

РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 213/2001 НА КОМИСИЯТА

от 9 януари 2001 година

относно определяне на подробни правила за прилагането на Регламент (ЕО) № 1255/1999 на Комисията по отношение на методи за анализ и оценка на качеството на мляко и млечни продукти и за изменение на Регламенти (ЕО) № 2771/1999 и 2799/1999

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 1255/1999 на Съвета от 17 май 1999 г. относно общата организация на пазара на мляко и млечни продукти¹, и по-специално членове 10 и 15 и членове 26, параграфи 3, 29, параграф 1 и 31, параграф 14 от него,

като има предвид, че:

(1) Регламенти (ЕИО) № 1216/68 и 3942/92, както и (ЕО) № 86/94, 2721/95, 1080/96, 1081/96, 1082/96, 1854/96, 880/98 и 1459/98 на Комисията, пълното позоваване на които е дадено в приложение XXVI към настоящия регламент, определят референтните и рутинните методи за анализ и оценка на качеството на мляко и млечни продукти и определят обхвата и правилата за прилагане на тези методи. В интерес на яснотата и с оглед да се осигури за работещите в този сектор единен набор от методи и правила за тяхното прилагане, гореупоменатите регламенти би следвало да бъдат преработени и обединени в общ текст. Поради същата причина, Регламент (ЕО) № 2771/1999 на Комисията от 16 декември 1999 г. за определянето на подробни правила за прилагането на Регламент (ЕО) № 1255/1999 на Съвета по отношение интервенцията на пазара на масло и сметана² и Регламент (ЕО) № 2799/1999 на Съвета от 17 декември 1999 г. относно определянето на подробни правила за прилагането на Регламент (ЕО) № 1255/1999 по отношение на предоставянето на помощи за обезмаслено мляко и обезмаслено мляко на прах, предназначено за животинска храна, и продажбата на такова обезмаслено мляко на прах³ би следвало да бъдат изменени, така че приложенията към тези регламенти относно методите за анализ да могат да бъдат включени в настоящия регламент.

(2) Изискванията към състава и качеството на млякото и млечните продукти, определени в Регламент (ЕО) № 1255/1999, трябва да бъдат проверени, за да се гарантира тяхното стриктно изпълнение.

¹ ОВ L 160, 26.6.1999 г., стр. 48.

² ОВ L 333, 24.12.1999 г., стр. 11.

³ ОВ L 340, 31.12.1999 г., стр. 3.

(3) Референтните методи за тези проверки се явяват често методи, които са публикувани от международни организации като CEN, IDF, ISO и AOAC International, и регулярно се актуализират от тези организации. В някои случаи е определен референтен метод на Общността, докато в други случаи в правилата на Общността не е определен референтен метод. За да се гарантира, че референтните методи се прилагат уеднаквено, всяка година би следвало да бъде съставян списък от референтните методи и само методите, които са включени в този списък, могат да се прилагат.

(4) Не би следвало да бъде изключвано използването на рутинни методи. Поради това, би следвало да бъдат определени условията за тяхното използване.

(5) Би следвало да бъдат създадени и общи методи за гарантирането на уеднаквена практика при оценяването на резултатите от анализите, при сензорното оценяване на визираните продукти и при прегледа на резултатите, които се оспорват.

референтни методи и поради това няма налична информация за варирането на аналитичните резултати от отделните лаборатории. Поради това, би следвало да бъдат определени методи на Общността, които са утвърдени съобразно международните правила и могат да се прилагат като референтни методи.

(7) Регламент (ЕО) № 2571/97 на Комисията от 15 декември 1997 г. относно продажбата на масло по намалени цени и за предоставянето на помощи за сметана, масло и концентрирано масло, които се използват в производството на сладкиши, сладолед и други хранителни продукти⁴, последно изменен с Регламент (ЕО) № 635/2000⁵, предвижда проследяването на сметана, масло и концентрирано масло при определени обстоятелства, за да се гарантира правилната крайна употреба на тези продукти. Тъй като проследяването е важно за надлежното функциониране на системата, както и за да се гарантира равно третиране на операторите, които участват в нея, би следвало да бъдат определени общи методи за определянето на някои от индикаторите за проследяването.

(8) Съгласно Регламент (ЕИО) № 3143/85 на Комисията от 11 ноември 1985 г. относно продажбата по намалени цени на интервенционно масло, предназначено за директна консумация под формата на концентрирано масло⁶, последно изменен с Регламент (ЕО) № 101/1999⁷, Регламент (ЕИО) № 429/90 на Комисията от 20 февруари 1990 г. относно предоставянето чрез покана за търг на помощ за концентрирано масло, предназначено за директна консумация в Общността⁸, последно изменен с Регламент (ЕО) № 124/1999⁹ и Регламент (ЕО) № 2571/97, на концентрираното масло трябва да се добавят под наблюдение индикатори за проследяване. Изпълнението на изискванията за проследяване на концентрирано

⁴ ОВ L 350, 20.12.1997 г., стр. 3.

⁵ ОВ L 76, 25.3.2000 г., стр. 9.

⁶ ОВ L 298, 12.11.1985 г., стр. 9.

⁷ ОВ L 11, 16.1.1999 г., стр. 14.

⁸ ОВ L 45, 21.2.1990 г., стр. 8.

⁹ ОВ L 16, 21.1.1999 г., стр. 19.

масло трябва да се налага стриктно с цел да се гарантира, че продуктите не се отклоняват от това изискване. Поради това, би следвало да бъде определен общ метод за откриването на такива индикатори за проследяване.

(9) Съгласно член 9 от Регламент (ЕО) № 1255/1999 може да бъде предоставена помощ за частно съхранение на сирена от овче мляко. Съгласно член 31 от този регламент може да се извърши специално възстановяване на средства за тези продукти. Сирената от овче мляко, козе мляко, биволско мляко и смес от овче, козе и биволско мляко могат да бъдат внасяни в Общността от определени трети страни при преференциални условия. Предвид горните разпоредби, е необходимо извършването на подходящи проверки, за да се гарантира, че във визираните продукти няма краве мляко. Поради това, би следвало да бъде определен референтен метод на Общността за откриване на краве мляко, без да се накърнява използването на рутинни методи, при условие че те изпълняват определени критерии.

(10) Съгласно Регламент (ЕИО) № 2921/90 на Комисията от 10 октомври 1990 г. относно предоставянето на помощ за обезмаслено мляко, което се използва в производството на казеин и казенати¹⁰, последно изменен с Регламент (ЕО) № 2654/1999/ЕО¹¹, следва да бъде установено отсъствието на форми на коли бактерии. Международно признатият референтен метод за откриване на форми на коли бактерии в мляко и млечни продукти е Международен стандарт IDF 73A: 1985. Този стандарт, обаче, е приложим само в модифицирана форма за откриването на форми на коли бактерии в определено количество продукт. Поради това, бе създаден референтен метод на Общността за откриването на форми на коли бактерии, базиращ се на гореупоменатия стандарт.

(11) Регламент (ЕИО) № 2658/87 на Съвета от 23 юли 1987 г. относно тарифната и статистическа номенклатура и за Общата митническа тарифа¹², последно изменен с Регламент (ЕО) № 254/2000¹³, предвижда различни митнически ставки за смеси от хранителни продукти, които попадат в тарифна позиция 2309, в зависимост от съдържанието им на млечни продукти. За да се гарантира, че въпросните правила се прилагат унифицирано, би следвало да бъде определен общо признат метод за анализ на съдържанието на лактоза, който да се използва задължително във всички държави-членки.

(12) Съгласно Регламент (ЕО) № 1255/1999, масло и обезмаслено мляко на прах, предназначено за интервенция или в случай на обезмаслено мляко на прах - за използване като животинска храна, трябва да изпълняват определени изисквания за качество. Би следвало да бъдат определени референтни методи за проверка на спазването на тези изисквания.

¹⁰ ОВ L 279, 11.10.1990 г., стр. 22.

¹¹ ОВ L 325, 17.12.1999 г., стр. 10.

¹² ОВ L 256, 7.9.1987 г., стр. 1.

¹³ ОВ L 28, 3.2.2000 г., стр. 16.

(13) Изпълнението на някои от методите, които се въвеждат за първи път с настоящия регламент, ще изисква известен период за адаптация. Поради това, прилагането на тези методи би следвало да бъде отложено.

(14) Управителният комитет по млякото и млечните продукти не е предоставил мнение в рамките на срока, определен от неговия председател,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

ГЛАВА I

ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ

Член 1

Обхват и приложно поле

Настоящият регламент определя правилата за прилагане на методите за химичен, физичен и микробиологичен анализ и сензорна оценка на мляко и млечни продукти, които следва да се използват при условията, предвидени в общата организация на пазара на мляко и млечни продукти, създадена с Регламент (ЕО) № 1255/1999. Също така, той определя някои от тези методи.

Член 2

Списък от методи

1. В приложение I към настоящия регламент се съдържа списък от референтните методи, които са приложими към анализите, назовани в член 1.
2. Комисията актуализира този списък поне веднъж годишно в съответствие с процедурата, установена в член 42 от Регламент (ЕО) № 1255/1999.

Член 3

Рутинни методи

За анализите, които се изискват съгласно правилата на Общността, могат да бъдат използвани рутинни методи, при условие че те са надлежно приведени в съответствие със стандартите, както референтните методи, и се проверяват регулярно.

Процедурата, описана в приложение II, може да се прилага за проверка на резултатите, получени чрез рутинните методи, които са близо до границите, определени в съответните регламенти. В случай на спор, решаващи са получените чрез референтния метод резултати.

Член 4

Потвърждаване на референтните методи

1. Референтните методи се потвърждават, ако изпълняват предварително определените критерии за прецизност по отношение на границата за повторяемост и възпроизвеждане.
2. Ако установеният в съответните регламенти референтен метод не е потвърден, държавите-членки определят граница за временно възпроизвеждане. Тази граница се получава съгласно процедурата, описана в приложение III, буква б). За първите 18 месеца, обаче, след влизането в сила на настоящия регламент, държавите-членки могат да използват подобна процедура. Съобразността с границата се проверява поне веднъж годишно.
3. Когато резултатите от прилагането на приети референтни методи или методи с временни данни за прецизност показват, че границата е превишена, аналитичните резултати могат да бъдат оценявани като се използва методът, описан в приложение IV, за определяне на критичната разлика спрямо съответната граница.

Член 5

Приемливост на резултатите от анализа

1. Анализите се извършват в лаборатории при спазване на вътрешната процедура за контрол на качеството в съответствие с тази, описана в приложение V, буква а) или еквивалентна процедура.

Подробно описание на прилаганата процедура трябва да бъде на разположение в лабораторията за извършването на справки.

2. Лабораториите създават вътрешни правила за прецизност при използването на всички методи, включително:

а) процедурата, описана в приложение V, буква б), или

б) публикувана, приета процедура с фиксирана повторяемост.

Съблюдаването на границата на възпроизвеждане трябва да бъде проверявано поне веднъж годишно като се използва процедурата, описана в приложение III, буква а). Алинея втора не се прилага за лаборатории, които са участвали в система за професионално тестване в рамките на последната година.

3. Лабораторните отчети на резултатите от анализа трябва да съдържат достатъчно информация за оценката на резултатите, която следва да се направи в съответствие с приложение IV и приложение VIII.

4. Резултатите от анализа се считат за приемливи, ако са получени в съответствие с критериите за приемливост, описани във вътрешната процедура за контрол на качеството, посочена в параграф 1 и правилата за вътрешната прецизност, посочени в параграф 2.

Член 6

Сензорна оценка

1. За масло се прилагат процедурите, описани в приложение VI, за проверка на работата на оценителите и надеждността на резултатите. Процедурата, описана в приложение VII, се прилага като референтен метод за сензорна оценка.

2. За мляко и млечни продукти, които са различни от масло, като референтен метод за сензорна оценка от държавите-членки се използва IDF стандарт 99C/1997 или други сравними методи, за което се уведомява Комисията.

Процедурите, описани в приложение VI, могат да бъдат използвани за проверка на работата на оценителите и надеждността на резултатите.

Член 7

Вземане на проби и оспорвания на резултатите от анализите

1. За анализи, които се изискват съгласно правилата на Общността, трябва да бъдат вземани двойни проби.

2. Процедурата, описана в приложение VIII, се използва в случаите, когато резултатите от анализа не се приемат от оператора.

ГЛАВА I

МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

Член 8

Съдържание на вода/сухо вещество без мазнини/мазнини в масло

1. Методът за анализ, описан в приложение IX, се използва като референтен метод за определяне на водното съдържание в масло.

2. Методът за анализ, описан в приложение X, се използва като референтен метод за определяне на съдържанието на сухо вещество без мазнини в масло.

3. Методът за анализ, описан в приложение XI, се използва като референтен метод за определяне на съдържанието на мазнини в масло.

Член 9

Индикатори за проследяване

1. Методът за анализ, описан в приложение XII, се използва като референтен метод за определяне на ванилин в концентрирано масло, масло и сметана.

2. Методът за анализ, описан в приложение XIII, се използва като референтен метод за определяне на етилов естер с бета-апо-8' съдържание на каротинна киселина в концентрирано масло и масло.

3. Методът за анализ, описан в приложение XIV, се използва като референтен метод за определяне на съдържание на ситостерин или сигмастерол в масло и концентрирано масло.

4. Концентрираното масло, маслото и сметаната са проследени съобразно съответните правила на Общността, ако получените резултати са в съответствие със спецификациите в параграф 8 от приложенията, посочени в параграфи 1, 2 и 3.

Член 10

Откриване на казеин в краве мляко

1. Референтният метод за анализ, описан в приложение XV, се използва, за да се гарантира, че сирене, което трябва да е произведено изключително от овче мляко, козе мляко или биволско мляко или смес от овче, козе и биволско мляко, на практика не съдържа казеин от краве мляко.

Счита се, че е налице казеин от краве мляко, ако видимото съдържание на казеин от краве мляко в анализираната пробата е равно или е по-голямо от съдържанието в референтната проба, съдържаща 1% краве мляко, както е описано в приложение XV.

2. Рутинните методи за откриване на казеин от краве мляко в сирената, посочени в параграф 1, могат да бъдат използвани, при условие че:

а) границата на откриване е 0,5 % или е по-ниска,

б) няма фалшиви положителни резултати,

в) казеинът от краве мляко се открива посредством необходимата чувствителност, дори и след дълги периоди на узряване, които могат да възникват при обичайни търговския условия.

Ако предвиденото в буква б) изискване не е спазено, всяка проба, която дава положителен резултат при използване на референтния метод, трябва да бъде анализирана.

Ако предвиденото в буква в) изискване не е спазено за един от видовете сирене, посочени в параграф 1, сиренето трябва да бъде анализирано при използване на референтния метод.

Член 11

Откриване на форми на коли бактерии

1. Референтният метод за анализ, описан в приложение XVI, се използва за откриване на форми на коли бактерии в масло, обезмаслено масло, казеин и казенати.

2. Рутинните методи за откриване на форми на коли бактерии могат да се използват, при условие че получените резултати са сравними с резултатите, получени чрез референтния метод, описан в упоменатото приложение. Рутинните методи трябва да имат, по-конкретно, адекватна граница за откриване. Не трябва да се получават фалшиви положителни резултати. Ако не може да бъде изключено получаването на фалшиви положителни резултати, всеки положителен резултат трябва да бъде потвърден чрез използване на референтния метод.

Член 12

Съдържание на лактоза

Методът за определяне на съдържанието на лактоза в продукти, попадащи в код по КН 2309, е описан в приложение XVII.

Член 13

Откриване на сирична суроватка

1. Методът за определяне на сирична суроватка в обезмаслено мляко на прах, предназначено за публичен резерв, е описан в приложение XVIII.

2. Методът за определяне на сирична суроватка в обезмаслено мляко на прах и смеси, предназначени за използване като животинска храна, е описан в приложение XIX.

Член 14

Откриване на мътеница

Методът за откриване на мътеница в обезмаслено мляко на прах е описан в приложение XX.

Член 15

Антибиотични утайки

Методът за откриване на антибиотични и сулфонамидни/дапсонови утайки в обезмаслено мляко на прах е описан в приложение XXI.

Член 16

Съдържание на обезмаслено мляко на прах

Методът за определяне на съдържанието на обезмаслено мляко на прах в смеси от хранителни продукти е описан в приложение XXI

Член 17

Откриване на скорбяла

Методът за откриване на скорбяла в обезмаслено мляко на прах, денатурирано мляко на прах и смеси от хранителни продукти е описан в приложение XXIII.

Член 18

Съдържание на влажност в кисела мътеница на прах

Методът за определяне на съдържанието на влажност в кисела мътеница на прах, предназначена за използване в животински храни, е описан в приложение XXIV.

Член 19

Откриване на чужди мазнини

Методът за откриване на чужди мазнини в мазнини на мляко е описан в приложение XXV.

ГЛАВА III

ЗАКЛЮЧИТЕЛНИ РАЗПОРЕДБИ

Член 20

Изменения на Регламент (ЕО) № 2771/1999

Регламент (ЕО) № 2771/1999 се изменя, както следва:

1. Първото изречение на член 4, параграф 1 се заменя със следното: „Компетентните органи проверяват качеството на маслото като използват методите, описани в приложение I, както и на базата на проби, вземани в съответствие с правилата, определени в приложение IV.”
2. В приложение I, бележка под линия №2 се заменя със следното: „Виж приложение I към Регламент (ЕО) № 213/2001”.
3. Приложения II и III се заличават.
4. В предпоследното изречение на приложение IV.2, думите „с приложение III” се заменят със „с приложение VII към Регламент (ЕО) № 213/2001”.

Член 21

Изменения на Регламент (ЕО) № 2799/1999

Регламент (ЕО) № 2799/1999 се изменя, както следва:

1. Член 20, параграфи 1, 2, 3 и 4 се заменят със следното: „1. Съдържанието на обезмаслено мляко на прах в смеси от хранителни продукти се определя чрез поне двойно тестване на всяка проба като се използва методът за анализ, описан в приложение XXII към Регламент (ЕО) № 213/2001, допълнен с проверките, предвидени в член 17, параграф 3 от настоящия регламент. Ако между резултатите от тези проверки има разлика, решаващ се явява резултатът от проверката на място.
 2. Отсъствието на сирична суроватка се проверява чрез използването на метода, описан в приложение XIX към Регламент (ЕО) № 213/2001.
 3. Съдържанието на скорбяла в смеси от хранителни продукти се определя посредством проверките, предвидени в член 17, параграф 3 от настоящия регламент, които трябва да бъдат допълнени с метода за анализ, описан в приложение XXIII към Регламент (ЕО) № 213/2001.
 4. Съдържанието на влажност в кисела мътеница на прах се определя чрез използване на метода за анализ, описан в приложение XXIV към Регламент (ЕО) № 213/2001.”
2. Приложения III, IV, V и VI се заличават.

Член 22

Отмени

Регламенти (ЕИО) № 1216/68, 3942/92, (ЕО) № 86/94, 2721/95, 1854/96, 1080/96, 1081/96, 1082/96, 880/98 и 1459/98 се отменят.

Позоваванията на отменените регламенти се тълкуват като позовавания на настоящия регламент.

Член 23

Влизане в сила

Настоящия регламент влиза в сила на седмия ден от публикуването му в *Официален вестник на Европейските общности*.

Методите, които са описани в приложения III, IV.4, V, VI и VIII, се прилагат след 18 месеца от влизането в сила на настоящия регламент.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

Съставено в Брюксел на 9 януари 2001 година.

За Комисията:
Franz FISCHLER
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

(Член 2)

СПИСЪК НА РЕФЕРЕНТНИТЕ МЕТОДИ

Индекс

Мин. = минимум, Макс. = максимум, Приложение = Приложение към цитирания регламент, SNF = сухо вещество без мазнини, FFA = свободни мастни киселини, PV = пероксидно число, А = форма, F = вкус, С = консистенция, TBC = общо бактериално число, Therm = термофилно бактериално число, MS = държава-членка, IDF = Международна федерация по млякото, ISO = Международна организация по стандартите, IUPAC = Международен съюз за теоретична и приложна химия, ADPI = Американски институт по млечните продукти, SCM = подсладено кондензирано мляко, EMC = сгъстено мляко или сметана, MSNF = млечно сухо вещество без мазнини.

ЧАСТ А

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница	Референтен метод	Забележка
Регламент (ЕО) № 2771/1999 публично складиране (ОВ L 333, 24.12.1999 г., стр. 11)	Неосолено масло	Млечни мазнини	min 82%	Приложение XI	Забележка 1 Забележка 3
		Вода	до 16%	Приложение IX	
		SNF	до 2%	Приложение X	
		FFA (макс.)	1.2 mmole/100 g мазнина	IDF стандарт 6B: 1989	
		V (макс.)	0,3 meq. кислород/1 000 g мазнина	IDF стандарт 74A: 1991 (английска версия)	
		Форми на коли бактерии	Неустановимо в 1 g	Приложение XVII	
		Немлечна мазнина	Неустановимо чрез триглицериден анализ	Приложение XXVI	
Стеролни индикатори	Неустановимо	Приложение XIV			
Други индикатори:					
— ванилин	Неустановимо	Приложение XII			
— етилов естер от каротинна киселина	Неустановимо	Приложение XIII			
— триглицериди от хептанова киселина	Неустановимо	ИUPAC 2.301 sub 5			

		Сензорни характеристики Водна дисперсия	Най-малко 4 от 5 точки за А, Ж и В Най-малко 4 точки	Приложение VII IDF стандарт 112A: 1989	
Регламент (ЕО) № 2771/1999 Частно складиране	Неосолено масло	Млечни мазнини Вода	min 82% до 16%	Приложение XI Приложение IX	Забележка 6
Регламент (ЕО) № 2771/1999 Частно складиране	Осолено масло	Млечни мазнини Вода сол	Мин. 80% До 16% до 2%	Приложение XI Приложение IX IDF стандарт 12B: 1988	Забележка 6

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница	Референтен метод	Забележка
Регламент (ЕО) № 2571/97 (ОВ L 350, 20.12.1997 г., стр. 3)	Неосолено масло	Млечни мазнини Вода Индикатори: — стероли — ванилин — етилов естер от каротинна киселина — триглицериди от хептанова киселина	Мин. 82% До 16%	Приложение XI Приложение IX Приложение XIV Приложение XII Приложение XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Регламент (ЕО) № 2571/97	Осолено масло	Млечни мазнини Вода Сол Индикатори: — стероли — ванилин — етилов естер от каротинна киселина — триглицериди от хептанова киселина	min 80% до 16% до 2%	Приложение XI Приложение IX IDF стандарт 12B: 1988 Приложение XIV Приложение XII Приложение XIII IUPAC 2.301 sub 5	

Регламент (ЕО) № 2571/97	Концентрирано масло	Млечни мазнини Влажност и MSNF FFA PV (макс.) Немлечна мазнина Вкус Миризма Други Индикатори: — стероли — ванилин — етилов естер от каротинна киселина — триглицериди от хептанова киселина	Мин. 99,8% До 0,2% до 0,35% (олеинов) 0,5 меq. кислород/1 000 g мазнина отсъствие чисто Отсъствие на чужди мазнини Отсъствие на неутрализиращи агенти, антиоксиданти и консерванти	IDF стандарт 24: 1964 IDF стандарт 23A: 1988 (влажност) IDF стандарт 24: 1964 (MSNF) IDF стандарт 6B: 1989 IDF стандарт 74A: 1991 (английска версия) приложение XXV Приложение XIV Приложение XII Приложение XIII IUPAC 2.301 sub 5	Забележка 1
-----------------------------	------------------------	---	--	---	-------------

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница	Референтен метод	Забележка
Регламент (ЕО) № 2571/97	сметана	мазнина Индикатори: — стероли — ванилин — етилов естер от каротинна киселина	35%	IDF стандарт 16C: 1987 Методи, одобрени от компетентния орган Приложение XII Методи, одобрени от компетентния орган	Забележка 2 Забележка 2

		— триглицериди от хептанова киселина		IUPAC 2.301 sub 5		
Регламент (ЕИО) № 429/90 (ОВ L 45, 21.2.1990 г., стр. 8)	Концентрирано масло	Млечни мазнини	Мин. 96%	Методи, одобрени от компетентния орган	Забележка 2	
		SNF	до 2%	Методи, одобрени от компетентния орган	Забележка 2	
		Индикатори:				
		— стигмастерол (95 %)	15 g/100 kg концентрирано масло	Приложение XIV		
		— стигмастерол (85 %)	17 g/100 kg концентрирано масло	Приложение XIV		
		— триглицериди от хептанова киселина	1,1 kg/100 kg концентрирано масло	IUPAC 2.301 sub 5		
		— етилов естер от маслена киселина и стигмастерол	Виж приложение, точка 1(в)	Приложение XIV	Забележка 2	
		— лецитин (E 322)	до 0,5%	Методи, одобрени от компетентния орган	Забележка 2	
		NaCl	До 0,75%	IDF стандарт 12В: 1988		
		FFA	До 0,35% (олеинов)	IDF стандарт 6В: 1989		
PV (макс.)	До 0,5 теж. кислород/1 000 g мазнина	IDF стандарт 74А: 1991 (английска версия)	Забележка 1			
Вкус	Чисто					
Миризма	Отсъствие на чужди мазнини					
други	Отсъствие на неутрализиращи агенти, антиоксиданти и консерванти					
Регламент (ЕИО) № 2191/81 (ОВ L 213, 1.8.1981 г., стр. 20)	Неосолено масло	Млечни мазнини Вода	Мин. 82% до 16%	Приложение XI Приложение IX		

Регламент на Комисията	продукт	параметър	граница	Референтен метод	забележка
Регламент (ЕИО) № 2191/81	Осолено масло	Млечни мазнини вода сол	Мин. 80% До 16% До 2%	Приложение XI Приложение IX IDF стандарт 12B: 1988	
Член 9 и Раздел II на Регламент (ЕО) № 1255/1999	Сирене, произведено от овче и/или козе мляко	Краве мляко	< 1%	Приложение XV	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение I — кисел казеин	вода Мазнини Свободна киселинност	До 12,00% До 1,75% до 0,30% (млечен)	IDF стандарт 78C: 1991 IDF стандарт 127A: 1988 IDF стандарт 91: 1979	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение I — сирищен казеин	Вода Мазнини Шлака	До 12,00% До 1,00% Мин. 7,50%	IDF стандарт 78C: 1991 IDF стандарт 127A: 1998 IDF стандарт 90: 1979	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение I — казенати	Вода Млечен протеин Мазнини и шлака	До 6,00% Мин. 88,00% до 6,00%	IDF стандарт 78C: 1991 IDF стандарт 92: 1979 IDF стандарт 127A: 1988 IDF стандарт 89: 1979 или IDF стандарт 90:1979	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение II — кисел казеин	Водна киселинност без мазнини ТВС (макс.) Форми на коли бактерии Therm. (макс.)	До 10,00% До 1,50% До 0,20% (млечен) 30 000 I/g Отсъствие в 0,1 g 5 000 I/g	IDF стандарт 78C: 1991 IDF стандарт 127A: 1988 IDF стандарт 91: 1979 IDF стандарт 100B: 1991 Приложение XVI IDF стандарт 100B: 1991	Забележка 3 Забележка 3 Забележки 3 и 4
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение II — сирищен казеин	Вода	До 8,00%	IDF стандарт 78C: 1991	

		Мазнини Шлака ТВС (макс.) Форми на коли бактерии Therm. (макс.)	до 1,00% min 7,50% 30 000 l/g Отсъствие в 0,1 g 5 000 l/g	IDF стандарт 127A: 1988 IDF стандарт 90: 1979 IDF стандарт 100B: 1991 Приложение XVI IDF стандарт 100B: 1991	Забележка 3 Забележка 3 Забележки 3 и 4
--	--	---	---	--	--

Регламент на Комисията	продукт	Параметър	граница	Референтен метод	забележка
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение II — казенати	Вода Млечен протеин Мазнини и шлака ТВС (макс.) Форми на коли бактерии Therm. (макс.)	До 6,00% min 88,00% До 6,00% 30 000 l/g Отсъствие в 0,1 g 5 000 l/g	IDF стандарт 78C: 1991 IDF стандарт 92: 1979 IDF стандарт 127A: 1988 IDF стандарт 89: 1979 или 90:1979 IDF стандарт 100B: 1991 Приложение XVI IDF стандарт 100B: 1991	 Забележка 3 Забележка 3 Забележки 3 и 4
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение III — казенати	Вода Млечен протеин Мазнини Лактоза Шлаки Форми на коли бактерии Therm. (макс.)	До 6,00 % min 85,00% До 1,50% До 1,00% До 6,50% 30 000 l/g Отсъствие в 0,1 g 5 000 l/g	IDF стандарт 78C: 1991 IDF стандарт 92: 1979 IDF стандарт 127A: 1988 IDF стандарт 106: 1982 IDF стандарт 89: 1979 или 90:1979 IDF стандарт 100B: 1991 Приложение XVI IDF стандарт 100B: 1991	 Забележка 3 Забележка 3 Забележки 3 и 4

Регламент (ЕО) № 2799/1999 (ОВ L 340, 31.12.1999 г., стр. 3)	Смеси от хранителни продукти и обезмаслено мляко на прах (SMP) (за използване в животинска храна)	вода (кисела мътеница на прах) протеин вода (SMP)	До 5% 31,4% (min) от сухото вещество без мазнини) до 5%	IDF стандарт 20B: 1993 IDF стандарт 26A: 1993 IDF стандарт 9C: 1987 Приложение XIX Приложение XXIII IDF стандарт 26A: 1993 Директива на Комисията 84/4/ЕИО (ОВ L 15, 18.1.1984 г., стр. 28) Приложение XIX Приложение XXII Директива на Комисията 84/4/ЕИО Приложение XXIII Директива на Комисията 78/633/ЕИО (ОВ L 206, 26.7.1987 г., стр. 43)	Забележка 7
		Мазнини (SMP)	До 11%		
		Сирична суроватка (SMP)	Отсъствие		
		Скорбяла (SMP)	Отсъствие		
		вода (смеси)	До 5% от сухото вещество без мазнини		
		мазнини (смеси)	—		
сирична суроватка (смеси) SMP съдържание (на крайния продукт)	Отсъствие Мин. 50%	Забележка 7			
мазнини (в крайния продукт)	Мин. 2,5% или 5%		Забележка 8		
скорбяла (в крайния продукт)	Мин. 2%		Забележка 9		
	мед (в крайния продукт)	25 ppm			

Регламент на Комисията	продукт	Параметър	граница	Референтен метод	Забележка
Регламент (ЕО) № 322/96 (ОВ L 45, 23.2.96 г., стр. 5)	SMP (спрей)	мазнини протеин	до 1,0% 31,4% (min) от сухото вещество без мазнини	IDF стандарт 9C: 1987 IDF стандарт 20B: 1993	
		Вода	До 3,5%	IDF стандарт 26A: 1993	
		Киселинност (N/10 NaOH)	До 19,5 ml	IDF стандарт 86: 1981	
		Лактати	До 150 mg/100 g	IDF стандарт 69B: 1987	
		Фосфати	Отрицателно	ISO стандарт 3356: 1975	

	Разтворимост	До 0,5 ml при 24 °C	IDF стандарт 129A: 1988	
	Обгорели частички	Филтър В min (15,0 mg)	ADPI: 1990	
	TVC	40 000/1 g	IDF стандарт 100B: 1991	Забележка 3
	Форми на коли бактерии	отрицателно/0,1 g	Приложение XVI	Забележка 3
	Мътеница	Отрицателно	Приложение XX	
	Сирична суроватка	Отрицателно	Приложение XVIII	
	Кисела суроватка	отрицателно	Метод, одобрен от компетентния орган	Забележка 2
	Антимикробни агенти		Приложение XXI	

ЧАСТ Б

Референтните методи, изброени в част Б, могат да бъдат използвани за продуктите, обхванати от някой от регламентите, изброени в колона 1.

Регламент на Комисията	продукт	Код по КН	параметър	граница	Референтен метод	Забележка
Регламент (ЕИО) № 2658/87 (ОВ L 256, 7.9.1987 г., стр. 1) Регламент (ЕО) № 2414/98 (ОВ L 299, 10.11.1998 г., стр. 7) Регламент (ЕО) № 1374/98 (ОВ L 185, 30.6.1998 г., стр. 21) Регламент (ЕО) № 2508/97 (ОВ L 345, 16.12.1997 г., стр. 31) Регламент (ЕО) № 174/1999 (ОВ L 20, 27.1.1999 г., стр. 8)	Мляко и сметана, неконцентрирани, нито подсладени със захар или друг подсладител	0401	мазнини ($\leq 6\%$) мазнини ($> 6\%$)	Границите са тези, определени в описанието на кода по КН за специфичния продукт, дефиниран по-нататък, когато е приложим в Регламент 3846/87/ЕИО на Комисията (ОВ L 366, 24.12.1987 г., стр. 1), част 9 от экспортната номенклатура, или Регламент 1374/98/ЕО (ОВ L 185, 30.6.1998 г., стр. 21)	IDF стандарт 1D: 1996 IDF стандарт 16C: 1987	

Регламент на Комисията	продукт	Код по КН	параметър	граница	Референтен метод	забележка
	Мляко и сметана, неконцентрирани,	0402	мазнини (течна форма)		IDF стандарт 13C: 1987	

<p>нито подсладени със захар или друг подсладител</p>		<p>мазнини (твърда форма) Протеин захароза (нормално съдържание) Захароза (ниско съдържание) Сухо вещество (SCM) Сухо вещество (EMC) Вода (мляко и сметана на прах)</p>		<p>IDF стандарт 9C: 1987 IDF стандарт 20B: 1993 IDF стандарт 35A: 1992 Методи, одобрени от компетентния орган IDF стандарт 15B: 1991 IDF стандарт 21B: 1987 IDF стандарт 26A: 1993</p>	<p>Забележка 2</p>
<p>мътеница, ферментирала или вкиснала, мляко и сметана, концентрирани или неконцентрирани, подсладени със захар или друг подсладител</p>	<p>0403</p>	<p>Мазнини протеин захароза (нормално съдържание) захароза (ниско съдържание) вода (кисела</p>		<p>IDF стандарти 1D: 1996, 9C: 1987, 16C: 1987, 22B: 1987, 126A: 1988 IDF стандарт 20B: 1993 IDF стандарт 35A: 1992 Методи, одобрени от компетентния орган Приложение XXIV</p>	<p>Забележка 2</p>

		мътеница на прах)			
		Вода (сладка мътеница на прах)			IDF стандарт 26A: 1993
		Сухо вещество (други продукти)			Методи, одобрени от компетентния орган
суроватка, концентрирана или неконцентрирана, подсладена със захар или друг подсладител; продукти, съставени от натурални млечни съставки	0404	Мазнини			IDF стандарти 9C: 1987, 16C: 1987 22B: 1987 IDF стандарт 20B: 1993 IDF стандарт 35A:1992
	0404 90	Протеин Захароза (нормално съдържание) Захароза (ниско съдържание)			Методи, одобрени от компетентния орган
	0405	Протеин Вода Сухо вещество (концентрирани продукти)			IDF стандарт 20B: 1993 IDF стандарт 26A: 1993 IDF стандарт 15B: 1991 IDF стандарт 21B: 1987
Масло и други мазнини, получени от мляко ; млечни пасти за намазване		Мазнини (ако са ≤ 85 %)			Приложение XI
	Масло	вода SNF NaCl			Приложение IX Приложение X IDF стандарт 12B: 1998
	Масло за производ- ство на	мазнини (ако са > 99 %)			IDF стандарт 24: 1964

Забележка
2

Регламент на Комисията	Продукт	Код по КН	параметър	граница	Референтен метод	забележка
		маргарин	вода (ако мазнините са < 99 %)		IDF стандарт 23A: 1988	
	Сирене и извара	0406	Сухо вещество от мазнини Сухо вещество (Ricotta) NaCl лактоза		IDF стандарт 5B: 1986 IDF стандарт 4A: 1982 IDF стандарт 58: 1970 IDF стандарт 88A: 1988 IDF стандарт 79B: 1991	
Регламент (ЕИО) № 2658/87	Смеси от хранителни продукти	2309	лактоза		Приложение XVII	

Бележки към списъка от референтните методи на Европейския съюз:

Бележка 1: Изолиране на млечни мазнини, както е описано в IDF стандарт 6B: 1989 (защита от светлина).

Бележка 2: Не е създаден референтен метод.

Бележка 3: Следва да бъде подготвена проба в съответствие с IDF стандарт 122C: 1996 или IDF стандарт 73A: 1985.

Бележка 4: Инкубация за 48 часа при температура от 55 °C; би следвало да се положат грижи за предотвратяване изсушаването на средата на пробата.

Бележка 5: % SNF = % сухо вещество – % мазнина.

Бележка 6: Маслото трябва да отговаря на националния клас за качество на държавата-членка на производството, посочена в приложение V на Регламент (ЕО) № 2771/1999 на Комисията.

Бележка 7: Директива 84/8/ЕИО на Комисията.

Бележка 8: Регламент (ЕО) № 1758/94 на Комисията (ОВ L 183, 19.7.1994 г., стр. 14).

Бележка 9: Директива 78/633/ЕИО на Комисията.

