I

(Актове, приети по силата на Договорите за ЕО/Евратом, чието публикуване е задължително)

РЕГЛАМЕНТИ

РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 273/2008 НА КОМИСИЯТА

от 5 март 2008 година

за определяне на подробни правила за прилагане на Регламент (ЕО) № 1255/1999 на Съвета по отношение на методи за анализ и оценка на качеството на млякото и млечните продукти

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 продукти ([1]), и по-специално членове 10 и 15, член 26, параграф 3, член 29, параграф 1 и член 31, параграф 4 от него,

като има предвид, че:

(1) Регламент (ЕО) № 213/2001 на Комисията ([2]) определя подробни правила за прилагането на Регламент (ЕО) № 1255/1999 на Съвета по отношение на методи за анализ и оценка на качеството на млякото и млечните продукти. В светлината на продължаващото техническо развитие в областта на аналитичната методология е необходимо да бъдат направени съществени промени. За повече яснота и ефективност и като се имат предвид броят и техническото естество на измененията, е необходимо Регламент (ЕО) № 213/2001 да бъде отменен и заменен с нов 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.

(3) Референтните методи за подобни проверки често са методи, публикувани от международни организации като Европейски комитет по стандартизация (Comité européen de normalisation, CEN), Международна федерация на млякото (International Dairy Federation, IDF), Международна организация по стандартизация (International Organisation for Standardisation, ISO) и Научната асоциация за аналитични постижения (AOAC International), които редовно се обновяват 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 осигури еднакво прилагане на референтните методи, следва да се изготви списък на референтните методи и да се приемат разпоредби, позволяващи на Комисията да актуализира при необходимост този списък.

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

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

(6) Понастоящем за някои анализи няма международно признати утвърдени 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 следва да се прилагат като референтни методи.

(7) Регламент (ЕО) № 1898/2005 на Комисията ([3]) определя подробни правила за прилагането на Регламент (ЕО) № 1255/1999 на Съвета по отношение на мерките за пускане на пазара на Общността на сметана, масло и концентрирано масло и предвижда маркиране на сметана, масло и концентрирано масло при определени обстоятелства с оглед осигуряването на правилната крайна употреба на тези продукти. Маркирането е важно за правилното функциониране на схемата. За да се осигури еднакво третиране на операторите, участващи в него, следва да се определят общи методи за определяне на някои от тези маркери.

([1]) ОВ L 160, 26.6.1999 г., стр. 48. Регламент, последно изменен с Регламент (ЕО) № 1152/2007 (ОВ L 258, 4.10.2007 г., стр. 3). Регламент (ЕО) № 1255/1999 ще бъде заменен с Регламент (ЕО) № 1234/2007 (ОВ L 299, 16.11.2007 г., стр. 1), считано от 1 юли 2008 г.

([2]) ОВ L 37, 7.2.2001 г., стр. 1.

([3]) ОВ L 308, 25.11.2005 г., стр. 1. Регламент, последно изменен с Регламент (ЕО) № 1546/2007 (ОВ L 337, 21.12.2007 г., стр. 68).

(8) Съгласно член 9 от Регламент (ЕО) № 1255/1999 може да бъде предоставена помощ за частно складиране на сирена от овче мляко. Съгласно член 31 от посочения регламент може да се отпусне специално възстановяване за същите 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 в съответните продукти не е вложено краве мляко. Поради това би следвало да бъде определен референтен метод на Общността за откриване на краве мляко, без да се засяга използването на рутинни методи, при условие че те отговарят на определени критерии.

(9) Съгласно Регламент (ЕИО) № 2921/90 на Комисията от 10 октомври 1990 г. относно предоставянето на помощ за производството на казеин и казеинати от обезмаслено мляко ([1]) е необходимо да се установи липсата на форми на коли бактерии. Международно признатият референтен метод за откриване на форми на коли бактерии в мляко и млечни продукти е стандарт ISO 4831. Бе създаден референтен метод на Общността за откриване на форми на коли бактерии, базиращ се на посочения по-горе стандарт.

(10) Регламент (ЕИО) № 2658/87 на Съвета от 23 юли 1987 г. относно тарифната и статистическа номенклатура и Общата митническа тарифа ([2]) предвижда различни митнически ставки за комбинираните фуражи, 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 общопризнат метод за анализ на съдържанието на лактоза, който да се използва задължително във всички държави-членки.

