodatkiem podpuszczki, zawierającego 0 % i 1 % mleka krowiego.

Mleko odtłuszczone jest przygotowywane przez odwirowywanie surowego mleka bawolego lub krowiego w temperaturze 37 °C przy 2500 g przez 20 minut. Po szybkim schłodzeniu rurki i zawartości do 6–8 °C górna warstwa tłuszczu jest usuwana w całości. W celu przygotowania 1 % wzorca dodać 5,00 ml odtłuszczonego mleka krowiego do 495 ml odtłuszczonego mleka bawolego w jednolitrowej zlewce, dostosować pH do 6,4 poprzez dodanie rozcieńczonego kwasu mlekowego (10 % w/v). Dostosować temperaturę do 35 °C i dodać 100 µl podpuszczki cielęcej (aktywność podpuszczki 1: 10 000, c. 3000 U/ml), mieszać przez 1 minutę, po czym pozostawić zlewkę przykrytą folią aluminiową w temperaturze 35 °C przez jedną godzinę, w celu uformowania twarogu. Po uformowaniu twarogu całe mleko z podpuszczką jest wymrażane bez uprzedniej homogenizacji lub odprowadzania serwatki. Po wymrażaniu mleko jest rozdrabniane do uzyskania jednorodnego proszku. W celu przygotowania 0 % wzorca przeprowadzić taką samą procedurę przy użyciu prawdziwego odtłuszczonego mleka bawolego. Wzorce muszą być przechowywane w temperaturze -20 °C.

Uwaga: Przed przygotowaniem wzorca zalecane jest zbadanie mleka bawolego pod względem jego czystości poprzez wyznaczenie punktu izoelektrycznego kazein skażonych plazminą.

Odczynniki do barwienia białka

- 4.9. *Utrwalacz*
- Rozpuścić 150 g kwasu trichlorooctowego w wodzie destylowanej i uzupełnić do 1000 ml.
- 4.10. *Roztwór odbarwiający*
- Rozpuścić 500 ml metanolu i 200 ml kwasu octowego lodowatego w wodzie destylowanej.
- Uwaga:* Przygotowywać świeży środek odbarwiający każdego dnia; może być on przygotowany poprzez zmieszanie jednakowych objętości roztworów podstawowych 50 % (v/v) alkoholu metylowego i 20 % (v/v) kwasu octowego lodowatego.
- 4.11. *Roztwory barwiące*
- 4.11.1. *Roztwór barwiący (roztwór podstawowy 1)*
- Rozpuścić 3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) w 1000 ml 90 % (v/v) metanolu, za pomocą mieszadła magnetycznego (w przybliżeniu 45 minut), przefiltrować przez dwa filtry złożone, o średniej prędkości filtrowania.
- 4.11.2. *Roztwór barwiący (roztwór podstawowy 2)*
- Rozpuścić 5,0 g siarczanu miedzi pięciowodnego w 1000 ml 20 % (v/v) kwasu octowego.
- 4.11.3. *Roztwór barwiący (roztwór roboczy)*
- Zmieszać razem 125 ml każdego z roztworów podstawowych (ppkt 4.11.1, 4.11.2) bezpośrednio przed barwieniem.
- Uwaga:* Roztwór barwiący powinien być przygotowany w dniu, w którym ma być użyty.

5. Wyposażenie

- 5.1. Szklane płytki (265 × 125 × 4 mm); gumowe walce (szerokość 15 cm); stół wypoziomowany.
- 5.2. Pojemnik transportowy arkusza żeluz (265 × 125 mm).
- 5.3. Arkusz pokrywający (280 × 125 mm). Przymocować pasek taśmy klejącej (280 × 6 × 0,25 mm) do każdej długiej krawędzi (patrz rysunek 1).
- 5.4. Komora elektroogniskowania z płytą chłodzącą (na przykład 265 × 125 mm) oraz odpowiedni układ zasilania (≥ 2,5 kV) lub urządzenie do automatycznej elektroforezy.
- 5.5. Kriostat cyrkulacyjny, regulowany termostatycznie przy 12 ± 0,5 °C.
- 5.6. Wirówka nastawna do 3000 g.
- 5.7. Paski elektrody (długości ≥ 265 mm).

- 5.8. Plastikowe butelki z wkraplaczem dla roztworu anodowego i katodowego.
- 5.9. Aplikator próbek (10 × 5 mm, bibuła filtracyjna wiskozowa lub o niskiej adsorpcji białka).
- 5.10. Nożyczki, skalpele i szczypce ze stali nierdzewnej.
- 5.11. Naczynia ze stali nierdzewnej lub ze szkła barwionego lub nie lub (na przykład tace do instrumentów, o wymiarach 280 × 150 mm).
- 5.12. Nastawny homogenizator drążkowy (średnica wałka – 10 mm), liczba obrotów na minutę 8000-20 000.
- 5.13. Mieszadło magnetyczne.
- 5.14. Wanna ultradźwiękowa.
- 5.15. Zgrzewarka warstwy.
- 5.16. Mikropipety 25 µl.
- 5.17. Wyparka próżniowa lub wymrażarka.
- 5.18. Termostatycznie regulowana wanna wodna nastawna do 35 i 40 ± 1°C z wytrząsarką.
- 5.19. Sprzęt densytometryczny z czynnikiem przy $\lambda = 634$ nm.

6. Procedura

6.1. Przygotowanie próbek

6.1.1. Oddzielenie kazein

Odmierzyć wagowo równowartość 5,0 g suchej masy sera lub standardowych wzorców do rurki wirówkowej, 100 ml dodać 60 destylowanej wody i homogenizować za pomocą homogenizatora drążkowego (8000-10 000 obrotów na minutę). Dostosować do pH 4,6 za pomocą rozcieńzonego kwasu octowego (ppkt 4.5.1), odwirować (5 minut, 3000 g). Zlać tłuszcz i serwatkę, homogenizować pozostałość przy 20 000 obrotach na minutę w 40 ml destylowanej wody dostosowanej do pH 4,5 za pomocą rozcieńzonego kwasu octowego (ppkt 4.5.1), dodać 20 ml dichlorometanu (ppkt 4.5.2), znowu homogenizować i odwirowywać (5 minut, 3000 g). Usunąć warstwę kazeiny znajdującą się między fazami wodną i organiczną (patrz rysunek 2) za pomocą łopatk i zlać obydwie fazy. Ponownie homogenizować kazeinę w 40 ml destylowanej wody (patrz wyżej) oraz 20 ml dichlorometanu (ppkt 4.5.2) i odwirować. Powtarzać tę procedurę, dopóki obie fazy ekstrakcyjne nie staną się bezbarwne (od dwóch do trzech razy). Homogenizować pozostałości białka przy użyciu 50 ml acetonu (ppkt 4.5.3) i przefiltrować przez złożoną bibułę filtracyjną o średniej prędkości filtrowania. Przemyć pozostałości znajdujące się na filtrze, każdorazowo dwoma oddzielnymi 25-ml porcjami acetonu i pozostawić do wysuszenia na powietrzu lub suszyć strumieniem azotu, na koniec sproszkować w móżdżerku.

Uwaga: Oddzielona sucha kazeina powinna być przechowywana w temperaturze -20 °C.

6.1.2. Rozszczepienie plazminą beta-kazein celem wzmocnienia gamma-kazein

Rozproszyć 25 mg oddzielonej kazeiny (ppkt 6.1.1) w 0,5 ml buforu węgla amonu (ppkt 4.7.1) i homogenizować przez 20 minut przez zastosowanie, na przykład, obróbki ultradźwiękowej. Podgrzać do 40 °C i dodać 10 µl plazminy (ppkt 4.7.2), wymieszać i poddać procesowi inkubacji przez jedną godzinę w temperaturze 40 °C, stale wstrząsając. Aby zahamować enzym, dodać 20 µl roztworu kwasu ε-aminoheksanowego (ppkt 4.7.3), następnie dodać 200 mg mocznika w postaci stałej i 2 mg ditiotreotolu.

Uwaga: Aby otrzymać lepszą symetrię w skupionych pasmach kazeiny, zaleca się wymrażanie roztworu po dodaniu kwasu ε-aminoheksanowego, a następnie rozpuszczenie pozostałości w 0,5 ml buforu rozpuszczającego białka (ppkt 4.6).

6.2. Przygotowanie żeli poliakrylamidowych zawierających mocznik

Używając kilku kropli wody, walcować pojemnik transportowy arkusza żelu (ppkt 5.2) na szklanej płytce (ppkt 5.1), usuwając resztki wody ręcznikiem papierowym lub bibułą. W ten sam sposób walcować arkusz pokrywający (ppkt 5.3) za pomocą przekładki (0,25 mm) na drugiej płytce szklanej. Położyć płytkę poziomo na stole wpoziomowanym.

Dodać 10 µl Temedu (ppkt 4.1.3.1) do przygotowanego i odpowietrzonego roztworu żelu (ppkt 4.1.2), wymieszać i dodać 10 µl roztworu PER (ppkt 4.1.3.2), starannie wymieszać i natychmiast wylać równomiernie na środek arkusza pokrywającego. Umieścić jedną krawędź pojemnika transportowego arkusza żelu (stroną arkusza do dołu) na arkuszu pokrywającym i opuszczać ją powoli, tak aby umożliwić powstanie cienkiej powłoki żelu między arkuszami i rozprowadzenie jej równo i bez pęcherzyków (rysunek 3). Ostrożnie opuścić całkowicie pojemnik transportowy arkusza żelu przy użyciu cienkiej łopatk i umieścić trzy dodatkowe płytki szklane na górze, aby spełniały funkcję ciężarków. Kiedy polimeryzacja jest zakończona (około 60 minut), przemieścić polimeryzowany żel na pojemniku transportowym arkusza żelu razem z arkuszem pokrywającym, poprzez lekkie uderzenie płytek szklanych. Ostrożnie wyczyścić drugą stronę pojemnika transportowego arkusza celem usunięcia pozostałości żelu i mocznika. Zgrzać żel wielowarstwowy w rurze foliowej i przechowywać w chłodziarce (maksymalnie przez sześć tygodni).

Uwaga: Arkusz pokrywający z przekładkami może zostać użyty ponownie. Żel poliakrylamidowy może być pocięty na mniejsze części, co jest zalecane w przypadku, kiedy jest kilka próbek lub kiedy użyte jest urządzenie do automatycznej elektroforezy (dwa żele, rozmiar 4,5 × 5 cm).

6.3. Wyznaczenie punktu izoelektrycznego

Nastawić termostat chłodzący na 12 °C. Wytrzeć drugą stronę pojemnika transportowego arkusza żelū naftą, następnie nakapać kilka kropli nafty (ppkt 4.2) na środek bloku chłodzącego. Następnie walcować żel wielowarstwowy, stroną pojemnika transportowego do dołu, unikając przy tym powstawania pęcherzyków. Wytrzeć nadmiar nafty oraz usunąć arkusz pokrywający. Nasączyć paski elektrod roztworem elektrodowym (ppkt 4.3, 4.4), przyciąć do długości żelū i umieścić w określonym położeniu (odległość między elektrodami 9,5 cm).

Warunki wyznaczenia punktu izoelektrycznego:

6.3.1. Rozmiar żelū 265 × 125 × 0,25 mm

Krok	Czas (minuty)	Napięcie elektryczne (V)	Natężenie elektryczne (mA)	Moc (W)	Woltogodziny (Vh)
1. Ogniskowanie wstępne	30	maksymalne 2 500	maksymalny 15	stała 4	c. 300
2. Ogniskowanie próbki (¹⁾)	60	maksymalne 2 500	maksymalny 15	stała 4	c. 1 000
3. Ogniskowa niekońcowa	60	maksymalne 2 500	maksymalny 5	maksymalna 20	c. 3 000
	40	maksymalne 2 500	maksymalny 6	maksymalna 20	c. 3 000
	30	maksymalne 2 500	maksymalny 7	maksymalna 25	c. 3 000

(¹) Zastosowanie próbki: Po ogniskowaniu wstępnym (krok 1) odmierzyć przy użyciu pipety 18 µl próbki i podstawowych roztworów na aplikatory próbek (10 × 5 mm), rozmieścić je w odległości 1 mm od siebie na żelū i w odległości 5 mm wzdłużnie od anody oraz lekko ucisnąć. Kontynuować ogniskowanie w powyżej wymienionych warunkach, ostrożnie usuwając aplikatory próbek po 60 minutach ogniskowania próbek.

Uwaga: Jeżeli grubość lub szerokość żelū są zmienione, wielkości w odniesieniu do natężenia elektrycznego i mocy muszą być odpowiednio dostosowane (np. podwoić wielkości dla natężenia elektrycznego i mocy, jeżeli stosuje się żel o rozmiarach 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. Przykład programu napięcia elektrycznego dla urządzenia do automatycznej elektroforezy (dwa żele 5,0 × 4,5 cm), elektrody bez pasków stosowane bezpośrednio na żelū.

Krok	Napięcie elektryczne	Natężenie elektryczne	Moc	Temperatura	Woltogodziny
1. Ogniskowanie wstępne	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Ogniskowanie próbki	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Ogniskowanie	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Ogniskowanie	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Umieścić aplikator próbki w ramach kroku 2 przy 0 Vh.

Usunąć aplikator próbki w ramach kroku 2 przy 30 Vh.

6.4. Barwienie białka

6.4.1. Utrwalanie białka

Usunąć paski elektrody niezwłocznie po wyłączeniu mocy i włożyć żel bezpośrednio do naczynia do barwienia/odbarwiania, wypełnionego 200 ml utrwalacza (ppkt 4.9); pozostawić na 15 minut, stale wstrząsając.

6.4.2. Mycie i barwienie płytki żelū.

Starannie odprowadzić utrwalacz i przemyć płytkę żelū dwa razy po 30 sekund w 100 ml roztworu odbarwiającego (ppkt 4.10). Wylać roztwór odbarwiający i napełnić naczynie 250 ml roztworu barwiącego (ppkt 4.11.3); pozostawić do zabarwienia na 45 minut, lekko wstrząsając.

6.4.3. Odbarwianie płytki żelu

Wylać roztwór barwiący, przemyć płytkę żelu dwa razy, używając 100 ml roztworu odbarwiającego (ppkt 4.10) za każdym razem, następnie wstrząsać z 200 ml roztworu odbarwiającego przez 15 minut i powtórzyć czynności odbarwiania co najmniej dwa lub trzy razy do czasu uzyskania klarownego i bezbarwnego tła. Następnie płukać płytkę żelu wodą destylowaną (dwa razy po 2 minuty) i suszyć na powietrzu (2–3 godziny) lub za pomocą suszarki do włosów (10–15 minut).

Uwaga 1: Czynności wiązania, mycia, barwienia i odbarwiania wykonywać w temperaturze 20 °C. Nie stosować podwyższonych temperatur.

Uwaga 2: Jeżeli preferowane jest bardziej czułe barwienie srebrem zabarwienie (na przykład Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, kod nr 17-1150-01), to próbki kazeiny skażonej plazminą muszą być rozcieńczone do 5 mg/ml.

7. Ocena

Ocena jest przeprowadzana przez porównywanie modeli białek nieznannej próbki ze standardowymi wzorcami na tym samym żelu. Wykrywanie mleka krowiego w serach produkowanych z mleka owczego, mleka koziego i mleka bawolego lub mieszanin mleka owczego, koziego i bawolego jest za pomocą γ_2 i γ_3 kazein, których punkty izoelektryczne mają zakres od pH 6,5 do pH 7,5 (wykres 4 a, b, wykres 5). Wartość graniczna wykrywalności jest niższa od 0,5 %.

7.1. Ocena wizualna

Przy ocenie wizualnej ilości mleka krowiego zalecane jest dostosowanie stężeń próbek i wzorców celem uzyskania tego samego poziomu nasilenia owczych, kozich i/lub bawolich γ_2 i γ_3 kazein (patrz „ γ_2 E, G, B” i „ γ_3 E,G,B” na wykresach 4a, b i wykresie 5). Po takim dostosowaniu ilość mleka krowiego (mniejsza, równa lub większa od 1 %) w nieznannej próbce może być oceniona bezpośrednio poprzez porównanie wzmocnienia γ_2 i γ_3 kazein krowich (patrz „ γ_3 C” i „ γ_2 C” na wykresach 4a, b i wykresie 5) z tymi standardowymi wzorcami 0 % i 1 % (owca, koza) lub tymczasowymi wzorcami laboratoryjnymi (bawół).

7.2. Ocena densytometryczna

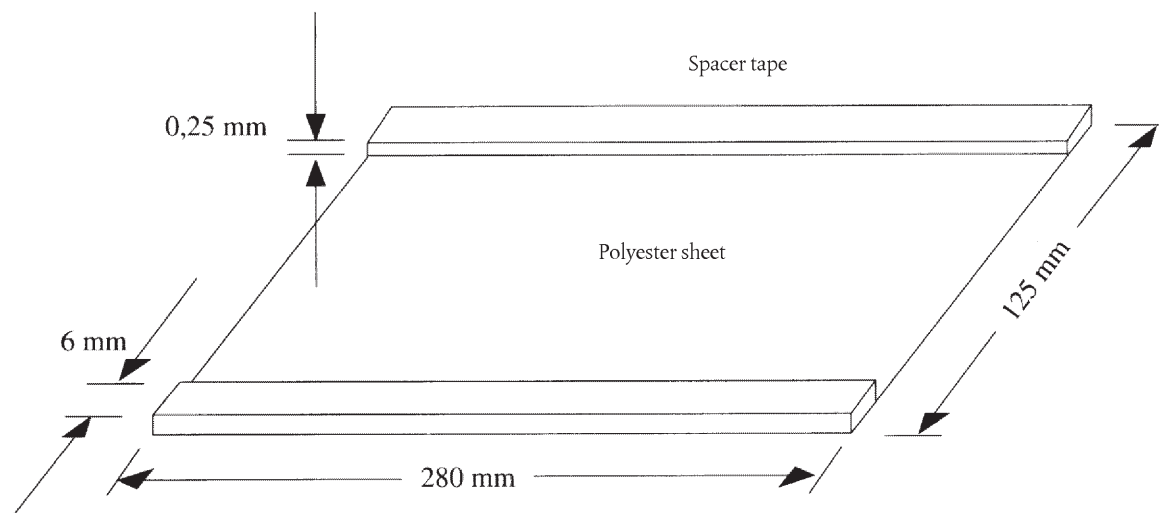
Jeżeli jest dostępna, stosować densytometrię (ppkt 5.19) celem oznaczenia stosunku powierzchni pików γ_2 i γ_3 kazein krów do owiec, kóz lub/i bawołów (patrz wykres 5). Porównać te wartości do stosunku powierzchni pików γ_2 i γ_3 kazeiny – 1 % standardowego wzorca (owca, koza) lub tymczasowego wzorca laboratoryjnego (bawół), poddanych analizie na tym samym żelu.

Uwaga: Metoda sprawdza się należycie w przypadkach, gdy występuje jasny dodatni sygnał w odniesieniu do obydwu krowich γ_2 i γ_3 kazein w 1-procentowym standardowym wzorcu, ale nie w przypadku 0-procentowego standardowego wzorca. Jeżeli nie, optymalizować procedurę przez dokładne postępowanie według wskazówek.

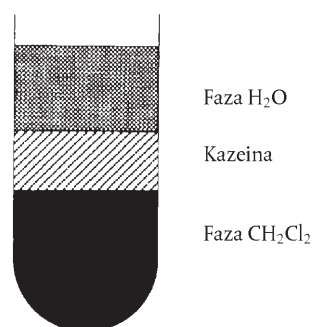
Próbka jest oceniana jako pozytywna, jeżeli obie krowie kazeiny γ_2 i γ_3 – lub odpowiedni stosunek powierzchni pików – są równe lub wyższe od poziomu 1 % standardowego wzorca.

8. Odniesienia

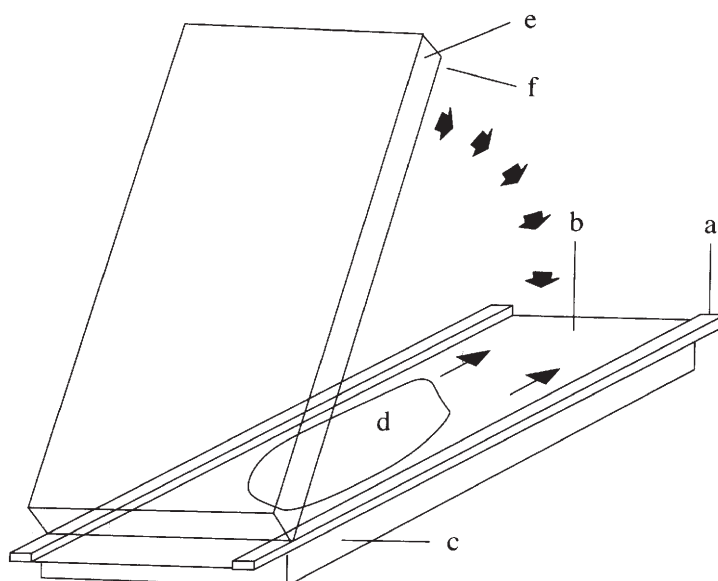
1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).



Rysunek 1: Schemat arkusza pokrywającego

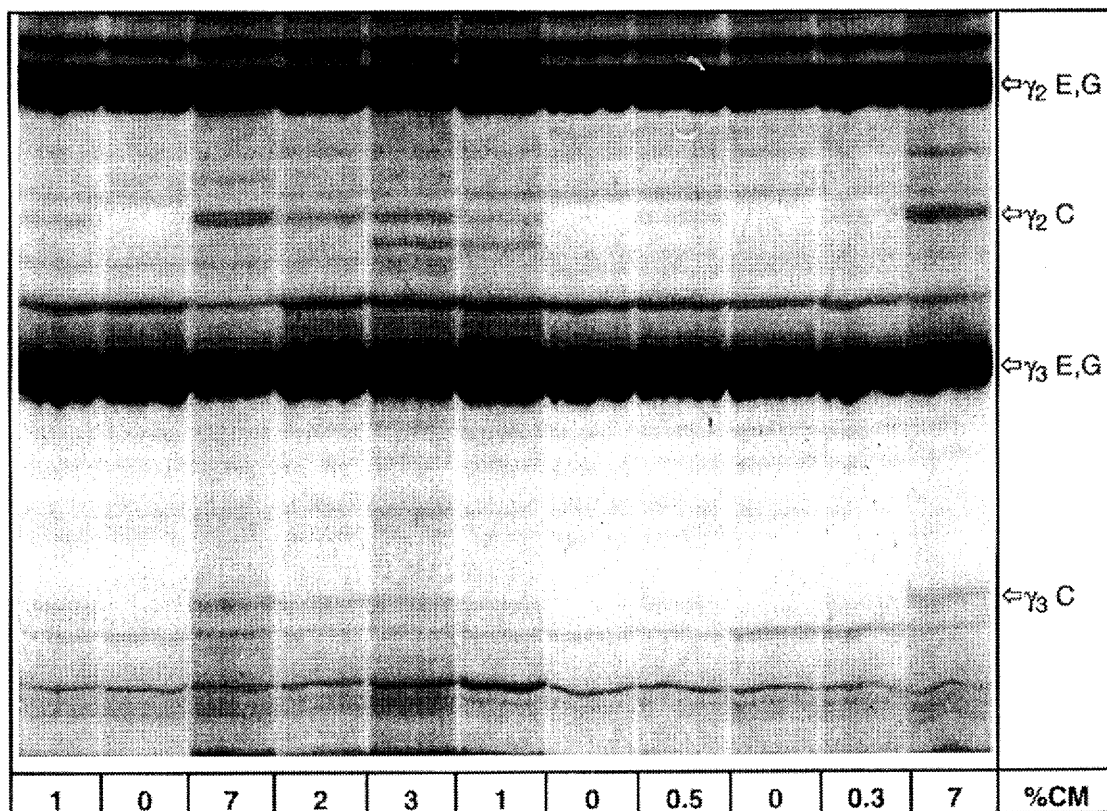


Rysunek 2: Warstwa kazeiny pływająca po odwirowaniu między fazami wodną i organiczną.