ПРИЛОЖЕНИЕ II
(Член 3)

**ПРОВЕРКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ ЧРЕЗ РУТИННИТЕ МЕТОДИ РЕЗУЛТАТИ,
КОИТО СА БЛИЗКИ ДО ГРАНИЦИТЕ, ОПРЕДЕЛЕНИ В РЕГЛАМЕНТИТЕ
ЗА ИЗИСКВАНИЯТА ЗА СЪСТАВ И КАЧЕСТВО**

Ако m е граница за изискванията за състав и качество, определена в регламент, то решението за границата (L) е:

$$L = m_0$$

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

R_{Rout} : граница на възпроизвеждане на рутинния метод

R_{Ref} : граница на възпроизвеждане на референтния метод

Ако m е горна граница и $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} > 1$, решението за границата се получава като се използва формулата:

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

Ако при същите условия m_0 е долна граница, решението за границата се получава като се използва формулата:

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

където CrD_{95} е критичната разлика на референтния метод (виж приложение IV).

Когато m е горна граница, окончателният резултат за решението на границата, получен чрез използване на рутинен метод, трябва да бъде заменен с окончателен резултат, получен чрез използване на референтен метод. Този окончателен резултат трябва да се базира поне на същия брой анализи/проби, както окончателният резултат, получен чрез използване на рутинния метод.

Когато m е долна граница, същата процедура трябва да бъде следвана за окончателен резултат, който се намира под решението за граница, получен чрез използване на рутинен метод.

Бележка

Гореописаната процедура може да бъде следвана, ако няма налице откриваеми матрични ефекти.

Матричните ефекти могат да бъдат откривани по следния начин: за всяка проба, използвана за калибриране, се определя разликата (w_i) между резултатите, получени с референтния и рутинния метод.

Стандартното отклонение се изчислява чрез използване на формулата:

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

m: брой проби, използвани за калибриране

То се сравнява с аритметичното значение на повтарящото се стандартно отклонение на референтния и рутинния метод:

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

Матричен ефект може да бъде изключен, ако:

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

където,

f = m (f: брой на степените на свобода)

α = вероятност за грешка; $\alpha = 0,05$.

В този случай, преди да се определи решението за граница, са необходими по-нататъшни изследвания.

ПРИЛОЖЕНИЕ III

(Членове 4 и 5)

а) процедура за определяне съблюдаването на установена граница на възпроизвеждане (химически анализ)

Съблюдаването на границата на възпроизвеждане се проверя чрез сравняване на лабораторните резултати с резултатите от лаборатория с опит¹⁴, получени чрез използване на идентична проба. В двете лаборатории се извършва двойно определяне и резултатите се оценяват чрез използване на формулата:

$$CrD_{95}(|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

където:

CrD 95: критична разлика (P = 0.95)

y -1: аритметично значение на двата резултата, получени в лаборатория 1

y -2: аритметично значение на двата резултата, получени в лаборатория 2

R: граница на възпроизвеждане, която следва да се определи чрез интерполация

r: граница на възпроизвеждане, когато прецизността се променя с нивото.

Ако критичната разлика е превишена, то тогава в рамките на следващите два месеца трябва да бъде извършен друг експеримент. Ако резултатите от втория експеримент не отговарят на сравнителната граница, компетентните органи трябва да предприемат необходимите стъпки.

б) процедура за получаване на временна граница на възпроизвеждане (химически анализ)

Временна граница на възпроизвеждане (R_{prov}) се получава чрез използване на следното уравнение:

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

y -1: средна стойност на два резултата, получени в лаборатория 1

y -2: средна стойност на два резултата, получени в лаборатория 2 (виж Приложение IIIa)

r: граница на възпроизвеждане или временна граница на възпроизвеждане.

Бележки:

1. R_{prov} може да се използва за изчисляване на критични граници (виж

¹⁴ Лаборатория с опит би следвало да бъде по принцип лаборатория, която е участвала успешно или в утвърждаване на тестовия метод или в тест за професионалност.

приложение VI).

2. R prov се фиксира на 2г, ако изчислената стойност за R prov е по-малка от 2г.
3. Ако изчислената стойност е по-голяма от 3г или е два пъти по-голяма от R-стойността, изчислена с уравнението на Хорвитц (*), то тогава R prov е с неприемливо висока стойност и не може да се използва за изчисляване на критичната граница.
4. Стойността на R_{prov} би следвало да бъде определяна поне веднъж годишно на базата на резултатите, получени в две лаборатории (виж приложение IV).
5. Средната стойност на R prov трябва да бъде използвана за изчисляването на критични граници. Дадените в 2 и 3 правила се прилагат за средната стойност на R prov.

(*) Уравнение на Хорвитц:

$$RSD_R(\%) = 2^{1-0,5 \log_{10} c}$$

където:

RSD_R: относителното сравнително стандартно отклонение

c: концентрация, изразена като десетична дроб (пример: 10 g/100 g = 0,1).

Позовавания:

Peeler, J.T., Horwitz, W. and Albert, R.

J.Ass. Off. Anal. Chem.

72(5), 784-806 (1989).

Границата на възпроизвеждане (R-стойност) е получена от изчислената RSD_R-стойност, както следва:

$$R = 0.0283 \bar{x} RSD_R$$

(x: средна аритметична стойност на получените резултати)

Някои изчислени RSD_R - стойности (примери)

Концентрация	RSD R (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

При концентрация на аналит от 1 g/100 g, се получава следната стойност:
 $R = 0.0283 \times 4 = 0,11 \text{ g /100 g}$

ПРИЛОЖЕНИЕ IV
(Член 4)

**ОЦЕНКА НА АНАЛИТИЧНИТЕ РЕЗУЛТАТИ, ПОЛУЧЕНИ ЧРЕЗ
ИЗПОЛЗВАНЕТО НА УТВЪРДЕНИ МЕТОДИ**

Средно аритметичната стойност на два или повече резултата се изчислява, ако аналитичният резултат показва, че е превишена граница. Следната процедура следва да бъде спазвана:

1. В случаите, в които аналитичният резултат представлява единичен резултат, трябва да бъде извършен втори анализ при сравнителни условия. Ако и двата анализа не могат да бъдат извършени при сравнителни условия, се извършва допълнителен двоен анализ при сравнителни условия и тези резултати се използват за оценката на съблюдаването на критичната граница.
2. Абсолютната стойност на разликата между средната стойност на резултатите, получени при сравнителни условия, и границата е определена. Абсолютна стойност на разликата, която е по-голяма от критичната разлика, показва, че анализираната проба не изпълнява изискванията.

Критичната разлика се определя чрез използване на следната формула:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

където:

у: средна стойност на получените резултати

m₀: граница

n: брой анализи/проби

Ако прецизността се променя от нивото, може да е необходимо да се определи r и R чрез интерполация.

Обикновено, окончателният резултат, отчитан за пробата, трябва да показва, че границата се съблюдава.

Поради това, окончателните резултати:

- в обхвата на m_0 и $m_0 + CrD_{95}(\bar{y} - m_0)$, ако границата е максимум,

- в обхвата на m_0 и $m_0 + CrD_{95}(\bar{y} - m_0)$, ако границата е минимум,

би следвало да се получат само като изключение.

Окончателните резултати в рамките на упоменатите обхвати са приемливи, само ако се получават не повече от веднъж на всеки пет проби, анализирани за пратка. Ако за пратка се анализират по-малко от пет проби, се приема един резултат в рамките на упоменатия обхват. Правилото, че в рамките на упоменатия обхват за пет анализирани проби се получава само един резултат, трябва да се спазва, ако производителят представя едни и същи пратки.

3. Ако окончателният резултат x се изчислява чрез използване на формула като $x = y_1 \pm y_2$ (пример: вода + съдържание сухо вещество без мазнини в масло за изчисляване на съдържанието на мазнини), където y_1 и y_2 са окончателните резултати на единичен тип анализ, то тогава общите граници на повторемост и границите на възпроизвеждане r и R на окончателните резултати се изчисляват, като:

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

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

където r_1 и r_2 са границите за повторемост, а R_1 and R_2 са границите на възпроизвеждане на y_1 и y_2 , съответно.

x се сравнява с границата m_0 , като се спазват определените в 1 и 2 правила. Критичната разлика се определя чрез използването на формула:

$$CrD_{95}(|x - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

където x е средната стойност на получените резултати x_1 .

4. Ако окончателният резултат се изчислява чрез използване на формулата:

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

(пример: мазнина в съдържание сухо вещество на сирене)

където y_1 и y_2 са окончателните резултати на единичен тип анализ, то тогава общите граници на повторемост и границите на възпроизвеждане r и R на окончателните резултати могат да бъдат изчислени, като:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{x1}^2 + r_{x2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{x1}^2 + R_{x2}^2}$$

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

μ_1 : граница или целева стойност за y_1 (пример: мазнина)

μ_2 : граница или целева стойност за y_2 (пример: сухо вещество)

$$r_{x1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0.15$$

$$r_{x2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

където:

r_1 : граница на повторяемост y_1

r_2 : граница на повторяемост y_2

$$R_{x1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0.15$$

$$R_{x2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

където:

R_1 : граница на възпроизвеждане y_1

R_2 : граница на възпроизвеждане y_2

Процедурите за изчисляване на r_x и R_x са приложими, само ако относителните граници на повторяемост и границите на възпроизвеждане r_1, r_2, R_1, R_2 са по-малки или равни на 0,15.

x се сравнява с границата μ_x , като се спазват определените в 1 и 2 правила.

Критичната разлика се определя чрез използване на формулата:

$$CrD_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

където \bar{x} е средно аритметичната стойност на резултатите x , получени по хронологичен ред (*).

(*) *Бележка:* Ако например, резултатите y_{11} и y_{22} са получени, трябва да бъде изчислена средно аритметичната стойност на y_{11}/y_{21} и y_{12}/y_{22} .

ПРИЛОЖЕНИЕ V

ВЪТРЕШЕН КОНТРОЛ

(Член 5)

а) Процедура за вътрешен контрол на качеството (ВКК) (химически анализ)

Дефиниция на контролния материал

Материалът, който се използва за целта на ВКК, е предмет на същата или част от същата процедура за тестване на материали.

Контролен материал може да бъде:

- сертифициран референтен материал,
- вътрешен референтен материал,
- материал, утвърден от вътрешен лабораторен тест,
- обогатен материал.

Процедура за създаване на ВКК

Лабораторията би следвало да въведе ВКК като спазва процедурата, описана в документа на IUPAC „Хармонизирани указания за вътрешен контрол на качеството в аналитични лаборатории” (¹).

ВКК се извършва чрез включването на контролните материали в аналитичната им последователност или чрез възпроизвеждането на анализа върху същата тестова проба. Контролните материали трябва да са еднакви по химически състав с тестовите проби и да бъдат адекватно стабилни през наблюдавания период. Трябва да се демонстрира, че те могат да бъдат разделени по подходящ начин на равни части за анализ и имат концентрация на аналити, подходяща за сферата на наблюдение.

Контролният материал трябва да бъде включен поне веднъж при всяка аналитична серия и получената стойност трябва да бъде вписвана в контролна диаграма, за да се измерват дългосрочните грешки. В допълнение, лабораторията би следвало периодично да демонстрира изпълнение на границите за повторяемост в рамките на серията. Това може да бъде постигнато чрез двойни анализи на контролните и/или тестовите материали. Резултатите от тези анализи би следвало да бъдат сравнени с всички публикувани граници за повторяемост и съществуващите данни за вътрешната прецизност.

Когато се използват контролни материали, получените стойности между аналитичните серии на контролния материал трябва да бъдат вписвани в диаграма-Shewhart (ISO 8258 (1991)) с подходящи контролни граници. Границите за действие трябва да бъдат установени:

$$x \pm 3s_r$$

където s_t е общото стандартно отклонение:

предупредителните граници са при $x \pm 2s_t$,

Общото стандартно отклонение:

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

в което:

s_b : Стандартно отклонение между аналитичните серии

s_w : Стандартно отклонение в рамките на аналитичните серии

n : Брой определяния

В случаите, в които контролните материали не се използват (напр. поради липса на стабилност), във всяка серия трябва да бъде анализиран двойно поне един от тестовите материали.

Абсолютната разлика, получена от двойния анализ в рамките на серия (виж приложение III), трябва да бъде вписана. Централната линия е $1.128 s_w$, долната граница е 0, горната граница (граница на действие) е $3.686 s_w$, където s_w е стандартното отклонение в рамките на серията.

Контролната процедура би следвало да включва материали с ниско и високо ниво, когато степента на концентрация е голяма.

(¹) М. Thompson и R. Wood: „Теоретична и приложна химия” 67 (4), 649-666 (1995).

Ако тестовите материали обхващат голяма област на концентрация на аналити, лабораторията би следвало да установи връзката между прецизността и нивото. Ако прецизността е пропорционална на нивото, последващият контрол би следвало да се базира на относителна прецизност (т.е. абсолютната разлика като процент от средната стойност).

Когато е налице условие, което е извън контрол в аналитичната система, то се идентифицира при възникване на следното:

А. настоящата стойност на резултата попада извън границите на действие,

В. настоящата стойност и предходната стойност попадат извън предупредителните граници, но в рамките на границите на действие,

В. когато се използват контролни материали, девет последователни стойности попадат от същата страна на средната линия.

Лабораторията би следвало да отговори на условие, което е извън контрол, чрез:

А. преустановяване на анализа и провеждане на диагностични тестове и поправителни мерки, и

Б. отказ от резултатите от сериите и повторно анализиране на тестовите материали.

б) процедура за избор на вътрешен контролен материал и определяне на „вътрешни” граници за прецизност (химически анализ)

Данните за лабораторна прецизност могат да бъдат получени чрез възпроизвеждане на анализ на контролни материали и/или чрез възпроизвеждане на анализ на тестови проби.

Лабораториите би следвало да използват при съставянето на контролни диаграми следната процедура за установяване на параметри на прецизността за варирането в рамките на серията и между сериите. Лабораториите могат да приемат алтернативни процедури, при условие че могат да демонстрират по адекватен начин, че са получени надеждни данни за прецизност.

1. Избор на контролни материали

Когато за лабораторията е уместно да използва контролен материал, първо трябва да бъдат получени данните, с оглед определянето на граници. Когато е възможно, би следвало да бъдат използвани сертифицирани референтни материали (СРМ). Бъдещите контролни материали би следвало да бъдат анализирани при условия на повторяемост в рамките на серията, включително подходящи СРМ, с възпроизвеждане и хаотизиране. Когато този подход не е подходящ, лабораториите би следвало да се стремят да участват в професионално тестване и да установяват съгласувани средни стойности (определени стойности), които могат да бъдат считани като приета реална средна стойност, съдържаща фактор на несигурност. Други подобни процедури включват определянето на реална стойност чрез изчисляването на формулата или използването на контролни материали, заместени с анализи.

В допълнение, когато лабораторията извършва регулярно този тип анализ и вече е създадала статистически контрол, всички нови контролни материали (напр. изисквани поради изчерпване на количествата) трябва да бъдат получавани по отношение на анализите, които се контролират при използване на съществуващите материали.

2. Определяне на граници

След като е избран контролен материал, лабораторията би следвало да го използва, за да определи данните на прецизността в рамките на серията и между сериите. Като минимално изискване за установяването на прецизност в рамките на серията, контролният материал би следвало да се анализира двойно 12 пъти. Двойният анализ би следвало да бъде извършван при условия за повторяемост, т.е. същият оператор, същите реагенти и т.н. Двойният анализ на контролния материал би следвало да бъде хаотизиран в рамките на аналитичната серия. Всеки двоен анализ би следвало да бъде предприеман в отделен ден за период от време, така че да се отчете варирането от серия до серия, като се вземат предвид нормалните вариации, напр. реагенти, инструменти, ново калибриране и, ако е уместно, различни анализатори.

Бележка: Използването на данните, които не са напълно представителни за вариацията между сериите, може да резултира в ненужно възпроизвеждане на анализ поради определянето на изключително тесни граници. От друга страна, лаборатория с прекалено неточни данни на прецизността може да не достигне предписаните в референтните методи граници и би следвало да очаква да покаже слаб резултат в сравнение с други лаборатории, както и да представи данни, които

не са подходящи за целта.

2.1. Определяне на прецизност в рамките на серията

2.1.1. Прецизност в рамките на серията, когато е наличен контролен материал
Двойните данни (минимум 12 дублирания) би следвало първо да бъдат предмет на Cochran-тест за максималните вариации. Това включва сравняване на максималния обхват на дублиране на квадрат със сумата на обхватите на квадрат.

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

където:

d_i = разликата между дублиранията.

Стойността на критерия C на Cochran се сравнява с табулираните стойности (ISO 5725 (1994)). Когато стойността може да се класифицира като изоставаща или отдалечаваща се, резултатът би следвало да бъде проучен за обяснение, напр. техническа грешка, изчислителна грешка, грешка при провеждането на теста, анализ на грешна проба. Ако обяснението на техническата грешка е такова, че замяната на съмнителния резултат се оказва невъзможна, то този резултат би следвало да се отстрани като реална отдалечаваща се стойност. Ако останат каквито и да е изоставащи или отдалечаващи се стойности, които не могат да бъдат обяснени, изоставащите стойности се запазват като коректни, а статистически отдалечаващите се стойности се отстраняват. Лабораторията би следвало да се стреми да получава заместващи стойности.

Когато лабораторията се увери, че в данните няма изоставащи стойности, стандартното отклонение в рамките на серията s_w се получава, както следва:

За всяка двойка x_{i1}, x_{i2} на данните на дублиранията, сумата на дублиранията,

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

и разликата между дублиранията,

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

се сравняват и сумират до:

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

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

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

Оценката на стандартното отклонение в рамките на серията е:

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

Границата на вътрешната прецизност е: $2.8 s_w$.

Ако се използва референтен метод, границата на вътрешната прецизност би следвало да бъде сравнявана с публикуваната граница на повторяемост. Лабораторията би следвало да изпълнява изискването на референтния метод. Неспазването на това изискване би следвало да бъде проучвано. Определените граници би следвало да бъдат считани като временни и предмет на преглед.

2.1.2. Прецизност в рамките на серията, когато не е наличен контролен материал
Лабораторията може да избере да определи прецизност в рамките на серията чрез двоен анализ на представителни тестови проби (минимум 12 дублиращи анализа). В случаите, в които не е възможно да се използват контролни материали, напр. поради нестабилност, дублиращите данни трябва да бъдат събрани с този метод.

Бележка: Предполага се, че анализите покриват относително близък обхват на стойностите и поради това за всички проби може да бъде прилагана единична стойност. В случаите, в които обхватът на резултатите е по-широк, напр. по реда на величините, и прецизността зависи от нивото, лабораториите би следвало да проучват използването на относителните стандартни отклонения.

Данните би следвало да се подложат на Cochran-тест, както в 2.1.1. Когато лабораторията е уверена, че в данните няма изоставащи стойности, стандартното отклонение в рамките на серията и границата на вътрешната прецизност могат да бъдат получени, както в раздел 2.1.1.

Стандартното отклонение s_w в рамките на серията може да бъде използвано за съставянето на контролни диаграми (виж приложение II). Определените граници би следвало да бъдат считани като временни и предмет на преглед.

2.2. Определяне на прецизността между сериите

За всяка двойка се изчислява средно аритметичната стойност ($s_1/2$) и тези стойности се подлагат на Grubbs-тест (ISO 5725 (1994)). Критериите за отказ/приемане на отдалечаващите се стойности или на изоставащите стойности са както описаните в 2.1.1. Лабораторията би следвало да се стреми да получава заместваща стойност за всеки отстранен резултат. Когато лабораторията е уверена, че в данните няма отдалечаващи се стойности, стандартното отклонение между сериите s_b се изчислява:

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

или 0, ако изразът под знака за корен квадратен е отрицателен.

Общото стандартно отклонение s се използва за съставянето на контролни диаграми за средната стойност на n определяния (виж приложение II). Определените граници би следвало да бъдат считани като временни и предмет на преглед.

3. Преглед на първоначалните граници

Контролните граници, определени както е описано по-горе, трябва да бъдат считани като първоначални оценки.

С оглед да се актуализират определените граници на базата на приемлива оценка в рамките на сериите (раздел 2.1.2), за тестовите проби би следвало да бъдат събрани допълнителни дублиращи данни. Периодът преди прегледа ще зависи от последователността на анализа. Като указание, данните би следвало да бъдат прегледани след получаването на 10 допълнителни дублирания. След това, всички данни би следвало да бъдат подложени на Cochran-тест, както и отново да бъдат определени границите на базата на новото стандартно отклонение. В светлината на допълнителните данни, трябва да бъдат взети последващи решения за валидността на контролните граници.

Прегледът на първоначалните данни, получени при оценката между сериите, зависи също и от последователността на анализа. Като указание, след като са получени допълнително десет точки данни от анализа на контролния материал при последователност от един анализ за партида, направените първоначални предположения за стандартното отклонение и средната стойност би следвало да бъдат преразгледани.

Всички данни би следвало да бъдат подложени на Grubbs-тест за отдалечаващите се резултати. Средната стойност и стандартното отклонение би следвало да бъдат преизчислени на базата на новите данни.

В допълнение, на този етап лабораторията би следвало да прилага Cusum-диаграма

(BS S700: (1984) с изменение и допълнение 5480 (1987)), за да проучва всички проблеми, които могат да бъдат свързани, напр. с остаряването на реагенти. Всеки единичен резултат, който попада извън границата на Cusum-”V-маска”, трябва да бъде проучен.

Новите граници (средна стойност и стандартно отклонение) трябва да са предмет на регулярна проверка чрез използването на Cusum-техниката. Всяка индикация, че валидността на контролния материал се поставя под въпрос, трябва подробно да бъде проучена.

4. Отчитане на данните на прецизността

Лабораториите трябва да изпращат следната информация на компетентния национален орган:

- използвания метод,
- стандартното отклонение s_w в рамките на серията и границата на вътрешната прецизност,
- стандартното отклонение s_b между сериите
- общото стандартно отклонение s_1
- броят на анализите за получаването на данните на прецизността.

ПРИЛОЖЕНИЕ VI
(Член 6)

ОЦЕНЯВАНЕ НА ОЦЕНИТЕЛИТЕ И НАДЕЖНОСТТА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПРИ ЧУВСТВИТЕЛНИ АНАЛИЗИ

Ако се използват методи със скала (IDF стандарт 99C/1997), се прилагат следните процедури:

(а) *определяне на „индекса на повторяемост”*

В рамките на 12 месеца оценителят анализира най-малко десет проби като дублирания на празни проби. Обичайно, това се извършва на няколко етапа. Резултатите за отделните характеристики на продукта се оценяват чрез използване на следната формула:

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

където:

w_1 : индекс на повторяемост

x_{i1} : резултат за първата оценка на проба x_i

x_{i2} : резултат за втората оценка на проба x_i

n : брой проби

Пробите, които се оценяват, би следвало да покриват широк обхват от качество. w_1 не би следвало да превишава 5 (5-точкови скали).

(б) *определяне на „индекса на отклонение”*

Този индекс би следвало да служи за проверка дали оценителят използва същата скала за оценка на качеството, както използваната от група оценители с опит. Получените от оценителя резултати са сравними със средната стойност на резултатите, получени от групата оценители.

Следната формула се използва за оценка на резултатите:

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

където:

x_{i1} ; x_{i2} : виж буква а)

$x - i1$; $x - i2$: среден резултат на групата оценители, съответно за първата и втората оценка на пробата x_i
 n : брой проби (най-малко десет за 12 месеца)

Пробите, които се оценяват, би следвало да покриват широк обхват от качество. D_1 не би следвало да превишава 1.5 (5-точкови скали). Държавите-членки трябва да съобщават за всички трудности, които са срещнати при прилагането на тази процедура.

(в) сравнение на резултатите, получени в различни региони на държава-членка и в различни държави-членки

Когато е приложимо, поне веднъж годишно трябва да бъде организиран тест за сравняване на резултатите, които са получени от оценители от различни региони. Ако се наблюдават значителни разлики, би следвало да бъдат предприети необходимите стъпки за идентифицирането на причините и получаването на сравними резултати.

Държавите-членки могат да организират тестове, за да сравняват резултатите, получени от техните оценители и от оценители от съседни държави-членки. Значителните разлики би следвало да бъдат предмет на задълбочено проучване с цел получаването на сравними резултати.

Държавите-членки би следвало да уведомяват Комисията за резултатите от тези сравнения.

ПРИЛОЖЕНИЕ VII
(Член 6)

СЕНЗОРНА ОЦЕНКА НА МАСЛО

1. Обхват

Целта на тази процедура за сензорна оценка на масло е да осигури унифициран метод, приложим във всички държави-членки.

2. Дефиниции

Сензорна оценка означава проверка на белезите на продукт чрез сетивата.

Панел означава група от избрани оценители, които работят по време на оценяването без вътрешни комуникации и без да се влияят един от друг.

Оценка на резултатите означава сензорна оценка от панел чрез използване на точкова скала. Трябва да бъде използвана номенклатура на грешките.

Степенуване означава класификация на качеството, която се извършва на базата на оценката на резултатите.

Контролни документи: документи, използвани за отчитане на индивидуалните резултати за всеки белег и окончателното степенуване на продукта. (Този документ може да бъде използван също и за отчитане на химически състав.)

3. Стая за тестове

3.1. Трябва да бъдат взети предварителни мерки, за да не могат оценителите в стаята за тестове да се влияят от външни фактори.

3.2. В стаята за тестове не трябва да има чужди миризми, както и стаята да е лесна за почистване. Стените трябва да са светли.

3.3. Стаята за тестове и нейното осветление трябва да бъдат такива, че качествата на оценяваните продукти да не се засягат. В стаята трябва да има подходящ температурен контрол.

4. Избор на оценители

Оценителят трябва да е запознат с масла и да е компетентен да извършва чувствително степенуване. Неговата компетентност би следвало да бъде оценявана на регулярна основа (поне веднъж годишно) от компетентния орган.

5. Изисквания за панела

Броят на оценителите в панела не би следвало да е четен, като минималният брой

следва да е три. Множеството оценители трябва да бъдат служители на компетентния орган или упълномощени лица, които не работят в млечната промишленост.

С оглед извършването на оптимална работа от лицата, преди оценката трябва да бъдат взети предвид определен брой фактори:

— лицата не трябва да страдат от болест, която би могла да засегне работата им. В обратния случай, съответният оценител би следвало да бъде заменен от друг оценител в панела;

— лицата трябва да пристигат навреме на съответното място, за да участват в оценката и да имат достатъчно време за извършването на индивидуалната оценка;

— лицата не трябва да използват субстанции със силен аромат, като парфюм, лосион след бръснене, дезодорант и т. н., както и би следвало да избягват храни със силен аромат (напр. силни подправки) и т.н.;

— в рамките на половин час преди оценката, на лицата не се разрешава да пушат, да се хранят или да пият, с изключение на вода.

6. Оценка на стойността на всеки белег

6.1. Сензорната оценка следва да се извършва по отношение на следните три белега: външност, консистенция и аромат.

Външността включва следните характеристики: цвят, видима степен на хомогенност, растеж на плесени и водна дисперсия. Водната дисперсия се тества съгласно IDF-стандарт 112A/1989.

Консистенцията включва следните характеристики: твърдост и способност за намазване.

За оценката на консистенцията на масло могат да бъдат прилагани физически методи. Комисията планира бъдещото хармонизиране на тези методи.

Ароматът включва следните характеристики: вкус и миризма.

При значително отклонение на препоръчваната температура не е възможна надеждна оценка на консистенцията и аромата. Температурата е от изключително значение.

6.2. Всеки белег се оценява чувствително поотделно. Оценяването на резултата трябва да бъде направено съгласно таблица 1.

6.3. С оглед постигането на унифициране, би могло да е уместно оценителите да оценяват резултатите заедно преди началото на оценката на една или две референтни проби за външност, консистенция и аромат.

6.4. Приемането на оценката на резултатите е, както следва:

максимум		Изискване
Външност	5	4
Консистенция	5	4
Аромат	5	4

Когато необходимият резултат не е получен, следва да бъде дадено описание на грешката. Резултатът, даден от всеки оценител за всеки белег, трябва да бъде записан в контролния документ. Продуктът е приет или отхвърлен на базата на решението, прието с мнозинство. Случаите, в които разликите между индивидуалните резултати за всеки белег са по-големи от съответстващите точки, не би следвало да възникват регулярно (не повече от веднъж на 20 проби). В противен случай, ръководителят на панела би следвало да провери компетентността на последния.

7. Надзор

По принцип, за цялата процедура отговаря ръководителят на панела, който трябва да бъде служител на компетентния орган и може да бъде член на панела. Той трябва да записва индивидуалните резултати за всеки белег в контролния документ и да удостоверява дали продуктът е приет или отхвърлен.

8. Вземане на проба и подготовка на пробата

8.1. — Желателно е идентичността на пробите да не бъде откривана по време на оценката, за да се избягва всяко възможно предубеждение.

— Това би следвало да бъде организирано преди оценката от ръководителя на панела, без присъствието на други членове на панела.

8.2. Когато сензорната оценка се извършва в хладилен склад, пробата се взема чрез използване на инструмент за вземане на проби от масло. Когато сензорната оценка се извършва на друго място, различно от хладилен склад, то тогава би следвало да бъде взета поне 500 g проба.

8.3. По време на оценката маслото би следвало да е с температура от 10 до 12 °C. При всички случаи би следвало да бъдат избягвани големи отклонения от тази температура.

9. Номенклатура

виж приложената таблица 2.

Таблица 1: оценяване на резултатите на масло

външност	Консистенция	аромат
----------	--------------	--------

Точки	№ (1)	забележки	Точки (клас качество)	№ (1)	Забележки	Точки (клас качество)	№ (1)	забележки
5		<i>много добра</i> идеален тип най-високо качество (суха)	5		<i>Много добра</i> Идеален тип Най-високо качество (добре се намазва)	5		<i>много добър</i> идеален тип най-високо качество (абсолютно чист най-фин аромат)
4		<i>добра (2)</i> няма видими дефекти	4	17 18	<i>Добра (2)</i> Твърда Мека	4		<i>добър (2)</i> няма видими дефекти
3	1 2 3 4 5 6 7 8	<i>задоволителна</i> (леки дефекти) ронлива, влажност нееднаква, двухцветна неравномерно оцветяване, изпъстрена като мрамор на петна отделяне на олио прекалено оцветена водниста консистенция	3	14 15 16 17 18	<i>Задоволителна</i> (леки дефекти) Сипкава, трошлива лепкава, тестява, мазна Влажна Твърда Мека	3	21 22 25 27 33 34 35	<i>задоволителен</i> (леки дефекти) нечист чужд вкус кисел готварски вкус, вкус на изгоряло вкус на ядене долнокачествен, горчив пресолен
2	1 3 4 5 6 10 11 12	<i>незадоволителна</i> (видими дефекти) ронлива, влажност неравномерно оцветяване изпъстрена като мрамор на петна отделяне на олио чужди съставки плесенясала неразтворена сол	2	14 15 16 17 18	<i>Незадоволителна</i> (видими дефекти) Сипкава, трошлива лепкава, тестява, мазна Влажна Твърда Мека	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36	<i>незадоволителен</i> (видими дефекти) нечист чужд вкус вкиснал кисел окислен вкус, метален вкус вкус на ядене долнокачествен, горчив пресолен мухлясало- застоял, гнил

							38	химически вкус
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	лоша (големи дефекти) ронлива, влажност неравномерно оцветяване изпъстрена като мрамор на петна отделяне на олио прекалено оцветена гранулирана чужди съставки плесенясала неразтворена сол	1	14 15 16 17 18	Лоша (големи дефекти) Сипкава, трошлива лепкава, тестява, мазна Влажна Твърда Мека	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	лош (големи дефекти) чужд вкус сиреняв, аромат на кисело сирене ферментирал вкус на плесен гранясал мазен, с вкус на риба окислен вкус, метален вкус долнокачествен, горчив мухлясало- застоял, гнил малцов химически вкус

(1) таблица 2.

(2) дефектите, упоменати под „добре” представляват само малки отклонения от идеалния тип.

Таблица 2: таблица на дефектите на масло

I. Външност

1. ронлива, влажност
2. нееднаква, двуцветна
3. неравномерно оцветяване
4. изпъстрена като мрамор
5. на петна
6. отделяне на олио
7. прекалено оцветена
8. водниста консистенция
9. гранулирана
10. чужди съставки
11. плесенясала
12. неразтворена сол

II. Консистенция

14. Сипкава, трошлива
15. лепкава, тестява, мазна
16. влажна
17. твърда
18. мека

III. Аромат

20. без аромат
21. нечист (1)
22. чужд вкус
23. киснал
24. сиренен, аромат на кисело сирене
25. кисел
26. ферментирал
27. (а) готварски вкус
(б) вкус на изгоряло
28. вкус на плесен
29. гранясал
30. мазен, с вкус на риба
31. лоен
32. (а) окислен вкус
(б) метален вкус
33. вкус на ядене
34. долнокачествен, горчив
35. пресолен
36. мухлясало-застоял, гнил
37. малцов
38. химически вкус

¹() Това обозначаване би следвало да се използва възможно най-рядко, и само когато дефектът не може да бъде описан по-точно.

ПРИЛОЖЕНИЕ VIII

(Член 7)

ПРИЛОЖИМА ПРОЦЕДУРА ПРИ ОСПОРВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ АНАЛИЗА (химически анализ)

1. По искане на оператора може да бъде извършен допълнителен анализ в рамките на седем работни дни от съобщаването на резултатите от първия анализ, при условие че са налични запечатани дублиращи проби от продукта, които се съхраняват по подходящ начин от компетентните органи.

2. По искане и за сметка на оператора, компетентният орган изпраща тези проби на втора лаборатория. Тази лаборатория трябва да е оторизирана да извършва официални анализи и трябва да има доказана компетентност за въпросните анализи. Компетентността би следвало да е документирана от успешно участие в съвместни изследвания, професионални тестове или сравнения между лаборатории. Втората лаборатория трябва да използва референтния метод. Получените от двете лаборатории резултати трябва да бъдат оценени, както следва:

(а) когато двете лаборатории изпълняват изискването за повторяемост и изискването за възпроизвеждане:

Средно аритметичната стойност на тестовите резултати, получени от двете лаборатории, се използва при окончателния резултат. Този окончателен резултат се оценява, като се взема предвид критичната разлика, при използване на следната формула:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_e|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

където:

– \bar{y} : средно аритметичната стойност на всички резултати, получени от двете лаборатории

m_e : граница

R: възпроизвеждане

r: повторяемост

n_1 : брой резултати, получени от лаборатория 1

n_2 : брой резултати, получени от лаборатория 2.

Бележка: Ако окончателният резултат се изчислява при използване на формулата:

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

(виж приложение IV(3) и (4), съответно), R² и r² би следвало да бъдат внесени във формулата вместо R² и r².

(б) когато двете лаборатории изпълняват изискването за повторяемост, но не изпълняват изискването за възпроизвеждане:

Ако вторият анализ потвърждава първия, анализираното количество би следвало да бъде отхвърлено. В противен случай, количеството би следвало да се приеме.

(в) когато само една лаборатория изпълнява изискването за повторяемост:

Окончателният резултат на лабораторията, която изпълнява изискването за повторяемост, следва да се използва, за да се реши дали да се приеме анализираното количество.

(г) когато никоя лаборатория не изпълнява изискването за повторяемост, но изискването за възпроизвеждане е изпълнено:

Прилага се (а).

(д) когато никоя лаборатория не изпълнява нито изискването за повторяемост, нито изискването за възпроизвеждане:

Анализираното количество би следвало да бъде прието, ако получените от една лаборатория резултати водят до това заключение.

(е) когато резултатите са получени чрез използването на невалидни методи:

Анализираното количество би следвало да бъде прието, ако получените от една лаборатория резултати водят до това заключение.

3. Резултатите от втория анализ трябва да бъдат съобщени на оператора от компетентния орган възможно най-бързо. Разходите за втория анализ следва да бъдат поети от оператора, ако анализираното количество се отхвърли.

4. Ако операторът може да докаже в рамките на пет работни дни от вземането на пробата, че процедурата по вземането на пробата не е извършена коректно, вземането на пробата трябва да бъде повторено, когато това е възможно. Ако вземането на пробата не може да бъде повторено, анализираното количество трябва да бъде прието.

ПРИЛОЖЕНИЕ IX

(Член 8)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВОДНОТО СЪДЪРЖАНИЕ НА МАСЛО

1. Обхват и приложно поле

Този референтен метод установява методика за определяне на водното съдържание на масло.

2. Позовавания

IDF стандарт 50 C: 1995 — Мляко и млечни продукти — методи за вземане на проби

3. Дефиниция

Водно съдържание на масло: загубата на маса след завършване на подгриващия процес, определен в упоменатия стандарт. Изразява се в грамове на 100 грама.

4. Принцип

Изпаряване на вода от тестова доза в сушилня, в присъствието на пемза и при температура от 102 °C.

5. Апаратура и материали

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално:

5.1. Аналитична везна с чувствителност 1 mg

5.2. Пещ за сушене, снабдена с ефективен сушилен агент (например, прясно изсушен гел на силициев двуокис с индикатор за влажност).