(11) Съгласно Регламент (ЕО) № 1255/1999 масло и обезмаслено мляко на прах, предназначени за интервенция или в случай на обезмаслено мляко на прах — за храна за животни, трябва да отговарят на определени изисквания за качество. Би следвало да бъдат определени референтни методи за проверка на спазването на тези изисквания.

(12) Някои методи се въвеждат за първи път в настоящия регламент. Необходимо е да се предвиди достатъчен период от момента на влизане в сила на настоящия регламент, за да могат лабораториите да въведат и използват правилно тези нови методи. Когато референтен метод, посочен в приложение I, бъде изменен и след това публикуван от организацията за разработване на стандарти, лабораториите следва да разполагат с шестмесечен срок, за да актуализират аналитичните си процедури така, че да съответстват на новия стандарт.

(13) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Управителния комитет по млякото и млечните продукти,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

ГЛАВА I

ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ

Член 1

Предмет и приложно поле

1. Настоящият регламент определя някои референтни методи за химичен, физичен и микробиологичен анализ и сензорна оценка на млякото и млечните продукти, които се използват в рамките на режимите, предвидени в общата организация на пазара на мляко и млечни продукти, създадена с Регламент (ЕО) № 1255/1999, и правилата за прилагане на тези методи.

2. Списъкът на референтните методи, приложими за анализите, както е посочено в параграф 1, се съдържа в приложение I към настоящия регламент.

3. Комисията актуализира списъка в съответствие с процедурата, установена в член 42 от Регламент (ЕО) № 1255/1999.

Член 2

Рутинни методи

За анализите, които се изискват съгласно правилата на Общността, могат да бъдат използвани рутинни методи, при условие че са надлежно приведени в съответствие с референтните методи и се проверяват редовно за наличието на това съответствие. Резултатите се сравняват, като се вземат под внимание системната грешка, повторяемостта и възпроизводимостта.

В случай на спор решаващи са получените чрез референтния метод резултати.

Държавите-членки уведомяват Комисията за използването на рутинни методи в анализа, посочен в член 1.

ГЛАВА II

МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

Член 3

Оценка за съответствието на дадена партида със законно установените гранични стойности

С изключение на анализа за маркери, за определяне на съответствието със законно установените изисквания за състав се прилага приложение II към настоящия регламент.

([1]) ОВ L 279, 11.10.1990 г., стр. 22. Регламент, последно изменен с Регламент (ЕО) №1487/2006 (ОВ L 278, 10.10.2006 г., стр. 8).

([2]) ОВ L 256, 7.9.1987 г., стр. 1. Регламент, последно изменен с Регламент (ЕО) № 1352/2007 на Комисията (ОВ L 303, 21.11.2007 г., стр. 3).

Член 4

Сензорна оценка

1. За мляко и млечни продукти, различни от масло за публично складиране, като референтен метод за сензорна оценка държавите-членки използват IDF стандарт 99C:1997 или други сравними методи, за което се уведомява Комисията.

Процедурите, описани в приложение III, се използват за проверка на работата на оценителите и надеждността на резултатите от сензорните анализи.

2. За масло за публично складиране се прилагат процедурите, описани в приложение III, за проверка на работата на оценителите и надеждността на резултатите от сензорните анализи.

Процедурата, описана в приложение IV, се прилага като референтен метод за сензорна оценка.

Член 5

Маркери за проследяване

1. Методът за анализ, определен в приложение V, се използва като референтен метод за определяне на съдържанието на триглицерид на енантовата киселина в масло, млечна мазнина (butteroil) и сметана.

2. Методът за анализ, определен в приложение VI, се използва като референтен метод за определяне на ванилин в концентрирано масло, масло и сметана.

3. Методът за анализ, определен в приложение VII, се използва като референтен метод за определяне на етилов естер с бета-апо-8' съдържание на каротинова киселина в концентрирано масло и масло.

4. Методът за анализ, определен в приложение VIII, се използва като референтен метод за определяне на съдържание на β-ситостерин или стигмастерол в масло и концентрирано масло.