Rysunek 3: Technika wykorzystująca łopatanie, której celem jest otrzymanie ultracienkich żeli poliakrylamidowych.

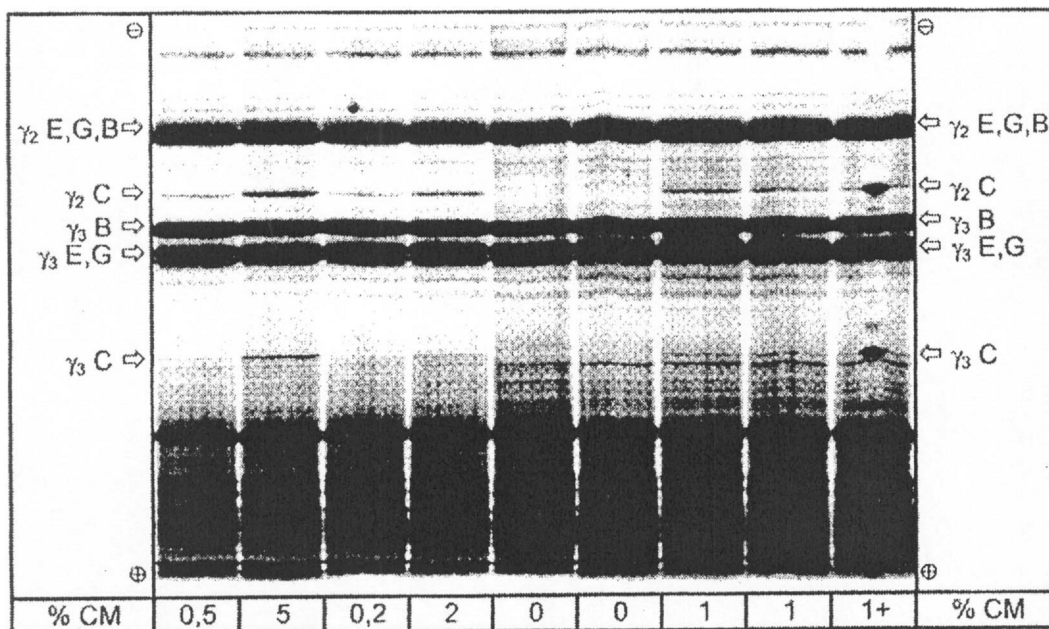
a = taśma przekładkowa (0,25 mm); b = arkusz pokrywający (ppkt 5.3); c, e = płytki szklane (ppkt 5.1); d = roztwór żelu (ppkt 4.1.2); f = pojemnik transportowy arkusza żelu (ppkt 5.2)



Rysunek 4a: Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazein skażonych plazminą z sera produkowanego z mleka owczego i koziego zawierającego różne ilości mleka krowiego.

% CM = wartość procentowa mleka krowiego; C = krowa, E = owca; G = koza.

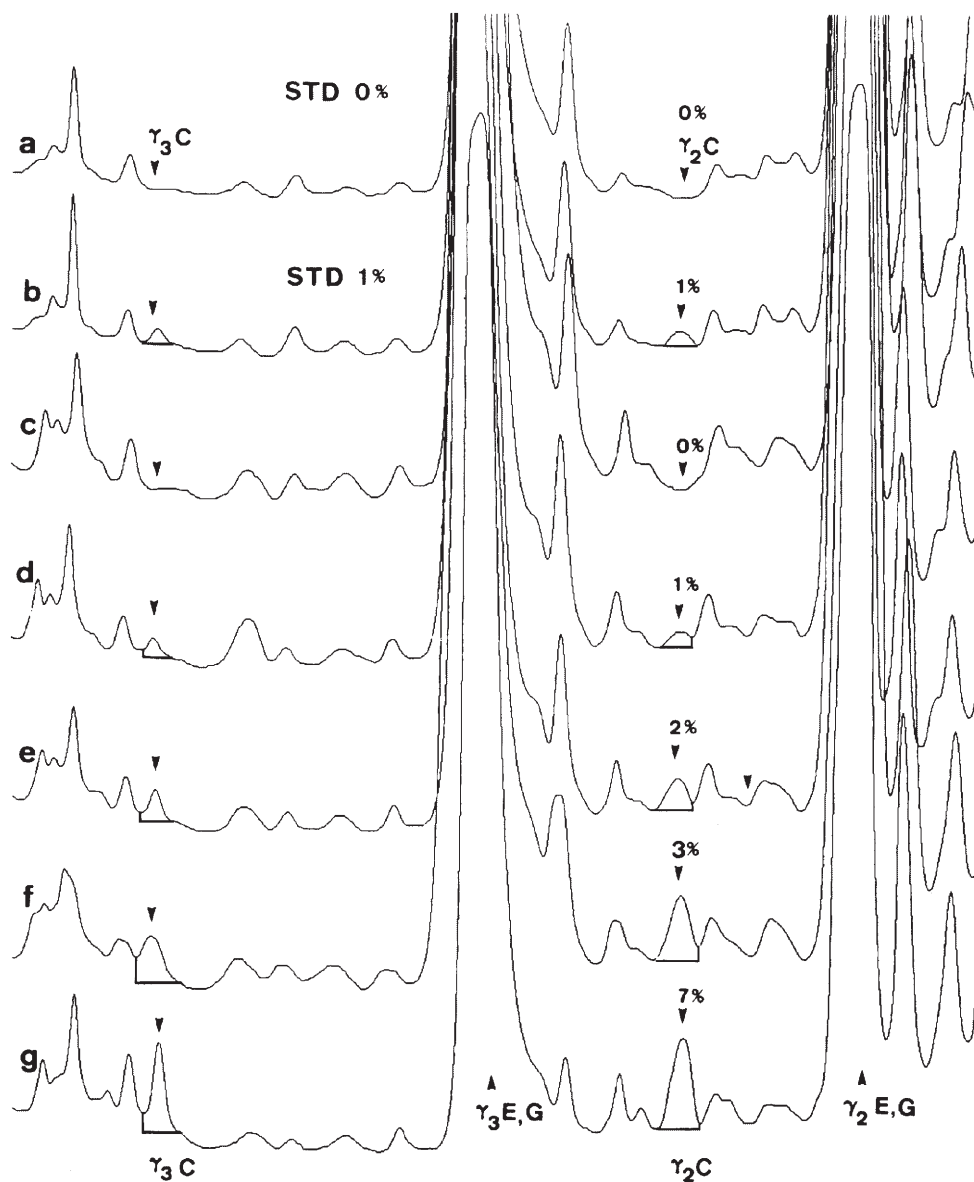
Przedstawiona jest górna połowa żelu IEF.



Rysunek 4b: Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazein skażonych plazminą z sera wyprodukowanego z mieszanek mleka owczego, koziego i bawolego zawierających różne ilości mleka krowiego.

% CM = wartość procentowa mleka krowiego; 1+ = próbka zawierająca 1 % mleka krowiego z dodatkiem czystej kazeiny krowiej w środku ścieżki. C = krowa, E = owca, G = koza, B = bawół.

Przedstawiona jest całkowita odległość separacji żelu IEF.



Rysunek 5: Po wyznaczeniu punktu izoelektrycznego nakładanie się densytogramów wzorców (STD) oraz próbek sera wyprodukowanego z mieszanki mleka owczego i koziego.

a,b = wzorce zawierające 0 i 1% mleka krowiego; c-g = próbki sera zawierające 0, 1, 2, 3 i 7% mleka krowiego; C = krowa; E = owca; G = koza.

Górna połowa żelu IEF została zeskanowana na $\lambda = 634 \text{ nm}$.

ZAŁĄCZNIK XVI

(art. 11)

METODA REFERENCYJNA WYKRYWANIA BAKTERII Z GRUPY COLI W MAŚLE, ODTŁUSZCZONYM MLEKU W PROSZKU, KAZEINIE I KAZEINIANACH

Próbki odpowiadające 1 g masła umieszcza się na podłożu kultury bakterii, jeżeli badane jest masło na obecność form bakterii *coli*.

W przypadku gdy badane jest odtłuszczone mleko w proszku lub kazeina/kazeiniany na obecność form bakterii *coli*, na podłożu kultury bakterii umieszcza się próbki o wadze 0,1 g.

Norma IDF 73A/1985, metoda B jest stosowana z uwzględnieniem następujących zmian:

- 1) Przygotowanie próbki wykonuje się zgodnie z normą IDF 122B: 1992. Dla kazeiny kwasowej procedura przygotowania próbki opisana w normie IDF 73A:1985 może być wykorzystywana alternatywnie.
- 2) Inkubacji oraz ocenie poddaje się jedynie rurki zawierające próbki masła o wadze 1 g lub odpowiednio 0,1 g odtłuszczonego mleka w proszku, kazeiny/kazeinianów. Nie sporządza się rozcieńczeń dziesiętnych.

Ocena wyników

Trzy wyniki negatywne	spełnia wymogi
Dwa lub trzy wyniki pozytywne	nie spełnia wymogów
Dwa wyniki negatywne	należy poddać analizie dwie dodatkowe próbki o wadze 1 g (masło) lub odpowiednio 0,1 g (odtłuszczone mleko w proszku, kazeina/kazeiniany). Spełnia wymogi, jeżeli dwa ostatnie wyniki są negatywne. W innym przypadku wymogi nie są spełnione.

UWAGA

Zawartość form bakterii *coli*: przeciętnie 1/10 g w odniesieniu do masła, 1/g w odniesieniu do odtłuszczonego mleka w proszku, kazeiny/kazeinianów.

Wyniki wskazujące, że wymogi są spełnione, są uzyskiwane z prawdopodobieństwem wynoszącym 93 %.

Zawartość form bakterii *coli*; przeciętnie 1/g w odniesieniu do masła, 1/0,1 g w odniesieniu do odtłuszczonego mleka w proszku, kazeiny/kazeinianów.

Wyniki wskazujące, że wymogi nie są spełnione, są uzyskiwane z prawdopodobieństwem wynoszącym 91 %.

(Założenie: rozkład Poissona).

ZAŁĄCZNIK XVII

(Art. 12)

METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI LAKTOZY W PRODUKTACH OBJĘTYCH KODEM CN 2309 ⁽¹⁾

CZĘŚĆ I

1. Zakres stosowania

Metodę stosuje się w przypadkach, w których zawartość laktozy przekracza 0,5 %.

2. Zasada

Rozpuścić cukry w wodzie. Pozwolić na działanie drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*): pozostawić to laktozę w stanie nienaruszonym. Po sklarowaniu i przefiltrowaniu określić zawartość laktozy w tym roztworze, za pomocą metody Luffa-Schoorla.

3. Odczynniki

Tiosiarczan sodu 0,1 N

Znacznik: roztwór skrobi. Dodać mieszaninę 5 g rozpuszczalnej skrobi (można dodać 10 mg jodku rtęci jako środka konserwującego) i 30 ml wody do 1 litra wrzącej wody; utrzymywać mieszaninę w stanie wrzenia przez trzy minuty; pozostawić do wystudzenia.

Roztwór jodku potasu AR do 30 % (w/v).

Roztwór kwasu siarkowego 6 N

Odczynnik Luffa-Schoorla:

- Rozpuścić 25 g pięciowodnego siarczuanu miedzi II AF wolnego od żelaza ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) w 100 ml wody.
- Rozpuścić 50 g kwasu cytrynowego monowodnego AR ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) w 50 ml wody.
- Rozpuścić 143,8 g bezwodnego węgla sodu AR (Na_2CO_3) w około 300 ml gorącej wody i pozostawić do wystudzenia.

Nalać lit. b) do lit. c), ostrożnie wstrząsać, a następnie dodać lit. a). Uzupełnić do 1 litra, pozostawić na jedną noc i następnie przefiltrować. Skontrolować normalność otrzymanego w ten sposób odczynnika (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2 N). pH musi wynosić w przybliżeniu 9,4.

roztwór Carreza I: rozpuścić 23,8 g $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g kwasu octowego lodowatego w wodzie i uzupełnić do 100 ml.

roztwór Carreza II: rozpuścić 10,6 g $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ w wodzie i uzupełnić do 100 ml.

Ziarenka pumeksu, poddane działaniu kwasu chlorowodorowego w czasie wrzenia, umyte w wodzie i wysuszone. Zawiesina *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g świeżych drożdży w 100 ml wody (przechowywać w chłodziarce nie dłużej niż przez jeden tydzień).

4. Procedura

Odmierzyć wagowo, z dokładnością do 1 mg, 1-gramową próbkę do analizy; umieścić tę próbkę w kolbie kalibrowanej 100 ml. Dodać od 25 do 30 ml wody. Umieścić kolbę we wrzącej łaźni wodnej na trzydzieści minut, następnie schłodzić do temperatury w przybliżeniu 35 °C.

Dodać 5 ml zawiesiny drożdży ⁽²⁾ i wstrząsnąć. Pozostawić kalibrowaną kolbę i jej zawartość w łaźni wodnej o temperaturze 38–40 °C na dwie godziny.

Po sfermentowaniu schłodzić do temperatury około 20 °C. Dodać 2,5 ml roztworu Carreza I i wstrząsać przez trzydzieści sekund, następnie dodać 2,5 ml roztworu Carreza II i ponownie wstrząsać przez 30 sekund. Uzupełnić do 100 ml wodą, wymieszać i przefiltrować. Odmierzyć pipetą ilość filtratu nie większą niż 25 ml, najlepiej zawierającego od 40 do 80 mg laktozy; w razie konieczności uzupełnić do 25 ml wodą i określić zawartość bezwodnej laktozy metodą Luffa-Schoorla.

Przeprowadzić pełną ślepa próbę z samymi drożdżami.

⁽¹⁾ Rozporządzenie (EWG) nr 222/88.

⁽²⁾ Dla produktów zawierających więcej niż 40 % cukru fermentacyjnego należy zwiększyć ilość zawiesiny drożdży.

CZEŚĆ II

1. Oznaczanie zawartości laktozy metodą Luffa-Schoorla.

Odmierzyć pipetą 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla i umieścić go w 300-ml kolbie Erlenmeyera; dodać dokładnie odmierzone 25 ml sklarowanego roztworu.

Po dodaniu dwóch ziarenek pumeksu podgrzać, potrząsając ręcznie nad nieosłoniętym płomieniem średniej wysokości i doprowadzić ciecz do wrzenia przez około dwie minuty. Natychmiast umieścić kolbę Erlenmeyera na siatce drucianej z azbestowym ekranem, pod którym wcześniej zapalono płomień. Ustawić go tak, aby ogrzewał jedynie dno kolby Erlenmeyera; następnie dołączyć chłodnicę zwrotną. Od tej chwili utrzymywać w stanie wrzenia dokładnie przez dziesięć minut. Schłodzić niezwłocznie w zimnej wodzie i po około pięciu minutach badać w następujący sposób:

Dodać do cieczy 10 ml jodku potasu i bezpośrednio potem, lecz ostrożnie (ponieważ może wystąpić silne wytwarzanie piany), 25 ml kwasu siarkowego 6 N.

Następnie badać, używając tiosiarczanu sodu aż do pojawienia się żółtego, matowego koloru i pod koniec badania dodać znacznik skrobi.

Przeprowadzić to samo badanie z mieszaniną dokładnie odmierzonych 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml jodku potasu i 25 ml kwasu siarkowego 6 N, tym razem bez doprowadzania do wrzenia.

Wykorzystując poniższą tabelę, ustalić ilość laktozy w mg odpowiadającą różnicy między wynikami dwóch badań (wyrażoną w ml tiosiarczanu sodu 0,1 N).

TABELA

Tabela dla 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla

(patrz warunki przedstawione w tekście)

1. Tiosiarczan sodu 0,1 N

2. Laktoza C₁₂H₂₂O₁₁

1			2		
ml	mg	różnica	ml	mg	różnica
1	3,6	3,7	12	44,6	3,8
2	7,3	3,7	13	48,4	3,8
3	11,0	3,7	14	52,2	3,9
4	14,7	3,7	15	56,0	3,9
5	18,4	3,7	16	59,9	3,9
6	22,1	3,7	17	63,8	4,0
7	25,8	3,7	18	67,7	4,0
8	29,5	3,7	19	71,7	4,1
9	33,2	3,8	20	75,7	4,1
10	37,0	3,8	21	79,8	4,1
11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
		3,8	23	88,0	4,1

ZAŁĄCZNIK XVIII

(Art. 13)

WYKRYWANIE OBECNOŚCI SERWATKI PODPUSZCZKOWEJ W ODTŁUSZCZONYM MLEKU W PROSZKU PRZEZNACZONYM DO SKŁADOWANIA W MAGAZYNACH PAŃSTWOWYCH, ZA POMOCĄ OZNACZANIA GLIKOMAKROPEPTYDÓW METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)**1. Zakres i dziedzina stosowania**

Omawiana metoda umożliwia wykrywanie obecności serwatki podpuszczkowej w odtłuszczonej mleku w proszku przeznaczonym do składowania w magazynach państwowych, metodą oznaczania glikomakropeptydów.

2. Odniesienie

Międzynarodowa norma ISO 707 – Mleko i przetwory mleczne – metody pobierania próbek, zgodnie z wytycznymi zawartymi w: załączniku I pkt 2 lit. c) akapit ostatni.

3. Definicja

Zawartość glikomakropeptydów w odtłuszczonej mleku w proszku: zawartość substancji oznaczanych za pomocą określonej poniżej metody, wyrażana jako wartość procentowa masy.

4. Zasada

- Odtworzenie odtłuszczonego mleka w proszku, usunięcie tłuszczu i białka za pomocą kwasu trichlorooctowego, a następnie odwirowanie;
- Oznaczenie ilości glikomakropeptydów (GMP) w supernatantu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC);
- Ocena wyniku, otrzymanego w przypadku próbek, poprzez odniesienie do próbek wzorcowych składających się z odtłuszczonego mleka w proszku z dodatkiem lub bez dodatku znanej wartości procentowej ilości serwatki w proszku.

5. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej. Woda wykorzystywana musi być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równorzędnej czystości.

5.1. Roztwór kwasu trichlorooctowego

Rozpuścić w wodzie 240 g kwasu trichlorooctowego (C_3Cl_7COOH) i uzupełnić do 1000 ml.

5.2. Roztwór eluentu, pH 6,0

Rozpuścić w około 700 ml wody 1,74 g ortofosforanu dipotasu (K_2HPO_4), 12,37 g ortofosforanu potasu (KH_2PO_4) oraz 21,41 g siarczanu sodu (Na_2SO_4). Jeżeli potrzeba, dostosować pH do 6,0, używając roztworu kwasu fosforowego lub wodorotlenku potasu.

Uzupełnić wodą do 1000 ml i homogenizować.

Przed użyciem przefiltrować roztwór eluentu za pomocą filtra membranowego o średnicy porów 0,45 μm .

5.3. Rozpuszczalnik wymywający

Zmieszać jedną objętość acetonitrylu (CH_3CN) z dziewięcioma objętościami wody. Przed użyciem przefiltrować mieszaninę przez filtr membranowy o średnicy porów 0,45 μm .

Uwaga: Można zastosować każdy inny rozpuszczalnik splukujący o działaniu bakteriobójczym, który nie wpływa na skuteczność rozdzielczą kolumn.

5.4. Próbkę wzorcowe

5.4.1. Odtłuszczone mleko w proszku spełniające wymogi niniejszego rozporządzenia (tzn. [0]).

5.4.2. To samo odtłuszczone mleko w proszku zafalszowane 5 % (m/m) serwatką typu podpuszczkowego w proszku, o składzie standardowym (tzn. [5]).

6. Aparatura

- 6.1. Waga analityczna
- 6.2. Wirówka, mogąca osiągać siłę odśrodkową 2200 g, wyposażona w rurki wirówkowe z zatyczkami, o pojemności około 25 ml.
- 6.3. Wyrząsarka mechaniczna.
- 6.4. Mieszadło magnetyczne.
- 6.5. Lejki szklane, średnica około 7 cm.
- 6.6. Bibuły filtracyjne, średni stopień filtrowania, średnica około 12,5 cm.
- 6.7. Sprzęt szklany do filtracji z filtrem membranowym o średnicy porów 0,45 µm.
- 6.8. Kalibrowane pipety umożliwiające podawanie 10 ml (ISO 648, klasa A lub ISO/R 835).
- 6.9. Łaźnia wodna termostatowana, ustawiona na $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. Zestaw do HPLC, składający się z:
 - 6.10.1. Pompy.
 - 6.10.2. Iniektora ręcznego lub automatycznego, o pojemności od 15 do 30 µl.
 - 6.10.3. Dwóch kolumn TSK 2000-SW połączonych szeregowo (długość 30 cm, średnica wewnętrzna 0,75 cm) lub kolumn równorzędnych, wraz z kolumną wstępną (3 cm × 0,3 cm), wypełnionych I 125 lub materiałem o równorzędnej skuteczności.
 - 6.10.4. Suszarki termostatowanej kolumny, ustawionej na 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5. Detektora zmiennej długości fali UV, umożliwiającego pomiary przy 205 nm, przy czułości 0,008 A.
 - 6.10.6. Integratora umożliwiającego całkowanie powierzchni pików (dolina-dolina).

Uwaga: Praca z kolumnami utrzymywanymi w temperaturze pokojowej jest możliwa, ale ich zdolność rozdzielcza jest nieco niższa. W takim przypadku temperatura powinna różnić się o mniej niż ± 5 °C w każdym zakresie analiz.