5.3. Пещ за сушене, вентилирана, термостатично контролирана, оперираща при 102 ± 2 °C в цялото работно пространство.

5.4. Стъклени, порцеланови и неръждаеми метални съдове, с височина от около 20 mm., диаметър от 60 до 80 mm.

5.5. Пемза, гранулирана, измита, с диаметър от 0,8-10 mm.

6. Вземане на проби

виж IDF 50 C: 1995

7. Процедура

7.1. Подготовка на тестовата проба

Лабораторната проба се затопля в затворен стъклен или подходящ пластмасов съд,

който би следвало да е пълен от една втора до две-трети, до температура, при която пробата ще стане достатъчно мека, за да се улесни смесването до постигане на хомогенно състояние (или с механичен шейкър или с ръка). Обичайно, температурата на смесване не би следвало да надвишава 35 °С. Пробата се охлажда до стайна температура. Съдът се отваря възможно най-бързо след охлаждането на пробата и се разклаща бързо (не повече от 10 секунди) с подходящ предмет, например лъжица или шпатула, преди да се претегли.

7.2. Определяне на водното съдържание

7.2.1. В съда (5.4) се поставят приблизително 10 g пемза.

7.2.2. Съдът с пемзата се изсушава в печта (5.3) при 102 ± 2 °С най-малко за един час.

Бележка: Периодите на сушене, упоменати в 7.2.2, 7.2.5 и 7.2.7, започват, когато температурата на печта достигне 102 ± 2 °С.

7.2.3. Съдът се оставя да се охлади в ексикатор (5.2) до температурата на стаята за претегляне и се претегля с точност до 1 mg

7.2.4. В съда се измерва с точност до 1 mg тестова доза от приблизително 5 mg от тестовата проба.

7.2.5. Съдът се поставя в печта за сушене при 102 ± 2 °С и се оставя да престои три часа.

7.2.6. Съдът се оставя да се охлади в ексикатор до температурата на стаята за претегляне и се претегля с точност до 1 mg

7.2.7. Процесът на сушене се повтаря за допълнителни периоди от един час, като охлаждането и претеглянето се извършва всеки път, както е посочено, докато се постигне константна маса (промяната на масата не трябва да надвишава 1 mg). В случай на увеличаване на масата, за изчисление се взема отчетената най-малка маса.

8. Изразяване на резултати

8.1. Метод на изчисляване и формула

Водното съдържание W се изчислява като процент от масата чрез използване на следната формула:

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

където:

m_0 е масата в грамове на съда с пемзата (7.2.3)

M_1 е масата в грамове на тестовата доза, съда и пемзата преди сушене (7.2.4)

M_2 е масата в грамове на тестовата доза, съда и пемзата след сушене (7.2.7)

Резултатите се отчитат до първия десетичен знак.

8.2. Повторяемост

Абсолютната разлика между резултатите от две отделни определяния, извършени едновременно или едно след друго от същия оператор и при същите условия върху идентичен тестов материал, не надвишава 0,2 %.

8.3. Възпроизвеждане

Абсолютната разлика между два отделни и независими резултата, получени от двама оператори, които работят в различни лаборатории върху идентичен тестов материал, не надвишава 0,3 %.

9. Отчитане на теста

При отчитането на теста се посочват използваният метод и получените резултати. Също така, се упоменават всички оперативни детайли, които не са определени в този международен стандарт или които се считат като опция, заедно с детайлите за всички случайности, които може да са повлияли на резултатите. При отчитането на теста се дава всяка необходима информация за пълното идентифициране на пробата.

ПРИЛОЖЕНИЕ X
(Член 8)

**МАСЛО: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА СУХО ВЕЩЕСТВО БЕЗ
МАЗНИНИ**

1. Обхват и приложно поле

Този стандарт установява метод за определяне на съдържанието на сухо вещество без мазнини в масло.

2. Позовавания

IDF стандарт 50 C: 1995 — Мляко и млечни продукти — методи за вземане на проби

3. Дефиниции

Съдържание на сухо вещество без мазнини в масло: процент от масата, установен при определената процедура. Изразява се в грама на 100 грама.

4. Принцип

Изпаряване на вода от известна маса масло, екстракция на мазнината с петролен етер и измерване на утайката.

5. Реагент

Петролен етер с амплитуда на кипене от 30 до 60 °C. След изпаряването на 100 ml, реагентът не оставя повече от 1 mg утайка.

6. Апаратура и материали

6.1. Аналитична везна с чувствителност 1 mg

6.2. Пещ за сушене, снабдена с ефективен сушилен агент (например, прясно изсушен гел на силициев двуокис с индикатор за влажност).

6.3. Пещ за сушене, вентилирана, термостатично контролирана, оперираща при 102 ± 2 °C в цялото работно пространство.

6.4. Стъклени, порцеланови и неръждаеми метални съдове, с височина от около 20 mm., диаметър от 60 до 80 mm., с предвидена стъклена бъркалка.

6.5. Филтърен тегел, синтерово стъкло, с диаметър на пора от 16 до 40 µm, с колба за всмукване.

7. Вземане на проби

Виж IDF стандарт 50 C: 1995

8. Процедура

8.1. Подготовка на тестовата проба

Лабораторната проба се затопля в затворен стъклен или подходящ пластмасов съд, който би следвало да е пълен от една втора до две-трети, до температура, при която пробата ще стане достатъчно мека, за да се улесни смесването до постигане на хомогенно състояние (или с механичен шейкър или с ръка). Обичайно, температурата на смесване не би следвало да надвишава 35 °С. Пробата се охлажда до стайна температура. Съдът се отваря възможно най-бързо след охлаждането на пробата и се разклаща бързо (не повече от 10 секунди) с подходящ предмет, например лъжица или шпатула, преди претеглянето.

8.2. Определяне

8.2.1. Съдът с бъркалката (6.4) и тегела (6.5) се изсушава в печта (6.3) за 1 час. Тези предмети се оставят да се охладят в ексикатора и се претеглят заедно (напр. съд, бъркалка и тегел) с точност до 1 mg (m_0).

Бележки: — като правило, достатъчното време за охлаждане е 45 минути, — важно е, когато се анализира повече от една тестова доза в партидата, за всяка тестова доза да се използва същата комбинация от съд, бъркалка и тегел.

8.2.2. Тегелът се отстранява, отчита се общото тегло на съда и бъркалката с точност до 1 mg (m_1).

8.2.3. В съда се измерва с точност до 1 mg тестова доза от приблизително 5 mg на тестовата проба (8.1) (m_2).

8.2.4. Съдът (заедно с бъркалката и маслото) се поставя в печта при 102 ± 2 °С и се оставя да престои през нощта.

8.2.5. Съдът (8.2.3) се оставя да се охлади на стайна температура.

8.2.6. 15 ml топъл (приблизително 25 °С) петролен етер се добавя към съда и се отделя колкото е възможно повече от седимента, залепнал за съда, чрез използването на стъклената бъркалка. Разтворителят се прехвърля в тегела и се оставя да се филтрира в колбата за просмукване.

8.2.7. Операция 8.2.6 се извършва допълнително четири пъти. Ако върху повърхността на чашата няма следи от мазнина, по време на четвъртото измиване в тегела се прехвърля възможно най-много количество от седимента. В противен случай, операция 8.2.6 се повтаря до цялостното елиминиране на всички следи от мазнина.

8.2.8. Седиментът в тегела се измива с 25 ml топъл петролен естер.

8.2.9. Съдът и бъркалката се изсушават заедно с тегела в пещта при 102 ± 2 °C за 30 минути.

8.2.10. Съдът се оставя да се охлади в ексикатора на стайна температура и се измерва с точност до 1 mg

8.2.11. Операции 8.2.9 и 8.2.10 се повтарят, докато не се получи обща константна маса (промяната на масата не трябва да надвишава 1 mg) за съда, бъркалката и тегела (m_3).

9. Изразяване на резултати

9.1. Изчисляване на съдържанието на сухо вещество без мазнини

Съдържанието на сухо вещество без мазнини SNF се изчислява като процент от масата чрез използване на следната формула:

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

където:

m_0 е масата в грамове на празния съд със стъклената бъркалка и тегела (8.2.1)

m_1 е масата в грамове на празния съд със стъклената бъркалка (8.2.2)

m_2 е масата в грамове на тестовата доза и съда със стъклената бъркалка (8.2.3)

m_3 крайната маса в грамове на съда с бъркалката и тегела, съдържащ седимента (8.2.11)

Резултатите се отчитат до първия десетичен знак.

9.2. Повторяемост

Абсолютната разлика между резултатите на две отделни определяния, извършени едновременно или едно след друго от същия оператор и при същите условия върху идентичен тестов материал, не надвишава 0,2 %.

9.3. Възпроизвеждане

Абсолютната разлика между два отделни и независими резултата, получени от двама оператори, които работят в различни лаборатории върху идентичен тестов материал, не надвишава 0,2%.

10. Отчитане на теста

При отчитането на теста се посочват използваният метод и получените резултати. Също така, се упоменават всички оперативни детайли, които не са определени в този международен стандарт или които се считат като опция, заедно с детайлите за всички случайности, които може да са повлияли на резултатите. При отчитането на теста се дава всяка необходима информация за пълното идентифициране на пробата.

Бележка: Ако се анализира осолено масло, прибавената сол се определя като сухо вещество без мазнини. За определянето на съдържанието на сухо вещество без

мазнини в мляко, съдържанието на прибавената сол трябва да се извлече от съдържанието на сухото вещество без мазнини. Изчисляването на данните на прецизността за определянето на съдържанието на сухо вещество без мазнини в мляко е:

повторяемост: $r = 0,104 \%$

възпроизвеждане: $R = 0,206 \%$.

Може да се направи заключение, че данните на прецизността, получени за определянето на съдържанието на сухо вещество без мазнини, са валидни за определянето на съдържанието на сухо вещество без мазнини в мляко.

ПРИЛОЖЕНИЕ XI
(Член 8)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА МАЗНИНИ В МАСЛО

Съдържанието на мазнини в масло се получава директно чрез определяне на водното съдържание и съдържанието на сухото вещество без мазнини, съответно съгласно приложение IX и приложение X. Процентът на мазнините от масата е равен на:

$$100 - (W + SNF)$$

където:

W: процент на вода от масата

SNF: процент на сухото вещество без мазнини от масата

Изчислените данни на прецизността за определянето на съдържанието на мазнини са:

повторяемост: $r = 0,22 \%$

възпроизвеждане: $R = 0,36 \%$.

ПРИЛОЖЕНИЕ XII
(Член 9)

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВАНИЛИН В КОНЦЕНТРИРАНО
МАСЛО, МАСЛО ИЛИ СМЕТАНА ЧРЕЗ ВИСОКООПТИМАЛНА ТЕЧНА
ХРОМАТОГРАФИЯ**

1. Обхват и приложно поле

Методът описва процедура за количествено определяне на ванилин в концентрирано масло, масло или сметана.

2. Принцип

Извличане на известно количество проба със смес на изопропанол/етанол/ацетонитрил (1:1:2). Утаяване на по-голямата част от мазнините чрез охлаждане между $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, последвано от центрофугиране. След разреждане с вода, определяне на съдържанието на ванилин чрез високооптимална течна хроматография (HPLC).

3. Апаратура

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално следното:

- 3.1. Хладилник, с температура на охлаждане от $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 3.2. Спринцовки, с обем от 2 ml;
- 3.3. Мембранни микрофилтри с размер на пора от 0,45 μm , резистентни на разтвор, който съдържа 5% екстрактен разтвор (4.4);
- 3.4. Система за течна хроматография, състояща се от помпа (поток от 1,0 ml/min), инжектор (20 μl инжектиране, автоматично или ръчно), UV-детектор (функциониращ при 306 nm, 0,01 AU пълна скала), датчик или интегратор и колонен термостат, функциониращ при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 3.5. Аналитична колона (250 mm. \times 4,6 mm.ID), обвита с LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) или еквивалентен материал;
- 3.6. Защитна колона (около 20 mm. \times 3 mm. ID), обвита в сухо състояние с Perisorb RP 18 (от 30 до 40 μm) или еквивалентен материал.

4. Реагенти

Всички използвани реагенти трябва да са с признато аналитично качество.

- 4.1. Изопропанол
- 4.2. Етанол 96% (v/v)

4.3. Ацетонитрил

4.4. Екстрактен разтвор

Смесва се изопропанол (4.1), етанол (4.2) и ацетонитрил (4.3) в съотношение 1:1:2 (v/v).

4.5. Ванилин (4-хидрокси-3-метоксибензалдехид)

4.5.1. Основен разтвор на ванилин (= 500 µg/ml)

Около 50 mg (SM.mg) ванилин (4.5) се претегля с точност до 0,1 mg в 100 ml измерителна колба, добавя се 25 ml екстрактен разтвор (4.4) и се долива вода.

4.5.2. Стандартен разтвор на ванилин (= 10 µg/ml).

5 ml от основния разтвор на ванилин (4.5.1) се капват в измерителна колба от 250 ml и се долива вода.

4.6. Метанол, HPLC-качество

4.7. Оцетна киселина, кристализирала

4.8. Вода, HPLC-качество

4.9. HPLC-мобилна фаза

300 ml метанол (4.6) се смесват с около 500 ml вода (4.8) и 20 ml оцетна киселина (4.7) в измерителна колба от 1 000 ml и се долива вода (4.8). Филтрира се през 0,45 µm филтър (3.3).

5. Процедура

5.1. Подготовка на тестовата проба

5.1.1. Масло

Пробата се загрява докато започне топенето. Избягва се прегряването над 40 °C. Когато пробата стане достатъчно гъвкава, тя се хомогенизира чрез разклащане. Маслото се разбърква за 15 секунди преди вземането на пробата. Около 5 g (SMг.) масло се претеглят се с точност до 1 mg в 100 ml измерителна колба.

5.1.2. Концентрирано масло

Непосредствено преди вземането на пробата, съдът с концентрираното масло се поставя в пещ при 40 до 50 °C, докато маслото се разтопи напълно. Пробата се смесва чрез разклащане или бъркане, като се избягва образуването на мехурчета въздух от прекалено силното бъркане. Около 4 g (SM г.) концентрирано масло се претегля с точност до 1 mg в 100 ml измерителна колба.

5.1.3. Сметана

Пробата се загрява във водна баня или инкубатор при температура от 35 до 40 °C.

Мазнината се разпределя хомогенно чрез разклащане, и ако е необходимо- чрез бъркане. Пробата се охлажда бързо до 20 ± 2 °С. Пробата трябва да изглежда хомогенна, в противен случай процедурата би следвало да бъде повторена. Около 10 g (SM г.) сметана се претегля с точност до 1 mg в 100 ml измерителна колба.

5.2. Подготовка на тестовия разтвор

Лабораторната проба се затопля в затворен стъклен или подходящ пластмасов съд, който би следвало да е пълен от една втора до две-трети, до температура, при която пробата ще стане достатъчно мека, за да се улесни смесването до постигане на хомогенно състояние (или с механичен шейкър или с ръка). Обичайно, температурата на смесване не би следвало да надвишава 35 °С. Пробата се охлажда до стайна температура. Съдът се отваря възможно най-бързо след охлаждането на пробата и се разклаща бързо (не повече от 10 секунди) с подходящ предмет, например лъжица или шпатула, преди претеглянето.

Добавя се около 75 ml екстрактен разтвор (4.4) към тестовата доза (5.1.1, 5.1.2 или 5.1.3), разбърква се или се разклаща силно за около 15 минути и се допълва с екстрактен разтвор (4.4). Около 10 ml от този екстракт се поставя в реагентна стъклена чаша със запушалка. Реагентната стъклена чаша се поставя в хладилник (3.1) и се оставя да престои около 30 минути. Студеният екстракт се центрофугира за около 5 минути при приблизително 2 000 rpm и веднага се прелива. Прелетият разтвор се оставя да се охлади до стайна температура. 5 ml от прелетия разтвор се капва в 100 ml измерителна колба и се долива вода. Една аликвотна част се филтрира чрез мембранен филтър (3.3). Филтратът е готов за определяне от HPLC.

5.3. Калибриране

5 ml стандартен разтвор ванилин (4.5.2) се капват в 100 ml измерителна колба. Добавят се около 5 ml екстрактен разтвор (4.4) и се долива до маркировката с вода. Този разтвор съдържа 0,5 µg/ml ванилин.

5.4. Определяне чрез HPLC

Хроматографската система се оставя да се стабилизира за 30 минути. Инжектира се стандартният разтвор (5.3). Това се повтаря докато разликата в пиковата повърхност или пиковата височина между две последователни инжектирания е по-малка от 2 %. При описаните условия, времето за запазване на ванилина е около 9 минути. Стандартният разтвор (5.3) се анализира двойно чрез инжектиране на 20 µl. Инжектира се 20 µl от тестовите разтвори (5.2). Определя се пиковата повърхност или височина за ванилина, който е получен. Двойното инжектиране на стандартния разтвор (5.3) се повтаря след 10 инжектирания на тестови проби (5.2).

6. Изчисляване на резултатите

Изчислява се средната пикова повърхност (или височина) (AC) на ванилина, свързвана с двойните инжектирания за всяка партида на тестовите разтвори (общо четири повърхности или височини).

Изчислява се коефициентът на влияние (R):

$$R = AC/CM.$$

където:

CM. е масата ванилин в mg (4.5.1).

Съдържанието (mg/kg) ванилин (C) в тестовата проба е дадено от:

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

където:

AS = пикова повърхност на ванилина в тестовата проба

SM= масата на тестовата проба в g (5.1.1, 5.1.2 или 5.1.3).

Когато се анализира сметана за съдържание на ванилин, концентрацията на индикаторите трябва да бъде изразена като mg индикатор/kg млечни мазнини. Това се извършва чрез умножаване на C с 100/f. f е съдържанието на мазнини в сметана, изразено в проценти (m/m).

20 = фактор, който взема предвид разрежданията в стандартната и тестовата проба
0,96 = фактор на коригиране за съдържанието на мазнини в първото разреждане на тестовата проба

Бележка: Вместо пикова повърхност могат да бъдат използвали пикови височини (виж 8.3).

7. Точност на метода

7.1. Повторяемост (r)

Разликата между резултатите от две определяния, извършени в най-краткия възможен срок от един и същ оператор и при използване на същата апаратура върху идентичен тестов материал, не могат да надвишават 16 mg/kg

7.2. Възпроизвеждане (R)

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на същата апаратура върху идентичен тестов материал, не могат да надвишават 27 mg/kg

8. Граници на толерантност

8.1. От обозначения продукт трябва да бъдат взети три проби за проверка на хомогенността.

8.2. Индикаторите се получават или от ванилин или от синтетичен ванилин.

8.2.1. Размерът за смесване за 4-хидрокси-3-метоксибензалдехид е 250 g за тон концентрирано масло или масло. Когато се индикира сметана, размерът за смесване е 250 g за тон млечни мазнини.

8.2.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от резултатите се сравнява със следните граници (критична граница за вероятност от 95 % (DCr_{95}) е взета предвид):

— 221,0 mg/kg (95% от минималния размер за смесване),

— 159,0 mg/kg (70% от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между 221,0 mg/kg и 159,0 mg/kg

8.3. Индикатор, получен изключително от ванилови зърна или интегрални екстракти от тях

8.3.1. Размерът за смесване за 4-хидрокси-3-метоксибензалдеhid е 100 g за тон концентрирано масло или масло. Когато се индикира сметана, размерът за смесване е 100 g за тон млечни мазнини.

8.3.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните граници (критична граница за вероятност от 95 % (DCr_{95}) е взета предвид):

— 79,0 mg/kg (95% от минималния размер за смесване),

— 54,0 mg/kg (70% от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между 79,0 mg/kg и 54,0 mg/kg

9. Бележки

9.1. повторяемостта r е стойността, под която абсолютната разлика между два отдели тестови резултата, получени чрез един и същ метод върху идентичен тестови материал и при същите условия (същата апаратура, същата лаборатория и за кратък период от време), може да бъде очаквана с определена вероятност; при отсъствието на други индикации, вероятността е 95 %.

9.2. Възпроизвеждането R е стойността, под която абсолютната разлика между два отделни тестови резултата, получени чрез един и същ метод върху идентичен тестови материал и при различни условия (различна апаратура, различни лаборатории, и/или в различен период от време), може да бъде очаквана с определена вероятност; при отсъствието на други индикации, вероятността е 95 %.

9.3. Откриването на прибавен ванилин при количество от 250 mg/kg масло варира от 97,0 до 103,8. Откритото средно съдържание бе 99,9% със стандартно отклонение от 2,7 %.

9.4. Стандартният разтвор съдържа 5% екстрактен разтвор, за да се компенсира

пиковото разширяване, причинено от присъствието на 5% екстрактен разтвор на тестовите проби. Това позволява определянето на количеството чрез пиковите височини.

9.5. Анализът се базира на нормална линия на калибриране с нулева отсечка. Чрез използването на подходящи разреждания на стандартния разтвор (4.5.2), линейността би следвало да бъде проверявана първия път, когато се извършва анализът, а след това - на регулярни интервали от време и при промени или ремонтване на оборудването за HPLC.

ПРИЛОЖЕНИЕ XIII
(Член 9)

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕТИЛОВ ЕСТЕР НА БЕТА-АПО-8'-КАРОТИННА
КИСЕЛИНА В КОНЦЕНТРИРАНО МАСЛО И МАСЛО ЧРЕЗ
СПЕКТРОМЕТРИЯ**

1. Обхват и приложно поле

Методът описва процедура за количествено определяне на етилов естер на бета-апо-8'-каротинна киселина (апо-каротинен естер) в концентрирано масло и масло. Апо-каротинният естер е сумата от всички субстанции, намиращи се в екстракт от проби, получени при описаните в метода условия, които абсорбират светлината при 440 nm.

2. Принцип

Мазнините на маслото се разтварят в петролен естер, като абсорбцията се измерва при 440 nm. Съдържанието на апо-каротинен естер се определя чрез външен стандарт.

3. Апаратура

3.1. Капкомери — градуирани, с обем от 0.25, 0.50, 0.75 и 1.0 ml

3.2. Спектрофотометър — подходящ за използване при 440 nm (и 447-449 nm) и оборудван с кювети с оптична дължина на траекторията от 1 cm.

3.3. Измерителни колби, 20 ml и 100 ml

3.4. Аналитична колона с чувствителност от 0.1 mg

4. Реагенти

Всички реагенти трябва да са с признато аналитично качество.

4.1. Суспензия на апо-каротинен естер (приблизително 20 %)

4.1.1. Съдържанието на суспензията се установява, както следва:

Претегля се около 400 mg в измерителна колба (100 ml), разтваря се в 20 ml хлороформ (4.4) и обемът се запълва с циклохексан (4.5). 5 ml от този разтвор се разрежда в 100 ml циклохексан (разтвор А). 5 ml на разтвор А се разтваря в 100 ml циклохексан. Абсорбцията се измерва при 447-449 nm (измерва се максимумът спрямо циклохексана като празна проба при използването на кювети с 1 cm оптична дължина на траекторията):

$$\text{Апо-carotenic ester content (\%)} = \frac{A_{\text{max}} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

б. пр.: Апо-carotenic ester content: съдържание на апо-каротинен естер

A = абсорбция на измервания разтвор при максимум
max

A = тегло на проба (г.)

2 550 = референтна стойност A (1 %, 1 см.)

Степента на хомогенност на суспензията е P (%).

Бележка: Суспензията на апо-каротинен естер е сензорна на въздух, топлина и светлина. В затворен, оригинален съд (запечатан с азот) и на хладно място тя може да бъде съхранявана 12 месеца. След отварянето, съдържанието би следвало да бъде използвано за кратък период от време.

4.1.2. Стандартен разтвор на апо-каротинен естер, прибл. 0.2 mg/ml

Около 0.100 g суспензия на апо-каротинен естер (4.1.1) (Wg) се измерват с точност до 0.1 mg и се разтварят в лаков бензин (4.2); количеството се прехвърля в измерителна колба с вместимост от 100 ml, като до маркировката се долива лаков бензин.

Този разтвор съдържа (W.P)/10 mg/ml апо-каротинен естер.

Бележка: Разтворът трябва да се съхранява на хладно и тъмно място. Неизползваният разтвор се изхвърля след един месец.

4.2. Лаков бензин (40 — 60 °C).

4.3. Натриев сулфат, дехидратиран, гранулат, предварително изсушен при 102 °C за два часа.

4.4. Хлороформ.

4.5. Циклохексан.

5. Процедура

5.1. Подготовка на тестовата проба

5.1.1. Концентрирано масло

Пробата се стопява в пещта при приблизително 45 °C.

5.1.2. Масло

Пробата се стопява в пещта при приблизително 45 °C и представителна доза от нея се филтрира през филтър, който съдържа около 10 g дехидратиран натриев сулфат (4.3), в среда, защитена от естествена и изкуствена светлина и поддържаща

температура от 45°C. От маслото се отнема подходящо количество мазнини.

5.2. Определяне

1 g концентрирано масло (или екстракт на мазнини от масло (5.1.2)), (M г.) се измерва с приблизителна точност от 1 mg. Количеството се прехвърля в 20 ml (Vml) измерителна колба при използване на лаков бензин (4.2), допълва се до маркировката и внимателно се смесва.

Аликвотна част се прехвърля в кювета от 1 см. и се измерва абсорбцията при 440 nm, като се сравнява с празната проба на лаков бензин. Концентрацията на апо-каротинен естер се получава в разтвора чрез графиката на калибриране (C µ/ml).

5.3. Графика на калибриране

0, 0.25, 0.5, 0.75 и 0 1.0 ml стандартен разтвор на апо-каротинен естер (4.1.2) се капват в пет 100 ml измерителни колби. Обемът се разрежда с лаков бензин (4.2) и се смесва.

Подходящите концентрации на разтворите са в обхвата от 0 до 2 µg/ml и се изчисляват точно чрез концентрацията на стандартния разтвор (4.1.2) (W.P)/10 mg/ml. Абсорбциите се измерват при 440 nm, като се сравняват с празната проба на лаков бензин (4.2).

Стойностите на абсорбцията се записват в у-координата срещу концентрацията на апо-каротинен естер в x-координатата.

6. Изчисляване на резултатите

6.1. Съдържанието на апо-каротинен естер, изразено като mg/kg продукт, се дава чрез:

концентрирано масло: $(C.V)/M$

масло: $0.82 (C.V)M$

където:

C= съдържанието на апо-каротинен естер, µg/ml, чете се от графиката на калибриране (5.3)

V = обем (ml) на тестовия разтвор (5.2)

M= маса (g) на тестовата доза (5.2)

0.82 = фактор на коригиране на съдържанието на мазнини в масло.

7. Точност на метода

7.1. Повторяемост

7.1.1. Анализ на масло

Разликата между резултатите от две определяния, извършени в рамките на

възможно най-краткия срок от един оператор и чрез използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишават 1.4 mg/kg

7.1.2. Анализ на концентрирано масло

Разликата между резултатите от две определяния, извършени в рамките на възможно най-краткия срок от един оператор и чрез използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишават 1.6 mg/kg

7.2. Възпроизвеждане

7.2.1. Анализ на масло

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и чрез използване на различни апаратури върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишават 4.7 mg/kg

7.2.2. Анализ на концентрирано масло

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и чрез използване на различни апаратури върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишават 5.3 mg/kg

7.3. Източник на данните на прецизността

Данните на прецизността бяха определени от експеримент, проведен през 1995 г. и включващ 11 лаборатории и 12 индикаторни проби (шест празни дублирания) за масло и 12 индикаторни проби (шест празни дублирания) за концентрирано масло.

8. Граници на толерантност

8.1. От индикаторния продукт трябва да бъдат взети проби за проверка на коректността на индикирането на продукта.

8.2. Масло

8.2.1. Размерът за смесване за масло, като се вземе предвид основната абсорбция, е 22 mg/kg

8.2.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните граници (критична граница за вероятност от 95 % (DCr_{95}) е взета предвид):

- 18.0 mg/kg (95% от минималния размер за смесване),
- 13.0 mg/kg (70% от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между 18.0 mg/kg и 13.0 mg/kg

8.3. Концентрирано масло

8.3.1. Размерът за смесване за концентрирано масло, като се вземе предвид основната абсорбция, е 24 mg/kg

8.3.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните граници (критична граница на вероятност от 95 %(DCr_{95}) е взета предвид):

- 20.0 mg/kg (95% от минималния размер за смесване),
- 14.0 mg/kg (70% от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между 20.0 mg/kg и 14.0 mg/kg

ПРИЛОЖЕНИЕ XIV
(Член 9)

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СИТОСТЕРИН ИЛИ СТИГМАСТЕРОЛ В МАСЛО ИЛИ
КОНЦЕНТРИРАНО МАСЛО ЧРЕЗ ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ С
КАПИЛЯРНА КОЛОНА**

1. Обхват и приложно поле

Методът описва процедура за количествено определяне на ситостерин или стигмастерол в масло и концентрирано масло. Ситостеринът се взема като сума от β -ситостерин и 22 дихидро- β -ситостерин; други ситостерини се вземат като незначителни.

2. Принцип

Маслото или концентрираното масло се хидролизира с разтвор на калиев хидроксид и нехидрализираните съставки се извличат с диетилов етер. Стеролите се прехвърлят върху триметил-силил етери и се анализират чрез газова хроматография с капилярна колона, с бегулин като външен стандарт.

3. Апаратура

- 3.1. 150 ml колба за хидролиза с охладител за отливната течност и връзки от шлифовано стъкло.
- 3.2. 500 ml отделителни фунии.
- 3.3. 250 ml колби.
- 3.4. Фунии за изравняване на налягането, 250 ml или подобни, за събирането на остатъка от диетиловия естер.
- 3.5. Стъклена колона, 350 mm. \times 20 mm., със запушалка от синтерово стъкло.
- 3.6. Водна баня или кожух.
- 3.7. Реактивни флакони от 2 ml
- 3.8. Газова хроматография, подходяща за използване с капилярна колона, снабдена с отделителна система и състояща се от:
 - 3.8.1. Термостатична камера за колони, които могат да поддържат желаната температура с точност от ± 1 °C;

- 3.8.2. Отделение за изпаряване с настройване на температурата;
- 3.8.3. Детектор за йонизиране на пламъка и конверторен увеличител;
- 3.8.4. Интегратор-датчик, подходящ за използване с конверторния увеличител (3.8.3).
- 3.9. Капилярна колона от кварцово стъкло, изцяло обвита с ВР1 или еквивалентен материал с унифицирана плътност от 0,25 μm ; колоната трябва да може да разтваря триметил-силил производни на ланостерин и ситостерин. Подходящ е ВР1 с дължина от 12 м., с вътрешен диаметър от 0,2 mm.
- 3.10. 1- μl - микро-спринцовка за газова хроматография със заострена игла.

4. Реагенти

Всички реагенти трябва да са с доказано аналитично качество. Използваната вода трябва да е дестилирана или да се използва вода с най-малко еквивалентна степен на чистота.

- 4.1. Етанол, поне 95% чисто съдържание
- 4.2. Калиев хидроксид, 60% разтвор (600 g калиев хидроксид (минимум 85 %) се разтваря във вода и се долива до един литър с вода.
- 4.3. Бетулин, поне 99% чисто съдържание.
- 4.3.1. Разтвори на бетулин в диетилов етер (4.4).
- 4.3.1.1. Концентрацията на бетулиновия разтвор, използван за определянето на ситостерин би следвало да бъде 1,0 mg/ml
- 4.3.1.2. Концентрацията на бетулиновия разтвор, използван за определянето на стигмастерол, би следвало да бъде 0,4 mg/ml
- 4.4. Диетилов етер с аналитична степен на чистота (без прекиси и утайки).
- 4.5. Натриев сулфат, дехидратиран, гранулиран и предварително изсушен при 102 °C за два часа.
- 4.6. Силилов реагент, например TRI-SIL (наличен от Pierce Chemical Co, кат.№49001) или подобен (важно: TRI-SIL е възпламеним, токсичен, корозивен и е възможно да бъде канцерогенен. Лабораторният персонал трябва да е запознат с данните за безопасност на TRI-SIL и да вземе необходимите предварителни мерки.)
- 4.7. Ланостерин.

4.8. Ситостерин с известна степен на чистота, с не по-малко от 90% чисто съдържание (P).

Бележка 1: Степента на чистота на използваните стандартни материали за калибриране трябва да бъде определена чрез използването на метода на нормализиране. Прима се, че всички стероли, присъстващи в пробата, са представени върху хроматограмата, като общата пикова повърхност представлява 100% от стеролните съставки, и че стеролите дават същия детекторен отговор. Линеарността на системата трябва да бъде валидирана за областите на концентрация, които са от интерес.

4.8.1. Ситостеринен стандартен разтвор — приготвя се разтвор, съдържащ с точност до 0,001 mg/ml приблизително 0,5 mg/ml (W_1) ситостерин (4.8) в диетилов етер (4.4).

4.9. Стилмастерол с известна степен на хомогенност, не по-малко от 90% чисто съдържание (P).

4.9.1. Стилмастеролен стандартен разтвор — приготвя се разтвор, съдържащ с точност до 0,001 mg/ml приблизително 0,2 mg/ml (W_1) стилмастерол (4.9) в диетилов етер (4.4).

4.10. Тестов разтвор за проверка на разтварянето. Приготвя се разтвор, съдържащ 0,05 mg/ml ланостерин (4.7) и 0,5 mg/ml ситостерин (4.8) в диетилов етер (4.4).

5. Метод

5.1. Приготвяне на стандартни разтвори за хроматография. Вътрешният стандартен разтвор (4.3.1) трябва да се добави към подходящ стеролов разтвор в същото време, когато се добавя към хидролизираната проба (виж 5.2.2).

5.1.1. Ситостеринов стандартен хроматографски разтвор: 1 ml ситостеринов стандартен разтвор (4.8.1) се поставя във всеки от двата реактивни флакона (3.7) и диетиловият етер се отстранява чрез струя азот. Добавя се 1 ml вътрешен разтвор (4.3.1.1) и диетиловият етер се отстранява чрез струя азот.

5.1.2. Стилмастеролен стандартен хроматографски разтвор: 1 ml стилмастеролен стандартен разтвор (4.9.1) се поставя във всеки от двата реактивни флакона (3.7) и диетиловият етер се отстранява чрез струя азот. Добавя се 1 ml вътрешен разтвор (4.3.1.2) и диетиловият етер се отстранява чрез струя азот.

5.2. Подготовка на нехидрализираните съставки

5.2.1. Пробата масло се стопява при температура, която не надвишава 35 °C; пробата се смесва внимателно чрез бъркане. В 150 ml колба (3.1) се измерва с точност до 1 mg приблизително 1 g масло (W_2) или концентрирано масло (W_2).

Добавя се 50 ml етанол (4.1) и 10 ml разтвор на калиев хидроксид (4.2). Поставя се конверторният увеличител и се загрява приблизително при 75 °С за 30 минути. Конверторният увеличител се отваря и колбата се охлажда на близка до стайната температура.

5.2.2. В колбата се добавя 1,0 ml вътрешен стандартен разтвор (4.3.1.1), ако ситостеринът трябва да се определи, или (4.3.1.2), ако стигмастеролът трябва да се определи. Смесва се внимателно. Съдържанието на колбата се поставя в 500 ml отделителна фуния (3.2), като колбата последователно се измива с 50 ml вода и 250 ml диетилов етер (4.4). Отделителната фуния се разклаща силно за две минути и се оставя за отделяне на фазите. Долният воден слой се отстранява и етеровият слой се измива чрез разклащане с четири последователни части вода от 100 ml

Бележка 2: За да се избегне образуването на емулсия, е съществено първите две измивания с вода да се извършват леко (10 превъртания). При третото измиване може да се разклаща силно за 30 секунди. Ако е образувана емулсия, тя може да бъде унищожена с добавянето на 5-10 ml етанол. Око се добавя етанол, е важно да се извършат две допълнителни енергични измивания с вода.

5.2.3. Чистият нехидрализиран етеров слой се оставя да изтече през стъклена колона (3.5), съдържаща 30 g дихидратиран натриев сулфат (4.5). Етерът се събира в 250 ml колба (3.3). Добавя се гранула против кипене с енергично отделяне на пара и се изпарява близо до изсушаване във водна баня или кожух, като се събират остатъците от разтвора.

5.3. Приготвяне на триметил силил етери

Бележка 3: Ако екстрактите от пробата са отнети, за да се завърши сушенето при прекалено висока температура, може да възникне загуба на стерол.

5.3.1. Етеровият разтвор, оставащ в колбата се поставя в 2 ml реактивен флакон (3.7) заедно с 2 ml диетилов етер и етерът се отстранява чрез използване на струя азот. Колбата се измива с две допълнителни части от 2 ml диетилов етер, който се поставя във флакона, и етерът се отстранява всеки път с азот.

5.3.2. Пробата се силилира чрез добавянето на 1 ml TRI-SIL (4.6). Флаконът се затваря и се разклаща силно, за да се разтвори. Ако разтварянето не е завършило, се подгръва при 65-70 °С. Оставя се да престои най-малко пет минути преди инжектирането в газовата хроматография. Стандартите се силилират по същия начин като пробите. Тестовият разтвор за проверка на разтварянето (4.10) се силилира по същия начин като пробите.

Бележка 4: Силилирането трябва да се извършва в безводна среда. Непълното силилиране на бетулин се индикира с втори пик, близък до този на бетулина. Присъствието на етанол на етапа на силилиране влияе на силилирането. Това може да е резултат от неадекватното измиване на етапа на извличането. Ако този

проблем продължава, на етапа на екстракцията може да бъде въведено пето измиване, като се разклаща силно за 30 секунди.

5.4. Газов хроматографски анализ

5.4.1. Избор на оперативни условия

Газовият хроматограф се настройва съобразно инструкциите на производителя.

Указанията за условията на работа са, както следва:

- температура на колоната: 265 °C
- температура на инжектора: 265 °C
- температура на детектора: 300 °C
- скорост на струята на носещия газ: 0,6 ml/min
- водородно налягане: 84 kPa
- налягане на въздуха: 155 kPa
- съотношение на разделянето на пробата: от 10:1 до 50:1; съотношението на разделяне трябва да бъде оптимизирано съобразно инструкциите на производителя и линейността на отговора на детектора и след това да бъде валидирано за обхвата на концентрацията, който е от интерес.

Бележка 5: Изключително важно е тръбичката за инжектиране да се почиства регулярно.

- количество на инжектираната субстанция: 1 µl на разтвор TMSE.

Преди започването на какъвто и да е анализ, системата се оставя да се уравни и да даде удовлетворителен постоянен сигнал-отговор. Тези условия трябва да варират в светлината на характеристиките на колоната и газовия хроматограф, така че да се получат хроматограми, които изпълняват следните условия:

- пикът ситостерин трябва да бъде адекватно разтворен от ланостерина. Фигура 1 показва типична хроматограма, която би следвало да бъде получена от силилирания тестови разтвор за проверка (4.10),

- относителните времена на запазване на следните стероли би следвало да бъдат приблизително:

холестерол:	1.0
стигмастерол:	1.3
ситостерин:	1.5
бетулин:	2.5

- времето за запазване за бетулин би следвало да бъде приблизително 24 минути.

5.4.2. Аналитична процедура

Инжектира се 1 µl силилиран стандартен разтвор (стигмастерол или ситостерин) и се настройват параметрите за калибриране на интегратора. Инжектира се допълнително 1 µl силилиран стандартен разтвор, за да се определят коефициентите на влияние по отношение на бетулина.

Инжектира се 1 µl силилиран разтвор на пробата и се измерват пиковите повърхности. Всяка хроматографска серия трябва да бъде придружавана с инжектиране на стандарти. Като указание, във всяка серия би следвало да бъдат включени шест инжектирания на проба.

Бележка б: Интегрирането на стигмастероловия пик би следвало да включва всички образования на неясни пикове, както са определени в точки 1, 2 и 3 във фигура 2б.

Интегрирането на ситостериновия пик би следвало да включва повърхността на пика на 22-дихидро-β-ситостерин (стигмастанол), който се отмива веднага след ситостерина (виж фигура 3б), когато се оценява общият ситостерин.

6. Изчисляване на резултатите

6.1. Пиковата повърхност на стерол и бетулин се определя в двата стандарта за партида и се изчислява R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{average area of the sterol peak in the standard}}{\text{average area of the betulin peak in the standard}}$$

Определя се пиковата повърхност на стерол (стигмастерол и ситостерин) и на бетулин в пробата и се изчислява R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{area of the sterol peak in the sample}}{\text{area of the betulin peak in the sample}}$$

Б. пр.: area of the sterol peak in the sample: повърхност на стероловия пик в пробата
Area of the betulin peak in the sample: повърхност на бетулиновия пик в пробата.

W_1 = стеролно съдържание на стандарта (mg), което се съдържа в 1 ml стандартен разтвор (4.8.1 или 4.9.1)

W_2 = тегло на пробата (г.) (5.2.1)

P = степен на чистота на стандартния стерол (4.8 или 4.9)

$$\text{Sterol content of the sample (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

Б. пр.: sterol content of the sample: стеролово съдържание на пробата

7. Точност на метода

7.1. Масло

7.1.1. Повторяемост

7.1.1.1. Стилмастерол

Разликата между резултатите от две определяния, извършени в рамките на възможно най-краткия срок от един оператор и чрез използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишава 19,3 mg/kg

7.1.1.2. Ситостерин

Разликата между резултатите от две определяния, извършени в рамките на възможно най-краткия срок от един оператор и чрез използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишава 23,0 mg/kg

7.1.2. Възпроизвеждане

7.1.2.1. Стилмастерол

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и чрез използване на различни апаратури върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишава 31,9 mg/kg

7.1.2.2. Ситостерин

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и чрез използване на различни апаратури върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишава 8,7% от средната стойност на определянето.

7.1.3. Източник на данните на прецизността

Данните на прецизността бяха определени от експеримент, проведен през 1992 г. и включващ осем лаборатории и шест проби (три празни дублирания) за стилмастерол в масло и шест проби (три празни дублирания) за ситостерин.

7.2. Концентрирано масло

7.2.1. Повторяемост

7.2.1.1. Стилмастерол

Разликата между резултатите от две определяния, извършени в рамките на възможно най-краткия срок от един оператор и чрез използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишава 10,2 mg/kg

7.2.1.2. Ситостерин

Разликата между резултатите от две определяния, извършени в рамките на възможно най-краткия срок от един оператор и чрез използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишава 3,6% от средната стойност на определянето.

7.2.2. Възпроизвеждане

7.2.2.1. Стилмастерол

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и чрез използване на различни апаратури върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишават 25,3 mg/kg

7.2.2.2. Ситостерин

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и чрез използване на различни апаратури върху идентичен тестови материал, не трябва да надвишава 8,9% от средната стойност на определянето.

7.2.3. Източник на данните на прецизността

Данните на прецизността бяха определени от експеримент, проведен през 1991 г. и включващ девет лаборатории и шест проби (три празни дублирания) за стигмастерол в масло и шест проби (три празни дублирания) за ситостерин.

8. Граници на толерантност

8.1. От индикаторния продукт трябва да бъдат взети проби за проверка на коректността на индикирането на продукта.

8.2. Масло

8.2.1. Стилмастерол

8.2.1.1. Количеството за смесване за стилмастерол е 150 g от най-малко 95% чист стилмастерол за тон масло, т.е. 142,5 mg/kg или 170 g от най-малко 85% чист стилмастерол за тон масло, т.е. 144,5 mg/kg

8.2.1.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните граници (критична граница на вероятност от 95% (DCr_{95}) е взета предвид):

- 116,0 mg/kg (95% от минималното количество за смесване за 95% чист стилмастерол),
- 118,0 mg/kg (95% от минималното количество за смесване за 85% чист стилмастерол),
- 81,0 mg/kg (70% от минималното количество за смесване за 95% чист стилмастерол),
- 82,0 mg/kg (70% от минималното количество за смесване за 85% чист стилмастерол).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между 116,0 mg/kg и 81,0 mg/kg или 118,0 mg/kg и 82,0 mg/kg

8.2.2. Ситостерин

8.2.2.1. Количеството за смесване за ситостерин е 600 g от най-малко 90% хомогенен ситостерин за тон масло, т.е. 540 mg/kg

8.2.2.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните граници (критична граница на вероятност от 95% (DCr_{95}) е взета предвид):

— 486,0 mg/kg (95% от минималното количество за смесване за 90% чист ситостерин),

— 358,0 mg/kg (70% от минималното количество за смесване за 90% чист ситостерин).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между 486,0 mg/kg и 358,0 mg/kg

8.3. Концентрирано масло

8.3.1. Стилмастерол

8.3.1.1. Количеството за смесване за стилмастерол е 150 g от най-малко 95% чист стилмастерол за тон концентрирано масло, т.е. 142,5 mg/kg или 170 g от най-малко 85% чист стилмастерол за тон концентрирано масло, т.е. 144,5 mg/kg

8.3.1.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните граници (критична граница на вероятност от 95% (DCr_{95}) е взета предвид):

— 120,0 mg/kg (95% от минималното количество за смесване за 95% чист стилмастерол),

— 122,0 mg/kg (95% от минималното количество за смесване за 85% чист стилмастерол),

— 84,0 mg/kg (70% от минималното количество за смесване за 95% чист стилмастерол),

— 86,0 mg/kg 70% от минималното количество за смесване за 85% чист стилмастерол).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между 120,0 mg/kg и 84,0 mg/kg или 122,0 mg/kg и 86,0 mg/kg

8.3.2. Ситостерин

8.3.2.1. Количеството за смесване за ситостерин е 600 g от най-малко 90% чист ситостерин за тон концентрирано масло, т.е. 540 mg/kg

8.3.2.2. Получените от анализа на продукта резултати за трите проби се използват за проверка на размера и хомогенността на смесването на индикатора, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните граници (критична граница на вероятност от 95 % (DCr_{95}) е взета предвид):

- 486,0 mg/kg (95% от минималното количество за смесване за 90% чист ситостерин),
- 358,0 mg/kg (70% от минималното количество за смесване за 90% чист ситостерин).

Използва се концентрацията на индикатора на пробата с най-ниския резултат, който се получава чрез изпаряване между между 486,0 mg/kg и 358,0 mg/kg

Фигура 1

Хроматограма на сместа за проверка на разтварянето

За предпочитане е пълно разтваряне, т.е. пиковете за ланостерин и ситостерин би следвало да се върнат изцяло до основната линия. Възможно е, обаче, непълно разтваряне.

Б. пр.: FID Detector response: FID-детекторен отговор

Figure 1

Chromatogram of resolution test mixture.

Complete resolution is preferable, i.e. the peak trace for lanosterol should return to baseline before leaving for the sitosterol peak although incomplete resolution is tolerable.

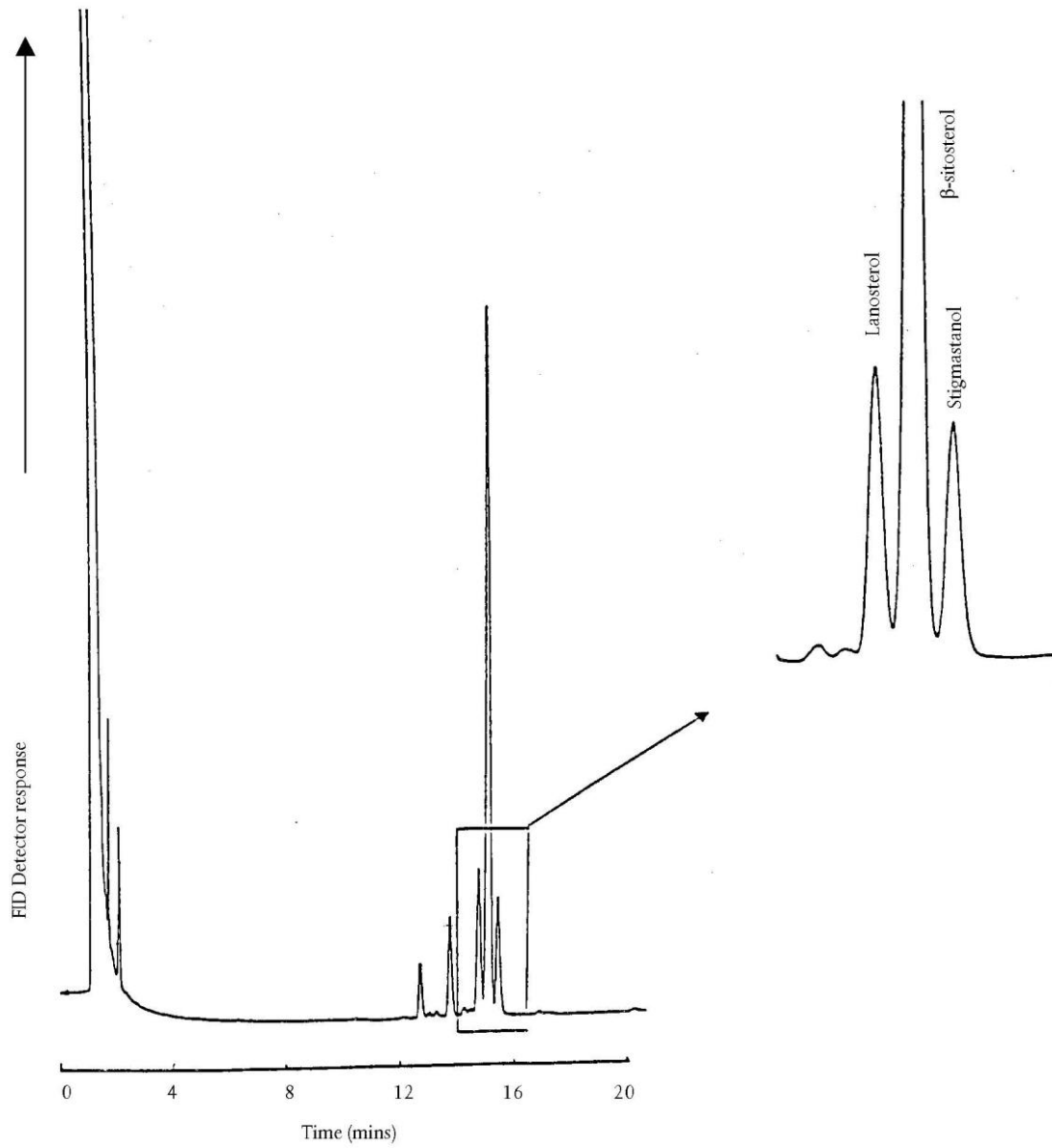


Figure 2a
Stigmasterol standard

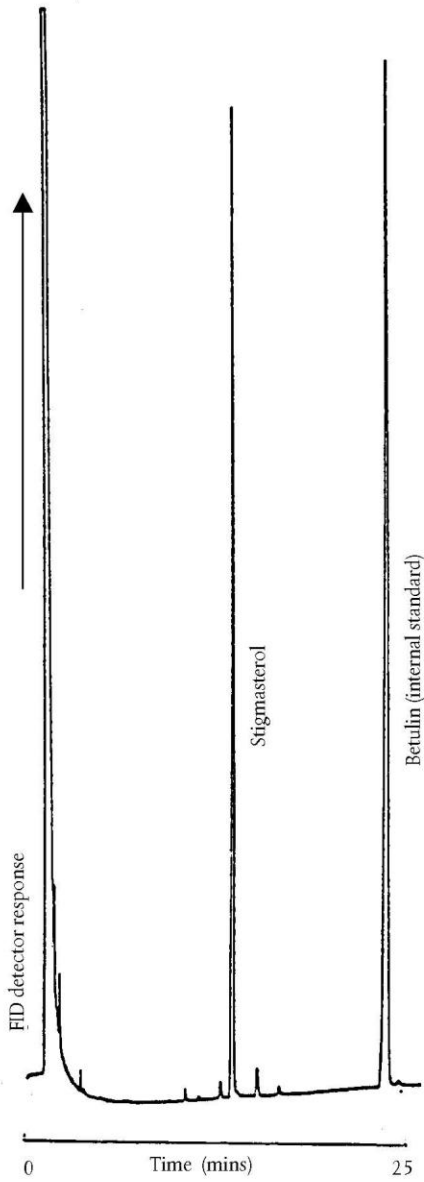
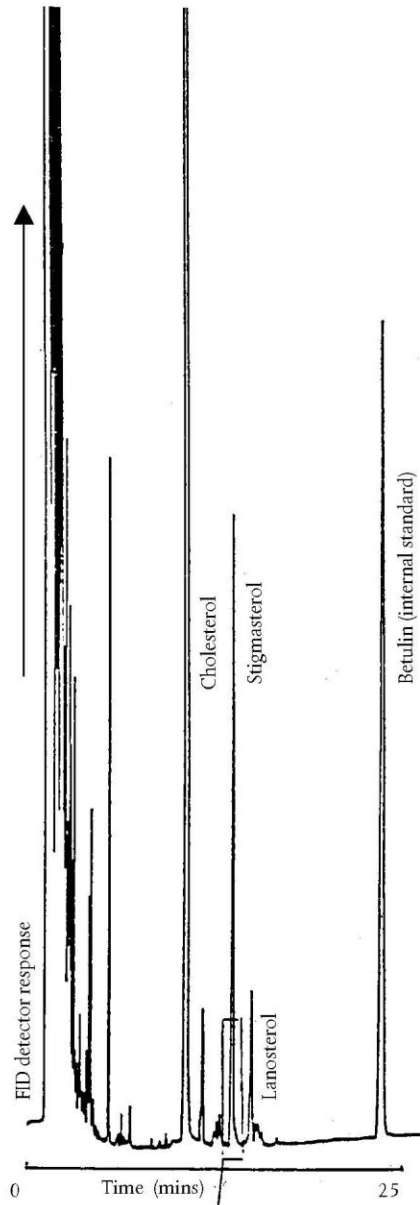


Figure 2b
Butter sample denatured with stigmasterol



Note: Integration of the stigmasterol peak should include any tailing as defined by points 1, 2 and 3.

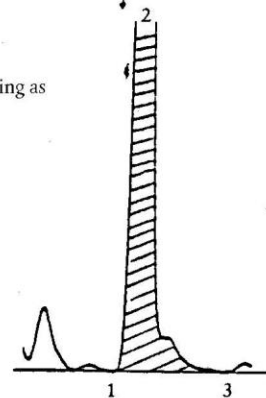
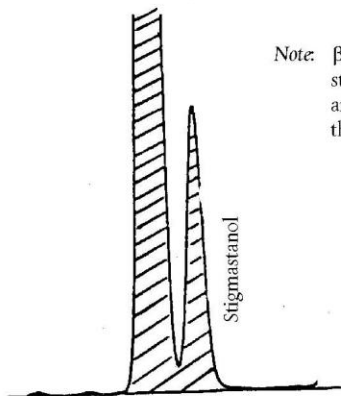
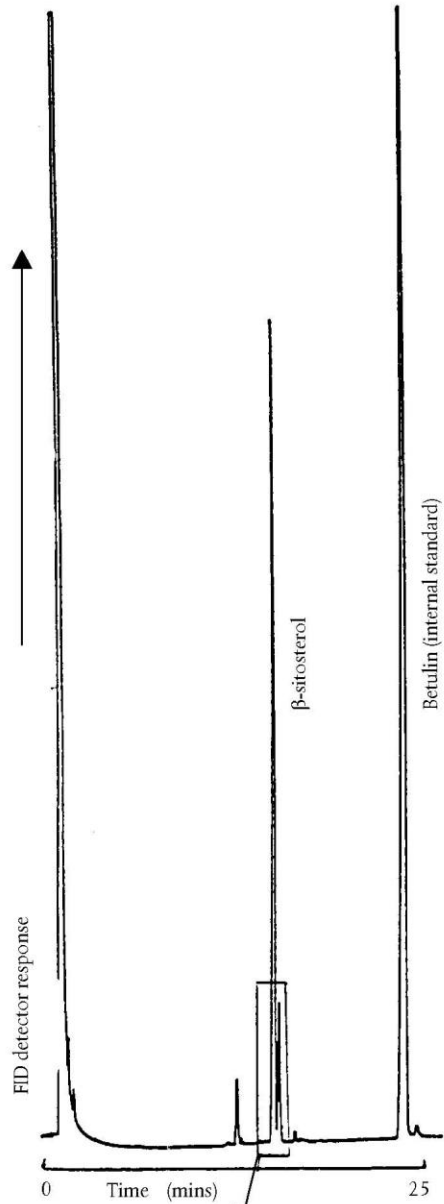
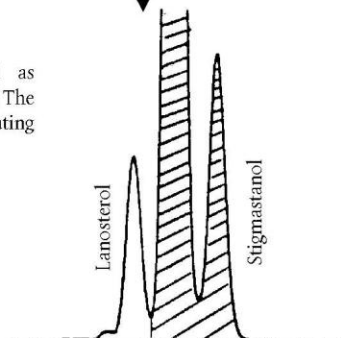
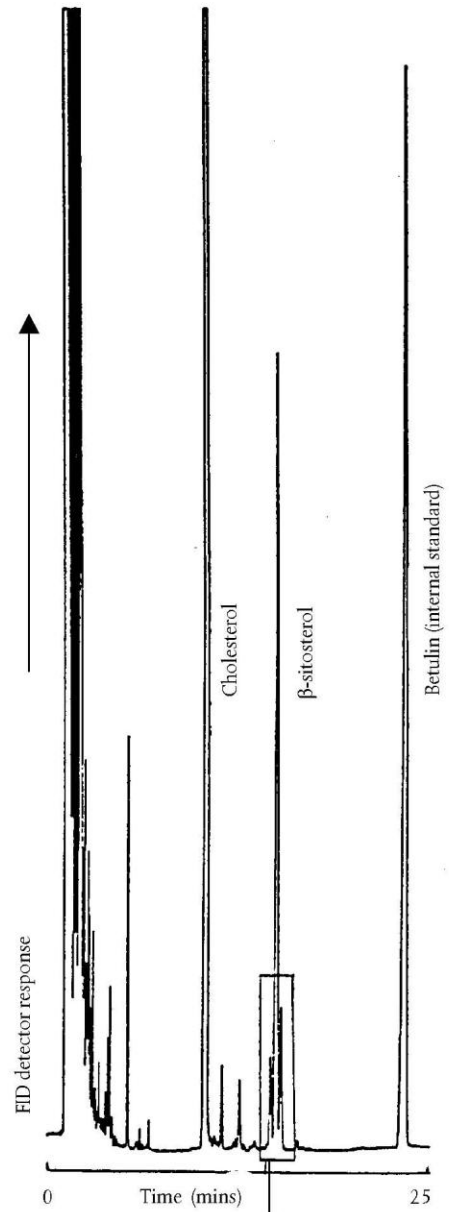


Figure 3a
Sitosterol standard



Note: β-sitosterol often contains an impurity (identified as stigmastanol) which elutes immediately after β-sitosterol. The areas of these two peaks should be summed when evaluating the total β-sitosterol present.

Figure 3b
Butter sample
denatured with β-Sitosterol



Фигура 2а
Стигмастеролов стандарт

Фигура 2б
Проба масло, денатурирана със стигмастерол

Бележка: Интеграцията на стигмастероловия пик би следвало да включва всякакви остатъци, както са определени от точки 1, 2 и 3.

Б. пр.: FID detector response: FID-детекторен отговор
Betulin (internal standard): бетулин (вътрешен стандарт)

Фигура 3а
Ситостеринов стандарт

Фигура 3б
Проба масло, денатурирано със s-ситостерин

Бележка: s-ситостеринът често съдържа примеси (идентифицирани като стигмастанол), които се разтварят веднага след β -ситостерина. Повърхностите на тези два пика би следвало да бъдат сумирани при оценката на общото налично количество β -ситостерин.

Б. пр.: FID detector response: FID-детекторен отговор
Betulin (internal standard): бетулин (вътрешен стандарт)

ПРИЛОЖЕНИЕ XV
(Член 10)

РЕФЕРЕНТЕН МЕТОД ЗА ОТКРИВАНЕ НА КРАВЕ МЛЯКО И КАЗЕНАТ В СИРЕНА ОТ ОВЧЕ МЛЯКО, КОЗЕ МЛЯКО ИЛИ БИВОЛСКО МЛЯКО ИЛИ СМЕСИ ОТ ОВЧЕ, КОЗЕ И БИВОЛСКО МЛЯКО

1. Обхват

Откриване на краве мляко и казенат в сирена, произведени от овче мляко, козе мляко, биволско мляко или смеси от овче, козе и биволско мляко чрез изоелектрическо фокусиране на γ -казеинни след плазминолиза.

2. Приложно поле

Методът е подходящ за чувствително и специфично откриване на натурално и топлинно обработвано краве мляко и казенат в пресни и узрели сирена, произведени от овче мляко, козе мляко, биволско мляко или смеси от овче, козе и биволско мляко. Той не е подходящ за откриването на подправяне на мляко и сирене чрез топлинно обработени концентрати на протеин в краве суроватка.

3. Принцип на метода

- 3.1. Изолиране на казеини от сирене и референтни проби.
- 3.2. Разтваряне на изолираните казеини и плазмено отделяне (ЕС.3.4.21.7).
- 3.3. Изоелектрическо фокусиране на обработени с плазма казеини в присъствието на урея и оцветяване на протеини.
- 3.4. Оценка на оцветените γ_3 и γ_2 -ивици на казеин (доказателство за краве мляко) чрез сравняване на получените от пробата ивици с тези, които са получени в същия гел от референтните проби, съдържащи 0% и 1% краве мляко.

4. Реагенти

Ако не е посочено друго, трябва да бъдат използвани химикали с аналитично качество. Водата трябва да е двойно дестилирана или да е с еквивалента степен на чистота.

Бележка: Следните данни се прилагат за лаборатория, която е подготвила полиакриламидни гелове, съдържащи урея, с размери 265 × 125 × 0,25 mm. Когато се използват други размери и типове гел, би могло да е необходимо адаптирането на условията за отделяне.

Изо-електрическо фокусиране

- 4.1. Реагенти за добиването на уреята, съдържащи полиакриламидни гелове

4.1.1. Разтваряне на основен гел

Разтваряне на:

4,85 g акриламид

0,15 g N, N'-метилетилен-би-акриламид (BIS)

48,05 g урея

15,00 g глицерин (87% w/w),

във вода, като се допълва до 100 ml и се съхранява в бутилка от кафяво стъкло в хладилник.

Бележка: Вместо цитираните определени дози невротоксични акриламиди може да се използва обичайният готов разтвор акриламид/BIS. Когато такъв разтвор съдържа 30% w/v акриламид и 0,8% w/v BIS, вместо определените дози за сместа трябва да бъде използван обем от 16,2 ml. Годността на основния разтвор е максимум 10 дни; ако неговата проводимост е повече от 5 μ S, той се дейонизира чрез разклащане с 2 g Амберлит MB-3 за 30 минути, след това се филтрира през мембрана от 0,45 μ m.

4.1.2. Разтвор на гел.

Приготвя се разтвор на гел чрез смесването на добавки и амфолити с основния разтвор на гел (виж 4.1.1).

9,0 ml основен разтвор

24 mg β -аланин

500 μ l амфолит pH 3,5 — 9,5 (¹)

250 μ l амфолит pH 5-7 (¹)

250 μ l амфолит pH 6-8 (¹).

Разтворът на гел се смесва и се подлага на суха дестилация за две до три минути в ултразвукова баня или във вакуум.

Бележка: Разтворът на гел се приготвя непосредствено преди изливането му (виж 6.2).

4.1.3. Катализаторни разтвори

4.1.3.1. N, N, N' N' — тетраметилетиленедиамин (Temed).

4.1.3.2. 40% w/v амониев персулфат (PER): 800 mg PER се разтварят във вода и се долива до 2 ml

Бележка: Винаги се използва прясно приготвен разтвор PER.

4.1. Контактна течност

Керосин или течен парафин

4.2. Аноден разтвор

5,77 g фосфорна киселина (85% w/w) се разтваря във вода и се разрежда до 100 ml

4.3. Катоден разтвор

2,00 g натриев хидроксид се разтваря във вода и се разрежда до 100 ml с вода.

Подготовка на проби

4.5. Реагенти за изолиране на протеин

4.5.1. Разрежена оцетна киселина (25,0 ml кристализирала оцетна киселина с добавена вода до 100 ml)

4.5.2. Дихлорметан

4.5.3. Ацетон

4.6. Неутрализатор за разтваряне на протеин

Разтварят се:

5,75 g глицерин (87% w/w),

24,03 g урея,

250 mg дитиотрейтол,

във вода и се добавя до 50 ml

Бележка: Съхранява се в хладилник; максимална годност- една седмица.

4.7. Реагенти за плазмено отделяне на казеини

4.7.1. Неутрализатор- амониев карбонат

0,2 mol/l разтвор на амониев бикарбонат (1,58 г./100 ml вода), съдържащ 0,05 mol/l етилен-диамин-тетраоцетна киселина (EDTA, 1,46 г./100 ml), се титрува с 0,2 mol/l разтвор на амониев карбонат (1,92 г./100 ml вода), съдържащ 0,05 mol/l EDTA, до pH 8.

4.7.2. Плазма на краве мляко (ЕС. 3.4.21.7), с дейност най-малко 5 U/ml.

4.7.3. ε-разтвор на аминок-апролна киселина за активиране на ензими

2,624 g ε-амино-капролна киселина (6 аминок-п-циклохексанонова киселина) се разтварят в 100 ml 40% (v/v) етанол.

(1) Продуктите Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia), както и Resolyte® pH 5-7, съответно pH 6-8 (BDH, Merck), се оказват особено подходящи за получаване на исканото отделяне на γ-казеини.

4.8. Стандартни проби

4.8.1. Сертифицирани референтни стандартни проби на смес от засирени овче и козе обезмаслено мляко, съдържащи 0% и 1% краве мляко, са налични в Института на Комисията за референтни материали и метрология, В-2440 Geel, Белгия.

4.8.2. Подготовка на вътрешнолабораторни стандартни проби на биволско засирено мляко, съдържащо 0% и 1% краве мляко:

Обезмасленото мляко се приготвя чрез центрофугиране на биволско или краве сурово непакетирано мляко при 37 °C за 2 500 g за 20 минути. След бързо охлаждане на съда със съдържанието от 6 до 8 °C, горният слой се отстранява напълно. За подготовката на 1% -на стандартна проба, към 495 ml биволско обезмаслено мляко се добавя 5,00 ml краве обезмаслено мляко в 1 л. бехерова чаша, адаптира се рН до 6,4 чрез прибавяне на разрежена млечна киселина (10% w/v). Температурата се регулира на 35 °C и се прибавя 100 µl телно сирище (сирищна дейност 1: 10 000, с. 3 000 U/ml), разклаща се за 1 минута и бехеровата чаша се оставя покрита с алуминиево фолио при 35 °C за един час, за да може да се образува съсирване. След образуването на съсирването, цялото сирищно мляко се суши чрез сублимиране без предварително хомогенизиране или отцеждане на суроватката. След сушенето чрез сублимиране, то е основа за добиването на хомогенен прах. За подготовката на 0 %-на стандартна проба се извършва същата процедура чрез използване на натурално биволско обезмаслено мляко. Стандартните проби трябва да бъдат съхранявани при – 20 °C.

Бележка: Препоръчително е да се проверява чистотата на биволското мляко чрез изоелектрическо фокусиране на третираните с плазма казеини, преди подготовката на стандартните проби.

Реагенти за оцветяване на протеин

4.8. Фиксатори

150 g трихлор оцетна киселина се разтварят във вода и се добавя до 1 000 ml

4.9. Обезцветяващ разтвор

500 ml метанол и 200 ml кристализирала оцетна киселина се разреждат до 2 000 ml с дестилирана вода.

Бележка: Всеки ден се приготвя пресен обезцветяващ разтвор; той може да бъде приготвен чрез смесване на равни обеми основни разтвори на 50% (v/v) метанол и 20% (v/v) кристализирала оцетна киселина.

4.11. Оцветяващи разтвори

4.11.1. Оцветяващ разтвор (основен разтвор 1)

3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) се разтваря в 1 000 ml 90% (v/v) метанол чрез използване на магнитна бъркалка (приблизително 45 минути), филтрира се чрез два прегънати филтъра със средна скорост.

4.11.2. Оцветяващ разтвор (основен разтвор 2)

5,0 g меден сулфатен пентахидрат се разтваря в 1 000 ml 20% (v/v) оцетна киселина.

4.11.3. Оцветяващ разтвор (работен разтвор)

Смесват се заедно 125 ml от всеки от основните разтвори (4.11.1, 4.11.2) непосредствено преди оцветяването.

Бележка: Оцветяващият разтвор би следвало да бъде приготвен в деня, в който се използва.

5. Оборудване

5.1. Огледални стъкла (265 ×125 ×4 mm.); гумена ролка (ширина 15 см.); нивелирана маса

5.2. Носещо фолио на гел (265 ×125 mm).

5.3. Покривно фолио (280 ×125 mm.). Двете дължини се залепват с импрегнирана ивица (280 ×6 ×0,25 mm.) (виж фигура 1).

5.4. Камера за електрофокусиране с охлаждаща плоча (напр. 265 ×125 mm.) и подходящо електрическо захранване ($\geq 2,5$ kV) или автоматично устройство за електрофореза.

5.5. Криостат за циркулация, термостатно контролиран при $12 \pm 0,5$ °C.

5.6. Центрофуга, приспособена за 3 000 g.

5.7. Електродни ленти (≥ 265 mm. дълги).

5.8. Пластмасови флакони за капене на анодните и катодните разтвори.

5.9. Апликатори за проби (10 ×5 mm., вискозна филтърна хартия или филтърна хартия с ниска абсорбция на протеин).

5.10. Ножове от неръждаема стомана, скалпели и пинсети.

5.11. Чаши от неръждаема стомана или от стъкло за оцветяване и обезцветяване (напр. 280 ×150 mm. корита за инструменти).

5.12. Приспособим хомогенизатор с мотовилка (с диаметър на ос от 10 mm.), при обхват от 8 000 до 20 000.

5.13. Магнитна бъркалка.

- 5.14. Ултразвукова баня.
- 5.15. Фолиен кислород.
- 5.16. 25 µl микро-капкомери.
- 5.17. Вакуумен концентратор или сушилка чрез сублимиране.
- 5.18. Термостатично контролирана водна баня, регулируема за 35 и 40 ± 1 °C с шейкър.
- 5.19. Денсиметър, четящ при λ= 634 nm.

6. Процедура

6.1. Подготовка на проби

6.1.1. Изолиране на казеини

Масата, еквивалентна на 5 g сухо вещество сирене, или референтните стандартни проби се претеглят в 100 ml центрофужен съд, прибавя се 60 g дестилирана вода и се хомогенизира с хомогенизатор с мотовилка (от 8 000 до 10 000 rpm). Регулира се до рН 4,6 с разредена оцетна киселина (4.5.1) и се центрофугира (5 минути, 3 000 g).

Мазнината и суроватката се отделят, утайката се хомогенизира при 20 000 rpm в 40 ml дестилирана вода, регулирана до рН 4,5 с разредена оцетна киселина (4.5.1), добавя се 20 ml дихлорметан (4.5.2), отново се хомогенизира и се центрофугира (5 минути, 3 000 g). Казеиновият слой, който се намира между водната и органичната фаза (виж фигура 2) се отстранява със шпатула и двете фази се отделят. Казеинът се хомогенизира отново в 40 ml дестилирана вода (виж по-горе) и 20 ml дихлорметан (4.5.2) и се центрофугира. Тази процедура се повтаря, докато двете фази на екстракцията останат безцветни (от два до три пъти). Утайката от протеин се хомогенизира с 50 ml ацетон (4.5.3) и се филтрира чрез прегънатата филтърна хартия със средна скорост. Утайката върху филтъра се измива с две отделни части от 25 ml ацетон и се оставя да се изсуши на въздух или чрез струя азот, след което фино се стрива на прах в хаван.

Бележка: Сухият изолиран казеин би следвало да бъде съхраняван при – 20 °C.

6.1.2. Плазмено отделяне на β-казеини за интензифициране на γ-казеини

25 mg изолирани казеини (6.1.1) се разпръскват в 0,5 ml неутрализатор на амониев карбонат (4.7.1) и се хомогенизират за 20 минути чрез напр. използване на ултразвуково третиране. Подгрява се до 40 °C и се добавя 10 µl плазма (4.7.2), смесва се и се инкубира за един час при 40 °C, с непрекъснато разклащане. За да се активизира ензимът, се добавя 20 µl разтвор от ε-амино-капронова киселина (4.7.3), след това се добавя 200 mg твърда урея и 2 mg дитиотрейтол.

Бележка: За да се получи по-голяма симетрия на фокусираните казеинови ивици, е препоръчително разтворът да се изсуши чрез сублимиране след добавянето на ϵ -аминокапронна киселина, като след това утайките се разреждат в 0,5 ml неутрализатор за обезцветяване на протеин (4.6).

6.2. Приготвяне на урея, съдържаща полиакриламидни гелове

С помощта на няколко капки вода, носещото фолио на гела (5.2) се навива на огледално стъкло (5.1), като излишната навън вода се отстранява с хартиена кърпа или памук. По същия начин, покривното фолио (5.3) се навива с ограничителите (0,25 mm.) върху друго огледално стъкло. Стъклото се поставя хоризонтално върху нивелирана маса.

Към приготвения и с отстранен въздух разтвор от гел (4.1.2) се добавя 10 μ l Temed (4.1.3.1), разклаща се и се добавя 10 μ l PER-разтвор (4.1.3.2), внимателно се смесва и веднага се излива равномерно върху центъра на покривното фолио. Единият край на носещото фолио на гела (с фолиото надолу) се поставя върху стъклото с покривното фолио и се смъква бавно, така че филмът от гел да се разпредели между фолията, без да се образуват мехурчета (фигура 3). Носещото стъкло на гела се смъква внимателно чрез използването на тънка шпатула и върху върха му се поставят още три огледални стъкла за тежест. След завършването на полимеризацията (около 60 минути), полимеризираният гел върху носещото фолио на гела се отстранява заедно с покривното фолио чрез наклоняване на огледалните стъкла. Обратната страна на носещото фолио се почиства внимателно, за да се отстрани утайката и уреята. „Гел-сандвичът“ се затваря във фолиев съд и се съхранява в хладилник (максимум шест седмици).