7. Pobieranie próbek

- 7.1. Międzynarodowa norma ISO 707 – „Mleko i przetwory mleczne – metody pobierania próbek”, zgodnie z wytycznymi zawartymi w załączniku I pkt 2 lit. c) akapit ostatni.
- 7.2. Przechowywać próbki w warunkach wykluczających jakiegokolwiek ich zniszczenie lub zmianę składu.

8. Procedura

- 8.1. *Przygotowanie próbki badanej*

Przenieść mleko w proszku do pojemnika o objętości w przybliżeniu dwukrotnie większej niż objętość proszku, wyposażonego w hermetyczną pokrywę. Natychmiast zamknąć pojemnik. Wymieszać dobrze mleko w proszku poprzez wielokrotne odwracanie pojemnika.
- 8.2. *Porcja badana*

Odmierzyć wagowo $2,000 + 0,001$ g próbki do badań i umieścić w rurce wirówkowej (ppkt 6.2).
- 8.3. *Usuwanie tłuszczu i białek*
 - 8.3.1. Do porcji badanej dodać 20 g ciepłej wody (50 °C). Rozpuścić proszek przez 5-minutowe potrząsanie za pomocą wyrząsarki mechanicznej (ppkt 6.3). Schłodzić rurkę do temperatury 25 °C.
 - 8.3.2. Przez dwie minuty dodawać stopniowo 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (ppkt 5.1), mieszając jednocześnie mieszadłem magnetycznym (ppkt 6.4). Umieścić rurkę w łaźni wodnej (ppkt 6.9) i pozostawić tam na 60 minut.
 - 8.3.3. Odwirowywać (ppkt 6.2) przez 10 minut przy 2200 g bądź filtrować przez bibułę (ppkt 6.6), odrzucając pierwsze 5 ml filtratu.

- 8.4. *Oznaczanie chromatograficzne*
- 8.4.1. Dokonać iniekcji 15–30 µl dokładnie odmierzonego supernatantu lub filtratu (ppkt 8.3.3) do aparatury HPLC (ppkt 6.10), ustawiając na działanie przy prędkości przepływu wynoszącej 1,0 ml roztworu eluentu (ppkt 5.2) na minutę.

Uwagi:

1. Utrzymywać roztwór eluentu (ppkt 5.2) w temperaturze 85 °C przez cały czas trwania analizy chromatograficznej po to, aby utrzymać go w stanie odgazowanym i aby zapobiec rozwojowi bakterii. Można stosować wszelkie inne środki ostrożności o podobnym działaniu.
2. Podczas każdej przerwy płukać kolumny wodą. Nie pozostawiać nigdy roztworu eluentu (ppkt 5.2) w kolumnach.

Przed każdą przerwą dłuższą niż 24 godziny przepłukać kolumny wodą, a następnie myć je roztworem (ppkt 5.3) co najmniej przez trzy godziny z prędkością przepływu równą 0,2 ml na minutę.

- 8.4.2. Wyniki analizy chromatograficznej próbki [E] są otrzymywane w postaci chromatogramu, na którym poszczególne piki określa się za pomocą ich czasu retencji RT, jak następuje:

- Pik II: Drugi pik chromatogramu, z RT równym około 12,5 min.
 Pik III: Trzeci pik chromatogramu, odpowiadający GMP, z RT równym 15,5 ± 1,0 min.
 Pik IV: Czwarty pik chromatogramu, z RT równym około 17,5 min.

Jakość kolumn może mieć wpływ na czasy retencji poszczególnych pików.

Integrator (ppkt 6.10.6) automatycznie oblicza powierzchnię A dla każdego piku:

- All: powierzchnia piku II,
 AIII: powierzchnia piku III,
 AIV: powierzchnia piku IV.

Istotne jest zbadanie wyglądu każdego chromatogramu przed dokonaniem interpretacji ilościowej, w celu wykrycia ewentualnych nieprawidłowości będących skutkiem wadliwego działania aparatury lub kolumn bądź wynikających z pochodzenia i rodzaju analizowanej próbki.

W razie wątpliwości analizę powtórzyć.

- 8.5. *Kalibracja*
- 8.5.1. Do próbek wzorcowych (ppkt 5.4) zastosować dokładnie procedurę opisaną od ppkt 8.2 do ppkt 8.4.2. Używać świeżo przygotowanych roztworów, z powodu degradacji GMP w 8-procentowym środowisku kwasu trichlorooctowego. Straty szacuje się na 0,2 % na godzinę w temperaturze 30 °C.
- 8.5.2. Przed chromatograficznym oznaczaniem próbek należy przygotować kolumny za pomocą wielokrotnych iniekcji próbki wzorcowej (ppkt 5.4.2) do roztworu (ppkt 8.5.1) aż do momentu, gdy powierzchnia i czas retencji piku odpowiadającego GMP są stałe.
- 8.5.3. Oznaczyć współczynniki odpowiedzi R przez iniekcję takiej samej objętości filtratów (ppkt 8.5.1) jak wykorzystywana do próbek.

9. Sposób prezentowania wyników

- 9.1. *Metoda obliczenia i wzory*
- 9.1.1. Wylizanie współczynników odpowiedzi R:

$$\text{Pik II:} \quad R_{\text{II}} = \frac{100}{A_{\text{II}}[0]}$$

$$\text{Pik IV:} \quad R_{\text{IV}} = \frac{100}{A_{\text{IV}}[0]}$$

gdzie:

R_{II} i R_{IV} = współczynniki odpowiedzi odpowiednio piku II i IV;
 $A_{\text{II}}[0]$ i $A_{\text{IV}}[0]$ = powierzchnie odpowiednio pików II i IV próbki wzorcowej [0] otrzymane w ppkt 8.5.3.

$$\text{Pik III:} \quad R_{\text{III}} = \frac{W}{A_{\text{III}}[5] - A_{\text{III}}[0]}$$

gdzie:

R_{III} = współczynnik odpowiedzi piku III,
 $A_{\text{III}}[0]$ i $A_{\text{III}}[5]$ = powierzchnie piku III w próbkach wzorcowych [0] i [5] odpowiednio otrzymane w ppkt 8.5.3,
 W = ilość serwatki w próbce wzorcowej [5], tzn. 5.

9.1.2. Obliczanie względnej powierzchni pików w próbce [E]

$$S_I[E] = R_{II} \times A_{II}[E]$$

$$S_{II}[E] = R_{III} \times A_{III}[E]$$

$$S_{IV}[E] = R_{IV} \times A_{IV}[E]$$

gdzie:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV}[E] = względne powierzchnie pików II, III i IV odpowiednio w próbce [E],A_{II} [E], A_{III}[E], A_{IV}[E] = powierzchnie pików II, III i IV odpowiednio w próbce [E] otrzymane w ppkt 8.4.2,R_{II}, R_{III}, R_{IV} = współczynniki odpowiedzi obliczone w ppkt 9.1.1.

9.1.3. Obliczanie względnego czasu retencji pików III w próbce [E]:

$$RRT_{III}[E] = \frac{RT_{III}[E]}{RT_{III}[5]}$$

gdzie:

RRT_{III} [E] = względny czas retencji pików III w próbce [E],RT_{III} [E] = czas retencji pików III w próbce [E] otrzymany w ppkt 8.4.2,RT_{III} [5] = czas retencji pików III w próbce kontrolnej [5] otrzymany w ppkt 8.5.3.9.1.4. Doświadczenia wykazały, że istnieje liniowa zależność między względnym czasem retencji pików III, tzn. RRT_{III}[E], i wartością procentową serwatki uzupełnionej do 10 %.— RRT_{III} [E] jest < 1,000, gdy wartość procentowa serwatki wynosi > 5 %,— RRT_{III} [E] jest ≥ 1,000, gdy wartość procentowa serwatki wynosi ≤ 5 %.Dopuszczalna niepewność w odniesieniu do wartości RRT_{III} wynosi ± 0,002.Zazwyczaj wartość RRT_{III} [0] odchyła się nieco od 1,034. W zależności od stanu kolumn wartość ta może zbliżać się do 1,000, ale zawsze musi ją przewyższać.

9.2. Wylizanie wartości procentowej serwatki podpuszczkowej w proszku w próbce:

$$W = S_{III}[E] - [1,3 + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

gdzie:

W = wartość procentowa m/m serwatki podpuszczkowej w próbce [E];

S_{III} [E] = względna powierzchnia pików III próbki badanej [E] otrzymana jak w ppkt 9.1.2;

1,3 = stanowi średnią powierzchnię względną pików III wyrażoną w gramach serwatki podpuszczkowej, na 100 g, oznaczoną w niezafałszowanym odtuszczonej mleku w proszku różnego pochodzenia. Wielkość ta została uzyskana doświadczalnie;

S_{III} [0] = stanowi względną powierzchnię pików III, która jest równa R_{III} x A_{III}[0]. Wartości te uzyskano w ppkt 9.1.1 i 8.5.3 odpowiednio;(S_{III} [0] — 0,9) = stanowi poprawkę do wykonania w odniesieniu do średniej powierzchni względnej 1,3, gdy S_{III} [0] nie jest równe 0,9. Doświadczalnie średnia powierzchnia względna pików III próbki kontrolnej [0] wynosi 0,9.

9.3. Dokładność procedury

9.3.1. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równocześnie lub w bezpośrednim następstwie przez tego samego analityka za pomocą tej samej aparatury na identycznym materiale badanym nie przekracza 0,2 % m/m.

9.3.2. Odtwarzalność

Różnica między dwoma pojedynczymi i niezależnymi wynikami, otrzymanymi na identycznym materiale badanym, nie przekracza 0,4 % m/m.

9.4. Interpretacja

- 9.4.1. Przyjąć nieobecność serwatki, jeżeli względna powierzchnia pików III, $S_{III} [E]$ wyrażona w gramach serwatki podpuszczkowej na 100 g produktu, wynosi $\leq 2,0 + (S_{III}[0]-0,9)$

gdzie:

2,0 = jest maksymalną wartością dopuszczalną dla względnej powierzchni pików III przy uwzględnieniu względnej powierzchni pików III, tzn. 1,3 niepewności wynikającej ze zmian składu odtłuszczonego mleka w proszku oraz odtwarzalności metody (ppkt 9.3.2),

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = stanowi poprawkę do wykonania, jeżeli powierzchnia $S_{III} [0]$ jest różna od 0,9 (patrz ppkt 9.2)

- 9.4.2. Jeżeli względna powierzchnia pików III, $S_{III}[E]$ jest $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$, a względna powierzchnia pików II, $S_{II} [E] \leq 160$, oznaczyć zawartość serwatki podpuszczkowej w sposób wskazany w pkt 9.2.
- 9.4.3. Jeżeli względna powierzchnia pików III, $S_{III}[E]$ jest $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$, a względna powierzchnia pików II, $S_{II} [E] \leq 160$, oznaczyć całkowitą zawartość białka (P %), następnie zbadać wykresy 1 i 2.
- 9.4.3.1. Dane otrzymane po analizie próbek niezafałszowanego odtłuszczonego mleka w proszku, o wysokiej całkowitej zawartości białka, zostały zgromadzone na wykresach 1 i 2.

Linia ciągła ilustruje regresję liniową, której współczynniki obliczane są metodą najmniejszych kwadratów.

Linia prosta przerywana wyznacza górną granicę względnej powierzchni pików III, z prawdopodobieństwem nieprzekroczenia jej w 90 % przypadków.

Równania w odniesieniu do prostych linii przerywanych na wykresach 1 i 2 są następujące:

$$S_{III} = 0,376 P \% - 0,7 \quad (\text{wykres 1}),$$

$$S_{III} = 0,0123 S_{II}[E] + 0,93 \quad (\text{wykres 2}),$$

gdzie:

S_{III} jest względną powierzchnią pików III wyliczoną albo według całkowitej zawartości białka albo według względnej powierzchni pików II $[E]$,

P % jest to całkowita zawartość białka wyrażona jako wartość procentowa w masie,

$(S_{II}[E])$ jest to względna powierzchnia próbki obliczona w ppkt 9.1.2.

Równania te odpowiadają liczbie 1,3 wymienionej w ppkt 9.2.

Różnica (T_1 i T_2) między stwierdzoną względną powierzchnią $S_{III}[E]$ a względną powierzchnią S_{III} jest podawana w sposób następujący:

$$T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P\% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

$$T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,91)]$$

- 9.4.3.2. Jeżeli T_1 i/lub T_2 są równe lub mniejsze od zera, nie można ustalić obecności serwatki podpuszczkowej.

Jeżeli T_1 i/lub T_2 są większe od zera, występuje obecność serwatki podpuszczkowej.

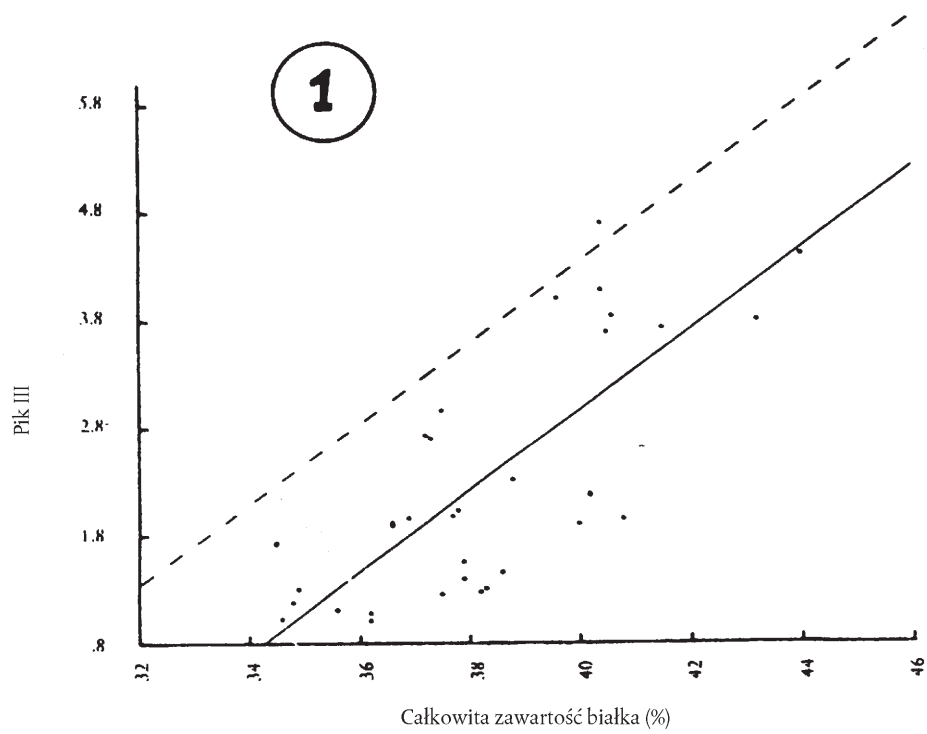
Zawartość serwatki podpuszczkowej jest obliczana zgodnie ze wzorem:

$$W = T_2 + 0,91$$

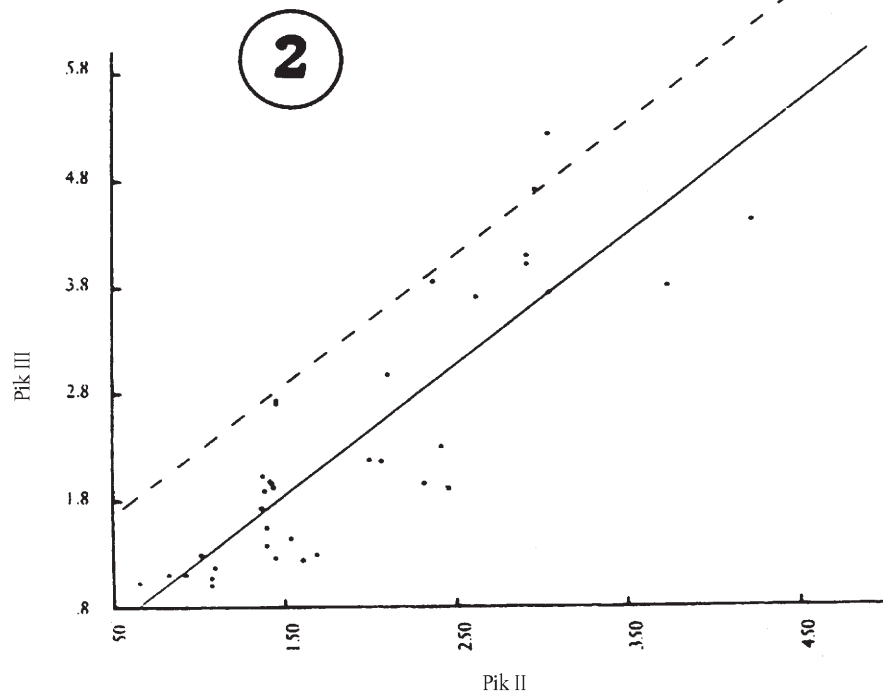
gdzie:

0,91 jest to odległość na pionowej osi między ciągłymi i przerywanymi liniami prostymi.

ODTĘSZCZONE MLEKO W PROSZKU



ODTĘSZCZONE MLEKO W PROSZKU



ZAŁĄCZNIK XIX

(Art. 13)

OZNACZANIE SUCHEJ MASY SERWATKI PODPUSZCZKOWEJ W ODTŁUSZCZONYM MLEKU W PROSZKU ORAZ W MIESZANKACH ZGODNIE Z ROZPORZĄDZENIEM (WE) NR 2799/1999**1. Cel: Wykrycie dodania suchej masy serwatki podpuszczkowej do:**

- a) odtłuszczonego mleka w proszku określonego w art. 2 rozporządzenia (WE) nr 2799/1999; oraz
- b) mieszanek określonych w art. 4 rozporządzenia (EW) nr 2799/1999.

2. Odniesienia: Międzynarodowa norma ISO 707**3. Definicja**

Zawartość suchej masy serwatki podpuszczkowej jest oznaczana jako wartość procentowa w masie, ustalona w ramach opisanej procedury.

4. Zasada

Zawartość glikomakropeptydu A jest oznaczana zgodnie z załącznikiem XVIII. Próbkę dającą pozytywne wyniki poddaje się badaniu na glikomakropeptyd A w drodze zastosowania procedury wysokosprawnej chromatografii cieczowej (procedura HPLC) z odwróconymi fazami. Ocena wyników jest otrzymywana przez odniesienie do próbek wzorcowych składających się z mleka odtłuszczonego w proszku zawierającego lub nie znaną wartość procentową serwatki w proszku. Wyniki wyższe niż 1 % (m/m) wskazują na obecność suchej masy serwatki podpuszczkowej.

5. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikiami o uznanej klasie analitycznej. Woda wykorzystywana musi być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równorzędnej czystości. Acetonitryl powinien mieć jakość spektroskopową lub jakość wymaganą dla HPLC.

Odczynniki konieczne do przeprowadzenia procedury są opisane w załączniku XVIII do niniejszego rozporządzenia.

Odczynniki do HPLC z odwróconymi fazami.

5.1. Roztwór kwasu trichlorooctowego

Rozpuścić 240 g kwasu trichlorooctowego (CCl_3CCOOH) w wodzie i uzupełnić do 1000 ml.

5.2. Eluenty A oraz B

Eluent A: 150 ml acetonitrylu (CH_3CN), 20 ml izopropanolu ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) oraz 1,00 ml kwasu trifluorooctowego (TFA, CF_3COOH) umieszcza się w 1000-ml kolbie pomiarowej. Uzupełnić do 1000 ml wodą. Eluent B: 550 ml acetonitrylu, 20 ml izopropanolu oraz 1,00 ml TFA umieszcza się w kolbie pomiarowej. Uzupełnić do 1000 ml wodą. Przed zastosowaniem przefiltrować roztwór eluentu przez filtr membranowy, o średnicy porów wynoszącej 0,45 μm .

5.3. Konserwacja kolumny

Po przeprowadzeniu analizy kolumnę płucze się eluentem B (poprzez gradient), a następnie spłukuje acetonitrylem (poprzez gradient przez 30 minut). Kolumnę przechowuje się w acetonitrylu.

5.4. Próbkę wzorcowe

- 5.4.1. Mleko odtłuszczone w proszku spełniające wymogi składowania w magazynach państwowych (tzn. (0)).
- 5.4.2. To samo mleko odtłuszczone w proszku zafałszowane za pomocą 5 % (m/m) podpuszczkowego rodzaju serwatki w proszku o wzorcowym składzie (tzn. (5)).
- 5.4.3. To samo mleko odtłuszczone w proszku zafałszowane za pomocą 50 % (m/m) podpuszczkowego rodzaju serwatki w proszku o wzorcowym składzie (to jest (50))⁽¹⁾.

6. Aparatura

Aparatura konieczna do opisanej procedury omówiona jest w załączniku XVIII do niniejszego rozporządzenia.

6.1. Waga analityczna.

- 6.2. Wirówka, mogąca osiągać siłę odśrodkową 2200 g, wyposażona w rurki wirówkowe z zatyczkami, o pojemności około 50 ml.

⁽¹⁾ Podpuszczkowy rodzaj serwatki w proszku o składzie wzorcowym, jak również zafałszowane odtłuszczone mleko w proszku są dostępne w NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL-6710 BA Ede. Jednakże stosowane mogą być również proszki dające wyniki równoważne wynikom uzyskiwanym za pomocą proszków NIZO.

- 6.3. Wstrząsarka mechaniczna, umożliwiająca wstrząsanie w temperaturze 50 °C.
- 6.4. Mieszadło magnetyczne.
- 6.5. Lejki szklane, średnica około 7 cm.
- 6.6. Bibuły filtracyjne, średni stopień filtrowania, średnicy wynoszącej około 12,5 cm.
- 6.7. Szklany sprzęt do filtrowania, z filtrem membranowym o średnicy porów 0,45 µm.
- 6.8. Kalibrowane pipety, umożliwiające podawanie 10 ml (ISO 648, Klasa A lub ISO/R 835), bądź system umożliwiający podawanie 10,0 ml w ciągu dwóch minut.
- 6.9. Łaźnia wodna termostatowana ustawiona na temperaturę 25 ± 0,5 °C.
- 6.10. Zestaw do HPLC, składający się z:
 - 6.10.1. Systemu pompującego o podwójnym gradiencie.
 - 6.10.2. Iniektora, ręcznego bądź automatycznego, o pojemności 100 µl.
 - 6.10.3. Kolumny Dupont Protein Plus (długości 25 cm, średnica wewnętrzna 0,46 cm) bądź równoważnej jej kolumny odwróconej fazy opartej o krzemionkę o szerokiej porowatości.
 - 6.10.4. Termostatycznego pieca kolumnowego, ustawionego na temperaturę 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5. Detektora dla zmiennej długości fal UV, umożliwiającego pomiary przy 210 nm (w razie konieczności można stosować długość fal do 220 nm), o czułości wynoszącej 0,02.
 - 6.10.6. Integratora umożliwiającego całkowanie powierzchni pików (dolina-dolina).

Uwaga

Działanie kolumny w temperaturze pokojowej jest możliwe, pod warunkiem że temperatura pokojowa nie podlega wahaniom większym niż 1 °C, w przeciwnym razie ma miejsce zbyt duże wahanie w retencji czasu GMP.

7. Pobieranie próbek

- 7.1. próbki muszą być pobierane zgodnie z procedurą określoną w międzynarodowej normie ISO 707. Jednakże Państwa Członkowskie mogą wykorzystywać inną metodę pobierania próbek pod warunkiem, że jest ona zgodna z zasadami powyższej normy.
- 7.2. próbkę składować w warunkach wykluczających pogorszenie lub zmianę składu.

8. Procedura

8.1. Przygotowanie próbki badanej

Przenieść mleko w proszku do pojemnika o pojemności około dwukrotnie większej niż objętość proszku, wyposażonego w szczelną pokrywkę. Natychmiast zamknąć pojemnik. Wymieszać dobrze mleko w proszku poprzez wielokrotne odwracanie pojemnika.

8.2. Porcja badana

Odmierzyć wagowo 2,000 ± 0,001 g próbki badanej i umieścić w rurce wirówkowej (ppkt 6.2) lub w odpowiedniej kolbie z zatyczką (50 ml).

8.3. Usuwanie tłuszczu i białek

- 8.3.1. Do porcji badanej dodać 20 g ciepłej wody (50 °C). Rozpuścić proszek, potrząsając przez pięć minut lub 30 minut w przypadku maślanki kwasowej, za pomocą wstrząsarki mechanicznej (ppkt 6.3). Umieścić rurkę w łaźni wodnej i pozostawić do wyrównania się temperatury do 25 °C.
- 8.3.2. Przez dwie minuty dodawać stopniowo 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (ppkt 5.1), mieszając jednocześnie energicznie mieszadłem magnetycznym (ppkt 6.4). Umieścić próbkę w łaźni wodnej (ppkt 6.9) i pozostawić na 60 minut.
- 8.3.3. Odwirowywać (ppkt 6.2) 2,200 g przez 10 minut lub filtrować przez bibułę (ppkt 6.6), odrzucając pierwsze 5 ml filtratu.

8.4. Oznaczanie chromatograficzne

- 8.4.1. Wykonać analizę HPLC w sposób opisany w załączniku XVIII. W przypadku otrzymania wyniku negatywnego analizowana próbka nie zawiera suchej masy serwatki podpuszczkowej w ilościach wykrywalnych. Jeżeli wynik jest pozytywny, musi zostać zastosowana określona poniżej procedura HPLC z odwróconymi fazami. Obecność maślanki kwasowej w proszku może stanowić podstawę fałszywie pozytywnych wyników. Metoda HPLC z odwróconymi fazami wyklucza taką możliwość.

- 8.4.2. Przed przeprowadzeniem analizy HPLC z odwróconymi fazami zoptymalizowane powinny zostać warunki gradientów. Czas retencji wynoszący 26 ± 2 minuty dla GMP_A jest optymalny dla systemów gradientowych o objętości martwej wynoszącej około 6 ml (objętość od punktu, w którym rozpuszczalniki schodzą się razem do objętości iniektora łącznie). Systemy gradientowe o mniejszej objętości martwej (np. 2 ml) powinny osiągać optymalny czas retencji 22 minuty.

Wziąć roztwory próbek wzorcowych (ppkt 5.4) z dodatkiem oraz bez dodatku 50 % serwatki podpuszczkowej.

Dokonać iniekcji 100 µl supernatantu lub filtratu (ppkt 8.3.3) do aparatury HPLC działającej w warunkach gradientu próbnego podanych w tabeli 1.

Tabela 1

Warunki gradientu próbnego dla optymalizacji chromatografii

Czas (minuty)	Przepływ (ml/minuty)	% A	% B	Krzywa
Pocz.	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

Porównanie dwóch chromatogramów powinno ujawnić położenie (piku GMP_A).

Wykorzystując podany poniżej wzór, można obliczyć skład początkowego rozpuszczalnika, który ma zostać użyty do normalnego gradientu (patrz ppkt 8.4.3)

$$\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{GMPA} - 26/6)) * 30/27$$

$$\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{GMPA} - 26/6)) * 1,11$$

Gdzie:

RT_{GMPA}: czas retencji GMP_A w gradiencie próbnym

10:: wstępny % B gradientu próbnego

2,5:: % B w punkcie środkowym minus % B w punkcie początkowym w gradiencie normalnym

13,5:: czas w punkcie środkowym gradientu próbnego

26:: wymagany czas retencji GMP_A

6:: stosunek nachyleń gradientu próbnego i normalnego

30:: % B na wstępie minus % B w 27. minucie gradientu próbnego

27:: czas działania gradientu próbnego.

- 8.4.3. Wziąć roztwory próbek do badań

Dokonać iniekcji dokładnie odmierzonych 100 µl supernatantu lub filtratu (ppkt 8.3.3) do aparatury HPLC działającej przy przepływie wynoszącym 1,0 roztworu eluentu (ppkt 5.2) na minutę.

Skład eluentu w chwili rozpoczęcia analizy otrzymuje się z ppkt 8.4.2. Normalnie jest on zbliżony do A:B = 76:24 (ppkt 5.2). Natychmiast po dokonaniu iniekcji rozpoczyna się gradient liniowy, który prowadzi do 5 % zwiększenia wartości procentowej B po 27 minutach. Następnie rozpoczęty zostaje gradient liniowy, który doprowadza skład eluentu do 90 % B w ciągu pięciu minut. Skład ten jest utrzymywany przez pięć minut, po czym zostaje zmieniony, poprzez gradient liniowy w ciągu pięciu minut do składu wstępnego. W zależności od wewnętrznej pojemności systemu pompującego następna iniekcja może zostać wykonana 15 minut po osiągnięciu warunków początkowych.

Uwagi

1. Czas retencji glikomakropeptydu powinien wynosić $26 \pm$ dwie minuty. Może to zostać osiągnięte w drodze różnicowania wstępnych oraz końcowych warunków pierwszego gradientu. Jednakże różnica w % B dla wstępnych oraz końcowych warunków pierwszego gradientu musi pozostawać na poziomie 5 % B.
2. Eluenty powinny być odgazowane w sposób wystarczający i pozostawać odgazowane. Jest to istotne dla sprawnego funkcjonowania gradientowego systemu pompowania. Odchylenie standardowe dla czasu retencji piku GMP powinno wynosić mniej niż 0,1 minuty ($n = 10$).
3. Co pięć próbek powinna być sporządzona przez iniekcję próbka wzorcowa (5) w celu obliczenia nowego współczynnika odpowiedzi R. (ppkt 9.1.1).

- 8.4.4. Wyniki chromatograficznej analizy próbek do badań (E) są otrzymywane w postaci chromatogramu, w którym pik GMP identyfikowany jest za pomocą swojego czasu retencji wynoszącego około 26 minut.

Integrator (ppkt 6.40.6) automatycznie oblicza szczytową wysokość H piku GMP. W każdym chromatogramie powinno zostać sprawdzone położenie linii podstawowej. Analiza lub całkowanie powinny zostać powtórzone w przypadku nieprawidłowego położenia linii podstawowej.

Istotne jest zbadanie wyglądu każdego chromatogramu przed dokonaniem interpretacji ilościowej, w celu wykrycia jakichkolwiek nieprawidłowości będących skutkiem wadliwego działania aparatury lub kolumny bądź wynikających z pochodzenia i rodzaju analizowanej próbki. W razie wątpliwości analizę powtórzyć.

8.5. Kalibracja

- 8.5.1. Do próbek wzorcowych (ppkt 5.4.1-5.4.2) stosować dokładnie procedurę opisaną od ppkt 8.2 do ppkt 8.4.4. Używać świeżo przygotowanych roztworów, z powodu degradacji GMP w środowisku 8-procentowego kwasu trichlorooctowego w temperaturze pokojowej. W temperaturze 4 °C roztwór pozostaje stabilny przez 24 godziny. W przypadku długich serii analiz pożądane jest korzystanie ze schłodzonej tacki na próbki w iniektorze automatycznym.

Uwaga

Podpunkt 8.4.2 można opuścić w przypadku, gdy % B w warunkach początkowych znany jest z poprzednich analiz.

Chromatogram próbki wzorcowej (5) powinien być analogiczny do pokazanego na rysunku 1. Na tym rysunku pik GMP_A poprzedzony jest przez dwa małe piki. Istotne jest uzyskanie podobnej separacji.

- 8.5.2. Przed oznaczeniem chromatograficznym próbek dokonać iniekcji 100 μ l próbki wzorcowej bez serwatki podpuszczkowej (0) (ppkt 5.4.1).

Chromatogram nie powinien wykazywać piku w czasie retencji piku GMP_A .

- 8.5.3. Oznaczyć współczynniki odpowiedzi R przez iniekcję takiej samej objętości filtratów (ppkt 8.5.1) jak wykorzystana do próbek.

9. Sposób prezentowania wyników

9.1. Metoda obliczania oraz wzory

- 9.1.1. Wylizanie współczynnika odpowiedzi R:

Pik GMP: $R = W/H$

Gdzie:

R= współczynnik odpowiedzi piku GMP

H= wysokość piku GMP

W= ilość serwatki w próbce wzorcowej (5).

9.2. Obliczanie wartości procentowej serwatki podpuszczkowej w proszku, w próbce

$R \times H(E)$

gdzie:

W(E)= wartość procentowa (m/m) serwatki podpuszczkowej w próbce (E).

R= współczynnik odpowiedzi piku GMP (ppkt 9.1.1)

H(E)= wysokość piku GMP dla próbki (E).

W przypadku gdy wartość W(E) jest większa niż 1 %, a różnica między czasem retencji a czasem retencji próbki wzorcowej (5) jest mniejsza niż 0,2 minuty, stwierdzona jest obecność suchej masy serwatki podpuszczkowej.

9.3. Dokładność procedury

9.3.1. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych równocześnie bądź w bezpośrednim następstwie przez tego samego analityka za pomocą tej samej aparatury na identycznym materiale badanym nie przekracza 0,2 % m/m.

9.3.2. Odtwarzalność

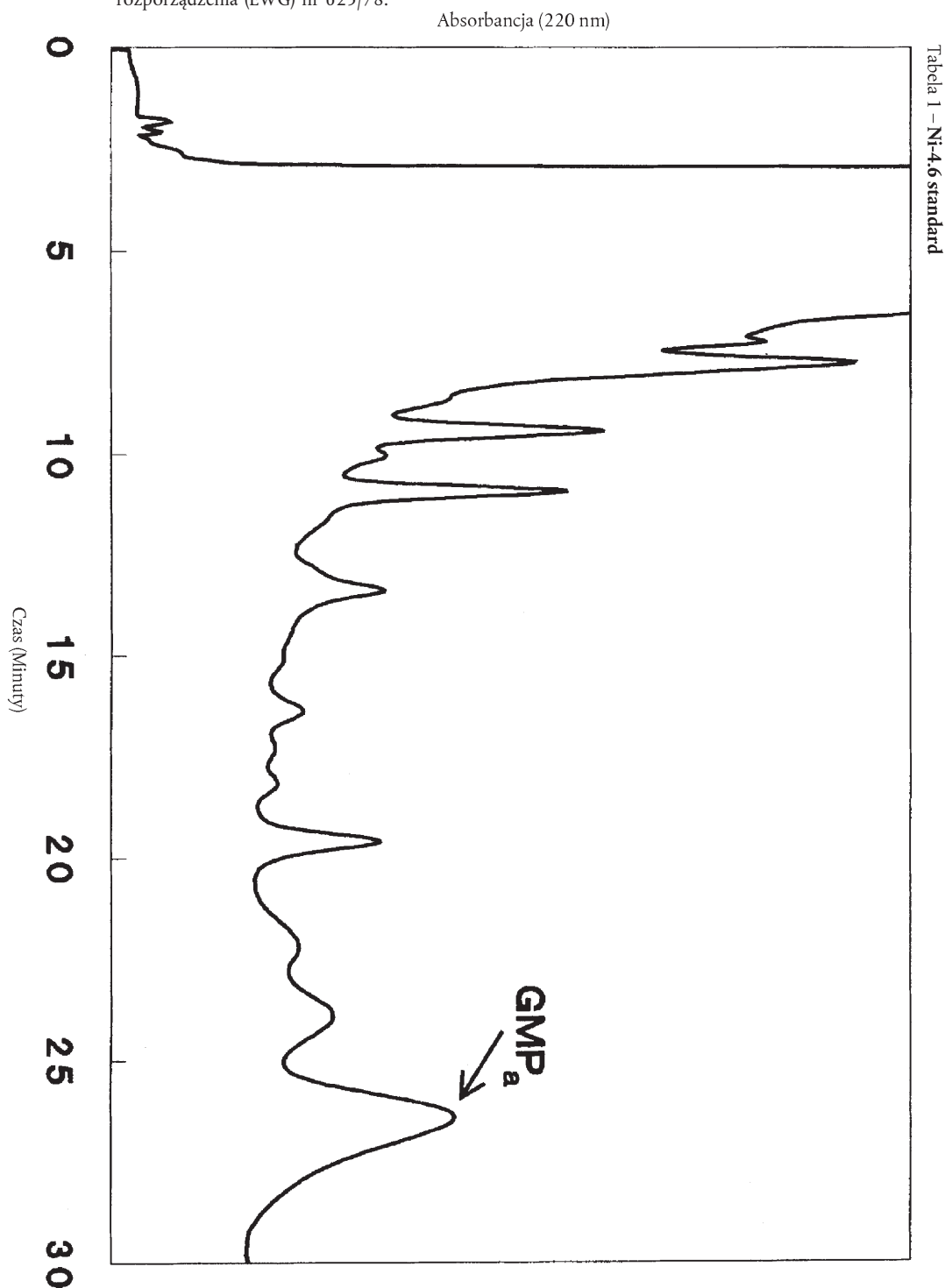
Dotychczas nieustalona.

9.3.3. Liniowość

Przy 0–16 % serwatki podpuszczkowej powinna zostać uzyskana zależność liniowa, ze współczynnikiem korelacji > 0,99.

9.4. Interpretacja

9.4.1. Uważa się, że serwatka występuje, w przypadku gdy wynik otrzymany w ppkt 9.2. jest wyższy niż 1 % m/m, a czas retencji pików GMP różni się o mniej niż 0,2 minuty od czasu dla próbki wzorcowej (5). Wartość graniczna wynosząca 1 % jest ustalana zgodnie z przepisami ppkt 9.2 i 9.4.1 załącznika V do rozporządzenia (EWG) nr 625/78.



ZAŁĄCZNIK XX

(Art. 14)

ODTŁUSZCZONE MLEKO W PROSZKU: ILOŚCIOWE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI FOSFATYDYLOSERYNY I FOSFATYDYLOETANOLAMINY**Metoda HPLC z odwróconymi fazami****1. Zakres i dziedzina stosowania**

Metoda opisuje procedurę ilościowego oznaczania fosfatydyloseryny (PS) oraz fosfatydyloetanolaminy (PE) w odtłuszczonej mleku w proszku (SMP) i nadaje się do wykrywania suchej masy maślanki w odtłuszczonej mleku w proszku.

2. Definicja

Zawartość PS + PE: ułamek masowy substancji oznaczony z wykorzystaniem procedury określonej niniejszym. Wynik wyrażony jest w miligramach dipalmitoilu fosfatydyloetanolaminy (PEDP) na 100 g proszku.

3. Zasada

Ekstrakcja aminofosfolipidów z odtworzonego odtłuszczonego mleka w proszku za pomocą metanolu. Oznaczanie PS i PE jako pochodnych o-ftalodialdehydu (OPA) metodą HPLC z odwróconymi fazami (RP) oraz wykrywanie fluoroscencyjne. Kwantyfikacja zawartości PS i PE w badanej próbce przez odniesienie do próbki wzorcowej zawierającej znaną ilość PEDP.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej. Woda musi być destylowana lub co najmniej o równorzędnej czystości, chyba że ustalono inaczej.

4.1. *Materiał wzorcowy: PEDP, czystość co najmniej 99 %*

Uwaga: Materiał wzorcowy musi być przechowywany w temperaturze -18°C .

4.2. *Odczynniki do przygotowania próbki wzorcowej i próbki do badań*

4.2.1. Metanol czystości HPLC

4.2.2. Chloroform czystości HPLC

4.2.3. Chlorowodorek tryptaminy

4.3. *Odczynniki do derywatywacji o-ftalodialdehydu*

4.3.1. Wodorotlenek sodu, roztwór wodny 12 M

4.3.2. Kwas borny, roztwór wodny 0,4 M dostosowany do 10,0 pH za pomocą wodorotlenku sodu (ppkt 4.3.1)

4.3.3. 2-markaptoetanol

4.3.4. o-ftalodialdehyd (OPA)

4.4. *Rozpuszczalniki elucyjne do HPLC*

Rozpuszczalniki elucyjne muszą być przygotowane przy użyciu odczynników czystości HPLC.

4.4.1. Woda czystości HPLC

4.4.2. Metanol o czystości sprawdzonej fluorometrycznie.

4.4.3. Tetrahydrofuran

4.4.4. Diwodorofosforan sodu

4.4.5. Octan sodu

4.4.6. Kwas octowy

5. Aparatura

5.1. Waga analityczna

5.2. Zlewki o pojemności 25 i 100 ml

5.3. Pipety, dozujące 1 i 10 ml

5.4. Mieszadło magnetyczne

- 5.5. Kalibrowane pipety, dozujące 0,2, 0,5 i 5 ml
- 5.6. Kolby pomiarowe o pojemności 10, 50 i 100 ml
- 5.7. Strzykawki o pojemności 20 i 100 μ l
- 5.8. Łaźnia ultradźwiękowa
- 5.9. Wirówka działająca przy 27 000 \times g
- 5.10. Fiolki szklane o pojemności około 5 ml
- 5.11. Cylinder pomiarowy o pojemności 25 ml
- 5.12. Pehametr
- 5.13. Sprzęt do HPLC
 - 5.13.1. System pompujący o podwójnym gradiencie o możliwości działania 1,0 ml/min przy 200 barach
 - 5.13.2. Automatyczny próbnik do pobierania próbek o zdolności różniczkującej.
 - 5.13.3. Ogrzewacz kolumnowy ustawiony na 30 °C
 - 5.13.4. Detektor fluorescencji ustawiony na długość fal wzbudzenia 330 nm i długość fal emisji 440 nm
 - 5.13.5. Integrator lub oprogramowanie do przetwarzania danych zdolne do pomiaru powierzchni pików
 - 5.13.6. Kolumna Lichrosphere – 100 (250 \times 4,6 mm) lub równorzędna kolumna wypełniona oktadecylosilanem (C18) o wielkości cząsteczek 5 μ m

6. Pobieranie próbek

Pobieranie próbek musi być przeprowadzane zgodnie z normą IDF 50B: 1985.

7. Procedura

7.1. Przygotowanie wewnętrznego roztworu wzorcowego

Odmierzyć wagowo 30,0 \pm 0,1 mg chlorowodoru tryptaminy (ppkt 4.2.3) do 100 ml kolby pomiarowej (ppkt 5.6), uzupełnić do znaku metanolem (ppkt 4.2.1). Odmierzyć pipetą (ppkt 5.3) 1 ml tego roztworu do kolby pomiarowej 10 ml (ppkt 5.6) i uzupełnić do znaku metanolem (ppkt 4.2.1), w celu uzyskania stężenia 0,15 mM tryptaminy.

7.2. Przygotowanie roztworu próbki badanej

Odmierzyć wagowo 1,000 \pm 0,001 g próbki odtłuszczonego mleka w proszku do 25 ml zlewki (ppkt 5.2). Dodać pipetą (ppkt 5.3) 10 ml wody destylowanej o temperaturze 40 °C i mieszać mieszadłem magnetycznym (ppkt 5.4) przez 30 min do całkowitego rozpuszczenia grudek. Odmierzyć pipetą (ppkt 5.5) 0,2 ml odtworzonego mleka do 10 ml kolby pomiarowej (ppkt 5.6), za pomocą strzykawki (ppkt 5.7) dodać 100 μ l roztworu 0,15 mM tryptaminy (ppkt 7.1) i uzupełnić objętość metanolem (ppkt 4.2.1). Wymieszać dokładnie, odwracając kolbę i poddając działaniu ultradźwięków (ppkt 5.8) przez 15 minut. Odwirowywać (ppkt 5.9) przy 27 000 \times g przez 10 minut i zebrać supernatant do szklanej próbówki (ppkt 5.10).

Uwaga: Do chwili przeprowadzania analizy HPLC roztwór próbki do badań powinien być przechowywany w temperaturze 4 °C.

7.3. Przygotowanie zewnętrznego roztworu wzorcowego

Odmierzyć wagowo 55,4 mg PEDP (ppkt 4.1) do 50 ml kolby pomiarowej (ppkt 5.6) i dodać około 25 ml chloroformu (ppkt 4.2.2), używając kalibrowanego cylindra (ppkt 5.11). Ogrzać zakorkowaną kolbę do 50 °C i wymieszać dokładnie, aż do rozpuszczenia PEDP. Schłodzić kolbę do 20 °C, uzupełnić objętość metanolem (ppkt 4.2.1) i wymieszać odwracając. Odmierzyć pipetą 1 ml (ppkt 5.3) tego roztworu do 100 ml kolby pomiarowej (ppkt 5.6), uzupełnić objętość metanolem (ppkt 4.2.1). Odmierzyć pipetą 1 ml (ppkt 5.3) tego roztworu do 10 ml kolby pomiarowej (ppkt 5.6), dodać 100 μ l (ppkt 5.7) roztworu 0,15 mM tryptaminy (ppkt 7.1) i uzupełnić objętość metanolem (ppkt 4.2.1). Wymieszać, odwracając.

Uwaga: Do chwili przeprowadzania analizy HPLC roztwór próbki wzorcowej powinien być przechowywany w temperaturze 4 °C.

7.4. Przygotowanie odczynnika derywatyzyjnego

Odmierzyć wagowo 25,0 \pm 0,1 mg OPA (ppkt 4.3.4) do 10 ml kolby pomiarowej (ppkt 5.6), dodać 0,5 ml (ppkt 5.5) metanolu (ppkt 4.2.1) i wymieszać dokładnie w celu rozpuszczenia OPA. Uzupełnić do znaku roztworem kwasu bornego (ppkt 4.3.2) i dodać 20 μ l 2-markaptoetanolu (ppkt 4.3.3), używając strzykawki (ppkt 5.7).

Uwaga: Odczynnik derywatyzyjny powinien być przechowywany w temperaturze 4 °C w ciemnej probówce, kiedy to zachowuje stabilność przez okres jednego tygodnia.