Бележка: Покривното фолио с ограничителите не може да бъде използвано повторно. Полиакриламидният гел може да бъде разпределен на по-малки части, което е препоръчително, когато има няколко проби или ако се използва автоматично устройство за електрофореза (два гела, с размер 4,5 \times 5 см.).

6.3. Изоелектрическо фокусиране

Охлаждащият термостат се настройва на 12 °C. Обратната страна на фолиото на съда с гел се избърсва с керосин, след това в центъра на охлаждащия блок се капват няколко капки керосин (4.2.). След това „гел-сандвичът“ се притиска надолу към страната на съда, като се внимава да не се образуват мехурчета. Излишният керосин се избърсва и покривното фолио се отстранява. Електродните ивици се напояват с електродните разтвори (4.3, 4.4), изрязват се по дължината на гела и се поставят на предвидените места (разстояние на електродите от 9,5 см).

Условия за изоелектрическо фокусиране:

6.3.1. Размер на гел- 265 \times 125 \times 0,25 mm.

Стъпка	Време (min)	Волтаж (V)	Ток (mA)	мощност (W)	волтчаса (Vh)
1. Пред-фокусиране	30	Максимум 2 500	Максимум 15	Константа 4	Ок. 300
2. Фокусиране на проби (1)	60	Максимум 2 500	Максимум 15	Константа 4	Ок. 1 000
3. Окончателно фокусиране	60	Максимум 2 500	Максимум 5	Максимум 20	Ок. 3 000
	40	Максимум 2 500	Максимум 6	Максимум 20	Ок. 3 000
	30	Максимум 2 500	Максимум 7	Максимум 25	Ок. 3 000

(¹) Прилагане на проби: След пред-фокусирането (стъпка 1), 18 µl от всеки от разтворите от пробата се дозират с капкомер върху апликаторите на пробата (10 × 5 mm.), поставят се върху гела на разстояние 1 mm. един от друг и на разстояние 5 mm. от анода и се притискат леко. Фокусирането се извършва, като се използват горните условия и след 60 минути фокусиране на пробата апликаторите внимателно се отстранят.

Забележка: Ако се промени плътността и ширината на геловите, стойностите за електрически ток и мощност следва да се адаптират по подходящ начин (напр. удвояване на стойностите за електрически ток и за мощност, ако се използва гел с размери 265 × 125 × 0,5 mm.).

6.3.2. Примери за програма за волтаж за автоматично устройство за електрофореза (2 гела с размери 5,0 × 4,5 см.); електродите без ивици се прилагат директно върху гела.

Стъпка	волтаж	ток	мощност	темп.	волт-часа
1. Пред-фокусиране	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Фокусиране на проби	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Фокусиране	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Фокусиране	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

При стъпка 2, апликаторът на пробата се поставя на 0 Vh.
При стъпка 2, апликаторът на пробата се отстранява на 30 Vh.

6.4. Оцветяване на протеин

6.4.1. Фиксиране на протеин

Електродните ивици се отстраняват непосредствено след изключване на захранването и гелът веднага се поставя в съд за оцветяване/премахване на цвета, пълнен с 200 ml фиксатор (4.9); оставя се за 15 минути, като непрекъснато се разклаща.

6.4.2. Измиване и оцветяване на съда с гел

Фиксаторът се отцежда внимателно и съдът с гел се измива два пъти за 30 секунди, всеки път със 100 ml обезцветяващ разтвор (4.10). Обезцветяващият разтвор се излива и съдът се пълни с 250 ml оцветяващ разтвор (4.11.3); оставя се да се оцвети за 45 минути с леко разклащане.

6.4.3. Обезцветяване на съда с гел

Оцветяващият разтвор се излива, съдът с гел се измива два пъти, като всеки път се използва 100 ml обезцветяващ разтвор (4.10), след това се разклаща с 200 ml обезцветяващ разтвор за 15 минути и стъпката за обезцветяване се повтаря най-малко два или три пъти, докато основата стане чиста и безцветна. След това съдът с гел се изплаква с дестилирана вода (2 × 2 минути) и се изсушава на въздуха (от 2 до 3 часа) или със сешоар (от 10 до 15 минути).

Бележка 1: Фиксирането, измиването, оцветяването и обезцветяването се извършва при 20 °С. Не се използват високи температури.

Бележка 2: Ако се предпочита по-изразено сребърно оцветяване (напр. кит за сребърно оцветяване, протеин, Pharmacia Biotech, код No 17-1150-01), пробите от казеин, третиран с плазма, следва да бъдат разредени до 5 mg/ml

7. Оценка

Оценката се извършва чрез сравняване на ивиците протеин на непозната проба с референтни проби върху същия гел. Откриването на краве мляко в сирена от овче мляко, козе мляко и биволско мляко и смеси от овче, козе и биволско мляко се извършва чрез γ_3 -and γ_2 -казеини, чийто обхват на изоелектрически точки е между рН 6,5 и рН 7,5 (фигури 4 а, б, фигура 5). Границата на откриване е по-ниска от 0,5 %.

7.1. Визуална оценка

За визуална оценка на количеството краве мляко се препоръчва да се адаптират концентрациите на пробите и стандартите за получаване на същото ниво на интензивност на овчи, кози и/или биволски γ_2 -и γ_3 -казеини (виж „ γ_2 E,G,B” и „ γ_3 E,G,B” във фигури 4 а, б и фигура 5). След това, количеството на кравето мляко (по-малко от, равно или по-голямо от 1 %) в непознатата проба може да бъде оценявано директно чрез сравняване интензитета на краве γ_3 -и γ_2 -казеини (виж „ γ_3 C” и „ γ_2 C” във фигури 4 а, б и фигура 5) с тези на 0% и 1% референтни стандарти (овца, коза) или вътрешнолабораторни стандарти (бивол).

7.2. Денсиметрична оценка

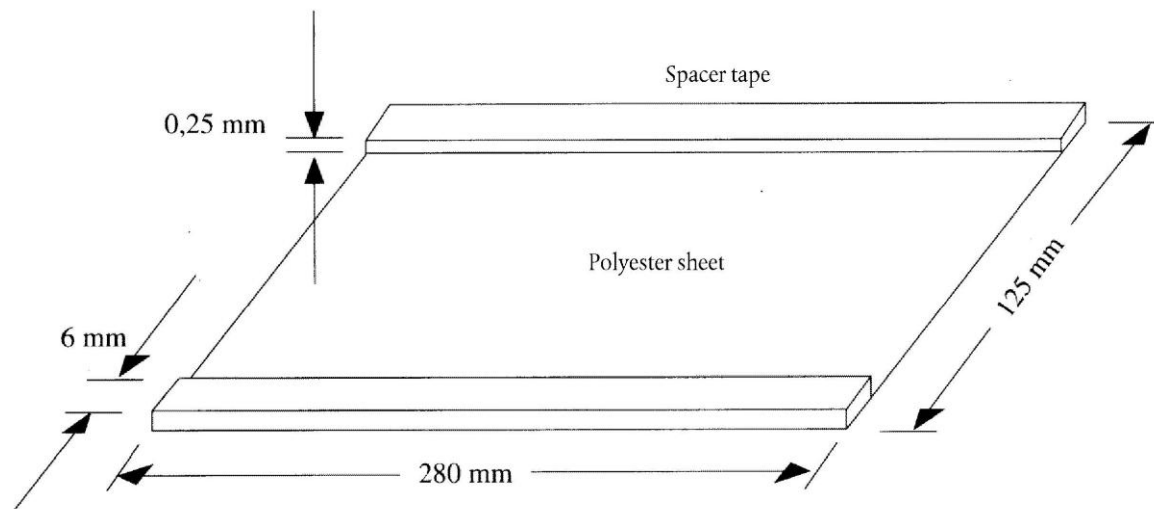
Ако е налице, за определянето на съотношението на най-високите повърхности на краве спрямо овчи, кози и/или биволски γ_2 -и γ_3 -казеини (виж фигура 5) се използва денсиметър (5.19). Тази стойност се сравнява със съотношението на най-високите повърхности на γ_2 -и γ_3 -казеини от 1% референтен стандарт (овца, коза) или вътрешнолабораторен стандарт (бивол), анализирани върху същия гел.

Бележка: Методът функционира задоволително, ако има ясен положителен сигнал за двата краве γ_2 -и γ_3 -казеина в 1% референтен стандарт, но не и в 0% референтен стандарт. Ако няма, процедурата се оптимизира, като прецизно се съблюдават детайлите на метода.

Пробата се оценява като положителна, ако двата краве γ_2 -и γ_3 -казеина или съотношенията на най-високите повърхности са равни или по-големи от нивото на 1% референтен стандарт.

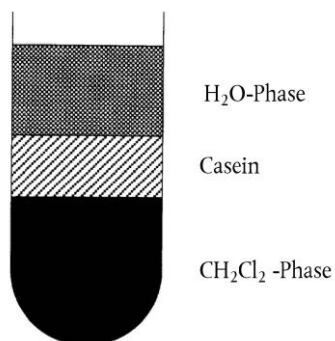
8. Позовавания

1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I, Krause I., Di Luccia A., Vocca A.: Използване на плазмата за увеличаване на чувствителността на откриване на краве мляко в овче и/или козе сирене с изоелектрическо фокусиране с гел на γ_2 -казеини. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Vocca A., Del Giovine L.: Контролен метод за откриване на краве мляко в овче и биволско сирене чрез използване на имуноблотинг. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Чувствително откриване на краве мляко в овче и козе мляко и сирене чрез амфолит-носител и амфолит-носител/неутрализиран рН градиент — изоелектрическо фокусиране на γ -казеини чрез използване на плазма като индикаторен фермент. В: форум по електрофорезата 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 Schafand Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: Изо-електрическо фокусиране със свръх тънък слой в 50-100 μm полиакриламидни гелове върху силилизирани стъклени съдове или полиестерни филми. *Електрофореза* 1, 43-56 (1980).

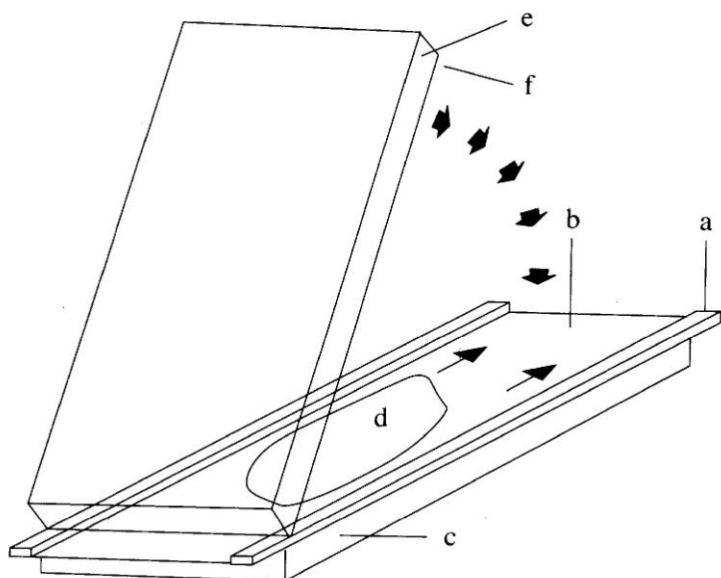


фигура 1: схематично представяне на покривното фолио

Б. пр.: spacer tape: разделителна ивица
polyester sheet: полиестерно фолио

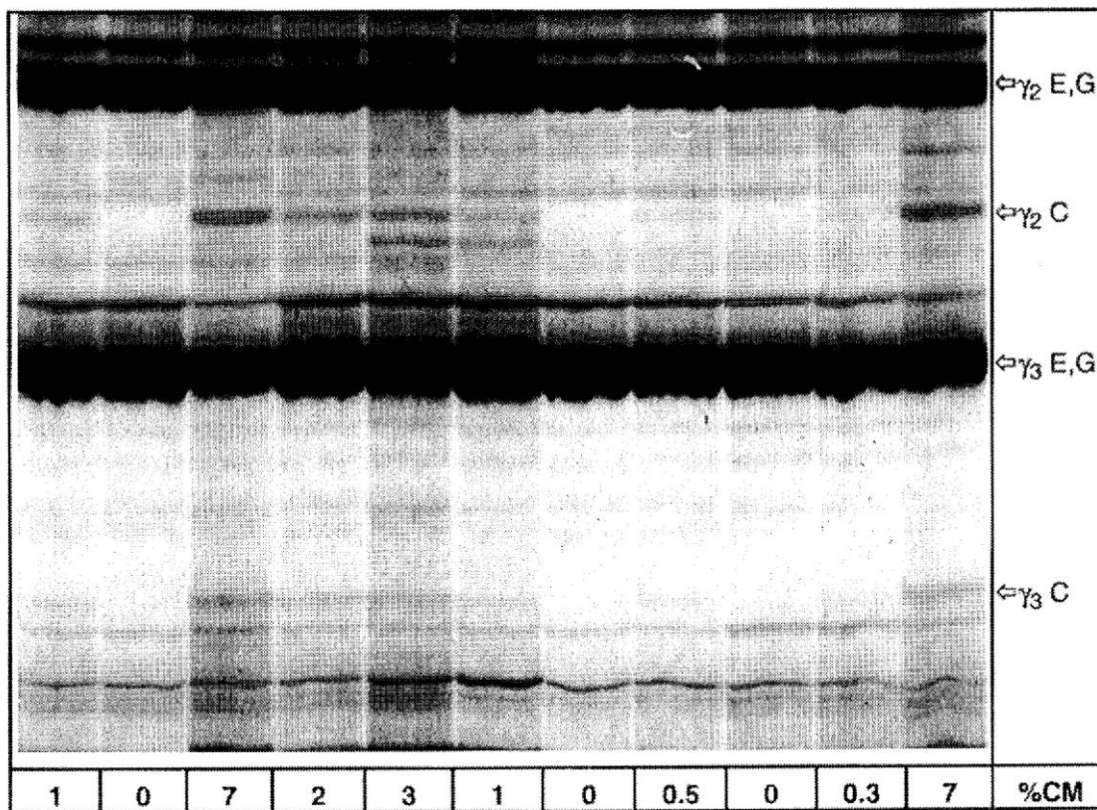


фигура 2: Слой казеин между водната и органичната фаза след центрофугиране



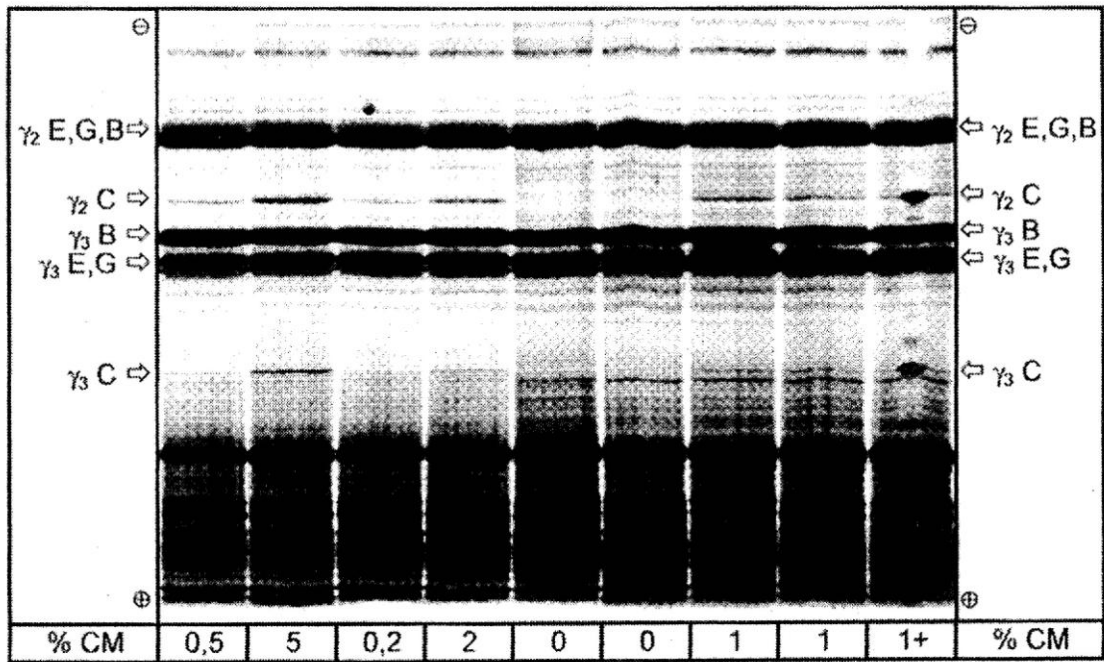
фигура 3: Махова техника за добиване на свръх тънки полиакриламидни гелове

a = разделителна ивица (0,25 mm.); б = покривно фолио (5.3); в, д = стъклени съдове (5.1); г = разтвор на гел (4.1.2); е = носещо фолио на гела (5.2)



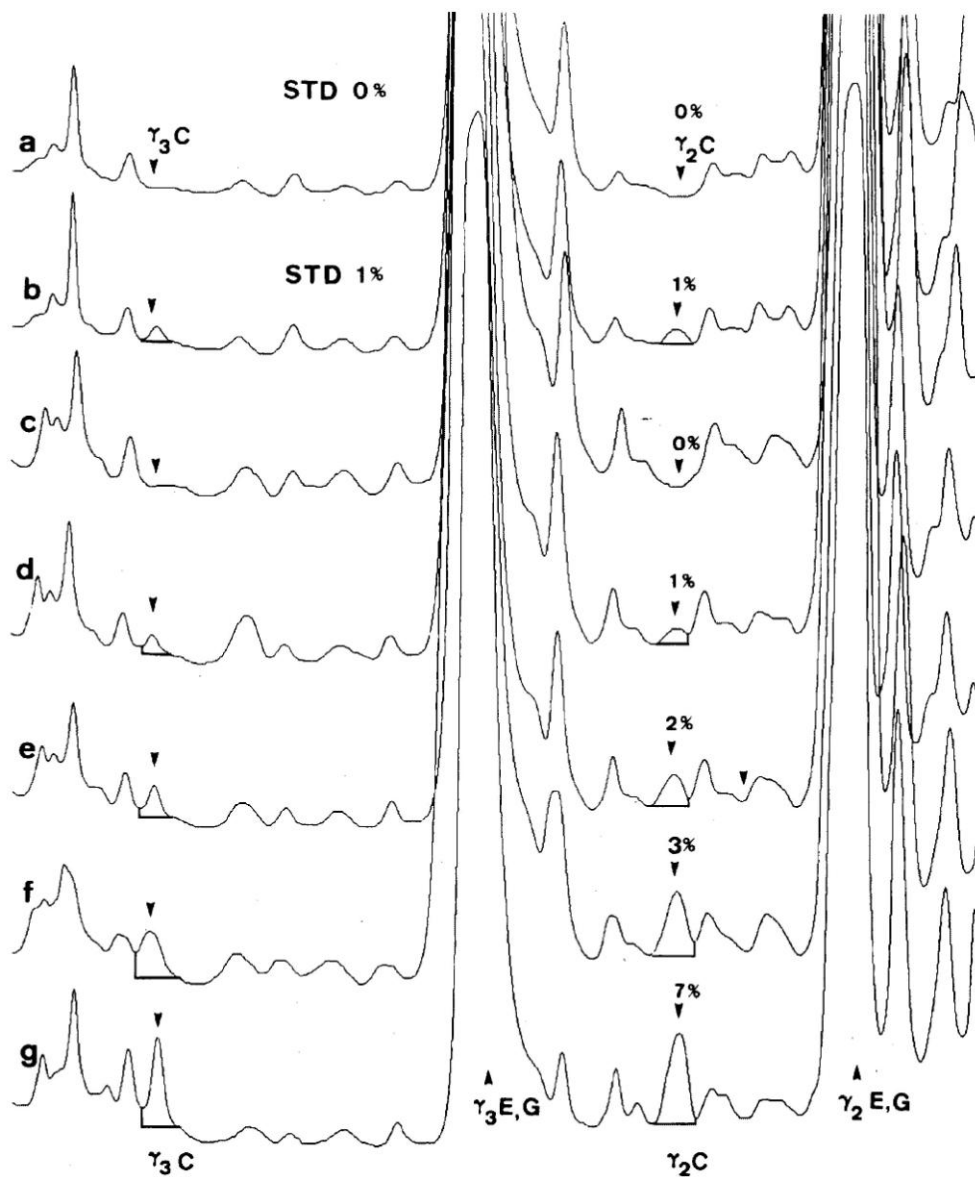
фигура 4а: Изо-електрическо фокусиране на третиран с плазма казеини от сирена, произведени от овче и козе мляко и съдържащи различни стойности на

овче мляко. % СМ= процент краве мляко, С = крава, Е = овца, G = коза. Показана е горната част на гел IEF.



фигура 4б: Изо-електрическо фокусиране на обработвани с плазма казеини от сирене, произведено от смеси от овче, козе и биволско мляко и съдържащо различни стойности на краве мляко.

% СМ= процент краве мляко; 1 + = проба, съдържаща 1% краве мляко и прибавен чист краве казеин в средата на прохода. С = крава, Е = овца, G = коза, В = бивол. Показано е общото разделяне на гела IEF.



фигура 5: Поредица денситограми на стандартните проби (STD) и пробите сирене, произведено от смес от овче и козе мляко, след изоелектрическо фокусиране.

а,б = стандарти, съдържащи 0 и 1% краве мляко; в-ж = проби сирене, съдържащи 0, 1, 2, 3 и 7% краве мляко. С = крава, Е = овца, G = коза.

Горната част на гела IEF бе сканирана при $\lambda = 634 \text{ nm}$.

ПРИЛОЖЕНИЕ XVI
(Член 11)

**РЕФЕРЕНТЕН МЕТОД ЗА ОТКРИВАНЕ НА ФОРМИ НА КОЛИ БАКТЕРИИ
В МАСЛО, ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ, КАЗЕИН И КАЗЕНАТИ**

За тестване наличието на форми на коли бактерии в масло, в средата на пробата се инокулират проби от 1 g масло.

Когато за наличието на форми на коли бактерии се тества обезмаслено мляко на прах или казеин/казенати, в средата на пробата се инокулират 0,1 g проби.

IDF стандарт 73A: 1985. Метод В се прилага със следните модификации:

1) приготвянето на пробите е съобразно IDF стандарт 122B:1992. За кисел казеин може да бъде използвана алтернативно процедурата за подготовка на проби, описана в IDF стандарт 73A:1985.

2) Инкубират се и се оценяват само реагентни стъкла, които са инокулирани с 1 g проби (масло), или съответно 0,1 g проби (обезмаслено мляко на прах, казеин/казенати). Не се извършва разреждане до десетичния знак.

Оценка на резултатите:

Три отрицателни резултата:	Изпълнено изискване
Три или три положителни резултата:	Неизпълнено изискване
Два отрицателни резултата:	Би следвало да бъдат анализирани допълнително две проби, като се претегля 1 g (масло) и 0,1 g (обезмаслено мляко на прах, казеин/казенати). Ако последните два резултата са отрицателни, изискването е изпълнено; в противен случай, изискването не е изпълнено.

Забележка:

Съдържание на форми на коли бактерии: 1/10 g за масло; 1/g за обезмаслено мляко на прах, казеин/казенати.

Резултатите, които показват, че изискването е изпълнено, са получени с вероятност от 93 %.

Съдържание на форми на коли бактерии: 1/g за масло; 1/0,1 g за обезмаслено мляко на прах или казеин/казенати средно.

Резултатите, които показват, че изискването не е изпълнено, са получени с вероятност от 91 %.

(Предположение: разпространение на инфекция)

ПРИЛОЖЕНИЕ XVII

(Член 12)

МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЛАКТОЗА В ПРОДУКТИ, КОИТО ПОПАДАТ В КОД ПО КН 2309 (1)

ЧАСТ I

1. Приложно поле

Методът би следвало да се прилага в случаите, в които съдържанието на лактоза надвишава 0,5 %.

2. Принцип

Захарта се разтваря във вода. Дрождите (*Saccharomyces cerevisiae*) се оставят да подействат; това ще запази лактозата. Чрез Luff-Schoorl-метода се определя съдържанието на лактоза в този разтвор, след избистрянето и филтрирането.

3. Реагенти

Натриев тиосулфат 0,1 N индикатор: разтвор на скорбяла. Добавя се смес от 5 g разтворима скорбяла (10 mg живачен йодид може да бъде добавен като консервиращ агент) и 30 ml вода към 1 литър кипяща вода; сместа се оставя да кипи три минути; оставя се да се охлади.

Разтвор на калиев йодид AR при 30% (w/v).

разтвор на сярна киселина 6 N

Luff-Schoorl-реагент:

а) 25 g меден II сулфат пентахидрат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), без съдържание на желязо, се разваря в 100 ml вода

б) 50 g монохидрат на лимонена киселина ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) се разтваря в 50 ml вода

в) 143,8 g безводен натриев карбонат (Na_2CO_3) се разтваря в около 300 ml гореща вода и се оставя да се охлади.

б) се добавя към (в), като се разклаща леко, след това се добавя (а). Допълва се до 1 литър, оставя се да престои през нощта и след това се филтрира. Проверява се нормалността на така получения реагент (Cu 0.1 N, Na_2CO_3 2 N). рН трябва да бъде приблизително 9.4.

Carrez I-разтвор: 23,8 g $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 3 g кристализирала оцетна киселина се разтварят във вода е се долива до 100 ml

Carrez II-разтвор: 10,6 g de $K_4F_2(CN)_6 \cdot 3H_2O$ се разтваря във вода и се долива до 100 ml

Зрънца от пемза, третирани при кипенето със солна киселина, измити с вода и изсушени.

Суспензия на *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g пресни дрожди в 100 ml вода (не се съхранява повече от една седмица в хладилник).

4. Процедура

1 g от пробата за анализ се претегля с точност до 1 mg; поставя се в измерителна колба от 100 ml. Добавя се от 25 до 30 ml вода. Колбата се поставя в кипяща водна баня за три минути, след което се охлажда приблизително при 35 °C.

Добавят се 5 ml от суспензията на дрождите ⁽²⁾ и се разклаща. Измерителната колба със съдържанието се оставя във водна баня при температура от 38 до 40 °C за два часа.

След ферментирането, колбата се охлажда до температура от приблизително 20 °C. Добавят се 2,5 ml Carrez I-разтвор и се разклаща за тридесет секунди; след това се добавят 2,5 ml Carrez II-разтвор и отново се разклаща за тридесет секунди. Допълва се до 100 ml с вода, смесва се и се филтрира. Капва се количество от филтрат, което е не повече от 25 ml и при възможност съдържа от 40 до 80 mg лактоза; ако е необходимо, се допълва до 25 ml с вода и Luff-Schoorl-метода се определя съдържанието на безводната лактоза.

Само с дрожди се извършва пълен празен тест.

⁽¹⁾ Регламент (ЕИО) № 222/88.

⁽²⁾ за продуктите, които съдържат повече от 40% ферментационна захар, количеството на суспензията се увеличава.

ЧАСТ II

1. Определяне на съдържанието на лактоза с Luff-Schoorl-метода

Капват се 25 ml Luff-Schoorl-реагент и се поставят в Erlenmeyer-колба от 300 ml; добавя се 25 ml избистрен разтвор, претеглен с точност.

Добавят се две зрънца пемза и се подгръва, като се разклаща с ръка над непокрит пламък от средна височина; течността се оставя да заври за приблизително две минути. Erlenmeyer-колбата се поставя веднага на метална цедка с азбестово сито, под която предварително е запален пламък. Регулира се така, че Erlenmeyer-колбата да се нагръва единствено в долната част; след това се свързва с кондензатор за отлив. От този момент се оставя да кипи точно за десет минути. Веднага се охлажда в студена вода и се тества приблизително за пет минути, както следва:

Към течността се добавят 10 ml калиев йодид и веднага след това, но внимателно

(тъй като може да възникне значително пенене), 25 ml сярна киселина 6 N.

Тестът с натриев тиосулфат се извършва до появяването на матов жълт цвят, като в края на теста се добавя индикатор за скорбяла.

Същият тест се извършва със смес от точно 25 ml реагент Luff-Schoorl и 25 ml вода, след добавянето на 10 ml калиев йодид и 25 ml сярна киселина 6 N, този път без кипене.

Със следната таблица се определя количеството лактоза в mg, отговарящо на разликата между резултатите от двата теста (изразено в ml натриев тиосулфат 0,1 N):

Таблица

Таблица за 25 ml Luff-Schoorl-реагент
(виж описанието в текста)

1. 0,1 n натриев тиосулфат
2. лактоза $C_{12}H_{22}O_{11}$

1	2	1	2		
ml	mg	разлика	ml	mg	разлика

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

ПРИЛОЖЕНИЕ XVIII

(Член 13)

ОТКРИВАНЕ НА СИРИЩНА СУРОВАТКА В ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ ЗА ОБЩЕСТВЕНО СКЛАДИРАНЕ ЧРЕЗ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА ГЛИКОМАКРОПЕПТИДИ ЧРЕЗ ВИСОКООПТИМАЛНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC)

1. Обхват и приложно поле

Този метод позволява откриването на сирищна суроватка в обезмаслено мляко на прах, предназначено за обществено складиране, чрез определянето на гликомакропептиди.

2. Позоваване

Международен стандарт ISO 707 — Мляко и млечни продукти — методи за вземане на проби в съответствие с указанията, съдържащи се в приложение I(2)(в), последен параграф.

3. Дефиниция

Съдържание на гликомакропептиди в обезмаслено мляко на прах: съдържание на субстанции, определено от метода, изложен по-долу, и изразено като процент от масата.

4. Принцип

— Промяна на състава на обезмасленото мляко на прах, отстраняване на мазнините и протеините с трихлор-оцетна киселина, последвано от центрофугиране;

— Определяне количеството гликомакропептиди (GMP) в супернатанта чрез високооптимална течна хроматография (HPLC);

— Оценка на получения резултат за пробите чрез позоваване на стандартните проби, съдържащи обезмаслено мляко на прах с или без прибавяне на известен процент суроватка на прах.

5. Реагенти

Всички реагенти трябва да са с доказано аналитично качество. Използваната вода трябва да е дестилирана или с най-малко същата чистота.

5.1. Разтвор на трихлор-оцетна киселина

240 g трихлор-оцетна киселина (Cl_3CCOOH) се разтварят във вода и се долива до 1 000 ml

5.2. Елюентен разтвор, pH 6,0

1,74 g Di-калиев фосфат (K_2HPO_4), 12,37 g Моно-калиев фосфат (KH_2PO_4) и 21,41 g натриев сулфат (Na_2SO_4) се разтварят в около 700 ml вода. Регулира се, ако е необходимо, до pH 6,0, като се използва разтвор на фосфорна киселина или калиев хидроксид.

Долива се до 1 000 ml с вода и се хомогенизира.

Елюентният разтвор се филтрира, преди да се използва, чрез мембранен филтър с 0,45 µm диаметър на пората.

5.3. Промиващ разтворител

Един обем ацетонитрил (CH₃CN) се смесва с девет обема вода. Преди да се използва, сместа се филтрира чрез мембранен филтър с 0,45 µm диаметър на пората.

Бележка: Може да бъде използван всеки друг промиващ разтворител с бактерициден ефект, който не уврежда ефективността на разтварянето в колоната.

5.4. Стандартни проби

5.4.1. Обезмаслено мляко на прах, което изпълнява изискванията на това разтваряне (т.е. [0]).

5.4.2. Същото обезмаслено мляко на прах, подправено с 5% (m/m) сирищна суроватка на прах със стандартен състав (т.е. [5]).

6. Апаратура

6.1. Аналитична везна.

6.2. Центрофуга, с капацитет за центрофугиране на 2 200 g, снабдена със стопорни центрофужни туби с капацитет от около 25 ml

6.3. Механичен шейкър.

6.4. Магнитна бъркалка.

6.5. Стъклени фунии, с диаметър от около 7 см.

6.6. Филтърна хартия, средно филтриране, с диаметър около 12,5 см.

6.7. Оборудване за филтриране през стъкло с 0,45 µm диаметър на пората на мембранныя филтър.

6.8. Градуирани капкомери, с обем от 10 ml (ISO 648, клас А, или ISO/R 835).

6.9. Термостатична водна баня, при 25 ± 0,5 °C.

6.10. Оборудване за HPLC, състоящо се от:

6.10.1. Помпа.

6.10.2. Инжектор, ръчен или автоматичен, с капацитет от 15 до 30 μ l.

6.10.3. Две колони TSK 2 000-SW в серии (дължина 30 см., вътрешен диаметър 0,75 см.) или еквивалентни колони и пред-колона (3 см. \times 0,3 см.), обвита с I 125 или материал с еквивалентна ефективност.

6.10.4. Термостатична колонна пещ, при 35 ± 1 °C.

6.10.5. UV детектор с променлива дължина на вълните, позволяващ измервания при 205 nm, с чувствителност от 0,008 A.

6.10.6. Интегратор, с възможност за „valley-to-valley” интеграция.

Бележка: Възможно е да се работи с колони, които се държат на стайна температура, но тяхната ефективност на разтваряне е малко по-ниска. В този случай, при една и съща аналитична серия температурата би следвало да варира с по-малко от ± 5 °C.

7. Вземане на проби

7.1. Международен стандарт ISO 707 — „Мляко и млечни продукти — методи на вземане на проби” в съответствие с указанията, съдържащи се в приложение I, част 2 буква в), последен параграф.

7.2. Пробата се съхранява при условия, които изключват всякакво увреждане или промяна на състава.

8. Процедура

8.1. Подготовка на тестовата проба

Млякото на прах се прехвърля в съд, снабден с уплътнен капак и имащ вместимост, която е около два пъти обема на праха. Съдът се затваря веднага. Млякото на прах се смесва добре чрез многократна инверсия на съда.

8.2. Тестова доза

2,000 + 0,001 g от тестовата проба се измерват в центрофужна туба (6.2).

8.3. Отстраняване на протеини

8.3.1. Към тестовата доза се прибавят 20 g топла вода (50 °C). Прахът се разтваря чрез разклащане за пет минути при използването на механичен шейкър (6.3). Тубата се охлажда до 25 °C.

8.3.2. 10,0 ml разтвор на трихлор-оцетна киселина (5.1) се добавят за две минути, като в същото време се бърка с помощта на магнитната бъркалка (6.4). Тубата се поставя във водна баня (6.9) и се оставя за 60 минути.

8.3.3. Пробата се центрофугира при 2 200 g (6.2) за 10 минути или се филтрира през хартия (6.6), като се отстраняват първите 5 ml от филтратата.

8.4. Хроматографско определяне

8.4.1. От 15 до 30 μ l точно измерен супернатант или филтрат (8.3.3) се инжектира в апарата HPLC (6.10), опериращ със струя от 1,0 ml елюентен разтвор (5.2) на минута.

Бележки:

1. По време на хроматографския анализ, елюентният разтвор (5.2) се съхранява при 85 °C, с оглед елюентът да се държи дегазиран и да се предотврати развитието на бактерии. Могат да бъдат използвани всякакви предварителни мерки, които имат подобен ефект.

2. Колоните се изплакват с вода при всяко прекъсване. Елюентният разтвор (5.2) никога не се оставя в тях.

Преди всяко прекъсване за повече от 24 часа, колоните се изплакват свода, след това се измиват с разтвор (5.3) за поне три часа при струя от 0,2 ml за минута.

8.4.2. Резултатите от хроматографския анализ на тестовата проба [E] се получават под формата на хроматограма, в която всеки пик е показан чрез времето му на запазване RT, както следва:

Пик II: вторият пик на хроматограмата с RT от около 12,5 минути.

Пик III: третият пик на хроматограмата, съответстващ на GMP, с RT от $15,5 \pm 1,0$ минути.

Пик IV: четвъртият пик на хроматограмата с RT от около 17,5 минути.

Качеството на колоните може да повлияе на времената на запазване на отделните пикове.

Интеграторът (6.10.6) автоматично изчислява повърхността A на всеки пик:

A II: повърхност на пик II,

A III: повърхност на пик III,

A IV: повърхност на пик IV.

Съществено е да се изследва появянето на всяка хроматограма преди количественото тълкуване, с оглед да се открият всякакви отклонения, които се дължат или на неправилното функциониране на апаратурата или на колоните, или на произхода и естеството на анализираната проба.

Ако има съмнение, анализът се повтаря.

8.5. Калибриране

8.5.1. Процедурата, описана в точки 8.2 - 8.4.2, се прилага с точност за стандартните проби (5.4).

Използват се прясно приготвени разтвори, тъй като GMP се унищожава в 8 %-на трихлор-оцетна- среда. Загубата се оценява на 0,2% за час при 30 °С.

8.5.2. Преди хроматографското определяне на пробите, колоните се подготвят чрез многократно инжектиране на стандартната проба (5.4.2) в разтвора (8.5.1), докато повърхността и времето на запазване на пика, съответстващ на GMP, станат постоянни.

8.5.3. Определят се коефициентите на влияние R чрез инжектирането на същия обем филтрата (8.5.1), използвани за пробите.