7.5. Oznaczanie za pomocą HPLC

7.5.1. Rozpuszczalniki elucyjne (ppkt 4.4)

Rozpuszczalnik A:

Roztwór 0,3 mM diwodorofosforanu sodu i roztwór 3 mM octanu sodu (dostosowane do pH 6,5 za pomocą kwasu octowego): metanol: tetrahydrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Rozpuszczalnik B:

metanol

7.5.2. Zalecany gradient elucji

Czas (min)	Rozpuszczalnik A (%)	Rozpuszczalnik B (%)	Prędkość przepływu (ml/min)
Początkowy	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Uwaga: W celu uzyskania rozdzielania pokazanego na rysunku 1 może okazać się konieczna lekka modyfikacja gradientu elucji.

Temperatura kolumny: 30 °C.

7.5.3. Objętość iniekcji: 50 µl odczynnika derywatyzacyjnego i 50 µl roztworu próbki.

7.5.4. Równoważenie kolumny

Uruchamiając układ codziennie, sfluować kolumny rozpuszczalnikiem B o 100-procentowym stężeniu przez 15 minut, następnie ustalić rozpuszczalniki A i B w proporcji 40: 60 i wyrównać do poziomu 1 ml/min dla 15 minut. Przeprowadzić ślepią próbę poprzez iniekcję metanolu (ppkt 4.2.1).

Uwaga: Przed długotrwałym przechowywaniem płukać kolumnę roztworem metanolu i chloroformu w proporcji 80: 20 (v/v) przez 30 minut.

7.5.5. Oznaczenie zawartości PS + PE w badanej próbce.

7.5.6. Przeprowadzić serię analiz chromatograficznych, utrzymując stały czas między seriami w celu uzyskania stałych okresów retencji. Wprowadzać zewnętrzny roztwór wzorcowy (ppkt 7.3) co 5–10 roztworów badanych próbek w celu ustalenia współczynnika odpowiedzi.

Uwaga: Kolumna musi być czyszczona przez płukanie 100-procentowym rozpuszczalnikiem B (ppkt 7.5.1) co najmniej przez 30 minut, co 20–25 serii.

7.6. Sposób całkowania

7.6.1. Pik PEDP

PEDP jest eluowany jak pojedynczy pik. Oznaczyć powierzchnię piku przez całkowanie powierzchni pików (dolina-dolina).

7.6.2. Pik tryptaminy

Tryptamina jest eluowana jak pojedynczy pik (rysunek 1). Oznaczyć powierzchnię piku poprzez całkowanie powierzchni pików (dolina-dolina).

7.6.3. Grupy pików PS i PE

Na niżej opisanych warunkach (rysunek 1) PS jest eluowany w formie dwóch częściowo nierozdzielonych pików poprzedzonych mniejszym pikiem. PE jest wypłukiwany/eluowany w formie trzech częściowo nierozdzielonych pików. Oznaczyć całkowitą powierzchnię każdej grupy pików przez utworzenie linii podstawowej zgodnie z rysunkiem 1.

8. Obliczanie i prezentacja wyników

Zawartość PS i PE w próbce badanej oblicza się, jak następuje:

$$C = 55,36 \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{T_1}{T_2}$$

gdzie:

C = zawartość PS lub PE (mg/100 g proszku) w próbce badanej

A₁ = powierzchnia pików PEDP roztworu próbki wzorcowej (ppkt 7.3)

A₂ = powierzchnia pików PS lub PE roztworu próbki badanej (ppkt 7.2)

T₁ = powierzchnia pików tryptaminy w roztworze próbki wzorcowej (ppkt 7.3)

T₂ = powierzchnia pików tryptaminy w roztworze próbki badanej (ppkt 7.2)

9. Dokładność

Uwaga: Wartości dotyczące powtarzalności zostały obliczone zgodnie z międzynarodową normą IDF (¹). Tymczasową wartość graniczną odtwarzalności obliczono zgodnie z procedurą określoną w załączniku III lit. b) do niniejszego rozporządzenia.

9.1. Powtarzalność

Względne odchylenie standardowe powtarzalności, wyrażające zmienność niezależnych wyników analitycznych otrzymanych przez ten sam podmiot, wykorzystujący tę samą aparaturę, w takich samych warunkach, na takiej samej próbce badanej oraz w krótkim odstępie czasu, nie powinno przekraczać 2 % względne. Jeżeli dwa oznaczenia są otrzymane w tych warunkach, względna różnica między dwoma wynikami nie powinna być większa niż 6 % średniej arytmetycznej wyników.

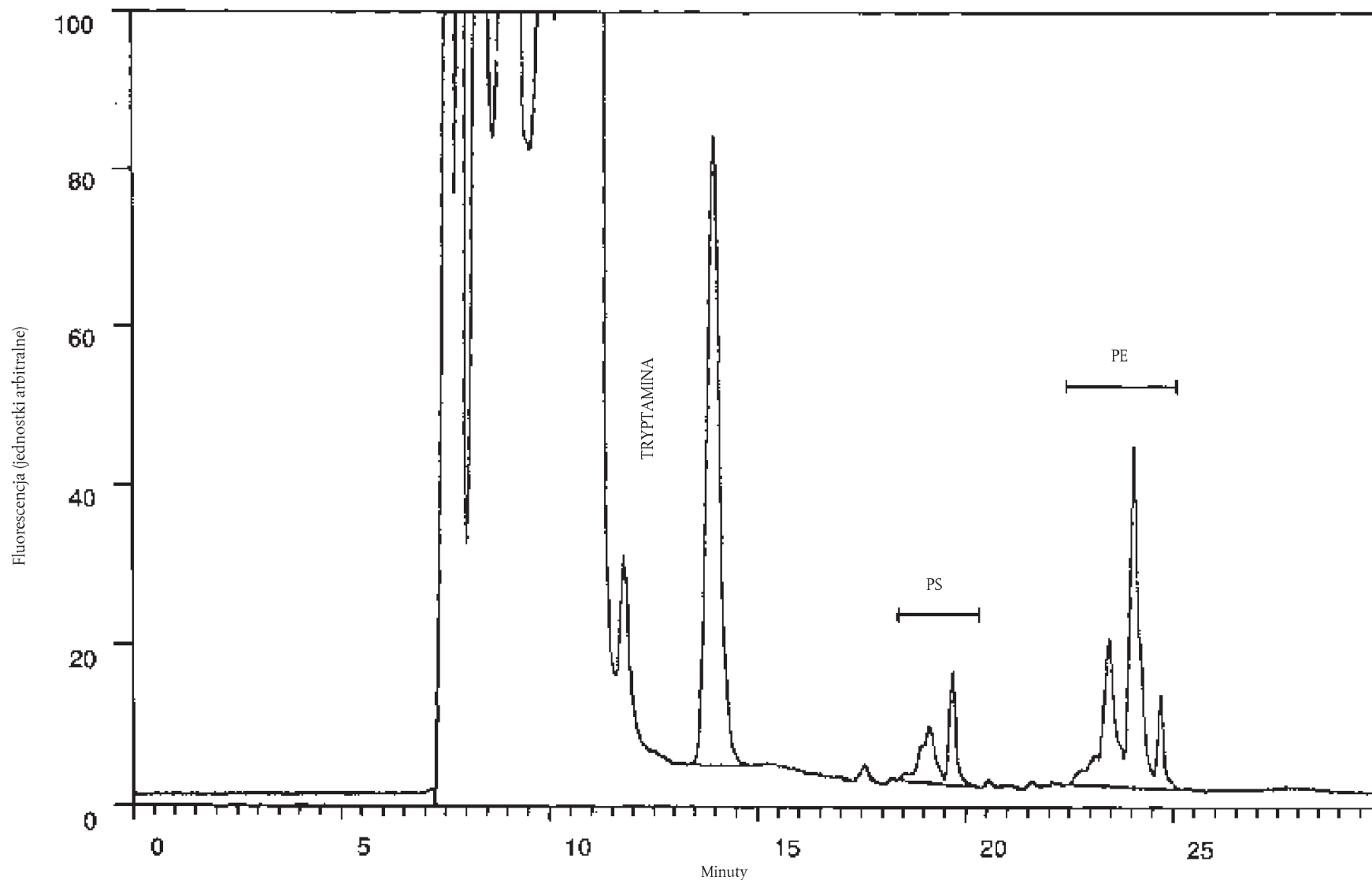
9.2. Odtwarzalność

Jeżeli dwa oznaczenia otrzymane są przez podmioty w różnych laboratoriach wykorzystujące różną aparaturę w różnych warunkach, podczas analizy tej samej próbki względna różnica między dwoma wynikami nie powinna być większa niż 11 % średniej arytmetycznej wyników.

10. Odniesienia:

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Ramilli M.: „Detection of buttermilk solids in skim-milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids”. Sci. Tecn. Latt.-Cas. 39,395 (1988).

⁽¹⁾ Międzynarodowa norma IDF 135B/1991. Mleko i przetwory mleczne. Charakterystyka precyzji metod analitycznych. Zarys procedury współpracy badawczej.



Rysunek 1: Wzór HPLC dla pochodnych OPA fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloetanolaminy (PE) w wyciągu metanolowym odtworzonego odtuszczonego mleka w proszku. Podaje się całkowanie dla pików PS, PE i tryptaminy (wzór wewnętrzny).

Rysunek 1: Wzór HPLC dla pochodnych OPA fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloetanolaminy (PE) w wyciągu metanolowym odtworzonego odtuszczonego mleka w proszku. Podaje się całkowanie dla pików PS, PE i tryptaminy (wzór wewnętrzny).

ZAŁĄCZNIK XXI

(Art. 15)

WYKRYWANIE POZOSTAŁOŚCI ANTYBIOTYKÓW I SULFONAMIDÓW/DAPSONU W ODTŁUSZCZONYM MLEKU W PROSZKU

Stosuje się badanie przesiewowe na inhibicję mikrobiologiczną, przy użyciu *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 jako mikroorganizmu badanego, o czułości odpowiedniej do wykrycia w mleku 4 µg benzylopenicyliny oraz 100 µg sulfadymidyny. W handlu są dostępne zestawy do badań i można ich używać, o ile mają one wymaganą czułość w odniesieniu do benzylopenicyliny i sulfadymidyny (¹).

Do badania używa się odtworzonego odtłuszczonego mleka w proszku (1 g proszku + 9 ml wody destylowanej). Badanie przeprowadza się w sposób opisany w biuletynie IDF – nr 258/1991, sekcja 1, rozdział 2, bądź zgodnie z instrukcją producenta zestawu do badań.

Wyniki pozytywne należy interpretować w sposób następujący:

- 1) Powtórzyć badanie, dodając do systemu badawczego penicylinazę.
Wynik *pozytywny*: Za pomocą tej procedury nie można zidentyfikować substancji hamującej.
Wynik *negatywny*: Substancją hamującą jest antybiotyk beta-laktam.
- 2) Powtórzyć badanie, dodając do systemu badawczego kwas p-aminobenzoowy.
Wynik *pozytywny*: Za pomocą tej procedury nie można zidentyfikować substancji hamującej.
Wynik *negatywny*: Substancją hamującą jest sulfonamid/dapson.
- 3) Powtórzyć badanie, dodając do systemu badawczego penicylinazę + kwas p-aminobenzoowy.
Wynik *pozytywny*: Za pomocą tej procedury nie można zidentyfikować substancji hamującej.
Wynik *negatywny*: Substancjami hamującymi są antybiotyk beta-laktam oraz sulfonamid/dapson.

⁽¹⁾ Ważne spostrzeżenie: Przy analizie odtłuszczonego mleka w proszku można uzyskać wyniki fałszywie pozytywne. Dlatego ważne jest sprawdzenie, czy wykorzystywany system badawczy nie daje wyników fałszywie pozytywnych.

ZAŁĄCZNIK XXII

(Art. 16)

ILOŚCIOWE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI MLEKA ODTŁUSZCZONEGO W PROSZKU W MIESZANKACH PASZOWYCH, METODĄ ENZYMATYCZNEJ KOAGULACJI PARAKAZEINY**1. Cel**

Ilościowe oznaczenie zawartości mleka odtłuszczonego w proszku w mieszankach paszowych metodą enzymatycznej koagulacji parakazeiny.

2. Zakres

Metoda ma zastosowanie w odniesieniu do mieszanek paszowych zawierających co najmniej 10 % odtłuszczonego mleka w proszku; duże ilości maślanki i/lub niektórych białek nie pochodzących z mleka mogą prowadzić do powstania zakłóceń.

3. Zasada metody

- 3.1. Rozpuszczenie kazeiny zawartej w mieszance paszowej poprzez ekstrahowanie za pomocą roztworu cytrynianu sodu.
- 3.2. Dostosowanie stężenia jonów wapnia do wymaganego poziomu w celu oddzielenia parakazeiny; parakazeina uzyskiwana jest z kazeiny poprzez dodanie podpuszczki.
- 3.3. Zawartość azotu w osadzie parakazeiny określana jest metodą Kjeldahla, zgodnie z opisem w normie 20A 1986; ilość odtłuszczonego mleka w proszku jest obliczana na podstawie minimalnej zawartości kazeiny wynoszącej 27,5 % (patrz ppkt 9.1).

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej. Woda wykorzystywana musi być wodą destylowaną lub wodą co najmniej o równorzędnej czystości. Z wyjątkiem podpuszczki (ppkt 4.5) wszystkie odczynniki i roztwory muszą być wolne od substancji azotowych.

- 4.1. Cytrynian (tri) sodu, dihydrat (1 % roztwór).
- 4.2. Chlorek wapnia (roztwór 2M). Odmierzyć wagowo 20,018 g CaCO_3 (jakość analityczna) w naczyniu porcelanowym o odpowiedniej wielkości (od 150 do 200 ml) lub w zlewce. Zalać wodą destylowaną i przenieść do łaźni o wrzącej wodzie. Dodawać powoli 50–60 ml roztworu HCl (koncentrat HCl: woda = 1:1) w celu całkowitego rozpuszczenia węglanu. Utrzymywać w łaźni o wrzącej wodzie do chwili uzyskania suchego CaCl_2 , w celu wyeliminowania HCl, który nie wszedł w reakcję. Przenieść za pomocą wody destylowanej do 100 ml kolby pomiarowej i rozcieńczyć do znaku. Zmierzyć wartość pH, która nie może być mniejsza niż 4,0. Przechowywać roztwór w chłodziarce.
- 4.3. Wodorotlenek sodu 0,1 N.
- 4.4. Kwas chlorowodorowy 0,1 N.
- 4.5. Płynna podpuszczka cielęca (wzorcowe stężenie 1:10 000). Przechowywać w chłodziarce w temperaturze od 4 do 6 °C.
- 4.6. Odczynniki do ilościowego oznaczania azotu według metody Kjeldahla, zgodnie z opisem w normie IDF 20A 1986.

5. Aparatura

Typowa aparatura laboratoryjna, składająca się z:

- 5.1. Moździerz lub homogenizatora
- 5.2. Wagi analitycznej
- 5.3. Wirówki przenośnej (2000–3000 obr./min) z rurkami o pojemności 50 ml
- 5.4. Mieszadła magnetycznego z adherentami (10–15 mm)
- 5.5. Zlewki 150–200 ml
- 5.6. Kolby 250 oraz 500 ml
- 5.7. Lejeków szklanych o średnicy 60–80 mm
- 5.8. Szybko filtrującej bezpopiołowej bibuły, o średnicy 150 mm (S.S. 589, S.S. 595 1/2)
- 5.9. Pipet o różnych pojemnościach nominalnych

- 5.10. Łaźni wodnej termostatowanej w temperaturze 37 °C
- 5.11. Pehametru
- 5.12. Zestawu do wytrawiania i destylacji metodą Kjeldahla wraz z osprzętem
- 5.13. 25 ml kalibrowanych biuretów
- 5.14. Plastikowej tryskawki do wody destylowanej
- 5.15. Łopatkę ze stali nierdzewnej
- 5.16. Termometrów
- 5.17. Pieca suszarniczego, regulowanego termostatycznie.

6. Procedura

- 6.1. Przygotowanie próbki.
Zetrzeć w moździerzu lub zhomogenizować w młynku 10–20 g próbki w celu uzyskania jednorodnej mieszanki.
- 6.2. Rozpuszczenie mleka w proszku oraz oddzielenie nierozpuszczalnych pozostałości.
 - 6.2.1. Odmierzyć wagowo 1,000 +/- 0,002 g dobrze zhomogenizowanej mieszanki paszowej (ppkt 6.1) bezpośrednio do rurki wirówkowej o pojemności 50 ml. Dodać 30 ml roztworu cytrynianu (tri) sodu (ppkt 4.1) podgrzanego uprzednio do temperatury 45 °C. Mieszać za pomocą mieszadła magnetycznego co najmniej przez pięć minut.
 - 6.2.2. Wirować przy 500 g (2000–3000 obr./min) przez 10 minut, a następnie dekantować czysty wodny supernatant do zlewki o pojemności od 150 do 200 ml, dbając o to, aby nie przelać żadnej części luźnego materiału pozostającego na dnie.
 - 6.2.3. Przeprowadzić dwie kolejne ekstrakcje pozostałości, według tej samej procedury, dodając uzyskane ekstrakty do pierwszego.
 - 6.2.4. Jeżeli na powierzchni utworzy się warstwa oleju, schłodzić ekstrakt w chłodziarce do chwili zestalenia się tłuszczu i usunąć zestaloną warstwę za pomocą łopatki.
- 6.3. Koagulacja kazeiny za pomocą enzymów podpuszczki.
 - 6.3.1. Nie przerywając mieszania, dodawać po kropli 3,4 ml nasyconego roztworu chlorku wapnia (ppkt 4.2) do całości ekstraktu wodnego (około 100 ml). Dostosować pH do 6,4–6,5 przy użyciu roztworów NaOH (ppkt 4.3) lub HCl (ppkt 4.4). Umieścić w regulowanej termostatycznie łaźni wodnej w temperaturze 37 °C na 15–20 minut w celu uzyskania równowagi solnej. Stanie się to bardzo wyraźne poprzez uformowanie się lekkiego zmętnienia.
 - 6.3.2. Przenieść płyn do jednej (lub dwóch) rurek wirówkowych i odwirowywać przy 2000 g przez 10 minut w celu usunięcia wytrąconego materiału. Przenieść supernatant, nie splukując osadu, do jednej (lub dwóch) rurek wirówkowych.
 - 6.3.3. Doprowadzić temperaturę supernatantu z powrotem do 37 °C. Mieszając ekstrakt, dodawać po kropli, 0,5 ml płynnej podpuszczki (ppkt 4.5). Koagulacja zachodzi w ciągu jednej lub dwóch minut.
 - 6.3.4. Włożyć z powrotem próbkę do łaźni wodnej i pozostawić w temperaturze 37 °C na 15 minut. Wyjąć próbkę z łaźni i rozbić koagulat poprzez mieszanie. Wirować przy 2000 g przez 10 minut. Filtrować supernatant przez odpowiednią bibułę filtracyjną⁽¹⁾ (Whatman nr 541 lub równorzędną) i zachować bibułę filtracyjną. Przemycić osad, mieszając go w rurce wirówkowej z 50 ml wody o przybliżonej temperaturze 35 °C.

Wirować ponownie przy 2000 g przez 10 minut. Przefiltrować supernatant przez zachowaną poprzednio bibułę filtracyjną.
- 6.4. Oznaczanie zawartości azotu w kazeinie
 - 6.4.1. Po przemyciu przenieść ilościowo osad na zachowaną poprzednio bibułę filtracyjną (ppkt 6.3.4), używając wody destylowanej. Przenieść bibułę filtracyjną do kolby Kjeldahla. Oznaczyć zawartość azotu metodą Kjeldahla, zgodnie z jej opisem w IDF normie 20A 1986.

7. Ślepa próba

- 7.1. Ślepa próba jest przeprowadzana regularnie z wykorzystaniem bezpopiołowej bibuły filtracyjnej (ppkt 5.8) zwilżonej mieszaniną składającą się z 90 ml roztworu cytrynianu sodu (ppkt 4.1), 1 ml nasyconego roztworu chlorku wapnia (ppkt 4.2), 0,5 ml podpuszczki płynnej (ppkt 4.5) i przemytej z użyciem 3 × 15 ml wody destylowanej przed mineralizacją za pomocą metody Kjeldahla, zgodnie z jej opisem w IDF normie 20A 1986.
- 7.2. Objętość kwasu użytego do przeprowadzenia ślepej próby musi zostać odjęta od objętości kwasu (ppkt 4.4) użytego do miareczkowania próbki.

⁽¹⁾ Ponieważ powinna być zastosowana bezpopiołowa bibuła do szybkiego filtrowania.

8. Próba kontrolna

- 8.1. W celu zbadania wspomnianej powyżej procedury oraz odczynników wykonać oznaczenie na wzorcowej mieszance paszowej o znanej zawartości odtuszczonego mleka w proszku ustalonej w trakcie badań międzylaboratoryjnych. Przeciętny wynik podwójnego oznaczenia nie powinien różnić się więcej niż 1 % od wyniku badania międzylaboratoryjnego.

9. Sposób prezentowania wyników

- 9.1. Wartość procentowa mleka odtuszczonego w proszku w mieszankach paszowych jest obliczana za pomocą poniższego wzoru:

$$\% \text{ MMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) - 2,81}{0,908}$$

gdzie N jest wartością procentową azotu parakazeiny; 27,5 stanowi współczynnik służący konwersji oznaczonej kazeiny na wartość procentową mleka odtuszczonego w proszku; 2,81 oraz 0,908 są współczynnikami korygującymi otrzymanymi z analizy regresji.

10. Dokładność metody

10.1. Powtarzalność

Co najmniej w 95 % przebadanych przypadków podwójna analiza tej samej próbki przez ten sam podmiot w tym samym laboratorium musi dawać różnice wyników równoważne wielkości nie większej niż 2,3 g odtuszczonego mleka w proszku, w 100 g mieszanki paszowej.

10.2. Odtwarzalność

Co najmniej w 95 % przebadanych przypadków ta sama próbka analizowana przez dwa laboratoria musi dawać różnice wyników nie większe niż 6,5 g odtuszczonego mleka w proszku, w 100 g mieszanki paszowej.

11. Granica tolerancji

Wartość CrD_{95} (różnica krytyczna; 95 % poziom ufności) jest obliczana z wykorzystaniem wzoru (ISO 5725):

$$CrD_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

Odtwarzalność; r: powtarzalność

Podwójne oznaczenie: $CrD_{95} = 4,5 \text{ g}$

W przypadku gdy wynik analizy chemicznej różni się od deklarowanej zawartości mleka odtuszczonego w proszku o nie więcej niż 4,5 g (podwójne oznaczenie), przesyłkę mieszanki paszowej uważa się za zgodną z niniejszym przepisem rozporządzenia.