9. Изразяване на резултатите

9.1. Метод на изчисляване и формула

9.1.1. Изчисляване на коефициентите на влияние R:

пик II:

$$R_{II} = \frac{100}{A_{II}[0]}$$

пик IV:

$$R_{IV} = \frac{100}{A_{IV}[0]}$$

където:

R II и R IV = коефициентите на влияние, съответно на пикове II и IV,
A II [0] и A IV = повърхностите, съответно на пикове II и IV на стандартната проба [0], получена в 8.5.3.

пик III:

$$R_{III} = \frac{W}{A_{III}[5] - A_{III}[0]}$$

където:

R III = коефициентът на влияние на пик III,
A_{III} [0] и A_{III} [5] = повърхностите на пик III на стандартните проби [0] и [5],
съответно получени в 8.5.3,
W = количеството суроватка в стандартната проба [5], т.е. 5.

9.1.2. Изчисляване на относителната повърхност на пиковите на пробата [E]:

където:

$S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E]$ = относителните повърхности, съответно на пикове II, III и IV на пробата [E],

$A_{II} [E], A_{III} [E], A_{IV} [E]$ = повърхностите, съответно на пикове II, III и IV на пробата [E], получена в 4.2,

R_{II}, R_{III}, R_{IV} = коефициентите на влияние, изчислени в 9.1.1.

9.1.3. Изчисляване на относителното време на запазване на пик III на проба [E]:

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

където:

$RRT_{III} [E]$ = относителното време на запазване на пик III на проба [E],

$RT_{III} [E]$ = относителното време на запазване на пик III на проба [E], получена в 8.4.2,

$RT_{III} [5]$ = относителното време на запазване на пик III на контролната проба [5], получена в 8.5.3.

9.1.4. Експериментите показаха, че има линейна връзка между относителното време на запазване на пик III, т.е. $RRT_{III} [E]$ и процента на суроватка на прах, прибавена до 10 %:

— $RRT_{III} [E] < 1,000$, когато съдържанието на суроватка $e > 5\%$;

— $RRT_{III} [E] \geq 1,000$, когато съдържанието на суроватка $e \leq 5\%$.

Допустимата несигурност за стойностите на $RRT_{III} e \pm 0,002$.

Обичайно, стойността на $RRT_{III} [0]$ се отклонява малко от 1,034. В зависимост от състоянието на колоните, стойността може да достигне 1,000, но трябва винаги да бъде по-голяма.

9.2. Изчисляване на процента на сирична суроватка на прах в пробата:

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

където:

W = процентът m/m на сирична суроватка в пробата [E];
 $S_{III} [E]$ = относителната повърхност на пик III на тестовата проба [E], получена както в 9.1.2;

1,3 представлява относителната средна повърхност на пик III, изразена в грамове сирищна суроватка за 100 г., определена в неподправено обезмаслено мляко на прах от различен произход. Тази цифра бе получена експериментално; $S_{III} [0]$ представлява относителната повърхност на пик III, която е равна на $R_{III} \times A_{III} [0]$. Тези стойности са получени в 9.1.1 и съответно 8.5.3; $(S_{III} [0] - 0,9)$ представлява корекцията, която следва да бъде направена спрямо относителната средна повърхност 1,3, когато $S_{III} [0]$ не е равно на 0,9. По пътя на експеримента, относителната средна повърхност на пик III на контролната проба [0] е 0,9.

9.3. Точност на процедурата

9.3.1. Повторяемост

Разликата между резултатите от две отделни определяния, извършени едновременно или едно след друго от същия анализатор и при използване на същата апаратура върху идентичен тестов материал, не надвишава 0,2% m/m.

9.3.2. Възпроизвеждане

Разликата между два отделни и независими резултата, получени в две различни лаборатории върху идентичен тестов материал, не надвишава 0,4% m/m.

9.4. Тълкуване

9.4.1. Липсата на суроватка се приема, ако относителната повърхност на пик III, $S_{III} [E]$, изразена в грамове сирищна суроватка за 100 g продукт, е $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$, където:

2,0 е максимално допустимата стойност за относителната повърхност на пик III, т.е. 1,3, като се вземе предвид несигурността, която се дължи на вариациите в състава на обезмасленото мляко на прах, както и сравнението на метода (9.3.2), $(S_{III} [0] - 0,9)$ е корекцията, която следва да бъде направена, когато повърхността $S_{III} [0]$ е различна от 0,9 (виж 9.2).

9.4.2. Ако относителната повърхност на пик III, $S_{III} [E]$, е $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ и относителната повърхност на пик II, $S_{II} [E]$, ≤ 160 , съдържанието на сирищна суроватка се определя, както е посочено в точка 9.2.

9.4.3. Ако относителната повърхност на пик III, $S_{III} [E]$, е $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ и ако относителната повърхност на пик II, $S_{II} [E]$, ≤ 160 , се определя общото съдържание на протеин (P %); след това се изследват графики 1 и 2.

9.4.3.1. Данните, получени след анализа на пробите на неподправено обезмаслено мляко на прах с високо общо съдържание на протеин, са събрани в графики 1 и 2.

Непрекъснатата линия представлява линейна регресия, коефициентите на която са изчислени чрез метода на най-малките квадрати.

Пунктираната права линия определя горната граница на сравнителната повърхност на пик III с вероятност, която не се надвишава в 90% от случаите.

Уравненията на пунктираните прави линии на графики 1 и 2 са:

$$S_{III} = 0,376 P\% - 10,7 \text{ (графика 1),}$$

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

където:

S_{III} е относителната повърхност на пик III, изчислена съобразно общото съдържание на протеин или съобразно относителната повърхност на пик $S_{II} [E]$,

$P\%$ е общото тегловно съдържание протеин, изразено като процент,

$S_{II} [E]$ е относителната повърхност на пробата, изчислена в точка 9.1.2.

Тези уравнения са еквивалентни по стойност на 1,3, упомената в точка 9.2.

Разликата (T_1 and T_2) между относителната повърхност $S_{III} [E]$ и относителната повърхност S_{II} се дава посредством следното:

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

$$T_2 = S_{III} [E] - [(0,0123 S_{II} [E] + 0,93) + (S_{II} [0] - 0,9)]$$

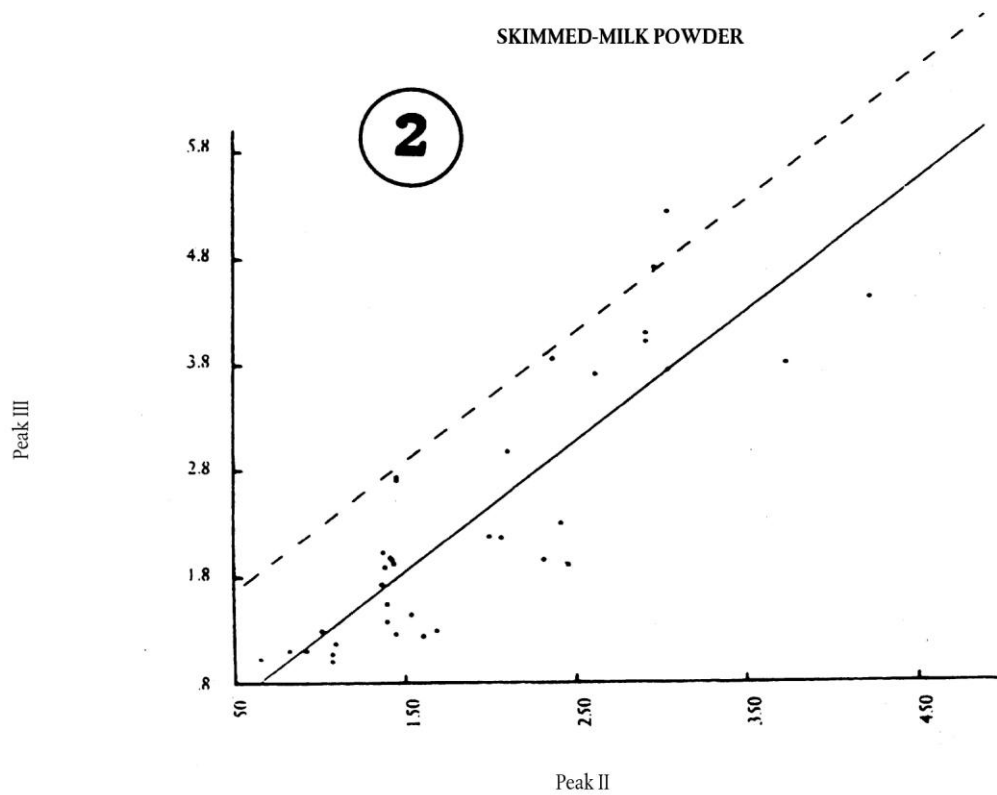
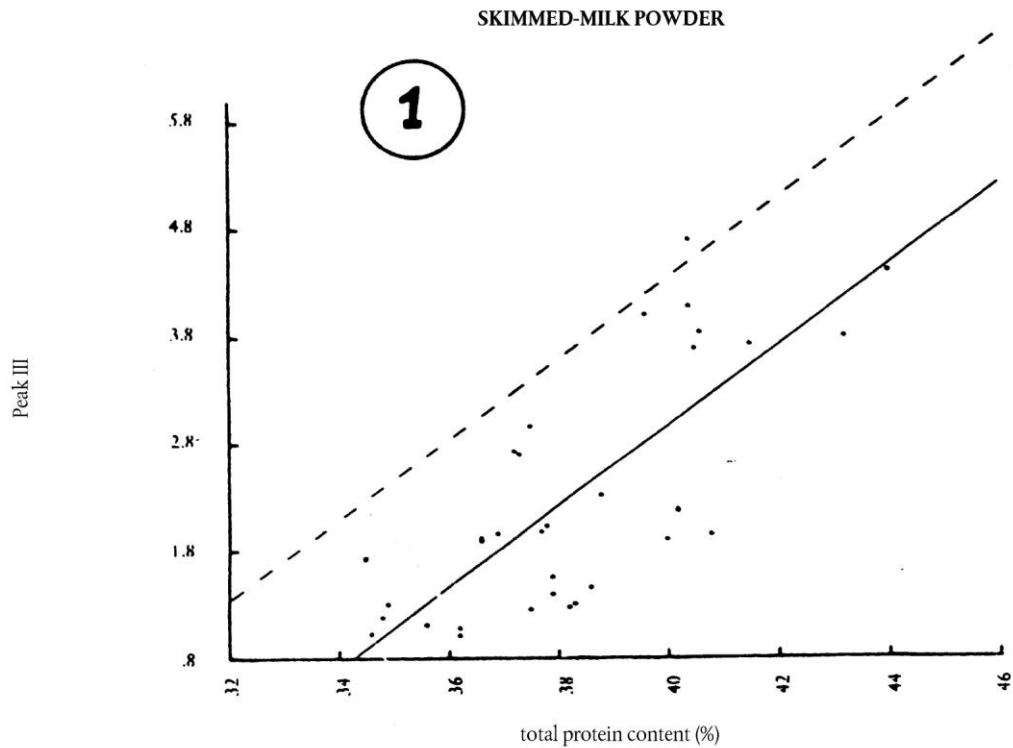
9.4.3.2. Ако T_1 и/или T_2 са нула или по-малко, не може да бъде определено присъствието на сирищна суроватка.

Ако T_1 и T_2 са по-големи от нула, то налице е сирищна суроватка.

Съдържанието на сирищна суроватка се изчислява съобразно следната формула:

където:

0,91 е разстоянието между непрекъснатата и пунктираната права линия на вертикалната ос.



Б. пр.: skimmed-milk powder: обезмаслено мляко на прах
 Total protein content: общо съдържание на протеини

ПРИЛОЖЕНИЕ XIX
(Член 13)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУХО ВЕЩЕСТВО НА СИРИЩНА СУРОВАТКА В ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ И В СМЕСИТЕ, НАЗОВАНИ В РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 2799/1999

1. **Цел:** откриване прибавянето на сухо вещество от сирищна суроватка към:
(а) обезмаслено мляко на прах, дефинирано в член 2 на Регламент (ЕО) № 2799/1999, и
(б) смеси, дефинирани в член 4 на Регламент (ЕО) № 2799/1999.

2. **Позовавания:** Международен стандарт ISO 707

3. **Дефиниция**

Съдържанието на сухо вещество на сирищна суроватка се дефинира като процент от масата, както е определено в описаната процедура.

4. **Принцип**

Съдържанието на гликомакропептиди се определя в съответствие с приложение XVIII. Пробите, които дават положителни резултати, се анализират за гликомакропептид А с високооптимална течна хроматограма с обратни фази (HPLC процедура). Оценката на резултата се получава чрез позоваване на стандартни проби, съдържащи обезмаслено мляко на прах с или без известен процент суроватка на прах. Резултатите, които са по-високи от 1% (m/m), показват наличието на сухо вещество на сирищна суроватка.

5. **Реагенти**

Всички реагенти трябва да са с доказано аналитично качество. Използваната вода трябва да е дестилирана или да е с най-малко същата чистота.

Ацетонитрилът би следвало да бъде със спектроскопично качество или с HPLC-качество.

Необходимите за процедурата реагенти са описани в приложение XVIII към настоящия регламент.

Реагенти за HPLC с обратни фази.

5.1. Разтвор на трихлор-оцетна киселина

240 g трихлор-оцетна киселина (Cl_3CCOOH) се разтварят във вода и се долива до 1 000 ml

5.2. Елюенти А и В

Елюент А: 150 ml ацетонитрил (CH_3CN), 20 ml изопропанол ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), и 1,00 ml трифлуор-ацетна киселина (TFA, CF_3COOH) се поставят в 1 000 ml

измерителна колба. Долива се до 1 000 ml с вода.

Елюент В: 550 ml ацетонитрил, 20 ml изопропанол и 1,00 ml TFA се поставят в 1 000 ml измерителна колба. Долива се до 1 000 ml с вода.

Елюентният разтвор се филтрира, преди да се използва, чрез мембранен филтър с 0,45 µm диаметър на пората.

5.3. Консервиране на колоната

След анализа, колоната се облива с елюент В (чрез градиент) и впоследствие се облива с ацетонитрил (чрез градиент за 30 минути). Колоната се оставя в ацетонитрила.

5.4. Стандартни проби

5.4.1. Обезмаслено мляко на прах, което изпълнява изискванията за обществено складиране (т. е. (0)).

5.4.2. Същото обезмаслено мляко на прах, подправено с 5% (m/m) сирищна суроватка на прах със стандартен състав (т.е. (5)).

5.4.3. Същото обезмаслено мляко на прах, подправено с 50% (m/m) сирищна суроватка на прах със стандартен състав (т.е. (50)) (1).

6. Апаратура

Необходимата апаратура за описаната процедура е дадена в приложение XVIII към настоящия регламент.

6.1. Аналитична везна.

6.2. Центрофуга, с капацитет за центрофугиране при 2 200 g, снабдена със стопорни центрофужни туби с капацитет от около 50 ml

6.3. Механичен шейкър с възможност за бъркане при 50 °C.

6.4. Магнитна бъркалка.

6.5. Стъклени фунии, с диаметър от около 7 см.

6.6. Филтърна хартия, средно филтриране, с диаметър около 12,5 см.

6.7. Оборудване за филтриране през стъкло с 0,45 µm диаметър на пората на мембранныя филтър.

6.8. Градуирани капкомери, с обем от 10 ml (ISO 648, клас А, или ISO/R 835) или система с вместимост от 10,0 ml за две минути.

6.9. Термостатична водна баня при $25 \pm 0,5$ °C.

6.10. Оборудване за HPLC, състоящо се от:

6.10.1. Двойно градуирана помпена система.

6.10.2. Инжектор, ръчен или автоматичен, с капацитет от 100 μ l.

6.10.3. Dupont Protein Plus-колона (дължина 25 см., с вътрешен диаметър от 0,46 см.) или еквивалентна широко-пореста кварцова колона с обратни фази.

6.10.4. Термостатична колонна пещ при 35 ± 1 °C.

6.10.5. UV детектор с променлива дължина на вълните, позволяващ измервания при 210 nm (ако е необходимо, може да бъде използвана по-голяма дължина на вълните до 220 nm), с чувствителност от 0,02 A.

6.10.6. Интегратор, с възможност за „valley-to-valley” интеграция.

(1) Сирищната суроватка на прах със стандартен състав и подправеното обезмаслено мляко на прах са налични от NIZO, Kernhemseweg 2, п.к. 20 — NL-6710 BA Ede. Също така, могат да бъдат използвани прахове, които дават еквивалентни резултати на праховете на NIZO.

Бележка: Функционирането на колоната на стайна температура е възможно, при условие че стайната температура не се отклонява повече от 1 °C, в противен случай се получава прекалено голямо вариране във времето на запазване на GMP_A.

7. Вземане на проби

7.1. Пробите трябва да се вземат в съответствие с процедурата, установена в международен стандарт ISO 707. Държавите-членки, обаче, могат да използват друг метод за вземане на проби, при условие че той е в съответствие с принципите на гореупоменатия стандарт.

7.2. Пробата се съхранява при условия, които изключват всякакво увреждане или промяна на състава.

8. Процедура

8.1. Подготовка на тестовата проба

Млякото на прах се прехвърля в съд, снабден с уплътнен капак и с вместимост, която е около два пъти обема на праха. Съдът се затваря веднага. Млякото на прах се смесва добре чрез многократна инверсия на съда.

8.2. Тестова доза

2,00 ± 0,001 g от тестовата проба се измерват в центрофужна туба (6.2) или подходяща уплътнена колба (50 ml).

8.3. Отстраняване на мазнини и протеини

8.3.1. 20 g топла вода (50 °C) се добавят към тестовата доза. Прахът се разтваря чрез разклащане за пет минути или 30 минути- в случай на кисела мътеница, при използване на механичен шейкър (6.3). Съдът се поставя във водна баня (6.9) и се оставя да се регулира до 25 °C.

8.3.2. 10,0 ml разтвор на трихлор-оцетна киселина се добавят при 25 °C (5.1) за две непрекъснати минути, като в същото време се бърка с помощта на магнитната бъркалка (6.4). Съдът се поставя във водна баня (6.9) и се оставя за 60 минути.

8.3.3. Пробата се центрофугира при 2 200 g (6.2) за 10 минути или се филтрира през хартия (6.6), като се отстраняват първите 5 ml от филтратата.

8.4. Хроматографско определяне

8.4.1. Извършва се HPLC-анализ, както е описан в приложение XVIII. Ако е получен отрицателен резултат, анализиранията проба не съдържа сухо вещество на сирична суроватка, което може да се открие. Ако резултатът е положителен, се прилага HPLC-процедура с обратни фази, както е описана по-долу. Наличието на кисела мътеница на прах може да не причини фалшиви положителни резултати. HPLC-методът с обратни фази изключва тази възможност.

8.4.2. Преди извършването на HPLC-анализа с обратни фази, условията на градиента би следвало да бъдат оптимизирани. Времето на запазване от 26 ± 2 минути за GMP_A е оптимално за системите на градиента с обем на работа от около 6 ml (обем от точката, в която разреждателите се събират с обема на пръстена на инжектора, включително). Системите на градиент с по-малък обем на работа (напр. 2 ml) би следвало да използват 22 минути като оптимално време за запазване.

Вземат се разтвори на стандартни проби (5.4) и на стандартни проби с 50% сирична суроватка.

100 µl супернатант или филтрат (8.3.3) се инжектират в HPLC-апаратурата, която функционира при условията на градиента, дадени в таблица 1.

Таблица 1

Условия на градиента за оптимизиране на хроматографията

Време (минути)	Струя (ml/минути)	% A	% B	крива
Начало	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

При сравняването на двете хроматограми би следвало да се открие местонахождението на пика на GMP_A .

Чрез използване на формулата, дадена по-долу, може да бъде изчислен първоначалният състав на разредителя, който ще се използва за нормалния градиент (виж 8.4.3):

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

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

където:

RT_{GMP_A} : времето за запазване на GMP_A в тестовия градиент,

10: първоначалният % B на тестовия градиент

2,5: % B на половината време минус % B първоначално в нормалния градиент

13,5: половината време на тестовия градиент

26: изисквано време за запазване на GMP_A

6: съотношение на наклоните на тестовия и нормалния градиент

30: % B първоначално минус % B при 27 минути в тестовия градиент

27: време на тестовия градиент.

8.4.3. Анализ на разтвори на тестови проби

100 μ l точно измерен супернатант или филтрат (8.3.3) се инжектира в апаратура HPLC, функционираща при струя от 1,0 ml елюентен разтвор (5.2) за минута.

Съставът на елюента в началото на анализа се получава съгласно 8.4.2. Той обичайно е близко до A:B = 76:24 (5.2). Непосредствено се стартира инжектирането на линеарен градиент, което резултира в 5% по-висок процент на B след 27 минути. Впоследствие се стартира линеарен градиент, с който съставът на елюента става 90% B за пет минути. Този състав се поддържа за пет минути, след което съставът се променя чрез линеарен градиент за пет минути към първоначалния състав. В зависимост от вътрешния обем на помпената система, следващото инжектиране може да бъде направено 15 минути след постигането на първоначалните условия.

Бележки:

1. Времето за запазване на гликомакропептида би следвало да бъде $26 \pm$ две

минути. Това може да бъде постигнато чрез вариране на първоначалните и крайните условия на първия градиент. Разликата, обаче, в % В за първоначалните и крайните условия на първия градиент, трябва да остане 5% В.

2. Елюентите би следвало да бъдат дегазирани в достатъчна степен и да се запазят такива. Това е съществено за надлежното функциониране на помпената система на градиента. Стандартното отклонение на времето за запазване на пика GMP би следвало да бъде по-малко от 0,1 минути ($n = 10$).

3. Всеки пет проби на референтната проба (5) би следвало да бъдат инжектирани и използвани за изчисляването на нов коефициент на влияние R. (9.1.1).

8.4.4. Резултатите от хроматографския анализ на тестовата проба (E) се получават под формата на хроматограма, в която пикът GMP се идентифицира чрез времето запазване от около 26 минути.

Интеграторът (6.40.6) автоматично изчислява височината H на пика GMP. Във всяка хроматограма би следвало да бъде проверявано основното местоположение. Анализът или интеграцията би следвало да бъдат повторени, ако основното местоположение е било определено неправилно.

Съществено е да се изследва появяването на всяка хроматограма преди количественото тълкуване, с оглед да се открият всякакви отклонения, които се дължат или на неправилното функциониране на апаратурата или на колоната, или на произхода и естеството на анализираната проба. Ако има съмнение, анализът се повтаря.

8.5. Калибриране

8.5.1. Процедурата, описана в точки 8.2 - 8.4.4, се прилага с точност за стандартните проби (от 5.4.1 до 5.4.2).

Използват се прясно приготвени разтвори, тъй като GMP се унищожава в 8 %-на трихлор-оцетна среда на стайна температура. При 4 °C разтворът остава стабилен за 24 часа. В случай на дълги аналитични серии, е желателно в автоматичния инжектор да се използва корито с охладена проба.

Бележка: Точка 8.4.2. може да бъде пропусната, ако % В при първоначалните условия е известен от предходни анализи.

Хроматограмата на референтната проба (5) би следвало да бъде аналогична на фигура 1. В тази фигура, пикът GMP_A се предшества от два малки пика. Важно е да се получи подобно отделяне.

8.5.2. Преди хроматографското определяне на пробите, се инжектира 100 µl стандартна проба без сирищна суроватка (0) (5.4.1).

Хроматограмата не би следвало да показва пик във времето за запазване на пика GMP_A.

8.5.3. Коефициентите на влияние R се определят чрез инжектиране на същия обем

филтрати (8.5.1), използвани за пробите.

9. Изразяване на резултатите

9.1. Метод за изчисляване и формула

9.1.1. Изчисляване на коефициента на влияние R:

пик GMP: $R = W/H$

където:

R = коефициент на влияние на пика GMP

H = височина на пика GMP

W = количеството суроватка в стандартната проба (5).

9.2. Изчисляване на процента на сиришна суроватка на прах в пробата:

$W(E) = R \times H(E)$

където:

W(E) = процент (m/m) сиришна суроватка в пробата (E).

R = коефициент на влияние на пика GMP (9.1.1)

H(E) = височината на пика GMP на пробата (E)

Ако W(E) е по-голямо от 1% и разликата между времето за запазване и това на стандартната проба (5) е по-малка от 0,2 минути, то тогава е налице сухо вещество на сиришна суроватка.

9.3. Точност на процедурата

9.3.1. Повторяемост

Разликата от резултатите на две определяния, извършени едновременно или последователно едно след друго от един и същ анализатор и при използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не надвишава 0,2% m/m.

9.3.2. Възпроизвеждане

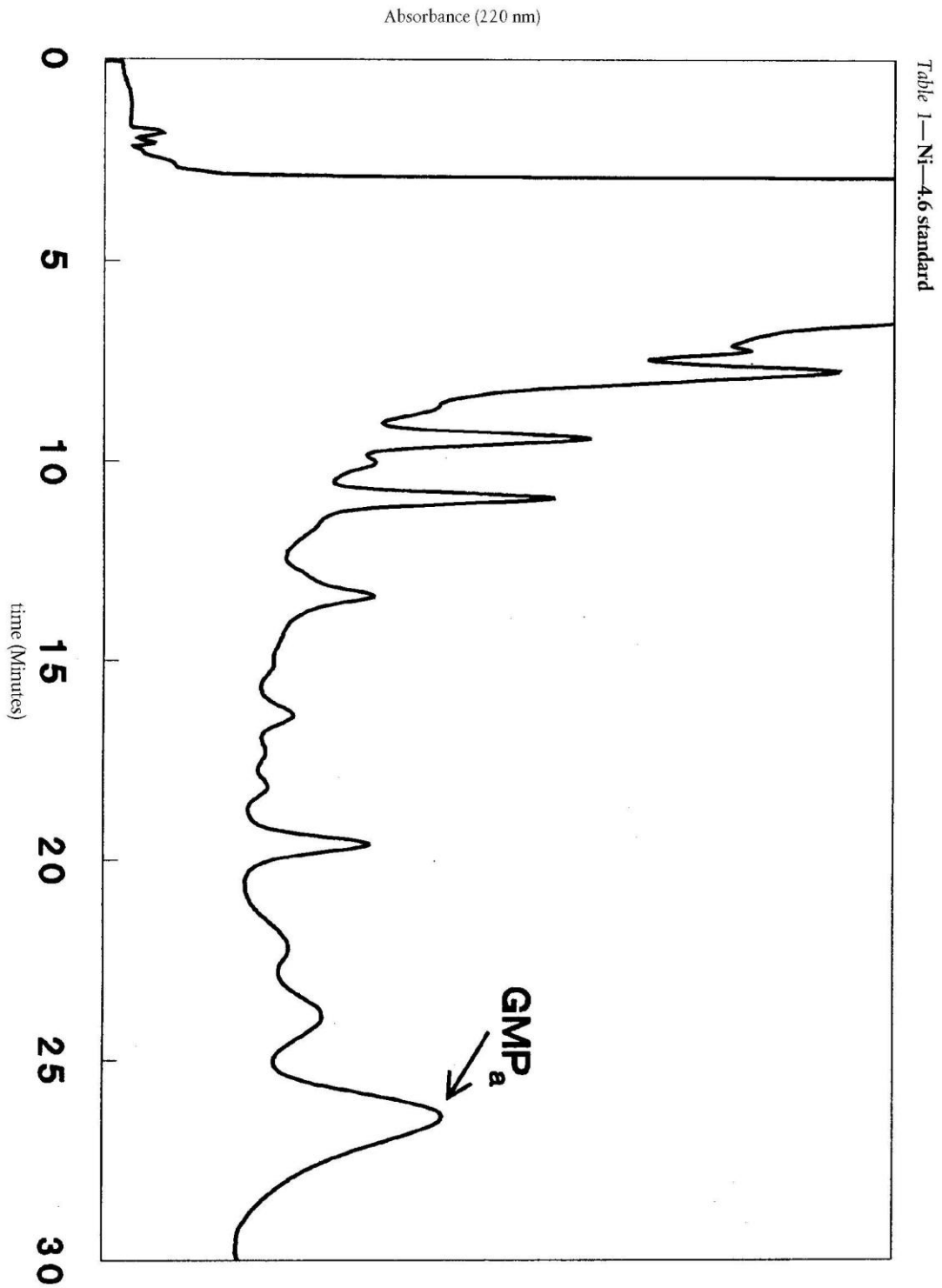
Все още не е определено.

9.3.3. Линеарност

При 0 до 16% сиришна суроватка би следвало да се получи линейна връзка с коефициент на корелация $> 0,99$.

9.4. Тълкуване

9.4.1. Счита се, че суроватка е налице, ако резултатът, получен в точка 9.2, е по-висок от 1% m/m и времето за запазване на пика GMP се различава с по-малко от 0,2 минути от това на стандартната проба (5). Границата от 1% се определя в съответствие с разпоредбите на точки 9.2 и 9.4.1 на приложение V към Регламент (ЕИО) № 625/78.



Б. пр.: Таблица 1-Ni-4.6 стандарт
Absorbance: абсорбция

ПРИЛОЖЕНИЕ XX
(Член 14)

**ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ: КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА
ФОСФАТИДИЛСЕРИН И ФОСФАДИЛЕТАНОЛАМИН
HPLC-метод с обърнати фази**

1. Цел и приложно поле

Методът описва процедура за количествено определяне на фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилетаноламин (PE) в обезмаслено мляко на прах (SMP) и е подходящ за откриване на сухо вещество на мътеница в SMP.

2. Дефиниция

PS +PE съдържание: фракция маса на определената субстанция чрез използване на определената процедура. Резултатът е изразен като милиграма фосфатидилетаноламин дипалмитол (PEDP) за 100 g прах.

3. Принцип

Екстракт на аминокфосфолипиди с метанол от мляко на прах с променен състав. Определяне на PS и PE като о-фталдиалдехид (OPA) производни чрез HPLC с обратни фази и флуоресцентно откриване. Определяне на количеството на съдържанието на PS и PE в тестовата проба чрез позоваване на стандартна проба, съдържаща познато количество PEDP.

4. Реагенти

Всички реагенти трябва да бъдат с признато аналитично качество. Водата трябва да е дестилирана или с най-малко еквивалентна чистота, ако не е определено друго.

4.1. Стандартен материал: PEDP, най-малко 99% чисто съдържание

Бележка: Стандартният материал трябва да бъде съхраняван при – 18 °С.

4.2. Реагенти за стандартна проба и подготовка на тестовата проба

4.2.1. Метанол за HPLC

4.2.2. Хлороформ за HPLC

4.2.3. Триптамин-монохидрохлорид

4.3. Реагенти за о-фталдиалдехид дериватизация

4.3.1. Натриев хидроксид, 12 М-воден разтвор

4.3.2. Борна киселина, 0,4 М-воден разтвор, регулиран до рН 10,0 с натриев хидроксид (4.3.1)

4.3.3. 2-меркаптоетанол

4.3.4. о-фталдиалдеhid (OPA)

4.4. HPLC-отмиващи разредители

Отмиващите разредители трябва да бъдат приготвени чрез използване на реагенти за HPLC.

4.4.1. Вода за HPLC

4.4.2. Метанол с флуориметрична тествана хомогенност

4.4.3. Тетрахидрофуран

4.4.4. Натриев дихидроген фосфат

4.4.5. Натриев ацетат

4.4.6. Оцетна киселина

5. Апаратура

5.1. Аналитична везна

5.2. Бехерови чаши с обем от 25 и 100 ml

5.3. Капкомери с обем от 1 и 10 ml

5.4. Магнитна бъркалка

5.5. Градуирани капкомери с обем от 0,2, 0,5 и 5 ml

5.6. Измерителни колби с обем от 10, 50 и 100 ml

5.7. Спринцовки с обем от 20 и 100 μ l

5.8. Ултразвукова баня

5.9. Центрофуга, функционираща при 27 000 \times g

5.10. Огледални стъкла с обем от около 5 ml

5.11. Градуиран цилиндър с обем от 25 ml

5.12. pH-метър

5.13. Оборудване за HPLC

5.13.1. Градиентна помпена система, с възможност да функционира при 1,0 ml/min при 200 bar

5.13.2. Автоматичен уред за вземане на проби с възможност за дериватизация

5.13.3. Подгревател за колони, поставен при 30 °C

5.13.4. Флуоресцентен детектор, поставен при 330 nm електризация на дължината на вълната и 440 nm емисия на дължината на вълната

5.13.5. Интегратор или софтуер за обработка на данни, с възможност за измерване на пиковите повърхности

5.13.6. Lichrosphere-колона — 100 (250 × 4,6 mm.) или еквивалентна колона, обвита с октадецилсилан (C 18), с размер на частиците от 5 µm

6. Вземане на проби

Вземането на проби трябва да се извършва в съответствие с IDF стандарт 50B:1985.

7. Процедура

7.1. Приготвяне на вътрешния стандартен разтвор

30,0 ± 0,1 mg триптамин-моноклорхидрат (4.2.3) се претегля в 100 ml измерителна колба (5.6) и се долива до маркировката с метанол (4.2.1). Капва се 1 ml (5.3) от този разтвор в 10 ml измерителна колба (5.6) и се долива до маркировката с метанол (4.2.1), с оглед да се получи 0,15 mM триптаминоз концентрат.

7.2. Подготовка на тестовия разтвор

1,000 ± 0,001 g на SMP-пробата се измерва в 25 ml бехерова чаша (5.2). Добавя се 10 ml дестилирана вода при 40 °C с капкомер (5.3) и се разбърква с магнитна бъркалка (5.4) за 30 минути, за да се разтворят всички бучки. От млякото с променен състав се капват 0,2 ml (5.5) в 10 ml измерителна колба (5.6), добавя се 100 µl от 0,15 mM триптаминоз разтвор (7.1) чрез използването на инжекция (5.7) и се долива до обема с метанол (4.2.1). Смесва се внимателно с инверсия и се извършва дисперсия с помощта на ултразвук (5.8) за 15 min Центрофугира се (5.9) при 27 000 × g за 10 минути и супернатантът се събира в стъклен флакон (5.10).

Бележка: Разтворът на тестовата проба би следвало да бъде съхраняван при 4 °C, докато се извърши HPLC-анализ.

7.3. Подготовка на външния стандартен разтвор

55,4 mg PEDP (4.1) се измерват в 50 ml измерителна (5.6) и се добавя около 25 ml хлороформ (4.2.2) като се използва градуиран цилиндър (5.11). Затворената колба

се загръва до 50 °С и се смесва внимателно докато се разтвори PEDP. Колбата се охлажда до 20 °С, обемът се долива с метанол (4.2.1) и се смесва с инверсия. Капва се 1 ml

(5.3) от този разтвор в 100 ml измерителна колба (5.6) и се долива до обема с метанол (4.2.1). Капва се 1 ml (5.3) от този разтвор в 10 ml измерителна колба (5.6), добавя се 100 µl (5.7) от 0,15 mM триптаминов разтвор (7.1) и обемът се долива с метанол (4.2.1). Смесва се чрез инверсия.

Бележка: Разтворът на стандартната проба би следвало да се съхранява при 4 °С, докато се извърши HPLC-анализ.

7.4. Подготовка на дериватизиращия реагент

25,0 ± 0,1 mg от ОРА (4.3.4) се измерва в 10 ml измерителна колба (5.6), добавя се 0,5 ml (5.5) метанол (4.2.1) и се смесва внимателно, за да се разтвори ОРА. Долива се до маркировката с разтвор на борна киселина (4.3.2) и се добавя 20 µl от 2-монотиогликол (4.3.3) чрез спринцовка (5.7).

Бележка: Дериватизиращият реагент би следвало да бъде съхраняван при 4 °С в тъмен флакон; той е годен една седмица.

7.5. Определяне чрез HPLC

7.5.1. Отмиващи разтворители (4.4)

разтворител А:

разтвор на 0,3 mM моносодиев фосфат и разтвор на 3 mM натриев ацетат (регулиран до pH 6,5 с оцетна киселина): метанол: тетраhydroфуран = 558:440:2 (v/v/v)

разтворител В:

метанол

7.5.2. Предложен отмиващ градиент:

време (min)	разтворител А (%)	разтворител В (%)	струя (ml/min)
Първоначално	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

Бележка: Отмиващият градиент може да изисква лека модификация, с оглед да се постигне разтварянето, показано във фигура 1.

Температура на колоната: 30 °С.

7.5.3. Обем на инжектиране: 50 µl дериватизиращ реагент и 50 µl разтвор на пробата.

7.5.4. Равновесие на колоната

Системата се стартира ежедневно, колоната се облива със 100% разтворител В за 15 минути, след това се настройва на А:В= 40:60 и се балансира при 1 ml/min за 15 минути. Чрез инжектирането на метанол (4.2.1) се извършва празна серия.

Бележка: Преди дългосрочно съхранение, колоната се облива с метанол:хлороформ = 80: 20 (v/v) за 30 минути.

7.5.5. Определяне на съдържанието на PS + PE в тестовата проба

7.5.6. Извършва се последователността от хроматографски анализи, като времето от серия до серия се поддържа константно, с оглед да се получат константни времена на запазване. Външният стандартен разтвор (7.3) се инжектира на всеки 5-10 разтвори на тестовите проби, с оглед да се оцени коефициентът на влияние.