12. Uwagi

- 12.1. Dodanie dużych wartości procentowych niektórych białek nie pochodzących z mleka, w szczególności białek soi, podczas podgrzewania z mlekiem odtuszczonego w proszku, może prowadzić do uzyskania zbyt wysokich wyników z powodu współdzielania z parakazeiną mleka.
- 12.2. Dodanie maślanek może prowadzić do uzyskania nieco zaniżonych wartości liczbowych, z tego powodu, że oznaczona jest wyłącznie część beztuszczonego. Dodanie niektórych maślanek kwasowych może dawać znacznie niższe wartości liczbowe, z powodu niepełnej rozpuszczalności w roztworze cytrynianu.
- 12.3. Dodatki lecytyny wielkości 0,5 % lub większe mogą również prowadzić do niskich wyników.
- 12.4. Dodanie mocno podgrzanego mleka odtuszczonego w proszku może prowadzić do uzyskania zbyt wysokich wartości liczbowych z powodu współ-wydzielania niektórych białek serwatki z parakazeiną mleka.

ZAŁĄCZNIK XXIII

(Art. 17)

JAKOŚCIOWE OZNACZANIE SKROBI W MLEKU ODTŁUSZCZONYM W PROSZKU, W ZDENATUROWANYM MLEKU W PROSZKU ORAZ W MIESZANKACH PASZOWYCH**1. Zakres**

Metoda służy do wykrywania skrobi, która jest wydzielana w ilościach śladowych w zdenaturowanych mlekach w proszku.

Wartość graniczna wykrywalności metody wynosi w przybliżeniu 0,05 g skrobi na 100 g próbki.

2. Zasada

Reakcja oparta jest na reakcji wykorzystywanej w jodometrii:

- wiązanie za pomocą koloidów wolnego jodu w roztworze wodnym,
- absorpcja za pomocą miceli skrobi oraz za pomocą zabarwienia.

3. Odczynniki**3.1. Roztwór jodu**

- jod 1 g,
- jodek potasu 2 g,
- woda destylowana 100 ml.

4. Aparatura

- 4.1. Waga analityczna
- 4.2. Łaźnia wodna
- 4.3. Rurki do badań, 25 mm × 200 mm.

5. Procedura

Odmierzyć wagowo 1 g próbki i umieścić tę ilość w rurce do badań (ppkt 4.3).

Dodać 20 ml wody destylowanej i wstrząsnąć w celu rozprowadzenia próbki.

Umieścić w łaźni wrzącej wody (ppkt 4.2) i pozostawić na pięć minut.

Wyjąć z łaźni i schłodzić do temperatury pokojowej.

Dodać 0,5 ml roztworu jodu (ppkt 3.1), wstrząsnąć i zaobserwować pojawiający się kolor.

6. Sposób prezentowania wyników

Zabarwienie niebieskie wskazuje na obecność naturalnej skrobi w próbce.

W przypadku gdy próbka zawiera skrobię modyfikowaną, zabarwienie może nie być niebieskie.

7. Uwagi

Zabarwienie, intensywność zabarwienia oraz obecność skrobi widzianej pod mikroskopem będą się różnić w zależności od pochodzenia skrobi naturalnej (np. kukurydza lub ziemniak) oraz od rodzaju skrobi modyfikowanej obecnej w próbce.

W obecności skrobi zmodyfikowanych wytworzone zabarwienie zmieni się na fioletowe, czerwone lub brązowe, zgodnie ze stopniem modyfikacji struktury krystalicznej skrobi naturalnej.

ZAŁĄCZNIK XXIV

(Art. 18)

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WILGOCI W KWASOWEJ MAŚLANCE W PROSZKU

1. Zakres

Oznaczyć zawartość wilgoci w kwasowej maślanie w proszku przeznaczonej na pasze dla zwierząt.

2. Zasada

Próbka jest suszona w warunkach próżni. Ubytek masy oznaczany jest przez ważenie.

3. Aparatura

- 3.1. Waga analityczna
- 3.2. Suche pojemniki z niekorodującego metalu lub ze szkła, zaopatrzone w pokrywki zapewniające szczelne zamknięcie; powierzchnia robocza umożliwiająca rozprowadzenie badanej próbki do wartości około 0,3 g/cm².
- 3.3. Regulowany, ogrzewany elektrycznie piec próżniowy, wyposażony w pompę olejową oraz albo w mechanizm służący do wprowadzania gorącego suchego powietrza, albo w środek suszący (np. tlenek wapnia).
- 3.4. Eksykator zawierający skuteczny środek suszący.
- 3.5. Piec suszarniczy, wentylowany, regulowany termostycznie, w temperaturze 102 ± 2 °C.

4. Procedura

Podgrzewać pojemnik (ppkt 3.2) wraz z pokrywką w piecu (ppkt 3.5) co najmniej przez jedną godzinę. Umieścić pokrywkę na pojemniku, natychmiast przenieść go do eksykatora (ppkt 3.4) i schłodzić do temperatury pokojowej oraz zważyć z dokładnością do 0,5 mg.

Zważyć pojemnik (ppkt 3.2) wraz z jego pokrywką, z dokładnością do 0,5 mg. W zważonym pojemniku odmierzyć wagowo, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki i rozprowadzić ją równomiernie. Umieścić pojemnik bez pokrywki, w piecu próżniowym (ppkt 3.3) podgrzany wcześniej do temperatury 83 °C. Aby zapobiec nadmieremu spadkowi temperatury, możliwie jak najszybciej umieścić pojemnik w piecu.

Doprowadzić ciśnienie do 100 Torr (13,3 kPa) i pozostawić do wyschnięcia na cztery godziny w takim ciśnieniu, albo w strumieniu suchego, gorącego powietrza, albo wysuszyć za pomocą środka suszącego (około 300 g na 20 próbek). Następnie wyłączyć pompę próżniową, gdy osiągnięte zostanie zalecane ciśnienie. Odliczać czas suszenia od chwili, kiedy temperatura pieca powróci do wartości 83 °C. Ostrożnie doprowadzić piec do ciśnienia atmosferycznego. Otworzyć piec i natychmiast umieścić pokrywkę na pojemniku, wyjąć pojemnik z pieca, pozostawić do schłodzenia na 30–45 minut w eksykatorze (ppkt 3.4) oraz zważyć z dokładnością do 1 mg. Suszyć przez dodatkowe 30 minut w piecu próżniowym (ppkt 3.3) w temperaturze 83 °C oraz ponownie zważyć. Różnica między wynikami dwóch ważeń nie powinna przekraczać 0,1 % wilgoci.

5. Obliczenie

$$(E-m) \cdot \frac{100}{E}$$

gdzie:

E = masa początkowa badanej próbki w gramach,

m = masa suchej próbki badanej w gramach.

6. Dokładność

6.1. Wartość graniczna powtarzalności

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych w możliwie najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot za pomocą tej samej aparatury na identycznym materiale badanym nie przekracza 0,4 g wody/100 g kwasowej maślanki w proszku.

6.2. *Wartość graniczna odtwarzalności*

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzanych przez podmioty w różnych laboratoriach za pomocą różnej aparatury na identycznym materiale badanym nie przekracza 0,6 g wody/100 g kwasowej maślanki w proszku.

6.3. *Źródło danych dotyczących dokładności*

Dane dotyczące dokładności zostały określone w czasie doświadczeń przeprowadzanych w 1995 r., które obejmowały osiem laboratoriów i 12 próbek (sześć ślepych duplikatów).

ZAŁĄCZNIK XXV

(Art. 19)

METODA REFERENCYJNA SŁUŻĄCA DO WYKRYWANIA OBCYCH TŁUSZCZÓW W TŁUSZCZU MLEKA W DRODZE GAZOWO-CHROMATOGRAFICZNEJ ANALIZY TRIGLICERYDÓW – REWIZJA 1**1. Zakres i dziedzina stosowania**

Niniejsza norma ustanawia metodę służącą do wykrywania obcych tłuszczów, zarówno tłuszczów roślinnych, jak i tłuszczów zwierzęcych, takich jak łój wołowy oraz smalec, w tłuszczu mleka lub przetworów mlecznych, za pomocą gazowo-chromatograficznej analizy triglicerydów.

Przy użyciu określonych wzorów triglicerydowych tłuszcze roślinne i zwierzęce są jakościowo i ilościowo wykrywalne w czystym tłuszczu mlekowym bez względu na warunki żywienia oraz laktacji.

Uwaga 1: Jakkolwiek kwas masłowy (C4) występujący wyłącznie w tłuszczach mleka umożliwia przeprowadzenie szacunków ilościowych od niskich do średnich ilości tłuszczu mleka w tłuszczach roślinnych, bardzo trudno jest uzyskać informację o charakterze jakościowym oraz ilościowym w zakresie dodania, do co najmniej 20 % (% wagowo) obcego tłuszczu do czystego tłuszczu mleka z powodu dużego zróżnicowania C4 wahającego się przeciętnie między 3,5 a 4,5 % (% wagowy).

Uwaga 2: Wyniki ilościowe można praktycznie uzyskać wyłącznie w drodze analiz triglicerydów, ponieważ zawartość sterolu w tłuszczach roślinnych różni się, będąc funkcją warunków produkcji i obróbki.

2. Definicja

Tłuszcze obce w tłuszczu mleka: zgodnie z definicją podaną w niniejszej normie tłuszczami obcymi są wszystkie tłuszcze roślinne oraz zwierzęce z wyjątkiem tłuszczu mleka.

3. Zasada metody

Po dokonaniu ekstrakcji tłuszczu mleka jest przygotowywany roztwór podstawowy. W tym roztworze oznaczane są triglicerydy (całkowite liczby węglowe) w drodze gazowo-chromatograficznej w kolumnach z wypełnieniem. Poprzez wprowadzanie procentu wagowego różnej wielkości molekuł tłuszczowych (C24 – C54 – wyłącznie liczby parzyste) do formuły triglicerydowej tłuszcze obce są albo wykrywane jakościowo, albo oznaczane ilościowo.

Uwaga: Przestrzeganie oceny zgodnie z niniejszym opisem umożliwia zastosowanie kapilarnej chromatografii gazowej, jeżeli gwarantowane jest osiągnięcie porównywalnych wyników⁽¹⁾.

4. Odczynniki

Muszą zostać użyte chemikalia klasy analitycznej.

- 4.1. Gaz nośny: azot, stopień czystości $\geq 99,996\%$.
- 4.2. Triglicerydy wzorcowe⁽²⁾, nasycone, jak również cholesterol do standaryzacji wzorcowego tłuszczu mleka zgodnie z ppkt 6.5.4.
- 4.3. Metanol, bezwodny.
- 4.4. n-heksan
- 4.5. n-heptan
- 4.6. Toluen
- 4.7. Roztwór dimetylochlorosilanu: 50 ml dimetylochlorosilanu zostaje rozpuszczone w 283 ml toluenu.
- 4.8. Gaz palny: wodór i powietrze syntetyczne
- 4.9. Faza stacjonarna, 3- % OV-1 na 125/150 μm (siatka 100/120) Gas ChromQ⁽³⁾.
- 4.10. 10-procentowy roztwór masła kakaowego

5. Aparatura

Typowa aparatura laboratoryjna, w szczególności:

- 5.1. Wysokotemperaturowy chromatograf gazowy przystosowany do temperatur wynoszących co najmniej 400–450 °C, wyposażony w detektor jonizacji płomieniowej (FID) oraz regulator przepływu masy stałej dla gazu nośnego. Gaz palny: 30 ml/min H₂, 270 ml/min powietrza syntetycznego.

⁽¹⁾ Opisano już stosowne metody, patrz D. Precht and J. Molzentin: Quantative triglyceride analysis using short capillary columns (Ilościowa analiza triglicerydów przy zastosowaniu krótkich kolumn kapilarnych), Chrompack News 4 z 16–17 (1993).

⁽²⁾ Odpowiednie produkty są dostępne w handlu.

⁽³⁾ Nazwy handlowe, takie jak np. Extrelut, Gas ChromQ, Chrompack, stanowią przykłady odpowiednich produktów dostępnych w wyspecjalizowanym handlu. Informacja ta przedstawiona jest w celu umożliwienia łatwego posługiwania się wzorcem przez użytkownika, a nie stanowi żądania nabycia produktu. Wskazanie grubości ziarna zostało zamienione na μm będący jednostką SI, zgodnie z BS 410:1988 („Wykaz brytyjskich norm dla Standardu dla sit testowych”).

Przy danym wysokim przepływie gazu nośnego płomień powinien być szczególnie duży.

Uwaga: Z powodu wysokich temperatur występujących przy analizach triglicerydów szklane wkładki w FID oraz w systemie iniektora muszą być często czyszczone.

Chromatograf gazowy musi być wyposażony w membrany, odporne na działanie wysokich temperatur, które mogą być często używane, oraz musi wykazywać ogólnie bardzo mały stopień „ociekania”.

Uwaga: Odpowiednie są membrany Chromblue (tm) (Chrompack).

Membrany muszą być wymieniane w regularnych odstępach czasu, np. średnio po 100 iniekcjach lub natychmiast, gdy pogarsza się rozdzielczość (patrz rysunek 4).

5.2. Kolumna chromatograficzna

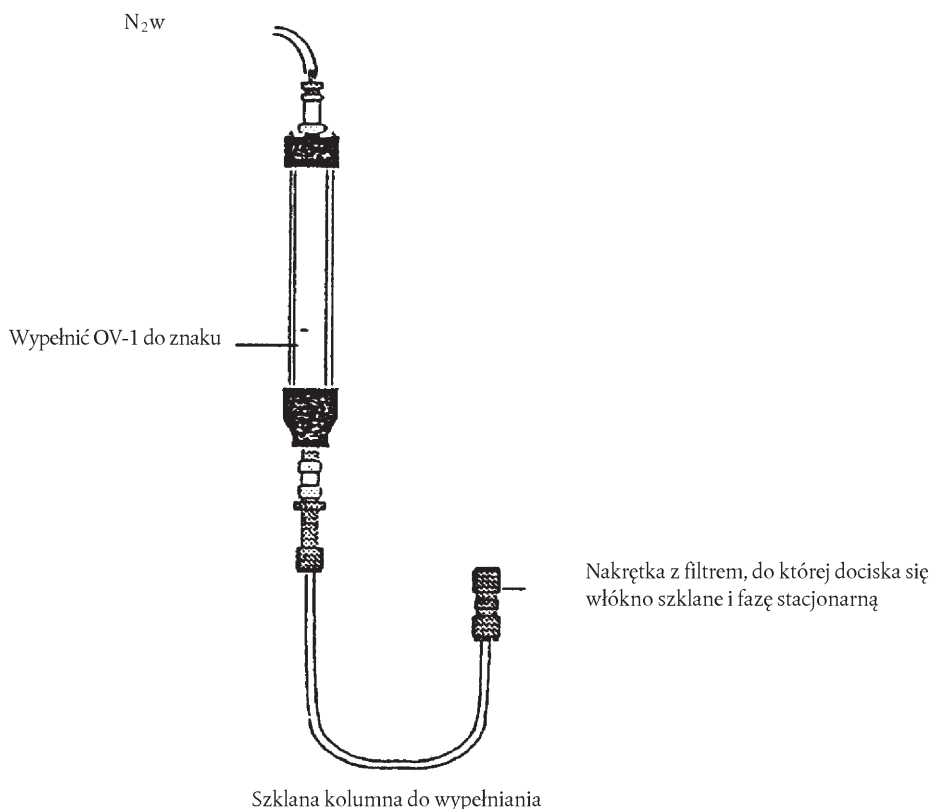
Szklana kolumna w kształcie litery U (o wewnętrznej średnicy 2 mm i długości 500 mm), która jest najpierw silanizowana zgodnie z ppkt 6.1 za pomocą dimetylochlorosilanu w celu dezaktywowania powierzchni szklanej.

Uwaga: Odpowiednie są również nieco dłuższe (80–200 mm długości) kolumny z wypełnieniem. Za ich pomocą może zostać osiągnięta nieco lepsza odtwarzalność wyników. Z drugiej strony faza stacjonarna wykazuje okazjonalne pęknięcia po eksploatacji, które mogą z kolei doprowadzić do uzyskania gorszych wyników ilościowych. Ponadto płomień FID jest łatwy do zgaszenia w wyniku wymaganego wyjątkowo dużego przepływu gazu nośnego, wynoszącego od 75 do 85 ml/min.

5.3. Instalacja do wypełniania kolumny (patrz rysunek 1)

Rysunek 1

Wypełnianie kolumny



- 5.3.1. Plastikowa kolumna z nakrętkami, wraz z oznaczeniem, do jakiej wysokości można wypełniać wymaganą ilością fazy stacjonarnej.
- 5.3.2. Drobne sito (o wielkości oczek wynoszącej w przybliżeniu 100 µm) z nakrętką, odpowiednie do zamknięcia kolumny szklanej zgodnie z rysunkiem 1.
- 5.3.3. Zdezaktywowana, silanizowana wata szklana.
- 5.3.4. Wibrator służący do jednolitego rozprowadzenia fazy stacjonarnej podczas wypełniania
- 5.4. 1–3-ml kolumna Extrelut⁽¹⁾ z żel z krzemionkowym. Kolumna ta może być alternatywnie wykorzystana do ekstrakcji mającej na celu uzyskanie tłuszczu mleka.

⁽¹⁾ Nazwy handlowe, takie jak np. Extrelut, Gas ChromQ, Chrompack, stanowią przykłady odpowiednich produktów dostępnych w wyspecjalizowanym handlu. Informacja ta przedstawiona jest w celu umożliwienia łatwego posługiwania się wzorcem przez użytkownika, a nie stanowi żądania nabycia produktu. Wskazanie grubości ziarna zostało zamienione na µm będący jednostką SI, zgodnie z BS 410:1988 („Wykaz brytyjskich norm w odniesieniu do standardu dla sit testowych”).

- 5.5. Plomba grafitowa o średnicy 6,4 mm (1/4) z przewodem o średnicy 6 mm.
- 5.6. Urządzenia do silanizacji szklanej powierzchni kolumny, zgodnie z ppkt 6.1.
 - 5.6.1. Butelka Woulffa
 - 5.6.2. Wodna pompa ssąca
- 5.7. Łaźnia wodna, regulowana do (50 ± 2) °C
- 5.8. Suszarka szafkaowa, regulowana do (50 ± 2) °C oraz (100 ± 2) °C
- 5.9. Pipeta mikrolitrowa
- 5.10. 5 ml kalibrowana pipeta, do odmierzenia 1,5 ml metanolu
- 5.11. 50-ml kolba okrągłodenna
- 5.12. Kolba Erlenmeyera, o nominalnej objętości 50 ml
- 5.13. Lejek
- 5.14. Filtr o drobnych porach
- 5.15. Wyparka obrotowa
- 5.16. Ampułki, o nominalnej objętości 1 ml, zamykane korkiem aluminiowym, z wewnętrzną membraną.
- 5.17. Strzykawka do iniekcji, tłok używanej strzykawki nie może dochodzić do końcówki igły.

Uwaga Takie strzykawki umożliwiają lepszą odtwarzalność osiągniętych wyników.

W celu uniknięcia uszkodzenia membrany stan końcówki igły powinien być sprawdzany w regularnych odstępach czasu (np. za pomocą stereomikroskopu).

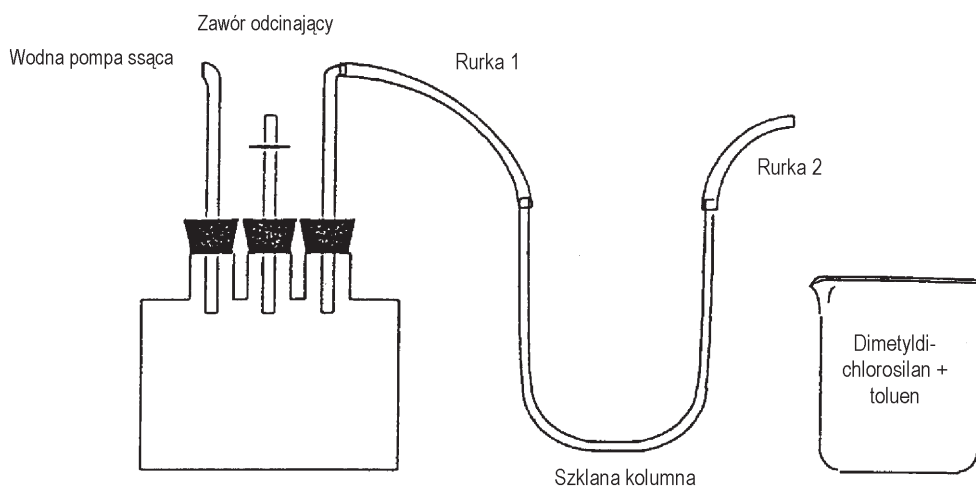
6. Procedura

6.1. Przygotowanie kolumny (silanizacja)

Po podłączeniu butelki Woulffa do wodnej pompy ssącej, tak jak przedstawiono to na rysunku 2, zanurzyć rurkę 2 w roztworze zgodnie z ppkt 4.7. Kolumna wypełniana jest poprzez zamknięcie zaworu odcinającego; następnie należy usunąć obydwie rurki.

Rysunek 2

Instalacja do silanizacji



Kolumna jest umocowana na statywie i jest całkowicie napełniona roztworem dimetyldichlorosilanu za pomocą pipety.

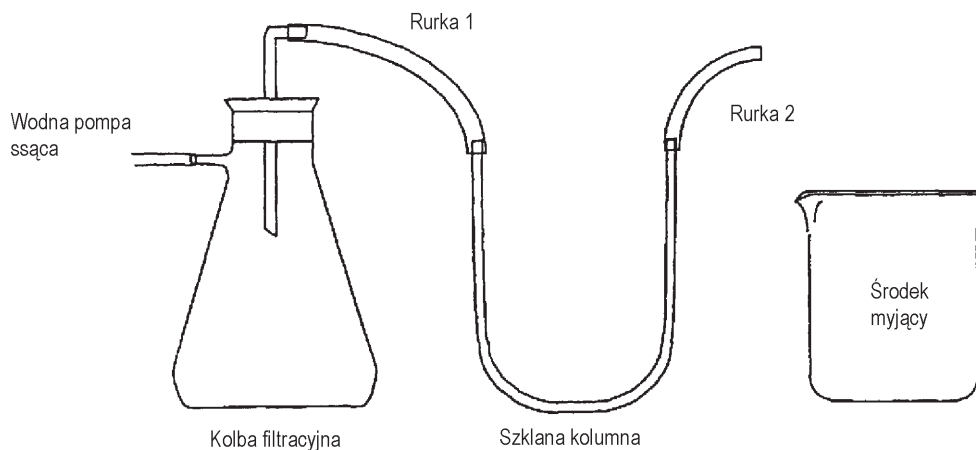
Po 20–30 min butelka Woulffa zostaje zastąpiona kolbą filtracyjną, natomiast kolumna zostaje opróżniona poprzez połączenie z wodną pompą ssącą (patrz rysunek 3).

6.2. Wypełnianie kolumny

Po czynności tej następuje czynność płukania przy użyciu 75 ml toluenu oraz 50 ml metanolu; następnie opróżniona kolumna jest suszona w suszarce szafkowej w temperaturze 100 °C przez około 30 minut.

Rysunek 3

Instalacja do płukania



Do napełniania kolumny służy instalacja przedstawiona na rysunku 1. Zgodnie z ppkt 4.9 fazę stacjonarną wprowadza się do kolumny plastikowej do wysokości znaku. Niższy koniec kolumny szklanej, który ma zostać wypełniony, jest zamykany za pomocą korka z waty szklanej o długości około 1 cm, uprzednio silanizowanej, który wciskany jest za pomocą stalowego pręta. Następnie koniec kolumny jest zamykany za pomocą sita zgodnie z ppkt 5.3.2.

Kolumna zostaje wypełniona pod ciśnieniem (N_2 , 3 bar) fazą stacjonarną. W celu uzyskania jednorodnego, nieprzerwanego oraz zwartego upakowania podczas wypełniania przesuwa się wibrator w górę oraz w dół kolumny szklanej.

Po wypełnieniu drugi koniec kolumny z wypełnieniem jest zakorkowany twardym korkiem z silanizowanej wełny szklanej, wystające końcówki są odcinane, a korek dociskany w kolumnie na głębokość kilku milimetrów, za pomocą łopatk.

6.3. Przygotowanie próbek

Do przygotowania próbek wykorzystywana jest jedna z trzech poniższych metod:

6.3.1. Wyodrębnienie tłuszczu mleka z masła

5–10 g masła jest stapiane w odpowiednim naczyniu w łaźni wodnej zgodnie z ppkt 5.7, w temperaturze 50 °C.

Kolba Erlenmeyera o pojemności 50 ml oraz lejek z filtrem zgodnie z ppkt 5.14 są podgrzewane w suszarce szafkowej do temperatury 50 °C. Warstwa tłuszczu roztopionej próbki masła jest filtrowana z zastosowaniem podgrzanego wcześniej urządzenia.

Taki tłuszcz mleka jest prawie całkowicie wolny od fosfolipidów.

6.3.2. Ekstrakcja frakcji tłuszczu według metody Röse-Gottlieba.

Ekstrakcja jest przeprowadzana albo zgodnie z normą IDF 1 C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 lub 22B: 1987.

Przy takim tłuszczu mleka fosfolipidy umożliwiają uzyskanie pik cholesterolowego, który jest powiększony w przybliżeniu o 0,1 %.

Widmo triglicerydów, znormalizowane do 100 za pomocą cholesterolu, ulega więc wpływom tylko w nieznacznym zakresie.

6.3.3. Ekstrakcja z mleka przy użyciu kolumn z żelą krzemionkowym

Próbka mleka o temperaturze 20 °C i objętości 0,7 ml jest wprowadzona, za pomocą pipety mikrotrowej, do kolumny Extrelut o pojemności 1–3 ml zgodnie z ppkt 5.4 i pozostawiona na około pięć minut w celu równomiernego rozprzodzenia na żelu krzemionkowym.

W celu denaturowania zespołów białkowo-lipidowych za pomocą pipety zostaje dodane 1,5 ml metanolu. Następnie próbka jest ekstrahowana za pomocą 20 ml n-heksanu. N-heksan jest dodawany powoli w niewielkich ilościach, natomiast odprowadzony rozpuszczalnik jest zbierany do 50 ml kolby okrągłodennej, wysuszonej do stałej, znanej wagi.

Po dokonaniu ekstrahowania kolumna jest całkowicie opróżniana.

Rozpuszczalniki zostają wydestylowane z eluatu na wyparce obrotowej w łaźni wodnej o temperaturze 40–50 °C.

Kolba jest osuszana, a uzysk tłuszczu oznaczony poprzez ważenie.

Uwaga: Ekstrakcja tłuszczu według Gerbera, Weibulla-Berntropa, Schmida-Bondzynskiego-Ratzlaffa oraz metoda oddzielania tłuszczu mleka przy użyciu detergentów (metoda BDI) nie są odpowiednie dla analizy triglicerydów, ponieważ przy stosowaniu tych metod mniejsze lub większe ilości cząstkowych gliceryny lub fosfolipidów mogą przeniknąć do fazy tłuszczowej.

6.4. Przygotowanie roztworu próbki

Do celów chromatografii gazowej wykorzystywany jest 5-procentowy roztwór tłuszczu w n-heptanie otrzymany zgodnie z ppkt 6.3. W celu przygotowania takiego roztworu próbki odpowiednie ilości materiału próbki otrzymane zgodnie z ppkt 6.3.1 oraz 6.3.2 są odmierzane wagowo i rozpuszczane w odpowiednich ilościach n-heptanu.

Przy przygotowywaniu próbki zgodnie z ppkt 6.3.3 ilość n-heptanu, która ma być dodana do materiału próbki w kolbie, jest obliczana na podstawie wagi, a pozostałość w niej rozpuszczona.

1 ml roztworu próbki w przybliżeniu jest wprowadzany do ampułki zgodnie z ppkt 5.1.6.

6.5. Chromatograficzne oznaczanie triglicerydów

W wysokich temperaturach do 350 °C stosowanych przy elucji triglicerydów o długim łańcuchu C52-C56 łatwo dochodzi do wznoszenia się linii podstawowej, szczególnie w przypadku, gdy kolumny nie były należycie wstępnie kondycjonowane. Można całkowicie uniknąć wymienionego wznoszenia się linii podstawowej w wysokich temperaturach przez albo łączenie dwóch kolumn, albo odejmowanie linii podstawowej.

Przy stosowaniu sposobu kompensacyjnego bądź działaniu za pomocą pojedynczych kolumn użyte muszą być szczelne plomby grafitowe, wymienione w ppkt 5.5, zarówno do wkładów szklanych w iniektorze, jak i w detektorze.

6.5.1. Korekta linii podstawowej

Aby uniknąć wznoszenia się linii podstawowej stosuje się jedną z poniższych czterech metod:

6.5.1.1. Połączenie kolumn

W sposobie kompensacyjnym stosowane są dwie kolumny z wypełnieniem.

6.5.1.2. Korekta linii podstawowej za pomocą chromatografu gazowego

Wznoszenia się linii podstawowej można uniknąć poprzez zastosowanie przebiegu chromatografu gazowego bez iniekcji roztworu tłuszczu oraz następującego po tym odjęcia zapisanej linii podstawowej.

6.5.1.3. Korekta linii podstawowej za pomocą oprogramowania wykonującego całkowanie.

Wznoszenia się linii podstawowej można uniknąć poprzez zastosowanie przebiegu układu integratora bez iniekcji roztworu tłuszczu oraz następującego po tym odjęcia zapisanej linii podstawowej.

6.5.1.4. Korekta linii podstawowej za pomocą odpowiedniego kondycjonowania

Po odpowiednim wstępnym kondycjonowaniu oraz średnio 20 dokonanych iniekcjach roztworów tłuszczu mleka wznoszenie się linii podstawowej w wysokich temperaturach jest często tak niewielkie, że korekcie linii podstawowej nie są konieczne.

6.5.2. Technika iniekcji

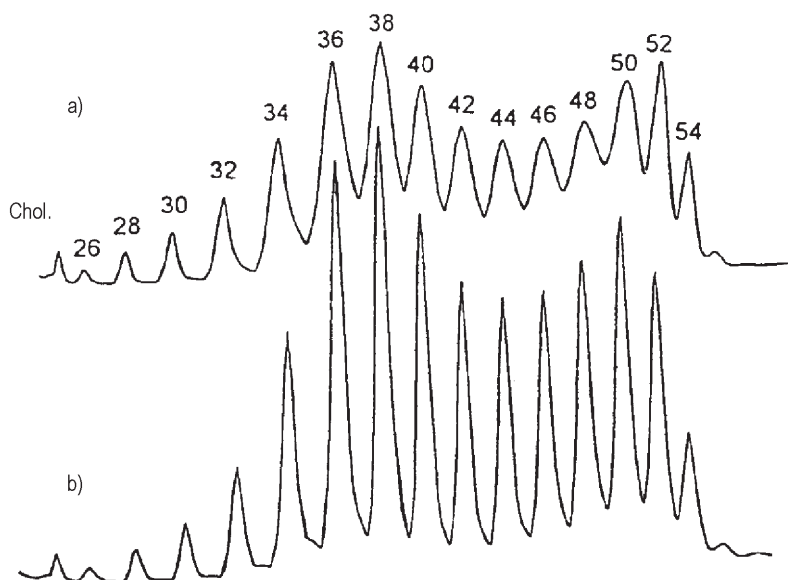
Technika „gorących iniekcji” jest stosowana w celu uniknięcia efektów wykluczających oraz w celu uzyskania lepszych wyników ilościowych za pomocą mających wysoką temperaturę wrzenia składników triglicerydów. W tej technice roztwór tłuszczu wciąga się do strzykawki, a przed dokonaniem iniekcji zimna igła strzykawki jest ogrzewana przez około trzy sekundy w głowicy iniektora. Następnie jest dokonywana szybka iniekcja zawartości strzykawki.

Uwaga: W tej technice iniekcji zmniejszone jest niebezpieczeństwo powstania zjawiska frakcjonowania wewnątrz strzykawki oraz powstania blokady iniekcyjnej. Nie są stosowane bezpośrednie iniekcje „na kolumnę”, w jej górnej bardziej ogrzanej części, ponieważ gromadzące się w tym miejscu fragmenty membrany, jak również zanieczyszczenia mogą zostać łatwo usunięte w stosowanej technice przez regularne wymienianie wkładu iniektora bez rozmontowywania kolumny.

Należy bezwzględnie unikać zginania końcówki igły w wyniku dotykania dna zlewki (nawet gdy jest ono trudno widzialne), aby nie doprowadzić do uszkodzenia membrany.

Rysunek 4

Chromatogram triglicerydu próbki tłuszczu mleka



- a) nieprawidłowa rozdzielczość będąca wynikiem uszkodzenia membrany
 b) prawidłowa rozdzielczość

6.5.3. Kondycjonowanie kolumny z wypełnieniem.

Podczas wykonywania czynności lit. a)–c) góry kolumny nie podłącza się do detektora w celu uniknięcia zanieczyszczenia.

Kolumny wypełnione zgodnie z ppkt 6.2 są kondycjonowane w poniższy sposób:

- 15 minut 40 ml/min N_2 – przepływ w temperaturze 50 °C;
- podgrzewanie przy 1 K/min do temperatury 355 °C przy 10 ml N_2 /min;
- przetrzywanie przez 12–15 godzin w temperaturze 355 °C;
- dokonanie dwóch iniekcji objętości 1 μ l roztworu masła kakaowego zgodnie z ppkt 4.10 oraz właściwym programem temperatury;
- dokonanie 20 iniekcji objętości 0,5 μ l roztworu tłuszczu mlekowego w czasie od dwóch do trzech dni, zgodnie z ppkt 6.4.

Uwaga: Masło kakaowe składa się niemal wyłącznie z triglicerydów od C50 do C56 o wysokiej temperaturze wrzenia. Iniekcja masła kakaowego służy do celu specjalnego kondycjonowania w tym zakresie o długim łańcuchu. Przy triglicerydach C50–C54 o wysokiej temperaturze wrzenia mogą wystąpić współczynniki odpowiedzi średnio do około 1,20. Normalnie przy powtarzanej iniekcji roztworu tłuszczu mleka należy oczekiwać zmniejszenia początkowo wysoko współczynników odpowiedzi dla C50–C54. W przypadku triglicerydów o niskiej liczbie acyl-c współczynniki są zbliżone do 1. Przygotowane zostają, odpowiednio, trzy pary kolumn wypełnione zgodnie z ppkt 6.2. Kondycjonowane pary są sprawdzane odpowiednio za pomocą analizy tłuszczu mleka w ramach badań rutynowych.

Para o najlepszych wynikach ilościowych (współczynniki odpowiedzi bliskie 1) wykorzystywana jest w dalszej części. Nie jest wykorzystywana kolumna o współczynniku odpowiedzi > 1,20.

6.5.4. Kalibracja

W celu kalibracji oznaczone powinny zostać współczynniki odpowiedzi odpowiednich triglicerydów, jak również cholesterolu w tłuszczu mleka (tłuszcz znormalizowany), przy użyciu znormalizowanych triglicerydów (przynajmniej nasyconych triglicerydów C24, C30, C36, C42, C48 oraz C54, jak również cholesterolu; a najlepiej dodatkowo C50 oraz C52). Pośrednie współczynniki odpowiedzi mogą zostać stwierdzone metodą interpolacji matematycznej.

Przy użyciu tłuszczu znormalizowanego muszą zostać przeprowadzone codziennie od dwóch do trzech kalibracji. W przypadku gdy uzyskiwane są prawie identyczne wyniki, osiąga się dobrze odtwarzalne wyniki ilościowe przy analizie triglicerydowej próbek.

Znormalizowany tłuszcz mleka może być przechowywany przez kilka miesięcy w temperaturze wynoszącej maksymalnie minus 18 °C i może być on tym samym wykorzystywany jako wzór.

Uwaga: Współczynnik odpowiedzi każdego składnika może być oznaczony z wykorzystaniem tłuszczu znormalizowanego o certyfikowanym składzie triglicerydów, takiego jak CRM 519 (bezwodny tłuszcz mleczny), który można otrzymać w Instytucie Materiałów Referencyjnych i Pomiarów, Geel, Belgia.

6.5.5. Program temperatury, gaz nośny oraz inne warunki dla analizy triglicerydów.

Program temperatury: wstępną temperaturę kolumny 210 °C utrzymywać przez jedną minutę, następnie zaprogramować na 6 °C/min do 350 °C oraz utrzymywać w końcowej temperaturze przez pięć minut.

Temperatura detektora oraz iniektora: odpowiednio 370 °C.

Uwaga: Temperatury (temperatura wstępna) detektora, iniektora oraz pieca powinny być utrzymywane na stałym poziomie (również w nocy, podczas weekendów oraz świąt).

Gaz nośny: azot, prędkość przepływu 40 ml/min.

Uwaga: W przypadku wykorzystywania kolumn 80 cm przepływ musi wynosić co najmniej 75 ml/min N₂. Przepływ gazu nośnego musi być stale utrzymywany (również w nocy, podczas weekendów oraz świąt). Dokładna wielkość przepływu gazu nośnego powinna być dostosowana w taki sposób, aby niezależnie od długości kolumny C54 był eluowany w temperaturze 341 °C.

Czas trwania analizy: 29,3 minuty.

Objętość iniekcji: 0,5 µl.

Uwaga: Strzykawka musi być kilkakrotnie płukana czystym heptanem po każdej iniekcji.

Warunki FID: zgodnie z pkt 5.1.

Uwaga: Detektor jonizacji płomieniowej jest zapalany, odpowiednio, na początku każdego dnia roboczego.

7. Całkowanie, ocena oraz kontrola warunków pomiarowych

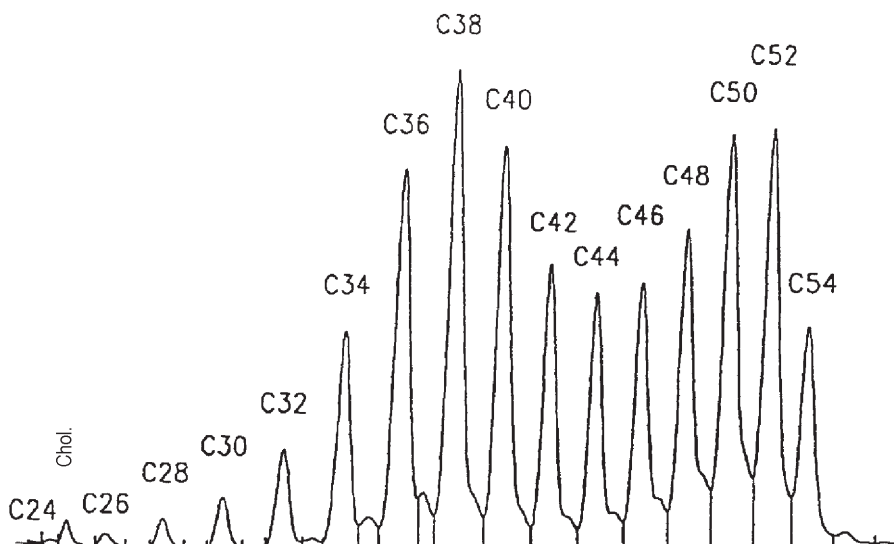
Triglicerydy o nieparzystej liczbie acyl-c ($2n + 1$) są łączone z poprzednimi triglicerydami o liczbie parzystej ($2n$). Mniej odtwarzalne, o niskich zawartościach C56 nie są uwzględniane. Pozostałe triglicerydy (powierzchnia pików) na chromatogramie włącznie z cholesterolem (pik bliski C24) są mnożone przez odpowiednie współczynniki odpowiedzi wzorcowego tłuszczu (ostatnia kalibracja) oraz wspólnie znormalizowane do 100. Obok wolnego cholesterolu, tym samym, oceniane są triglicerydy C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 oraz C54. Wyniki podawane są w % wagowych (g/100 g).

Ocena pików chromatogramu powinna zostać sporządzona przy użyciu integratora, za pomocą którego wykreślona może zostać podstawowa. Powinno być możliwe ponowne całkowanie przy zoptymalizowanych parametrach całkowania

Rysunki 5 i 6 przedstawiają dwa przykłady chromatogramów triglicerydów. Rysunek 5 przedstawia chromatogram, który może zostać dobrze oceniony, podczas gdy rysunek 6 przedstawia błąd przypadkowy w zakresie od C50 do C54 oraz linię podstawową przebiegającą w sposób niepoprawny w porównaniu z linią podstawową przedstawioną na rysunku 5. Takie typowe błędy mogą być z dużym stopniem pewności wykryte i można ich uniknąć jedynie poprzez użycie integratora, za pomocą którego wykreślona jest linia podstawowa.

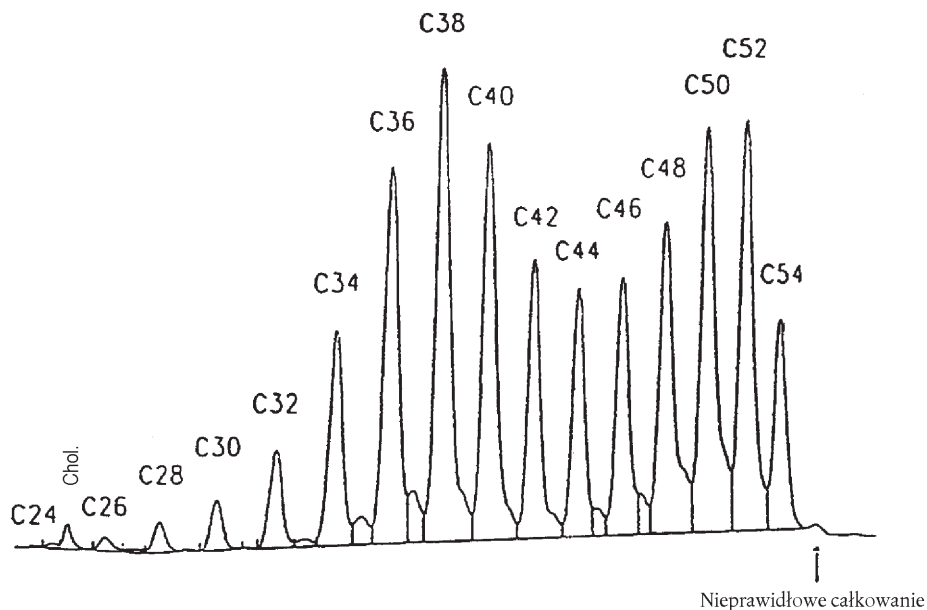
Rysunek 5

Łatwy do oceny chromatogram triglicerydów tłuszczu mleka z zaznaczoną linią podstawową



Rysunek 6

Chromatogram tłuszczu mleka przynieprawidłowym całkowaniu



Do celów kontrolowania warunków pomiarowych można stosować względne odchylenia standardowe (RSD) (RSD: współczynnik zmienności $\times 100$) podane w tabeli 1 dla różnych triglicerydów. Zostały one obliczone na podstawie 19 kolejnych analiz tego samego tłuszczu mleka:

Tabela 1

Względne odchylenia standardowe (RSD) zawartości triglicerydów (n=19)

Trigliceryd	RSD (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Przy RSD znacznie wyższych niż wartości podane w tabeli 1 chromatogramy są niewłaściwe i muszą zostać sprawdzone membrany oraz prędkość przepływu gazu. Ponadto niewielkie cząsteczki membrany mogły utworzyć osady na wacie szklanej przy wejściu do kolumny lub kolumna nie nadaje się już do użytku w wyniku zesterzenia się, oddziaływania temperatury itd. (patrz rysunek 3).

Uwaga Wartości podane w tabeli 1 nie są obowiązkowe, lecz jedynie orientacyjne do celów kontroli jakości. Jednakże w przypadku, gdy wyższe wartości RSD są dopuszczalne, wartości graniczne powtarzalności i odtwarzalności wskazane w pkt 11 muszą być mimo wszystko przestrzegane.

8. Jakościowe wykrywanie tłuszczu obcego

Do celów wykrywania tłuszczów obcych opracowane zostały wzory triglicerydowe (tabela 2) z wartościami granicznymi S (tabela 3), gdzie wartości S czystych tłuszczów mleka mogą ulegać wahaniom. W przypadku gdy te wartości graniczne zostają przekroczone, można przyjąć obecność tłuszczu obcego.

Najbardziej czułym wzorem służącym do wykrywania dodatku smalcu jest np.:

$$6,5125 \cdot C_{26} + 1,2052 \cdot C_{32} + 1,7336 \cdot C_{34} + 1,7557 \cdot C_{36} + 2,2325 \cdot C_{42} + 2,8006 \cdot C_{46} + 2,5432 \cdot C_{52} + 0,9892 \cdot C_{54} = S$$

Uwaga Przy wykorzystaniu 755 różnych próbek tłuszczu mleka uzyskano 99-procentowy przedział ufności S = 97,96 - 102,04 w odniesieniu do próbek czystego tłuszczu mleka przy odchyleniu standardowym wszystkich wartości S wynoszącym SD = 0,39897.