Бележка: Колоната трябва да бъде почистена чрез обливане със 100% разтворител В (7.5.1) за най-малко 30 минути на всеки 20-25 серии.

7.6. Метод на интегриране

7.6.1. PEDP-пик

PEDP се отмива като единствен пик. Повърхността на пика се определя чрез „valley-to-valley” интеграция.

7.6.2. Триптаминов пик

Триптаминът се отмива като единствен пик (фигура 1). Повърхността на пика се определя чрез „valley-to-valley” интеграция.

7.6.3. Групи на пикове PS и PE

Съгласно описаните условия (фигура 1), PS се отмива като два основни частично неразтворени пика, предшествани от по-малък пик. PE се отмива като три основни

частично неразтворени пика. Определя се цялата повърхност на всяка група пикове, като се фиксира основната линия, както е отчетено във фигура 1.

8. Изчисляване и изразяване на резултатите

Съдържанието на PS и PE в тестовата проба се изчислява, както следва:

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

където:

C = съдържанието на PS или PE (mg/100 g прах) в тестовата проба

A 1 = PEDP пикова повърхност на разтвора на стандартната проба (7.3)

A 2 = PS или PE пикова повърхност на разтвора на стандартната проба (7.2)

T 1 = триптаминава пикова повърхност на разтвора на стандартната проба (7.3)

T 2 = триптаминава пикова повърхност на разтвора на тестовата проба (7.2).

9. Прецизност

Бележка: Стойностите за повторяемост бяха изчислени в съответствие с IDF международен стандарт ⁽¹⁾. Временната граница за сравнение бе изчислена в съответствие с процедурата, определена в приложение III, буква б) към настоящото.

9.1. Повторяемост

Относителното стандартно отклонение на повторяемостта изразява варирането на резултатите на независим аналитичен анализ, получени от същия оператор чрез използване на същата апаратура и при същите условия върху същия тестови материал в и в кратък период от време; не би следвало да се надвишава относителната стойност от 2 %. Ако при тези условия са получени две определяния, относителната разлика между двата резултата не би следвало да бъде по-голяма от 6% от средно аритметичната стойност на резултатите.

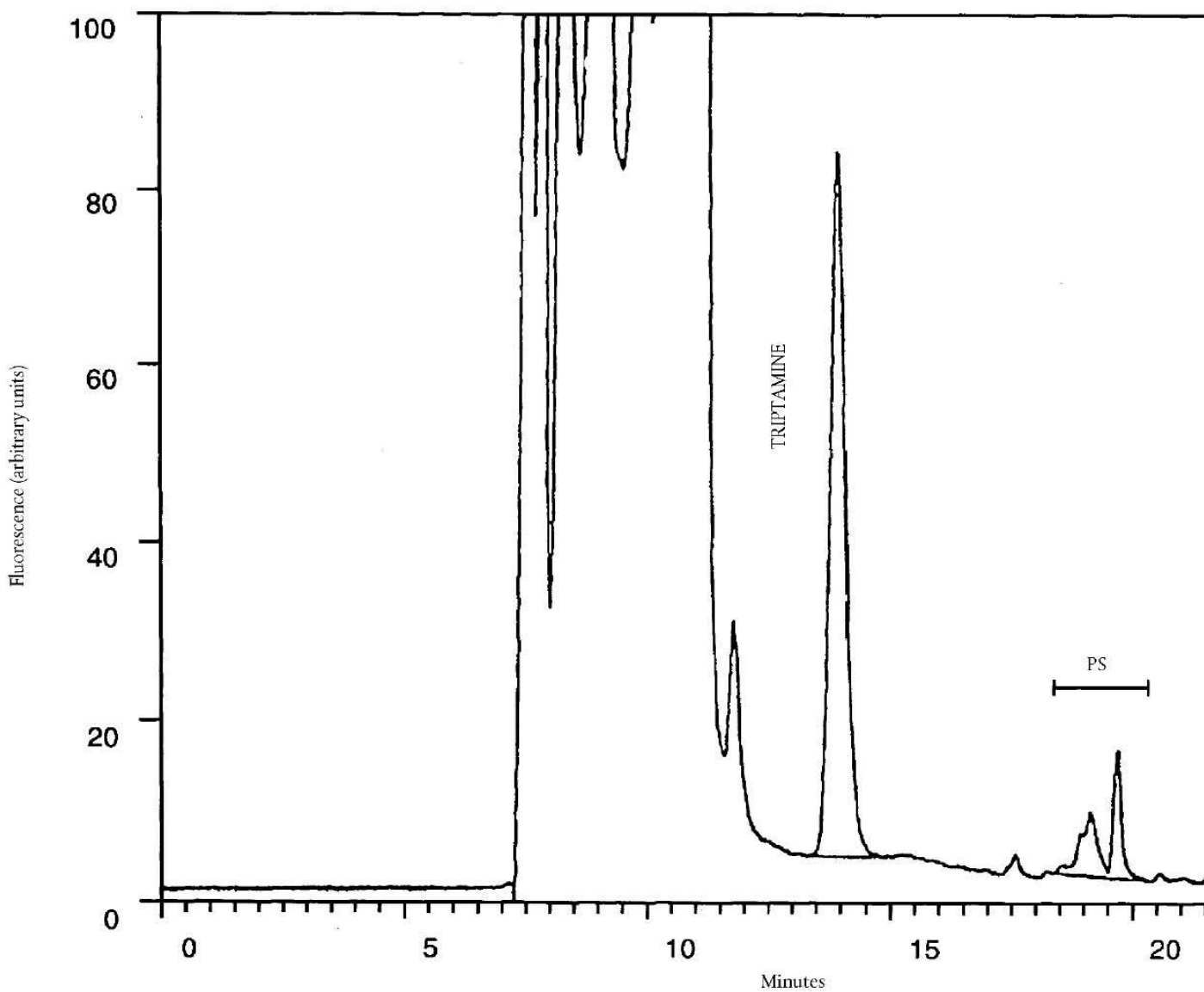
9.2. Възпроизвеждане

Ако две определяния са получени от оператори в различни лаборатории чрез използване на различна апаратура, при различни условия за анализа на същия тестови материал, относителната разлика между двата резултата не би следвало да бъде по-голяма от 11% от средно аритметичната стойност на резултатите.

10. Позовавания

10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hoogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., „Откриване на сухо вещество на мътеница в обезмаслено мляко на прах чрез HPLC-определяне на количеството на аминокиселини.” Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).

⁽¹⁾ Международен IDF стандарт 135B/1991- Мляко и млечни продукти. Характеристики на прецизността на аналитични методи. Описание на процедурата за съвместно изследване.



Фигура 1: HPLC-модели на ОРА-производни на фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилетаноламин (PE) в метанолов екстракт на обезмаслено мляко на прах с променен състав. Отчита се методът на интеграция за пиковите на PS, PE и триптамин (вътрешен стандарт).

Б. пр.: Fluorescence (arbitrary units): флуоресценция (произволни единици)

ПРИЛОЖЕНИЕ XXI

(Член 15)

ОТКРИВАНЕ НА АНТИБИОТИЧНИ И СУЛФОНАМИДНИ /ДАПСОНОВИ УТАЙКИ В ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ

Използва се скрининг тест за микробен антиокислител, използващ *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 като тестов микроорганизъм, който е достатъчно чувствителен да открива 4 µg бензилпеницилин за мляко и 100 µg сулфаметазин за мляко. Могат да бъдат използвани обичайните тестове, ако имат необходимата чувствителност за бензилпеницилин и сулфаметазин ⁽¹⁾.

За теста се използва обезмаслено мляко на прах с променен състав (1 g прах + 9 ml дестилирана вода). Тестът се извършва, както е описано в IDF — бюлетин No 258/1991, раздел 1, глава 2, или съобразно инструкциите на производителя на теста.

Положителните резултати следва да се тълкуват, както следва:

1. Тестът се повтаря с добавянето на пеницилиназа към тестовата система:

Положителен резултат: антиокислителната субстанция не може да бъде открита чрез тази процедура.

Отрицателен резултат: антиокислителната субстанция е β-лактам антибиотик.

2. Тестът се повтаря с добавянето на р-аминобензоатна киселина към тестовата система:

Положителен резултат: антиокислителната субстанция не може да бъде открита чрез тази процедура.

Отрицателен резултат: антиокислителната субстанция е сулфонамид/дапсон.

3. Тестът се повтаря с добавянето на пеницилиназа + р-аминобензоатна киселина към тестовата система:

Положителен резултат: антиокислителната субстанция не може да бъде открита чрез тази процедура.

Отрицателен резултат: антиокислителните субстанции са β-лактам антибиотик и сулфонамид/дапсон.

⁽¹⁾ *Важно:* Когато се анализира обезмаслено мляко на прах, могат да бъдат получени фалшиви положителни резултати. Поради това, е важно да се провери дали използваната тестова система не произвежда фалшиви положителни резултати.

ПРИЛОЖЕНИЕ XXII
(Член 16)

КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ В СМЕСИ ОТ ХРАНИТЕЛНИ ПРОДУКТИ ЧРЕЗ ЕНЗИМНА КОАГУЛАЦИЯ НА ПАРА-КАЗЕИН

1. Цел

Количествено определяне на обезмаслено мляко на прах в смеси от хранителни продукти чрез ензимна коагулация на пара-казеин.

2. Обхват

Този метод се прилага за смеси от хранителни продукти, съдържащи най-малко 10% обезмаслено мляко на прах; наличието на големи количества мътеница и/или определени немлечни протеини може да доведе до определени въздействия.

3. Принцип на метода

3.1. Разтваряне на казеин, съдържащ се в смесите от хранителни продукти, чрез екстракция с разтвор на натриев цитрат.

3.2. Регулиране на калциево-йонната концентрация до изискваното ниво, за да се утаи пара-казеинът; пара-казеинът се добива от казеин чрез добавянето на сирище.

3.3. Азотното съдържание на утайката от пара-казеина се определя чрез Kjeldahl-метода, както е описан от IDF стандарт 20A 1986; количеството на обезмасленото мляко на прах се изчислява на базата на минималното съдържание казеин от 27,5% (виж 9.1).

4. Реагенти

Използваните реагенти трябва да са с аналитично качество. Използваната вода трябва да е дестилирана или с еквивалентна чистота. С изключение на сирището (4.5), всички реагенти и разтвори трябва да бъдат без азотни субстанции.

4.1. Тринатриев цитрат като дихидрат (1% w/v разтвор).

4.2. Калциев хлорид (2М разтвор). 20,018 g CaCO₃ (с аналитично качество) се измерват в порцеланов съд с подходящ размер (от 150 до 200 ml) или в бехерова чаша. Покрива се с дестилирана вода и се прехвърля в кипяща водна баня. Бавно се добавят от 50 до 60 ml HCl разтвор (концентр. HCl:вода = 1:1), за да може карбонатът да се разтвори напълно. Остава се във врящата водна баня, докато CaCl₂ се изсуши, за да се елимира HCl, който не предизвиква реакция. Заедно с дестилираната вода се прехвърля в 100 ml измерителна колба и се разрежда до маркировката. Измерва се рН-стойността, която не трябва да бъде по-ниска от 4,0. Разтворът се съхранява в хладилник.

- 4.3. 0,1 N натриев хидроксид.
- 4.4. 0,1 N хлороводородна киселина.
- 4.5. Течно телно сирище (стандартен състав 1:10 000). Съхранява се в хладилник от 4 до 6 °С.
- 4.6. Реагенти за количествено определяне на азот в съответствие с Kjeldahl-метода, както е описан в IDF стандарт 20А 1986.

5. Апаратура

Обща лабораторна апаратура, включваща:

- 5.1. Хаван или хомогенизатор
- 5.2. Аналитична везна
- 5.3. Настолна центрофуга (от 2 000 до 3 000 rpm) с 50 ml туби
- 5.4. Магнитна бъркалка с (от 10 до 15 mm.) с отводни палци
- 5.5. Бехерови чаши от 150 до 200 ml
- 5.6. Колби от 250 и 500 ml
- 5.7. Стъклени фунии с диаметър от 60 до 80 mm.
- 5.8. Бързо филтриращи филтри с диаметър от 150 mm. (S.S. 589², S.S. 595 1/2)
- 5.9. Капкомери с различна номинална вместимост
- 5.10. Термостатично контролирана водна баня при 37 °С
- 5.11. рН метър
- 5.12. Kjeldahl-устройство за разтваряне и дестилация, с принадлежности
- 5.13. 25 ml градуирана бюретка
- 5.14. Пластмасов флакон за дестилирана вода
- 5.15. Шпатули от неръждаема стомана
- 5.16. Термометри

5.17. Пещ за изсушаване с контролиране на температурата.

6. Процедура

6.1. Подготовка на пробата. От 10 до 20 g от пробата се смела в хавана или се хомогенизира в пресата, за да се получи хомогенна смес.

6.2. Разтваряне на млякото на прах и отделяне на неразтворимата утайка.

6.2.1. $1,000 \pm 0,002$ g от добре хомогенизираната смес от хранителни продукти (6.1) се претегля директно в 50 ml центрофужна туба. Добавят се 30 ml разтвор на тринатриев цитрат (4.1), който е предварително загрят при 45 °C. Смесва се с помощта на магнитната бъркалка за най-малко пет минути.

6.2.2. 500 g (от 2 000 до 3 000 rpm) се центрофугират за 10 минути и ясният воден супернатант се прелива в бехерова чаша от 150 до 200 ml, като се внимава по време на преливането да не се загуби никакъв ронлив материал на дъното.

6.2.3. Извършват се допълнителни екстракции на утайката, в съответствие със същата процедура, като екстрактите се добавят към първите.

6.2.4. Ако на повърхността се образува слой мазнина, се охлажда в хладилник, докато мазнината се втвърди и твърдият слой се отстранява със шпатула.

6.3. Коагулиране на казеин с ензимите на сирисце.

6.3.1. При непрекъснато разбъркване, се прибавят на капки 3,4 ml наситен разтвор на калциев хлорид (4.2) към общия воден екстракт (около 100 ml). Регулира се до рН 6,4-6,5 с разтвори на NaOH (4.3) или HCl (4.4). Поставя се в термостатично контролирана водна баня при 37 °C за 15 до 20 минути, за да се получи солени баланс. Това се изразява чрез образуването на лека гъстота.

6.3.2. Течността се поставя в една (или две) центрофужни туби и при 2 000 g се центрофугира за 10 минути, с оглед да се отстрани утаеният материал. Супернатантът се прехвърля, без да се измива седимента, в една (или две) центрофужни туби.

6.3.3. Температурата на супернатанта се регулира отново до 37 °C. При разбъркване на екстракта, се прибавят на капки 0,5 ml течна сирисце (4.5). Коагулирането се получава за една или две минути.

6.3.4. Пробата се връща във водната баня и се оставя при температура от 37 °C за 15 минути. Пробата се отстранява от банята и коагулацията се прекъсва чрез разбъркване. Центрофугира се при 2 000 g за 10 минути. Супернатантът се филтрира чрез подходяща филтърна хартия ⁽¹⁾ (Whatman No 541 или подобна), като филтърната хартия се запазва. Утайката се измива в центрофужната туба с 50 ml вода при приблизително 35 °C чрез разбъркване.

Центрофугира се отново при 2 000 g за 10 минути. Супернатантът се филтрира през филтърната хартия, която преди това е запазена.

6.4. Определяне на азот в казеин.

6.4.1. След измиването, количеството утайка се прехвърля върху филтърната хартия, запазена при 6.3.4, като се използва дестилирана вода. Филтърната хартия се прехвърля в Kjeldahl-колбата. Азотът се определя чрез Kjeldahl-метода, както е описан в IDF стандарт 20A 1986.

7. Празен тест

7.1. Регулярно се прави празен тест, като се използва филтърна хартия (5.8), навлажнена със смес от 90 ml (4.1) разтвор на натриев цитрат, 1 ml наситен разтвор на калциев хлорид (4.2), 0,5 ml течено сирище (4.5); измива се с 3 ×15 ml дестилирана вода преди минерализацията чрез Kjeldahl-метода, описан от IDF стандарт 20A 1986.

7.2. Обемът киселина, който се използва за празния тест, трябва да бъде изваден от обема киселина (4.4), който се използва за титруването на пробата.

(¹) Би следвало да бъде използвана бързо филтрираща филтърна хартия.

8. Контролен тест

8.1. За да се тестват гореупоменатите процедура и реагенти, се прави определяне върху стандартна смес от хранителни продукти с известно съдържание на обезмаслено мляко на прах, установено от съвместно изследване. Средният резултат на двойното определяне не би следвало да се отличава с повече от 1% от това на съвместното изследване.

9. Изразяване на резултати

9.1. Процентът обезмаслено мляко на прах в сместа от хранителни продукти се изчислява със следната формула:

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

където:

N е процентът азот в пара-казеин; 27,5 е факторът за конвертиране на определен казеин в процента обезмаслено мляко на прах; 2,81 и 0,908 са факторите за корекция, получени от анализа на регресията.

10. Точност на метода

10.1. Повторяемост

В поне 95% от проучваните случаи, двойният анализ на една и съща проба от същия оператор и в същата лаборатория трябва да даде разлики в резултатите, които са равни на не повече от 2,3 g обезмаслено мляко на прах в 100 g смес от хранителни продукти.

10.2. Възпроизвеждане

В поне 95% от проучваните случаи, анализираната от две лаборатории една и съща проба трябва да даде разлики в резултатите, които са равни на не повече от 6,5 g обезмаслено мляко на прах в 100 g смес от хранителни продукти.

11. Граница на толерантност

Стойността CrD_{95} (критична разлика; 95% граница на сигурност) се изчислява чрез използване на формулата (ISO 5725):

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

(R: възпроизвеждане; r: повторяемост)

двойно определяне: $CrD_{95} = 4,5$ g

Когато резултатът от химическия анализ се различава от декларираното съдържание на обезмасленото мляко на прах с не повече от 4,5 g (двойно определяне), пратката от сместа от хранителни продукти се счита като изпълняваща тази разпоредба на регламента.

12. Наблюдение

12.1. Прибавянето на големи проценти определени немлечни протеини, и по-специално соеви протеини, когато се подгряват заедно с обезмаслено мляко на прах, може да доведе до прекалено високи резултати, които се дължат на съвместното утаяване с пара-казеин на мляко.

12.2. Прибавянето на мътеница може да доведе до сравнително ниски данни, които се дължат на факта, че се определя само дозата, която е без мазнини. Прибавянето на определена кисела мътеница може да даде значително ниски данни, които се дължат на непълното разтваряне в цитратния разтвор.

12.3. Добавките от лецитин от 0,5% или повече могат също да доведат до ниски резултати.

12.4. Включването на обезмаслено мляко на прах с висока температура може да доведе до прекалено високи данни, които се дължат на съвместното утаяване на определени протеини от суроватка с пара-казеина на мляко.

ПРИЛОЖЕНИЕ XXIII
(Член 17)

КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СКОРБЪЯЛА В ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ, ДЕНАТУРИРАНО МЛЯКО НА ПРАХ И СМЕСИ ОТ ХРАНИТЕЛНИ ПРОДУКТИ

1. Обхват

Този метод е за откриването на скорбяла като индикатор в денатурирано мляко на прах. Границата на откриване на метода е приблизително 0,05 g скорбяла за 100 g проба.

2. Принцип

Реакцията се базира върху тази, използвана в иодометрията:

- фиксиране чрез колоидите на свободния йод във воден разтвор,
- абсорбция чрез мицелите на скорбялата и чрез образуването на цвят.

3. Реагенти

3.1. Йоден разтвор:

- йод: 1 г.,
- калиев йод: 2 г.,
- дестилирана вода: 100 ml

4. Апаратура

4.1. Аналитична везна

4.2. Водна баня

4.3. Тестови съдове, 25 mm. ×200 mm.

5. Процедура

1 g от пробата се претегля и се прехвърля в тестовия съд (4.3). Добавя се 20 ml дестилирана вода и се разбърква, с оглед да се получи дисперсия на пробата. Постава се в кипящата водна баня (4.2) и се оставя за 5 минути. Отстранява се от банята и се охлажда на стайна температура. Добавя се 0,5 ml йоден разтвор (3.1), разбърква се и се наблюдава полученият цвят.

6. Изразяване на резултатите

Синьото оцветяване показва наличие в пробата на натурална скорбяла. Ако пробата съдържа модифицирана скорбяла, цветът може да не е син.

7. Забележки

Цветът, интензивността на цвета и микроскопската форма на скорбялата варират в

зависимост от произхода на натуралната скорбяла (напр. царевица или картоф) и вида на модифицираната скорбяла, който присъства в пробата.

При наличието на модифицирана скорбяла, полученият цвят преминава във виолетов, червен или кафяв, в съответствие със степента на модификация на кристалната структура на натурална скорбяла.

ПРИЛОЖЕНИЕ XXIV
(Член 18)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЛАЖНОСТ В КИСЕЛА МЪТЕНИЦА НА ПРАХ

1. Обхват

Да определи съдържанието на влажност в кисела мътеница на прах, предназначена за животинска храна.

2. Принцип

Пробата се изсушава под вакуум. Загубата на маса се определя чрез претегляне.

3. Апаратура

3.1. Аналитична везна

3.2. Сухи съдове от некорозивен метал или от стъкло с уплътнени капаци, с работна повърхност, която позволява тестовата проба да се разпространи на около 0,3 г./см.².

3.3. Регулируема електрическа вакуумна пещ, снабдена с маслена помпа и с механизъм за въвеждане на горещ изсушен въздух или с изсушаващ агент (напр. калциев оксид).

3.4. Ексикатор с ефективен изсушаващ агент.

3.5. Изсушаваща пещ, вентилирана и термостатично контролирана при 102 ± 2 °C.

4. Процедура

Съдът (3.2) се загрява с капака в пещта (3.5) за най-малко един час. Капакът се поставя върху съда, веднага се поставя върху ексикатора (3.4), оставя се да се охлади на стайна температура и се претегля с точност до 0,5 mg

Съдът (3.2) с капака се претегля с точност до 0,5 mg В претегления съд се измерва с точност до 1 mg около 5 g от пробата и се разпространява равномерно. Съдът без капака се поставя във вакуумната пещ (3.3), предварително загрята до 83 °C. За да

се предотврати прекомерното спадане на температурата на пещта, съдът се внася възможно най-бързо.

Налягането се регулира до 100 Torr (13,3 kPa) и пробата се оставя да се изсуши за четири часа при това налягане, с потока от горещ, сух въздух или чрез използването на изсушаващ агент (около 300 g за 20 проби). В последния случай, вакуумната помпа се откача при постигне на предписаното налягане. Времето за изсушаване се изчислява от момента, в който температурата на пещта се върне до 83 °C. Пещта се връща внимателно към атмосферно налягане. Пещта се отваря, капакът се поставя веднага върху съда, съдът се отстранява от пещта, оставя се да се охлади за 30 до 45 минути в ексикатор (3.4) и се претегля с точност до 1 mg. Изсушава се за допълнително 30 минути във вакуумната пещ (3.3) при 83 °C и отново се претегля. Разликата между двете претегляния не трябва да надвишава 0,1% влажност.

5. Изчисляване

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

където:

E = първоначалната маса на тестовата проба, в грамове,

m = маса на сухата тестова проба, в грамове.

6. Прецизност

6.1. Граница на повторяемост

Разликата от резултатите на две определяния, извършени във възможно най-кратък срок от един и същ оператор и при използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не надвишава 0,4 g вода/100 g кисела мътеница на прах.

6.2. Граница на възпроизвеждане

Разликата от резултатите на две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на същата апаратура върху идентичен тестови материал, не надвишава 0,6 g вода/100 g кисела мътеница на прах.

6.3. Източник на данните за прецизността

Данните за прецизността бяха определени от експеримент, проведен през 1995 г. и включващ осем лаборатории и 12 проби (6 празни дублирания).

ПРИЛОЖЕНИЕ XXV

(Член 19)

РЕФЕРЕНТЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧУЖДИ МАЗНИНИ В МЛЕЧНА МАЗНИНА ЧРЕЗ ГАЗОВ ХРОМАТОГРАФСКИ АНАЛИЗ НА ТРИГЛИЦЕРИДИ — РЕВИЗИЯ 1

1. Обхват и приложно поле

Този стандарт определя метод за откриване на чужди мазнини, растителни и животински, такива като говежда лой и свинска мае в млечна мазнина на млечни продукти, като се използва газов хроматографски анализ на триглицериди.

Чрез използването на определена формула за триглицерид се откриват качествата и количествата на растителни и животински мазнини в чиста млечна мазнина, независимо от условията на хранене или лактация.

Бележка 1: Въпреки, че маслената киселина (C4), която се появява изключително в млечни мазнини, прави възможно извършването на количествени оценки на ниски до средни стойности млечна мазнина в растителни мазнини, качествена и количествена информация едва ли може да бъде получена при прибавена най-малко 20% (% тегло) чужда мазнина към чисто мляко поради голямата вариация на C4, приблизително в обхват между 3,5 до 4,5% (% тегло).

Бележка 2: На практика, количествените резултати могат да бъдат получени само от триглицериден анализ, тъй като стеролното съдържание на растителните мазнини е различно в зависимост от условията на производство и обработка.

2. Дефиниция

Чужди мазнини в млечна мазнина: чужди мазнини, дефинирани в този стандарт, са всички растителни и животински мазнини, с изключение на млечната мазнина.

3. Принцип на метода

След екстракцията на млечната мазнина се приготвя основен разтвор. От този разтвор се определят триглицеридите (общо въглеродно число) чрез газова хроматография с обвити колони. Чрез внасянето на %-та тегло на молекулите мазнина от различен размер (C24 — C54 — само четни числа) в триглицеридната формула, чуждите мазнини се откриват качествено или се определят количествено.

Бележка: При съблюдаването на описаната оценка може да бъде използвана капилярна газова хроматография, ако се гарантира постигането на сравними резултати ⁽¹⁾.

4. Реагенти

Трябва да бъдат използвани химикали с аналитично качество.

- 4.1. Носещ газ: азот, степен на чистота $\geq 99,996\%$.
- 4.2. Стандартни триглицериди ⁽²⁾, наситени, както и холестерол за стандартизиране на стандартна млечна мазнина съобразно раздел 6.5.4.
- 4.3. Метанол, безводен.
- 4.4. n-хексан
- 4.5. n-хептан
- 4.6. Толуол
- 4.7. Разтвор на диметилхлоросилан: 50 ml диметилхлоросилан се разтварят в 283 ml толуол.
- 4.8. Възпламеним газ: въглерод и синтетичен въздух
- 4.9. Стационарна фаза, 3-% OV-1 върху 125/150 μm (100/120 mesh) газ ChromQ.⁽³⁾
- 4.10. 10% разтвор на какаово масло в n-хептан.

5. Апаратура

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално следното:

- 5.1. Газов хроматограф с висока температура, подходящ за температури от най-малко 400-450°C, съоръжен с детектор за йонизация на пламък (FID) и контролиращо устройство за константния поток маса за носещия газ. Газ за възпламеняване: 30 ml/min H_2 , 270 ml/min синтетичен въздух.

⁽¹⁾ Подходящи методи вече са описани, виж D. Precht и J. Molkenin: Количествен анализ на триглицериди чрез използване на къси капилярни колони, Chrompack News 4, 16-17 (1993).

⁽²⁾ Подходящи продукти се намират в търговската мрежа.

⁽³⁾ Търговски имена, такива като напр. Extrelut, газ ChromQ, Chrompack, са примери за подходящи продукти, които се намират в специализираната търговска мрежа. Тази информация служи за по-лесното боравене със стандарта от потребителя и не представлява изискване за продукт. Индикацията на зърно бе включена като SI-единица μm съгласно BS 410:1988 „Британска спецификация на стандарта за тестови филтри”.

Като се има предвид силният поток носещ газ, горелката на детектора би следвало да бъде по-широка.

Бележка: Поради високите температури, които се получават по време на триглицеридните анализи, стъклените вложки в FID или инжекторната система трябва да бъдат регулярно почиствани.

Газовият хроматограф трябва да е снабден с прегради, устойчиви на високи температури, които могат да бъдат използвани често и имат по принцип много ниска степен на „избледняване“.

Бележка: Подходящи са Chromblue (tm)-прегради (Chrompack).

Преградата трябва да бъде сменяна често, напр. след приблизително 100 инжекции или след като разтварянето започне да се влошава (виж фигура 4).

5.2. Хроматографска колона

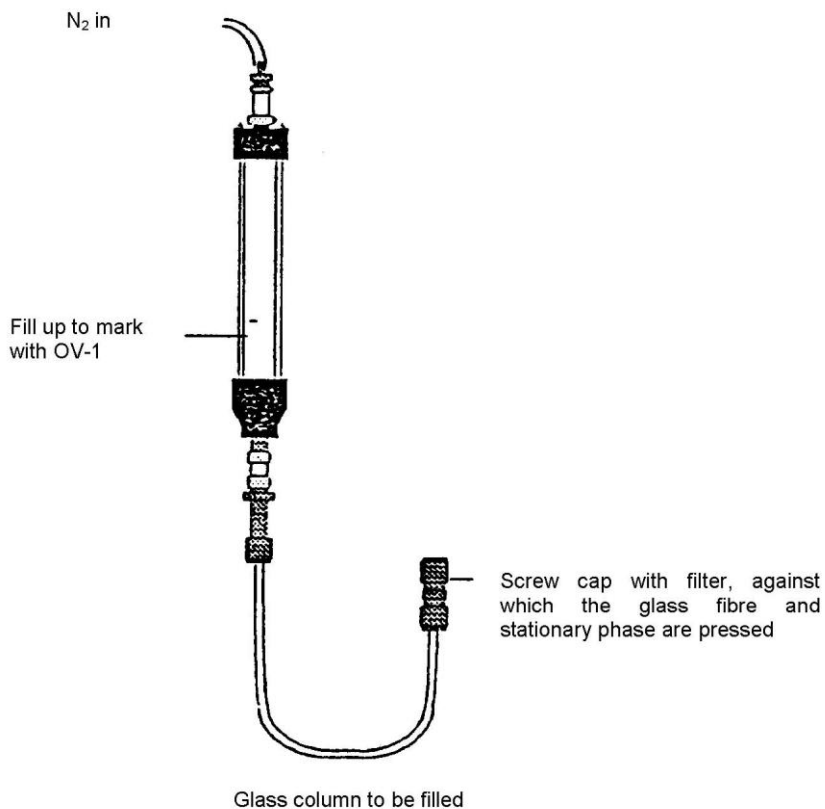
U-образна стъклена колона (диаметър във вътрешността от 2 mm., 500 mm. дължина), която първо е силилирана съобразно раздел 6.1 с диметилхлорсилан, с оглед да се деактивира стъклената повърхност.

Бележка: Подходящи са също малко по-дълги (с дължина 80-200 mm.) обвити колони. С тях може да бъде постигнато малко по-добро възпроизвеждане на резултатите. От друга страна, стационарната фаза показва понякога счупвания след работа, които могат да доведат, от своя страна, до лоши количествени резултати. В допълнение, пламъкът FID се загася лесно в резултат на необходимия изключително силен поток носещ газ от 75 до 85 ml/min

5.3. Начин на пълнене на колоната (виж фигура 1)

фигура 1

Пълнене на колоната



Б. Пр.: Fill up to the mark with OV-1: Напълва се до маркировката с OV-1
Screw cap with filter, against which the glass fibre and stationary phase are pressed:
капакът се завинтва с филтъра, към който са притиснати стъклената нишка и
стационарната фаза.

Glass column to be filled: стъклена колона, която следва да се напълни

5.3.1. Пластмасова колона с горни капаци с винт, снабдена с маркировка, до която
може да бъде пълнено необходимото количество на стационарната фаза

5.3.2. Фин филтър (размер на клетката от приблизително 100 μm) с капак с винт,
подходящ за затваряне на стъклената колона съобразно фигура 1.

5.3.3. Деактивирана, силилирана стъклена вата

5.3.4. Вибратор за еднакво разпространение на стационарната фаза по време на
пълненето

5.4. От 1 до 3 ml Extrelut-колона ⁽¹⁾ с кварцов гел. Тази колона може да бъде
алтернативно използвана за екстракцията с цел получаване на млечна мазнина.

⁽¹⁾ виж бележка под черта 3 на страница 86.

- 5.5. Графитно уплътнение от 6,4 mm. (1/4), с отвор от 6 mm.
- 5.6. Устройства за силилиране на стъклената повърхност на колоната съобразно раздел 6.1.
 - 5.6.1. Woulff-бутилка
 - 5.6.2. Водно-смукателна помпа
- 5.7. Водна баня, регулируема до $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- 5.8. Сушилня, регулируема до $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- 5.9. Милилитров капкомер
- 5.10. Градуиран капкомер с обем от 5 ml за дозиране на 1,5 ml метанол
- 5.11. Колба с кръгло дъно с обем от 50 ml
- 5.12. Erlenmeyer-колба с номинален обем от 50 ml
- 5.13. Фуния
- 5.14. Филтър с фини пори
- 5.15. Ротативен изпарител
- 5.16. Ампули с номинален обем от 1 ml, затворени с алуминиева запушалка, с преграда във вътрешността
- 5.17. Спринцовка за инжектиране, използваната запушалка на спринцовката не трябва да достига до края на иглата.

Бележка: Такива спринцовки позволяват по-добро сравнение на получаваните резултати.

С оглед да се избегне развалянето на преградата, крайт на иглата би следвало да бъде проверяван регулярно (напр. със стерео микроскоп).

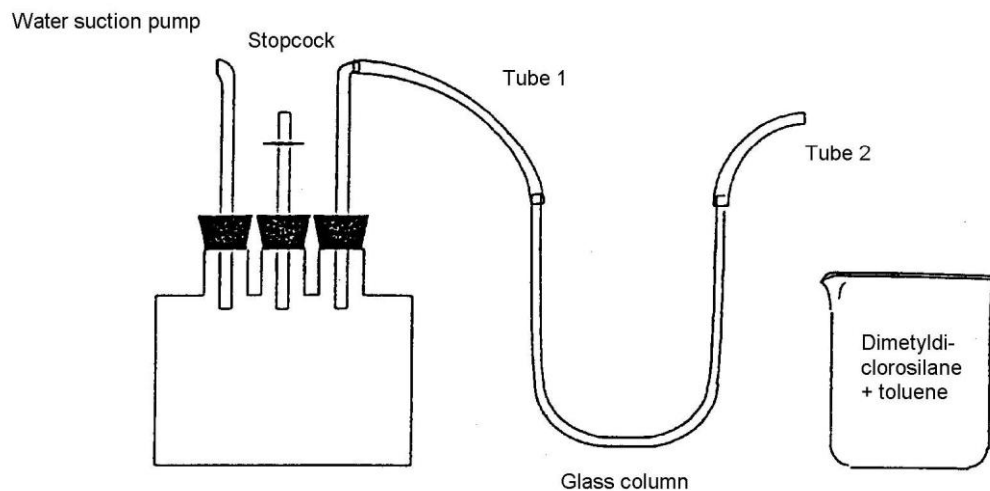
6. Процедура

6.1. Подготовка на колоната (силилиране)

След свързването на Woulff-бутилката, както е показано във фигура 2, с водно-смукателната помпа, съд 2 се потопява в разтвора съобразно раздел 4.7. Колоната се пълни чрез затваряне на стопирация кран; впоследствие двата съда се отстраняват.

фигура 2

Условия за силилиране



Б. пр.: water suction pump: водно-смукателна помпа

Stopcock: стопиращ кран

Tube 1: съд 1

Tube 2: съд 2

Glass column: стъклена колона

Колоната се поставя в изправено положение и се пълни изцяло с разтвора на диметилдихлорсилан с помощта на капкомер.

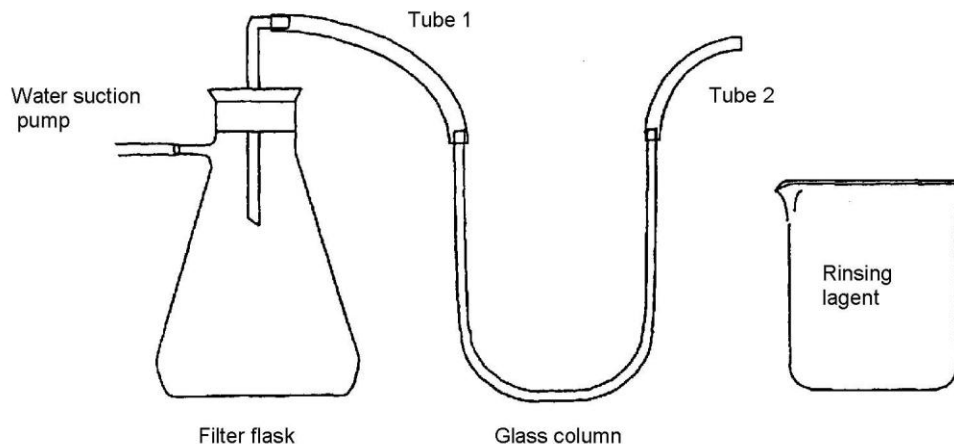
След 20-30 min Woulff-бутилката се заменя от колба с филтър и колоната се изпразва чрез свързването ѝ с водно-смукателната помпа (виж фигура 3).