Rozpoczynając od oznaczania składu triglicerydów próbki nieznanego tłuszczu, zastosowanie takiego wzoru umożliwi, bez konieczności użycia komputera, przeprowadzenie w prosty sposób weryfikacji, czy suma zawartości triglicerydów przedstawiona tutaj wraz z odpowiadającymi współczynnikami mieści się poza zakresem 97,96-102,04 i czy mamy najprawdopodobniej do czynienia z dodatkiem tłuszczu obcego.

Do celów wykrywania różnych tłuszczów obcych w tabeli 2 przedstawione są różne wzory triglicerydowe. Wspólny wzór może zostać odpowiednio wykorzystywany do celów wykrywania tłuszczów obcych, takich jak olej sojowy, olej słonecznikowy, oliwa z oliwek, olej z nasion rzepaku, olej z siemienia lnianego, olej z kiełków pszenicy, olej z kiełków kukurydzy, olej z nasion bawełny oraz uwodorniony olej z ryb, dla tłuszczów roślinnych, tłuszczu kokosowego oraz tłuszczu z ziaren palmowych, jak również dla oleju palmowego oraz łoju wołowego.

Z uwagi na to, że skład triglicerydów tłuszczów obcych również podlega wahaniom, wykorzystano dane tego samego typu, zmierzone doświadczalnie, odnoszące się do czterech różnych triglicerydów tłuszczu obcego (Przy tych samych rodzajach tłuszczu obcego uwzględniono odpowiednio najmniej korzystną wartość graniczną (patrz tabela 4)).

Za pomocą następującego „wzoru całkowitego” podobnie dobre wyniki mogą zostać uzyskane dla wszystkich tłuszczów obcych:

$$- 2,7575 \cdot C_{26} + 6,4077 \cdot C_{28} + 5,5437 \cdot C_{30} - 15,3247 \cdot C_{32} + 6,2600 \cdot C_{34} + 8,0108 \cdot C_{40} - 5,0336 \cdot C_{42} + 0,6356 \cdot C_{44} + 6,0171 \cdot C_{46} = S$$

Obliczenia przeprowadzone w celu wykrycia jakiegokolwiek kombinacji tłuszczów obcych w tłuszczu mleka wykazały, że np. w odniesieniu do jakiegokolwiek wzoru dla smalcu, podanego w tabeli 2, wartość graniczna dla tego tłuszczu obcego jest niska, a mianowicie 2,7 %, to inne tłuszcze, takie jak tłuszcz kokosowy, olej palmowy bądź tłuszcz z ziaren palmowych, o wartościach granicznych wykrywalności wynoszących odpowiednio 26,8 %, 12,5 % oraz 19,3 %, mogą, za pomocą tego wzoru, zostać wykryte wyłącznie w przypadku, gdy do tłuszczu mlekowego została dodana ich wyjątkowo duża ilość. Stosuje się to również do pozostałych wzorów podanych w tabeli 2.

Tabela 2

Wzory triglicerydowe służące do wykrywania różnych tłuszczów obcych w tłuszczu mleka, wskazujących odchylenia standardowe SD dla S

<i>Wzór dla oleju sojowego, słonecznikowego, z oliwek, z nasion rzepaku, siemienia lnianego, z kiełków pszenicy, z kiełków kukurydzy, z nasion bawełny oraz oleju rybiego</i>
$2,0983 \cdot C_{30} + 0,7288 \cdot C_{34} + 0,6927 \cdot C_{36} + 0,6353 \cdot C_{38} + 3,7452 \cdot C_{40} - 1,2929 \cdot C_{42} + 1,3544 \cdot C_{44} + 1,7013 \cdot C_{46} + 2,5283 \cdot C_{50} = S$; SD = 0,38157
<i>Wzór dla tłuszczu kokosowego oraz tłuszczu z ziaren palmowych</i>
$3,7453 \cdot C_{32} + 1,1134 \cdot C_{36} + 1,3648 \cdot C_{38} + 2,1544 \cdot C_{42} + 0,4273 \cdot C_{44} + 0,5809 \cdot C_{46} + 1,1226 \cdot C_{48} + 1,0306 \cdot C_{50} + 0,9953 \cdot C_{52} + 1,2396 \cdot C_{54} = S$; SD = 0,11323
<i>Wzór dla oleju palmowego oraz dla łoju wołowego</i>
$3,6644 \cdot C_{28} + 5,2297 \cdot C_{30} - 12,5073 \cdot C_{32} + 4,4285 \cdot C_{34} - 0,2010 \cdot C_{36} + 1,2791 \cdot C_{38} + 6,7433 \cdot C_{40} - 4,2714 \cdot C_{42} + 6,3739 \cdot C_{46} = S$; SD = 0,81094
<i>Wzór dla smalcu</i>
$6,5125 \cdot C_{26} + 1,2052 \cdot C_{32} + 1,7336 \cdot C_{34} + 1,7557 \cdot C_{36} + 2,2325 \cdot C_{42} + 2,8006 \cdot C_{46} + 2,5432 \cdot C_{52} + 0,9892 \cdot C_{54} = S$; SD = 0,39897

Dlatego dla sprawdzenia nieznanego próbki tłuszczu użyte muszą zostać wszystkie wzory podane w tabeli 2 oraz wzór ogólny (2), w przypadku gdy prawdopodobne jest to, że próbka stanowi mieszkankę tłuszczu mleka oraz jednego z 14 różnych tłuszczów obcych lub połączenie takich tłuszczów obcych. W przypadku gdy poprzez wprowadzanie triglicerydu próbki tłuszczu, która ma zostać poddana analizie, otrzymuje się taką wartość S, która nie mieści się w zakresach podanych w tabeli 3 wyłącznie dla jednej z pięciu wzorów, wówczas próbka stanowi najprawdopodobniej zmodyfikowany tłuszcz mleka. Wykrycie obcego tłuszczu w tłuszczu mleka za pomocą jednego z czterech wzorów podanych w tabeli 2 nie pozwala na wyciągnięcie wniosków co do rodzaju domieszki tłuszczu obcego.

Tabela 3

Wartości graniczne S dla tłuszczów mleka

Wzór służący do wykrywania:	Zakres S
Oleju sojowego, słonecznikowego, z oliwek, z nasion rzepaku, z siemienia lnianego, z kielków pszenicy, z kielków kukurydzy, bawełnianego, z ryb	98,05-101,95
Tłuszczu kokosowego oraz tłuszczu z ziaren palmowych	99,42-100, 58
Oleju palmowego oraz łoju wołowego	95,90-104,10
Smalcu	97,96-102,04
Wzór ogólny	95,68-104, 32

W tabeli 4 podane są wartości graniczne wykrywalności różnych tłuszczów obcych przy ufności 99 %. W kolumnie pierwszej przedstawione są minimalne wartości graniczne wykrywalności dla najlepszego wzoru tłuszczu mleka w tabeli 2. W kolumnie drugiej przedstawione są wartości graniczne wykrywalności dla wzoru ogólnego. Jakkolwiek te wartości graniczne są nieco wyższe, wyłącznie ten wzór konieczny jest do wykrycia nieco większych ilości tłuszczów obcych. Za pomocą wszystkich wzorów również połączenia różnych tłuszczów obcych mogą zostać wykryte. Zakresy wahań triglicerydów różnych tłuszczów obcych jednego rodzaju nie mają znaczącego wpływu na wartości graniczne wykrywalności.

Tabela 4

99 % wartości graniczne wykrywalności poprzez dodanie tłuszczu obcego do tłuszczu mleka w %

	Wzór indywidualny	Wzór ogólny
Olej sojowy	2,1	4,4
Olej słonecznikowy	2,3	4,8
Oliwa z oliwek	2,4	4,7
Tłuszcz kokosowy	3,5	4,3
Olej palmowy	4,4	4,7
Olej z ziaren palmowych	4,6	5,9
Olej z nasion rzepaku	2,0	4,4
Olej z siemienia lnianego	2,0	4,0
Olej z kielków pszenicy	2,7	6,4
Olej z kielków kukurydzy	2,2	4,5
Olej z nasion bawełny	3,3	4,4
Smalec	2,7	4,7
Łój wołowy	5,2	5,4
Uwodorniony olej rybi	5,4	6,1

Uwaga Zakresy S oblicza się w taki sposób, że przyjmuje się jedynie występowanie tłuszczu obcego, jeżeli wartości graniczne wzoru indywidualnego są przekroczone (patrz tabela 4).

9. Ilościowe oznaczanie tłuszczów obcych

W celu uzyskania informacji ilościowej na temat stężenia tłuszczu obcego w próbce tłuszczu mleka stosuje się poniższy wzór:

$$X(\%) = |(100 \cdot)100 - S(100 - S_f)|$$

gdzie X stanowi ilość nieznanego tłuszczu obcego bądź mieszanki tłuszczów obcych w nieznanym tłuszczu mleka. S wynika z dodania nieznanego tłuszczu obcego poprzez wprowadzenie triglicerydów tłuszczu obcego/mieszanki tłuszczu mleka do powyższego ogólnego wzoru triglicerydowego. W przypadku gdy nieznaną tłuszcz obcy jest dodany do tłuszczu mleka wartość S dotycząca różnych tłuszczów obcych dla wzoru ogólnego jest wybierana dla S_f ; ta średnia wartość S jest uzyskiwana przez wprowadzenie danych dotyczących triglicerydów czystych tłuszczów obcych do tego wzoru oraz przez obliczenie wartości średniej ($S_f = 7,46$). Dobre wyniki ilościowe dotyczące wszelkich dodatków tłuszczów obcych są uzyskiwane również przy wykorzystaniu wzoru dla oleju palmowego/łoju wołowego (tabela 2) oraz średniej wartości S_f wynoszącej 10,57.

W przypadku znanych rodzajów tłuszczów obcych do powyższego wzoru wprowadzone muszą zostać następujące wartości S_f oraz wybrany musi zostać odpowiedni wzór tłuszczu obcego z tabeli 2:

Tabela 5

Wartości SF różnych tłuszczów obcych

Tłuszcz obcy	SF
Olej sojowy	8,18
Olej słonecznikowy	9,43
Oliwa z oliwek	12,75
Tłuszcz kokosowy	118,13
Olej palmowy	7,55
Olej z ziaren palmowych	112,32
Olej z nasion rzepaku	3,30
Olej z siemienia lnianego	4,44
Olej z kielków pszenicy	27,45
Olej z kielków kukurydzy	9,29
Olej z nasion bawełny	41,18
Smalec	177,55
Łój wołowy	17,56
Olej rybi	64,12

10. Zakres stosowania metody wykrywania

Omawiana metoda ma zastosowanie do mleka ze zbiornika i oparta jest na reprezentatywności próbek tłuszczu mleka.

Wysoce precyzyjne wykrywanie byłoby możliwe, gdyby z uwagi na reprezentatywną liczbę tłuszczów mleka omówione powyżej wzory zostały wyprowadzone w odniesieniu do różnych państw.

Szczególnie dobrze dostosowane możliwości wykrywania mogłyby zostać uzyskane, gdyby w różnych państwach wzory, zgodne z przedstawionym opisem, zostały utworzone z reprezentatywnej liczby tłuszczów mlekowych. W tym przypadku wykorzystywanie złożonych programów komputerowych nie jest wymagane, jeżeli zastosowane są połączenia triglicerydów użyte w tabeli 2, a współczynniki zostają ponownie oznaczone metodą najmniejszych kwadratów.

Poprzez stosowanie zakresów S przedstawionych w tabeli 3 wzory stają się ogólnie stosowalne, w ramach szczególnych warunków żywienia, jak na przykład, niedożywienia krów bądź żywienia krów drożdżami paszowymi lub kostkami wapiennymi. Wyłącznie w przypadku ekstremalnych warunków żywienia (wysokiego wychwytu czystych olejów paszowych, intensywne podawanie kostek wapiennych w połączeniu z tłuszczem paszowym etc.) wzory wskazują częściowo zmodyfikowany tłuszcz mleka.

Uwaga: Frakcjonowane tłuszcze mleka są generalnie uznawane za niezmodyfikowane tłuszcze mleka, jeżeli modyfikacja jest zakładana jedynie w przypadku, gdy wartości graniczne są przekroczone. Wyłącznie w przypadku frakcjonowanych tłuszczów mleka o niezwykłym składzie tłuszczu mleka, jak to ma miejsce w przypadku na przykład frakcji twardej, uzyskiwanych przez frakcjonowanie za pomocą metod fizycznych w wysokich temperaturach wynoszących w przybliżeniu 30 °C, przy niskich wielkościach wynoszących kilka procent lub przez frakcjonowanie o ponad krytyczną wielkość CO₂, wzory wskazują na modyfikację.

Frakcjonowanie tłuszczu mlekowego może być jednakże wykryte przy wykorzystaniu innych procedur, np. kalorymetrii skaningowej różnicowej.

11. Dokładność metody

Oznaczona przy wykorzystaniu tłuszczu mleka w oparciu o wzory przedstawione w tabeli 2 oraz zakresy S przedstawione w tabeli 3.

11.1. Powtarzalność

Różnica między wartościami S uzyskanymi w dwóch oznaczeniach przeprowadzonych w możliwie najkrótszym odstępie czasu przez ten sam podmiot zgodnie z tą samą procedurą, na identycznym materiale próbki, w takich samych warunkach (ta sama osoba, te same narzędzia/to samo urządzenie, to samo laboratorium):

Tabela 6

Wartości graniczne powtarzalności (r) dla różnych wzorów

Wzór służący do wykrywania:	r
Oleju sojowego, słonecznikowego, z oliwek, z ziaren rzepaku, z siemienia lnianego, z kiełków pszenicy, z kiełków kukurydzy, z nasion bawełny, z ryb.	0,67
Tłuszczu kokosowego oraz z ziaren palmowych	0,12
Oleju palmowego oraz łoju wołowego	1,20
Smalcu	0,58
Wzór ogólny	1,49

11.2. *Odtwarzalność*

Różnica między wartościami S uzyskanymi w dwóch oznaczeniach przeprowadzonych przez podmioty w różnych laboratoriach, zgodnie z tą samą procedurą z wykorzystaniem identycznego materiału próbki, w różnych warunkach (inna osoba, inne przyrządy) w różnym czasie.

Tabela 7

Wartości graniczne odtwarzalności (R) dla różnych wzorów

Wzór służący do wykrywania:	R
Oleju sojowego, słonecznikowego, z oliwek, z ziaren rzepaku, z siemienia lnianego, z kiełków pszenicy, z kiełków kukurydzy, z nasion bawełny, z ryb	1,08
Tłuszczu kokosowego oraz tłuszczu z ziaren palmowych	0,40
Oleju palmowego oraz łoju wołowego	1,81
Smalcu	0,60
Wzór ogólny	2,07

11.3. *Różnica krytyczna*

Przy znanych wartościach granicznych powtarzalności (r) oraz odtwarzalności (R) różnice krytyczne dla wszystkich zakresów S z tabeli 3 mogą zostać obliczone (podwójne analizy). Odpowiednie wartości są przedstawione w tabeli 8.

Tabela 8

Różnice krytyczne dla wszystkich wzorów triglicerydowych

Wzór służący do wykrywania	Zakres
Oleju sojowego, słonecznikowego, z oliwek, z ziaren rzepaku, z siemienia lnianego, z kiełków pszenicy, z kiełków kukurydzy, z nasion bawełny, z ryb	97,43-102,57
Tłuszczu kokosowego oraz z ziaren palmowych	99,14-100,86
Oleju palmowego oraz łoju wołowego	94,91-105,09
Smalcu	97,65-102,35
Wzór ogólny	94,58-105,42

11.4. *Dopuszczalność wyników*

Wszystkie skalibrowane, o wartości wyliczonej w zaokrągleniu do dwóch miejsc po przecinku, zawartości triglicerydów C24, C26, C28 do C54, jak również cholesterolu, muszą być dokładnie znormalizowane do 100.

Wyniki podwójnej analizy są wykorzystywane jako sprawdzenie powtarzalności. W przypadku gdy różnica bezwzględna między dwoma wynikami *S* dla wszystkich pięciu wzorów triglicerydowych nie przekracza wartości granicznych powtarzalności *r* przedstawionych w tabeli 6, wymóg powtarzalności jest spełniony.

Do celów kontroli optymalnych warunków chromatografii gazowej oraz, szczególnie, jakości kolumny zagwarantowane powinno zostać to, że przy 10 powtarzających się seriach różnica między maksymalnymi a minimalnymi wartościami *S* we wszystkich pięciu wzorach triglicerydowych nie przekracza zakresu $x \cdot r$, przy $x = 1,58$ (dla 10 serii, patrz bibliografia (16)), oraz wartości granicznych powtarzalności *r* dla różnych wzorów przedstawionych w tabeli 6.

12. **Powołane normy**

DIN 10 336: 1994	Nachweis oraz Bestimmung von Fremdfetten in Milchlief anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse
Norma IDF 1 C: 1987	Milk. Determination of Fat Content — Rose Gottlieb Gravimetric Method
Norma IDF 16C: 1987	Cream. Determination of Fat Content — Rose Gottlieb Gravimetric Method
Norma IDF 116A: 1987	Milk – Based Edible Ices and Ice Mixes. Determination of Fat Content — Rose Gottlieb Gravimetric Method
Norma IDF 22B: 1987	Skimmed Milk, Whey & Buttermilk. Determination of Fat Content — Rose Gottlieb Gravimetric Method.

13. **Bibliografia**

1. Komisja Wspólnot Europejskich: Detection of foreign fats in milk fat by means of gas chromatographic triglyceride analysis, Doc. No VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Komisja Wspólnot Europejskich: Control of butter fat purity of 100 different samples of different feeding periods from 11 EEC countries; Doc. No VI/4577/93.
3. Komisja Wspólnot Europejskich: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EWG collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. Dairy Research 47 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: Nachweis von modifiziertem Milchlief mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchlief mit Hilfe von Triglyceridkombinationen, 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: Zum Nachweis von Fremdfett in Milchlief über die Triglyceridanalyse. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 29-35 (1987).
7. Precht, D.: Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchlief. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143-157 (1989).
8. Precht, D.: Schnelle Extraktion von Milchlief, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchlief. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992).
13. Precht, D.: Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns in CRC Handbook of Chromatography: Analysis of lipids, p. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molzentin, J.: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molzentin, J., Precht, D.: Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme, Springer - Verlag, Berlin, P. 378 (1970).

ZAŁĄCZNIK XXVI

WYKAZ ROZPORZĄDZEŃ, DO KTÓRYCH NASTĘPUJE ODNIESIENIE W PIERWSZYM USTĘPIE PREAMBUŁY

- rozporządzenie Komisji (EWG) nr 1216/68 z dnia 9 sierpnia 1968 r. ustanawiające metodę oznaczania zawartości laktozy w zwierzęcych mieszkach paszowych przywożonych z państw trzecich ⁽¹⁾, zmienione rozporządzeniem Komisji (EWG) nr 222/88 z dnia 22 grudnia 1987 r. zmieniające niektóre środki w sprawie stosowania wspólnej organizacji rynku w sektorze mleka i przetworów mlecznych w następstwie wprowadzenia Nomenklatury Scalonej ⁽²⁾;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 3942/92 z dnia 22 grudnia 1992 r. ustanawiające metodę referencyjną oznaczania sitosterolu i stigmasterolu w bezwodnym tłuszczu mleka ⁽³⁾, ostatnio zmienione rozporządzeniem Komisji (WE) nr 175/1999 zmieniającym rozporządzenia (EWG) nr 3942/92, (WE) nr 86/94, (WE) 1082/96 i (WE) nr 1459/98 ustanawiające metodę referencyjną oznaczania niektórych znaczników w maśle, bezwodnym tłuszczu mlecznym i śmietanie ⁽⁴⁾;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 86/94 z dnia 19 stycznia 1994 r. ustanawiające metodę referencyjną oznaczania sitosterolu i stigmasterolu w maśle ⁽⁵⁾, zmienione rozporządzeniem (WE) nr 175/1999;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 2721/95 z dnia 24 listopada 1995 r. ustanawiające zasady stosowania metod referencyjnych i rutynowych analizy i oceny jakości mleka oraz przetworów mlecznych w ramach wspólnej organizacji rynku ⁽⁶⁾;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 1080/96 z dnia 14 czerwca 1996 r. ustanawiające metodę referencyjną wykrywania form bakterii *coli* w maśle, odtłuszczonym mleku w proszku i kazeinie/kazeinianach ⁽⁷⁾;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 1081/96 z dnia 14 czerwca 1996 r. ustanawiające metodę referencyjną wykrywania mleka krowiego i kazeiny w serach wyprodukowanych z mleka owczego, mleka koziego lub mleka bawolego lub mieszanki mleka owczego, koziego i bawolego i uchylające rozporządzenie (EWG) nr 690/92 ⁽⁸⁾;
- rozporządzenie Rady (WE) nr 1082/96 z dnia 14 czerwca 1996 r. ustanawiające referencyjną metodę oznaczania zawartości estru etylowego kwasu beta-apo-8' karotenowego w koncentracie masła oraz w maśle ⁽⁹⁾, zmienione rozporządzeniem (WE) nr 175/1999;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 1854/96 z dnia 26 września 1996 r. ustanawiające wykaz metod referencyjnych stosowanych do celów analizy i oceny jakości mleka i przetworów mlecznych w ramach organizacji wspólnego rynku ⁽¹⁰⁾, zmienione rozporządzeniem (WE) nr 881/1999 ⁽¹¹⁾;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 880/98 z dnia 24 kwietnia 1998 r. ustanawiające referencyjne metody oznaczania zawartości wody, suchej masy beztłuszczowej i tłuszczu w maśle ⁽¹²⁾;
- rozporządzenie Komisji (WE) nr 1459/98 z dnia 8 lipca 1998 r. ustanawiające referencyjną metodę oznaczania waniliny w koncentracie masła, maśle lub śmietanie ⁽¹³⁾ zmienione rozporządzeniem (WE) nr 175/1999.

⁽¹⁾ Dz.U. L 160 z 26.6.1999, str. 48.

⁽²⁾ Dz.U. L 333 z 24.12.1999, str. 11.

⁽³⁾ Dz.U. L 340 z 31.12.1999, str. 3.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 350 z 20.12.1997, str. 3.

⁽⁵⁾ Dz.U. L 76 z 25.3.2000, str. 9.

⁽⁶⁾ Dz.U. L 298 z 12.11.1985, str. 9.

⁽⁷⁾ Dz.U. L 11 z 16.1.1999, str. 14.

⁽⁸⁾ Dz.U. L 45 z 21.2.1990, str. 8.

⁽⁹⁾ Dz.U. L 16 z 21.1.1999, str. 19.

⁽¹⁰⁾ Dz.U. L 279 z 11.10.1990, str. 22.

⁽¹¹⁾ Dz.U. L 325 z 17.12.1999, str. 10.

⁽¹²⁾ Dz.U. L 256 z 7.9.1987, str. 1.

⁽¹³⁾ Dz.U. L 28 z 3.2.2000, str. 16.