6.2. Пълнене на колоната

Това се изпълнява чрез последователно изплакване с използване на 75 ml толуол и 50 ml метанол; след това, изпразнената колона се изсушава в сушилнята при 100 °C за приблизително 30 минути.

фигура 3

Условия за изплакване



Б. пр.: filter flask: филтърна колба
Rinsing agent: измиващ агент

За пълнене на колоната се използва начинът, представен във фигура 1. Съобразно 4.9, стационарната фаза се пълни в пластмасовата колона до маркировката. Долният край на стъклената колона, който следва да се напълни, се затваря със запушалка от стъклена вата, дълга приблизително 1 см., която преди това е била силилирана и пресована чрез използването на стоманена пръчка. След това, краят на колоната се затваря с филтъра съобразно раздел 5.3.2.

Колоната се пълни под налягане (3 bar, with N₂) със стационарната фаза. За да се получи еднакво, непрекъснато и стабилно обвиване, нагоре и надолу по стъклената колона, докато се пълни, се движи вибратор.

След напълването, към другия край на обвитата колона се притиска плътна запушалка от силилирана стъклена вата, издадените краища се изрязват и запушалката се притиска няколко милиметра в колоната със шпатула.

6.3. Подготовка на пробите

За подготовка на пробите се използва един от следните три метода:

6.3.1. Изолиране на млечната мазнина от масло

От 5 до 10 g масло се стопяват в подходящ съд във водна баня съобразно раздел 5.7 при 50 °C.

50 ml Erlenmeyer-колба и фуния с поставен филтър съобразно раздел 5.14 се загряват в сушилнята до 50 °C. Слой мазнина на пробата от стопено масло се филтрира чрез използването на предварително загрято устройство.

Такава млечна мазнина е почти без фосфолипиди.

6.3.2. Екстракция на фракцията мазнина съобразно Röse-Gottlieb-метода

Екстракцията се извършва или в съответствие с IDF стандарт 1 C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 или 22B: 1987.

С такава млечна мазнина, фосфолипидите позволяват получаването на пик на холестерола, който е увеличен с приблизително 0,1 %.

Триглицеридният спектър, стандартизиран до 100 с холестерола, е повлиян от това само до незначителна степен.

6.3.3. Екстракция от мляко чрез използване на колони с кварцов гел

0,7 ml от проба мляко, темперирана до 20 °C, се поставят в 1 до 3 ml Extrelut-колони с милилитров капкомер съобразно раздел 5.4 и се оставя да се разпространят еднакво върху кварцовия гел за приблизително пет минути.

За денатурирането на съвкупността от протеин и липид, с капкомер се добавя 1,5 ml метанол. Впоследствие се извършва екстракция от пробата с 20 ml n-хексан. n-хексанът се добавя бавно на малки количества и отцеждащият се разтворител се събира в 50 ml колба с кръгло дъно, която е била изсушена до константно, известно тегло.

След екстракцията колоната се оставя празна.

Разтворителите се дестилират от елюента в ротативен изпарител на температура на водна баня от 40 до 50 °C.

Колбата се изсушава и утайката от мазнини се претегля.

Бележка: Методът за екстракция на мазнина според Gerber, Weibull-Berntrop, Schmid-Bondzynski-Ratzlaff или изолирането на млечна мазнина чрез използване на детергенти (метод BDI) не са подходящи за триглицериден анализ, тъй като с тези методи във фазата на мазнината могат да преминат повече или по-малко големи количества частични глицериди или фосфолипиди.

6.4. Подготовка на разтвора на пробата

За газова хроматография се използва 5 %-ен разтвор на мазнината в n-хептан, получен съобразно раздел 6.3. За подготовката на този разтвор на пробата се измерват съответстващи количества от материала на пробата, получен съобразно раздели 6.3.1 и 6.3.2, и се разтварят в съответни количества n-хептан.

С подготовката на пробата съобразно раздел 6.3.3, количеството n-heptane, което следва да се добави към материала на пробата в колбата, се изчислява чрез претегляне, а остатъкът се разтваря.

Приблизително 1 ml от разтвора на пробата се пълни в ампула съобразно раздел 5.16.

6.5. Хроматографско определяне на триглицерид

С високите температури до 350 °C за отмиване на дългата верига триглицериди C52-C56, лесно се появява увеличение на основната стойност, по-специално ако в началото колоните не са били адекватно поставени. Това увеличение на основната стойност при високи температури може да бъде изцяло предотвратено чрез комбинирането на две колони или изваждането на основната стойност.

За компенсиращия начин или работата с единични колони, както и за стъклените вложки в инжектора и в детектора, следва да бъдат използвани графитните уплътнения съобразно раздел 5.5.

6.5.1. Коригиране на основната стойност

За да се избегне увеличаване на основната стойност, се използва един от следните

четири метода:

6.5.1.1. Комбиниране на колони

Две обвити колони се използват по компенсиращ се начин.

6.5.1.2. Коригиране на основната стойност чрез газовия хроматограф

Увеличаването на основната стойност може да се избегне чрез прилагане на серия от газовия хроматограф без инжектиране на разтвор мазнина и последващо извличане на натрупаната основна стойност.

6.5.1.3. Коригиране на основната стойност чрез софтуер за интеграция

Увеличаването на основната стойност може да се избегне чрез прилагане на серия от интеграционната система без инжектиране на разтвор мазнина и последващо извличане на натрупаната основна стойност.

6.5.1.4. Коригиране на основната стойност с подходящо предварително третиране

С адекватното първоначално поставяне на колоната и приблизително 20 инжекции с разтвори на млечна мазнина, увеличаването на основната стойност при високи температури е често толкова малко, че коригиранията на основната стойност не са необходими.

6.5.2. Техника за инжектиране

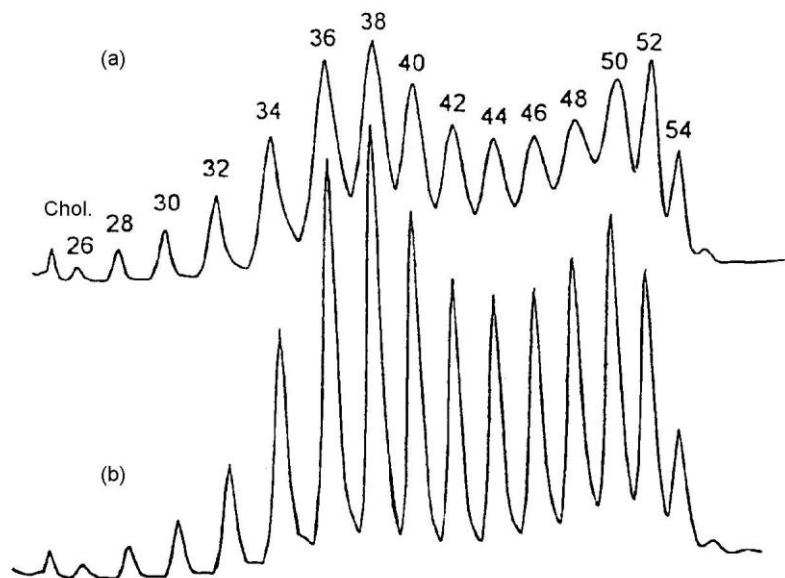
За да се избегнат дискриминиращи ефекти, техниката на „гореща инжекция” се прилага за постигането на по-добри количествени резултати с триглицеридните компоненти, кипящи при високи температури. Тук, разтворът на мазнината е изтеглен в спринцовката и студената игла на спринцовката е затоплена преди инжектирането за приблизително три секунди в инжекторния блок. След това, съдържанието на спринцовката се инжектира бързо.

Бележка: С тази техника за инжектиране се намалява рискът от фракциониране вътре в спринцовката или инжекционния блок. Не се прилага директно инжектиране „върху колоната” в горната, разширена нагрята част на колоната, тъй като парчетата на преградата, които се събират тук, както и замърсяванията могат лесно да бъдат елиминирани с използваната техника чрез регулярно сменяне на инжекторната вложка, без да се демонтира колоната.

Извиването на края на иглата, причинено от докосване дъното на бехеровата чаша с пробата (дори и ако едва се вижда с просто око) трябва да бъде абсолютно избягвано, с оглед да не се уврежда преградата.

фигура4

Триглицеридна хроматограма на проба от млечна мазнина



(a) bad resolution as a result of a damaged septum
 (b) good resolution

- (а) лошо разтваряне в резултат на повреждане на преградата
 (б) добро разтваряне

6.5.3. Предварително третиране на обвита колона

По време на стъпките от (а) до (в), върхът на колоната не е свързан с детектора, за да се избегне замърсяване.

Напълните колони съобразно раздел 6.2 се третират, както следва:

- (а) 15 min с 40 ml/min N_2 -струя при 50 °C;
- (б) загряване с 1 K/min до 355 °C at 10ml N_2 /min;
- (в) фаза на задържане от 12 до 15 часа при 355 °C;
- (г) две инжекции от 1 μ l от разтвора на какаово масло съобразно раздел 4.10 и съответната температурна програма;
- (д) 20 инжекции от 0,5 μ l от разтвор на млечна мазнина за два до три дни съобразно раздел 6.4.

Бележка: Какаовото масло се състои почти изключително от кипящи при висока температура C50 до C56 триглицериди. Инжекцията с какаово масло служи за специално предварително третиране в този обхват на дългата верига. С кипящите при висока температура C50 до C54 триглицериди, могат да възникнат частично коефициенти на влияние до приблизително 1,20. Обичайно, с повторна инжекция на разтвор на млечна мазнина може да се очаква намаляване на първоначално високите коефициенти на влияние за C50 до C54. С триглицериди с ниско ацил-с число, коефициентите се доближават до 1. Подготвят се три двойки, съответно на напълнените колони съобразно раздел 6.2. Предварително третираните колони се проверяват, съответно с анализ на млечната мазнина за рутинно тестване.

Използва се двойката с най-добрите количествени резултати (коефициенти на влияние почти 1). Колоната не се използва с коефициенти на влияние > 1,20.

6.5.4. Калибриране

За калибрирането би следвало да бъдат определени коефициенти на влияние на съответстващите триглицериди, както и на холестерола на млечна мазнина (стандартизирана мазнина) чрез използването на стандартизираните триглицериди (поне наситените триглицериди C24, C30, C36, C42, C48 и C54, както и холестерол; още по-добре, допълнително C50 и C52). Междинните коефициенти на влияние могат да бъдат открити чрез математическа интерполация.

Всеки ден трябва да бъдат извършвани от две до три калибрирания при използване на стандартизираната мазнина. Ако се получават почти идентични резултати, количествени резултати с добро възпроизвеждане се постигат с триглицериден анализ на пробите. Стандартизираната млечна мазнина има годност от няколко месеца при максимална температура на съхранение от $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ и така може да бъде използвана като стандарт.

Бележка: Коефициентът на влияние на всяка съставка може също да бъде определен чрез използвана на стандартизирана мазнина със сертифициран триглицериден състав, такъв като CRM519 (безводна млечна мазнина), от Института за референтни материали и метрология, Geel, Белгия.

6.5.5. Температурна програма, носещ газ и други условия за триглицериден анализ
температурна програма: първоначална температура на колоната от $210\text{ }^{\circ}\text{C}$, поддържана за една минута, след това се програмира при $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ до $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ и се поддържа при крайната температура за пет минути.

Температура на детектора и инжектора: $370\text{ }^{\circ}\text{C}$, съответно.

Бележка: Температурите (първоначална температура) на детектора, инжектора и печта би следвало да бъдат поддържани на константно ниво (също и през нощта, почивните и празничните дни).

Носещ газ: азот, поток от $40\text{ ml}/\text{min}$

Бележка: Ако се използват 80 cm колони, потокът трябва да бъде най-малко $75\text{ ml}/\text{min N}_2$. Потокът на носещия газ трябва да се поддържа константен (също и през нощта, почивните и празничните дни). Потокът от носещ газ трябва да се регулира толкова точно, че C54 да се разтваря при $341\text{ }^{\circ}\text{C}$, независимо от дължината на колоната.

Времетраене на анализа: $29,3$ минути.

Обем на инжектиране: $0,5\text{ }\mu\text{l}$.

Бележка: След всяко инжектиране, спринцовката трябва се измива няколко пъти с чист хептан.

FID- условия: в съответствие с раздел 5.1

Бележка: Детекторът за йонизация на пламък се загрява в началото на всеки работен ден.

7. Интеграция, оценка и контрол на условията за измерване

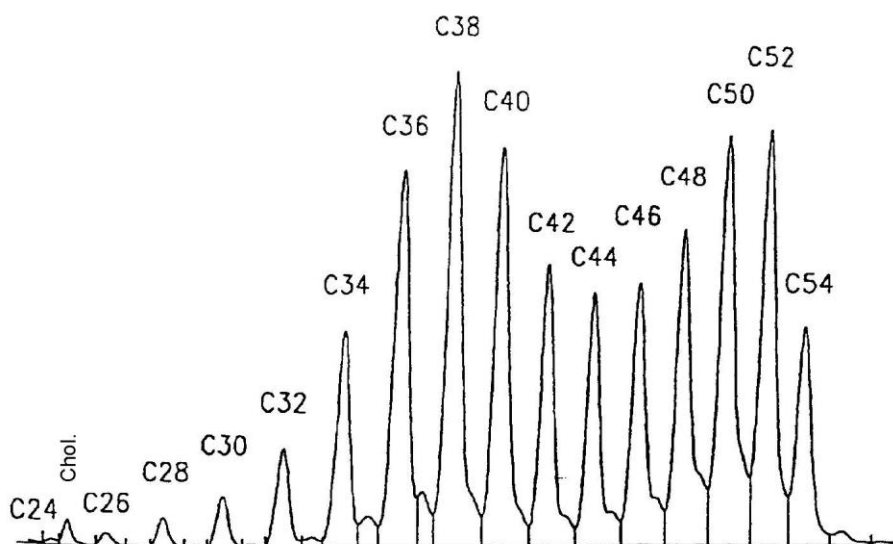
Триглицериди с нечетно ацил-с число ($2n + 1$) се комбинират с предходното по-малко четно число триглицерид ($2n$). Ниските съдържания на C56, с по-малка граница на възпроизвеждане, не се вземат под внимание. Оставащите триглицериди (пикова повърхност) в хроматограмата, включително холестерол (с пик близо до C24) се умножават със съответните коефициенти на влияние на стандартната мазнина (последно калибриране) и заедно се нормализират до 100. Освен свободният холестерол, по този начин се оценяват и триглицеридите C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 и C54. Резултатите се изразяват в тегловни проценти (г./100 г.).

Оценката на хроматограмните пикове би следвало да бъде извършвана с интегратор, с който може да бъде показвана основаната линия. Възможна е ре-интеграция с оптимизирани параметри на интеграцията.

Фигури 5 и 6 показват два примера на триглицеридни хроматограми. Фигура 5 показва хроматограма, която може да бъде оценена добре, докато фигура 6 представлява спорадична грешка в областта от C50 до C54, като основната линия се движи неправилно, в сравнение с фигура 5. Такива типични грешки могат да бъдат откривани с по-голяма сигурност, както и да бъдат избягвани, само с използването на интегратор, с който се показва основната линия.

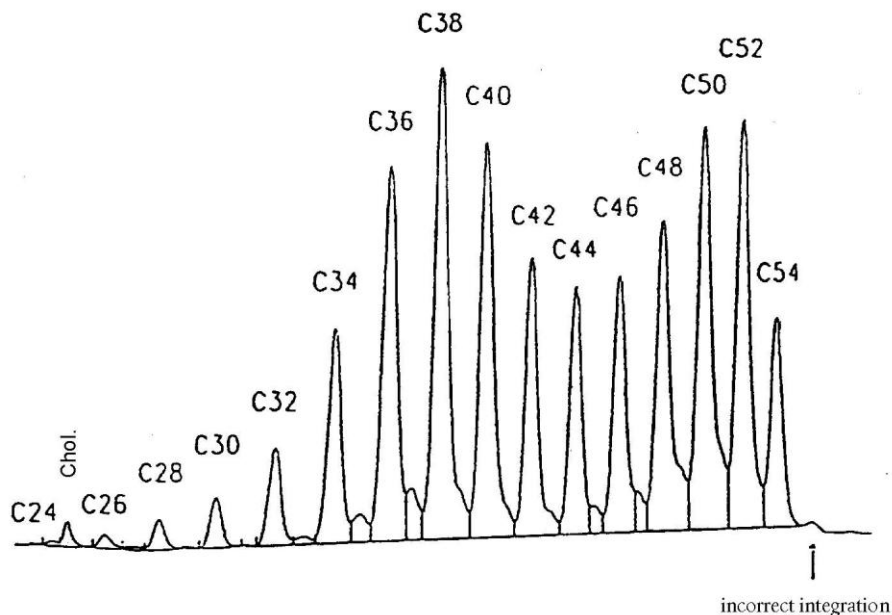
Фигура 5

Лесна за оценка триглицеридна хроматограма на млечна мазнина, с начертана основна линия



Фигура 6

Грешно интегрирана хроматограма на млечна мазнина



За контролирането на условията на измерване, за различните триглицериди могат да бъдат използвани относителните стандартни отклонения (RSD: коефициент на отклонение $\times 100$), дадени в таблица 1. Те бяха изчислени от 19 последователни анализа на една и съща млечна мазнина.

Б. пр.: incorrect integration: неправилна интеграция

Таблица 1

Относителни стандартни отклонения (RSD) на триглицеридни съдържания (n=19)

Триглицерид	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

Ако RSD-стойностите са значително по-високи от стойностите в таблица 1, то хроматографските условия не са подходящи и преградите или потокът носещ газ трябва да бъдат проверени. В допълнение, малки частици на преградата може да са образували отлагания върху стъклената вата на входа на колоната може да е станала негодна за използване в резултат на износване, температурни влияния и пр. (виж фигура 3).

Бележка: Дадените в таблица 1 стойности не са задължителни, но са индикативни за целите на качествения контрол. Ако, обаче, се приемат по-високи RSD-стойности, границите на повторемост и на възпроизвеждане, дадени в точка 11, трябва да бъдат съблюдавани.

8. Качествено откриване на чужди мазнини

За откриването на чужди мазнини бяха разработени формулите на триглицерид (таблица 2) с S-граница (таблица 3), в които S-стойностите на чистите млечни мазнини могат да варират. Ако тези граници се надвишават, то се предполага наличието на чужда мазнина.

Най-чувствителната формула за откриване прибавянето на свинска мас е, напр.:

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$$

Бележка: Чрез използването на 755 различни проби на млечна мазнина бе определен 99 %-ен обхват на сигурност на $S = 97,96 - 102,04$ за проби на чиста млечна мазнина със стандартно отклонение за всички S-стойности $SD = 0,39897$.

Изхождайки от триглицеридния състав на проба на неизвестна мазнина, такава формула позволява, без използването на компютър, да се провери по прост начин дали сумата на триглицеридните съдържания, предвидени тук със съответните коефициенти, попада извън обхвата от 97,96 - 102,04 и дали, по всяка вероятност, става въпрос за прибавяне на чужда мазнина.

Таблица 2 показва различни триглицеридни формули за откриването на различни чужди мазнини. За откриването на соево олио, слънчогледово олио, маслиново масло, рапично олио, ленено олио, житно олио, царевично олио, олио от памук и хидрирано рибно олио, за кокосова и палмова мазнина, както и за палмово олио и

говежда лой, може да бъде използвана обща формула.

Тъй като триглицеридният състав на чуждите мазнини е също предмет на вариации, бяха използвани до четири различни, експериментално измерени триглицеридни данни на чужда мазнина от един и същ тип. (Към едни и същи типове чужда мазнина е взета е предвид най-малко благоприятната граница (виж таблица 4)).

Със следната „обща формула”, за всички чужди мазнини могат да бъдат получени по подобен начин добри резултати:

$$2,7575 \cdot C_{26} + 6,4077 \cdot C_{28} + 5,5437 \cdot C_{30} - 15,3247 \cdot C_{32} + 6,2600 \cdot C_{34} + 8,0108 \cdot C_{40} - 5,0336 \cdot C_{42} + 0,6356 \cdot C_{44} + 6,0171 \cdot C_{46} = S$$

Изчисленията за откриването на всякакви комбинации на чужда мазнина в млечна мазнина показват, че напр. въпреки ниската граница с дадената в таблица 2 формула на свинска мас, а именно от 2,7 %, други мазнини като кокосова мазнина, палмово олио или палмова мазнина с граници на откриване, съответно от 26,8, 12,5 и 19,3 %, могат да бъдат открити с тази формула, само ако към млечната мазнина са добавени изключително големи количества. Това се прилага и за други формули в таблица 2.

Таблица 2

Триглицеридни формули за откриване на различни чужди мазнини в млечна мазнина, с индикиране на стандартните отклонения SD за S

Формула за соево олио, слънчогледово олио, маслиново масло, рапично олио, ленено олио, житно олио, царевично олио, олио от памук и рибно олио

$$2,0983 \cdot C_{30} + 0,7288 \cdot C_{34} + 0,6927 \cdot C_{36} + 0,6353 \cdot C_{38} + 3,7452 \cdot C_{40} - 1,2929 \cdot C_{42} + 1,3544 \cdot C_{44} + 1,7013 \cdot C_{46} + 2,5283 \cdot C_{50} = S; SD = 0,38157$$

Формула за кокосова и палмова мазнина

$$3,7453 \cdot C_{32} + 1,1134 \cdot C_{36} + 1,3648 \cdot C_{38} + 2,1544 \cdot C_{42} + 0,4273 \cdot C_{44} + 0,5809 \cdot C_{46} + 1,1226 \cdot C_{48} + 1,0306 \cdot C_{50} + 0,9953 \cdot C_{52} + 1,2396 \cdot C_{54} = S; SD = 0,11323$$

Формула за палмово олио и говежда лой

$$3,6644 \cdot C28 + 5,2297 \cdot C30 - 12,5073 \cdot C32 + 4,4285 \cdot C34 - 0,2010 \cdot C36 + 1,2791 \cdot C38 + 6,7433 \cdot C40 - 4,2714 \cdot C42 + 6,3739 \cdot C46 = S; SD = 0,81094$$

Формула за свинска мас

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S; SD = 0,39897$$

Поради това, за проверката на проба на непозната мазнина трябва да бъдат използвани всички формули, дадени в таблица 2, и общата формула (2), ако пробата по всяка вероятност е смес от млечна мазнина и една от 14 различни чужди мазнини или комбинация от тези чужди мазнини. Ако при анализирането на триглицерида на проба мазнина се получава S-стойност, която при само една от петте формули попада извън обхватите на таблица 3, то тогава пробата най-вероятно е модифицирана млечна мазнина. Откриването на чужда мазнина в млечна мазнина посредством една от четирите формули в таблица 2 не позволява да бъдат направени заключения за типа комбинация от чужди мазнини.

Таблица 3
S-граници за млечни мазнини

Формула за откриване на	Обхват на S-стойностите
соево олио, слънчогледово олио, маслиново масло, рапично олио, ленено олио, житно олио, царевично олио, олио от памук и рибно олио	98,05 — 101,95 99,42 — 100,58
кокосова и палмова мазнина	95,90 — 104,10
палмово олио и говежда лой	97,96 — 102,04
свинска мас	95,68 — 104,32
обща формула	

В таблица 4, границите на откриване за различните чужди мазнини са дадени с 99% сигурност. Първата колона показва минималните граници на откриване за най-добрата формула за млечна мазнина в таблица 2. Във втората колона са дадени

границите на откриване за общата формула. Въпреки, че границите са в известна степен по-високи, само тази формула е необходима за откриване на малко по-големи количества чужди мазнини. С всички формули могат да бъдат откривани и комбинации на различни чужди мазнини. Обхватите на вариране на триглицеридите на различни чужди мазнини от един тип нямат значително влияние върху границите на откриване.

Таблица 4

99% граници на откриване чрез прибавяне на чужда мазнина към млечна мазнина в %

	Индивидуална формула	Обща формула
Соево олио	2,1	4,4
Слънчогледово олио	2,3	4,8
маслиново масло	2,4	4,7
Кокосова мазнина	3,5	4,3
Палмово олио	4,4	4,7
Палмова мазнина	4,6	5,9
Рапично олио	2,0	4,4
Ленено олио	2,0	4,0
Житно олио	2,7	6,4
Царевично олио	2,2	4,5
Олио от памук	3,3	4,4
Свинска мас	2,7	4,7
Говежда лой	5,2	5,4
Хидрирано рибно олио	5,4	6,1

Бележка: S-обхватите се изчисляват по такъв начин, че наличието на чужда мазнина се предполага, ако границите на индивидуалната формула са надвишени (виж таблица 4).

9. Количествено определяне на чужда мазнина

С оглед да се получи количествена информация за съдържанието на чужда мазнина в проба млечна мазнина, се използва следната формула:

$$X (\%) = 100 \cdot |(100 - S)/(100 - S_F)|,$$

където:

X е количеството на неизвестна чужда мазнина или смес от чужди мазнини в непозната млечна мазнина. S резултира от прибавянето на непозната чужда мазнина чрез внасянето на триглицериди на сместа от чужди мазнини/млечна мазнина в горната триглицеридна формула. Ако към млечната мазнина се прибави

непозната чужда мазнина, средната S-стойност на различните чужди мазнини за общата формула е избрана за S_F ; тази средна S-стойност е получена чрез внасянето на триглицеридните данни на чистите чужди мазнини в тази формула и чрез изчисляването на средна стойност ($S_F = 7,46$). Добри количествени резултати за всички прибавяния на чужда мазнина се получават и чрез използване на формулата за палмово олио/говежда лой (таблица 2) и средната S_F -стойност от 10,57.

При познати типове чужда мазнина, в горната формула трябва да бъдат внесени следните S_F -стойности, като трябва да бъде избрана съответната формула за чужда мазнина от таблица 2:

Таблица 5
 S_F -стойности на различни чужди мазнини

Чужда мазнина S_F	
Соево олио	8,18
Слънчогледово олио	9,43
Маслиново масло	12,75
Кокосова мазнина	118,13
Палмово масло	7,55
Палмова мазнина	112,32
Рапично олио	3,30
Ленено олио	4,44
Житно олио	27,45
Царевично олио	9,29
Олио от памук	41,18
Свинска мас	177,55
Говежда лой	17,56
Рибно олио	64,12

10. Обхват на приложение на метода за откриване

Описаният метод се прилага към непакетирани млека и се базира на представителността на пробите млечна мазнина.

Би било възможно много специфично откриване, ако за представителен брой млечни мазнини се извеждат формули, както са описани по-горе, за различните страни.

По-конкретно, би могло да има подходящи възможности за откриването, ако формулите, както са описани тук, за различните страни са съставени от представителен брой млечни мазнини. В този случай не се изисква използването на сложни компютърни програми, ако се прилагат триглицеридните комбинации, използвани в таблица 2, и коефициентите се определят отново чрез използването на метода на най-малкия квадрат.

При прилагането на S-обхватите, както е показано в таблица 3, формулите се прилагат по принцип при конкретни условия на хранене, като например недохранване или хранене на кравите с хранителна мая или Са-сапуни. Само в случай на извънредни условия на хранене (напр. поемане на големи количества чисти мазнини в храна, използване на големи количества Са-сапуни, комбинирани с мазнина в храна и пр.), формулите показват частично наличието на модифицирана млечна мазнина.

Бележка: По принцип, фракционираните млечни мазнини се признават като немодифицирана млечна мазнина, ако модификацията се предполага само на базата на превишение на границите. Формулите показват модификация само с фракционирани млечни мазнини с необичаен състав на млечна мазнина, какъвто е напр. случаят с твърда фракция, получена с фракциониране чрез физични методи при високи температури от приблизително 30 °C и с ниски резултати от няколко процента, или с фракциониране със свръхкритичен CO₂.

Фракционирането на млечната мазнина може, обаче, да бъде открито чрез използване на други процедури, напр. диференциално-сканираща-калориметрия.

11. Точност на метода

Използваната млечна мазнина се определя на базата на формулите от таблица 2 и S-обхватите в таблица 3.

11.1. Повторяемост

Разлика на S-стойностите от две определяния, извършени в рамките на възможно най-краткия срок от един оператор при използване на същата процедура, върху идентичен материал на пробата и при същите условия (същото лице, същите инструменти/същите уреди, същата лаборатория):

Таблица 6

Граници на повторяемост (r) за различните формули

Формула за откриване на	r
соево олио, слънчогледово олио, маслиново масло, рапично олио, ленено олио, житно олио, царевично олио, олио от памук и	0,67

рибно олио	0,12
кокосова и палмова мазнина	1,20
палмово олио и говежда лой	0,58
свинска мас	1,49
обща формула	

11.2. Възпроизвеждане

Разлика на S-стойностите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории, при използване на същата процедура върху идентичен материал на пробата и при различни условия (различно лице, различни инструменти) по различно време.

Таблица 7

Граници за възпроизвеждане (R) за различните формули

Формула за откриване на	R
соево олио, слънчогледово олио, маслиново масло, рапично олио, ленено олио, житно олио, царевично олио, олио от памук и	1,08
рибно олио	0,40
кокосова и палмова мазнина	1,81
палмово олио и говежда лой	0,60
свинска мас	2,07
обща формула	

11.3. Критична разлика

Критичните разлики за всички S-обхвати на таблица 3 могат да бъдат изчислени (двойни анализи) с границите на повторяемост (r) и на възпроизвеждането (R). Съответните стойности са дадени в таблица 8.

Таблица 8

Критични разлики за всички триглицеридни формули

Формула за откриване на	обхват

соево олио, слънчогледово олио, маслиново масло, рапично олио, ленено олио, житно олио, царевично олио, олио от памук и рибно олио	97,43 — 102,57 99,14 — 100,86
кокосова и палмова мазнина	94,91 — 105,09
палмово олио и говежда лой	97,65 — 102,35
свинска мас	94,58 — 105,42
обща формула	

11.4. Приемливост на резултатите

Всички калибрирани със закръгление до втория десетичен знак триглицеридни съдържания на C24, C26, C28 до C54, както и холестерол, трябва да бъдат нормализирани точно до 100.

Резултатите на двойния анализ се използват като проверка за повторемостта. Ако абсолютната разлика между двата S-резултата за всичките пет триглицеридни формули не преминава границите на повторемост r в таблица 6, то тогава изискването за повторемост е изпълнено.

За контрол върху оптималните условия за газова хроматография, и по-специално качеството на колоната, би следвало да се гарантира, че с 10 повтарящи се серии разликата между максималната и минималната S-стойности на всичките пет триглицеридни формули няма да надвишава обхватът $x \cdot r$, като $x = 1,58$ (за 10 серии, виж позоваване (16)), и границите на повторемост r за различните формули в таблица 6.

12. Цитирани стандарти

DIN 10 336: 1994 Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse

IDF стандарт 1 C: 1987 Мляко. Определяне на съдържанието на мазнини — Röse-Gottlieb- Gravimetric-метод

IDF стандарт 16C: 1987 Сметана. Определяне на съдържанието на мазнини — Röse-Gottlieb- Gravimetric-метод

IDF стандарт 116A: 1987 Ядивен лед и смеси от лед на млечна основа. Определяне на съдържанието на мазнини— Röse-Gottlieb Gravimetric-метод

IDF стандарт 22B: 1987 Обезмаслено мляко, суроватка & мътеница. Определяне на съдържанието на мазнини— Röse-Gottlieb- Gavimetric-метод.

13. Позовавания

1. Комисия на Европейските общности: *Откриване на чужди мазнини в млечна мазнина чрез газов хроматографски триглицериден анализ*, Doc. No VI/5202/90-EN, VI/2645/91.

2. Комисия на Европейските общности: *Контрол на чистота на мазнини в масло на 100 различни проби от различни периоди на хранене от 11 ЕО-страни*; Doc. No VI/4577/93.
3. Комисия на Европейските общности: *Разглеждане на резултатите от първото, второто, третото, четвъртото, петото и шестото съвместно изпитание на: Определяне на триглицериди в млечна мазнина*; 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.: *Откриване и определяне на количеството на немлечна мазнина в смеси от млечни и немлечни мазнини*. Изследване в областта на млякото 47 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: *Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen*, 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: *Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse*. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 29-35 (1987).
7. Precht, D.: *Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143-157 (1989).
8. Precht, D.: *Schnelle Extraktion von Milchfett*, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: *Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: *Контрол на чистотата на млечна мазнина с газов хроматографски триглицериден анализ*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: *Откриване на подправена млечна мазнина чрез мастно киселинен и триглицериден анализ*. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: *Откриване на чужда мазнина в млечна мазнина. I. Количествено откриване с триглицеридови формули. II. Количествена оценка на смеси от чужди мазнини*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992).
13. Precht, D.: *Газова хроматография на триглицерини и други липиди върху обвити колони в CRC Наръчник по хроматография: Анализ на липиди*, стр. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkentin, J.: *Количествен триглицериден анализ чрез използване на къси капиларни колони*, Chrompack News 4 16-17 (1993).

15. Molquentin, J., Precht, D.: *Сравнение на обвити и капилярни колони за количествена газова хроматография на триглицериди в млечна мазнина*. Хроматография 39 (5/6) 265-270 (1994).

16. Stange, K.: *Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme*, Springer-Verlag., Berlin, P. 378 (1970).

ПРИЛОЖЕНИЕ XXVI

СПИСЪК НА РЕГЛАМЕНТИТЕ, НАЗОВАНИ В ПЪРВАТА ЧАСТ

- Регламент (ЕИО) № 1216/68 на Комисията от 9 август 1968 г. за установяването на метода за определяне на съдържанието на лактоза в смеси от хранителни продукти, внесени от трети страни¹, изменен с Регламент (ЕИО) № 222/88 на Комисията от 22 декември 1987 г. за изменение и допълнение на определени мерки за прилагането на общата пазарна организация в сектора на млякото и млечните продукти след въвеждането на Комбинираната номенклатура²;
- Регламент (ЕИО) № 3942/92 на Комисията от 22 декември 1992 г. за създаването на референтен метод за определянето на ситостерин и стигмастерол в масло за производство на маргарин³, последно изменен с Регламент (ЕО) № 175/1999 на Комисията за изменение на Регламенти (ЕИО) № 3942/92, (ЕО) № 86/94, (ЕО) № 1082/96 и (ЕО) № 459/98 за създаването на референтни методи за определянето на някои индикатори за проследяване за масло, масло за производство на маргарин и сметана⁴;
- Регламент (ЕО) № 86/94 на Комисията от 19 януари 1994 г. за създаването на референтен метод за определянето на ситостерин и стигмастерол в масло⁵, последно изменени с Регламент (ЕО) № 175/1999;
- Регламент (ЕО) № 2721/95 на Комисията от 24 ноември 1995 г. за създаването на правила за прилагането на референтни и рутинни методи за анализ и качествено оценяване на мляко и млечни продукти при общата организация на пазара⁶;
- Регламент (ЕО) № 1080/96 на Комисията от 14 юни 1996 г. за създаването на референтен метод за откриването на форми на коли бактерии в масло, обезмаслено мляко на прах и казеин /казенати⁷;
- Регламент (ЕО) № 1081/96 на Комисията от 14 юни 1996 г. за създаването на референтен метод за откриването на краве мляко и казенати в сирена, произведени от овче мляко, козе мляко или биволско мляко или смеси от овче, козе и биволско мляко и за отменяне на Регламент (ЕИО) № 690/92⁸;
- Регламент (ЕО) № 1082/96 на Комисията от 14 юни 1996 г. за създаването на референтен метод за откриването на етилов естер от бета-апо-8' каротинна киселина в концентрирано масло и масло⁹, изменен с Регламент (ЕО) № 175/1999;
- Регламент (ЕО) № 1854/96 на Комисията от 26 септември 1996 г. за създаването на списък от референтни методи, които следва да се прилагат за анализ

¹ ОВ L 198, 10.8.1968 г., стр. 13.

² ОВ L 28, 1.2.1988 г., стр. 1.

³ ОВ L 399, 31.12.1992 г., стр. 29.

⁴ ОВ L 20, 27.1.1999 г., стр. 22.

⁵ ОВ L 17, 20.1.1994 г., стр. 7.

⁶ ОВ L 283, 25.11.1995 г., стр. 7.

⁷ ОВ L 142, 15.6.1996 г., стр. 13.

⁸ ОВ L 142, 15.6.1996 г., стр. 15.

⁹ ОВ L 142, 15.6.1996 г., стр. 26.

и качествено оценяване на мляко и млечни продукти при общата организация на пазара¹⁰, изменен с Регламент (ЕО) № 881/1999¹¹;

— Регламент (ЕО) № 880/98 на Комисията от 24 април 1998 г. за създаването на референтен метод за определяне на съдържанието на вода, сухо вещество без мазнини и мазнини в масло¹²;

— Регламент (ЕО) № 1459/98 на Комисията от 8 юли 1998 г. за създаването на референтен метод за определянето на ванилин в концентрирано масло, масло или сметана¹³, последно изменен с Регламент (ЕО) № 175/1999.

¹⁰ ОВ L 246, 27.9.1996 г., стр. 5.

¹¹ ОВ 0 L 111, 29.4.1999 г., стр. 24.

¹² ОВ L 124, 25.4.1998 г., стр. 16.

¹³ ОВ L 193, 9.7.1998 г., стр. 16.