5. Концентрираното масло, маслото и сметаната се считат за проследени съобразно съответните правила на Общността, ако получените резултати са в съответствие със спецификациите в точки 10 и 11 от приложение V и точка 8 от приложения VI, VII и VIII.

Член 6

Откриване на казеин в краве мляко

1. Референтният метод за анализ, определен в приложение IX, 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, не съдържа казеин от краве мляко.

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

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

а) границата на откриване е максимум 0,5 %, и

б) няма фалшиви положителни резултати, и

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

Ако някое от горните изисквания не е спазено, следва да се използва референтният метод, определен в приложение IX.

Член 7

Откриване на форми на коли бактерии

За откриване на форми на коли бактерии в масло, обезмаслено мляко на прах, казеин и казеинати се използва референтният метод, описан в приложение X.

Член 8

Определяне на съдържанието на лактоза

Методът за определяне на съдържанието на лактоза в продукти, попадащи под код по КН 2309, се определя в съответствие с референтния метод, определен в приложение XI.

Член 9

Откриване на сирищна суроватка

1. Наличието на сирищна суроватка в обезмаслено мляко на прах, предназначено за публично складиране, се открива в съответствие с референтния метод, определен в приложение XII.

2. Наличието на сирищна суроватка в обезмаслено мляко на прах и смеси, предназначени за използване като храна за животни, се открива в съответствие с референтния метод, определен в приложение XII. При откриване на сирищна суроватка се прилага приложение XIII.

Член 10

Откриване на мътеница

Наличието на мътеница в обезмаслено мляко на прах се открива в съответствие с референтния метод, определен в приложение XIV.

Член 11

Откриване на антибиотични утайки

Наличието на антибиотични утайки в обезмаслено мляко на прах се открива в съответствие с референтния метод, определен в приложение XV.

Член 12

Определяне на съдържанието на обезмаслено мляко на прах

Съдържанието на обезмаслено мляко на прах в смеси от комбинирани фуражи се определя в съответствие с референтния метод, определен в приложение XVI.

Член 13

Откриване на скорбяла

Наличието на скорбяла в обезмаслено мляко на прах, денатурирано мляко на прах и смеси от комбинирани фуражи следва да се определя съгласно референтния метод, описан в приложение XVII.

Член 14

Определяне на съдържанието на влага в суха сметана

Съдържанието на влага в суха сметана се определя в съответствие с референтния метод, определен в приложение XVIII.

Член 15

Определяне на съдържанието на влага в кисела мътеница на прах

Съдържанието на влага в кисела мътеница на прах, предназначена за използване в храни за животни, се определя в съответствие с референтния метод, определен в приложение XIX.

Член 16

Определяне на чистотата на млечната мазнина

Чистотата на млечната мазнина се определя в съответствие с референтния метод, определен в приложение XX.

ГЛАВА III

ОБЩИ И ЗАКЛЮЧИТЕЛНИ РАЗПОРЕДБИ

Член 17

Гарантиране на качеството

Анализите се извършват в лаборатории, разполагащи с аналитична система за гарантиране на качеството, включваща вътрешни процедури за контрол на качеството. Лабораториите, които не са акредитирани, участват в системи за професионално тестване най-малко веднъж годишно, а резултатите им не следва да се отклоняват с повече от $2\sigma_R$ (стандартно отклонение при възпроизводимост на референтния метод) от съгласуваната стойност. Подробно описание на използваните системи трябва да бъде на разположение в лабораторията за извършването на справки.

Лаборатории, акредитирани съгласно стандартите, посочени в член 12 от Регламент (ЕО) № 882/2004 на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 година относно официалния контрол, провеждан с цел осигуряване на проверка на съответствието със законодателството в областта на фуражите и храните и правилата за опазване здравето на животните и хуманното отношение към животните [1], са освободени от задължението за участие в професионално тестване.

Член 18

Вземане на проби и оспорвания на резултатите от анализите

1. Вземането на проби се извършва съгласно съответната правна уредба за разглеждания продукт. Ако не са налице никакви разпоредби относно вземане на проби, се прилагат разпоредбите на ISO 707|IDF 50, Мляко и млечни продукти — Методи за вземане на проби.

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

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

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

5. Ако производителят 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, партидата трябва да бъде приета.

Член 19

Преходен период

Оценката на съответствието съгласно приложение II към настоящия регламент се извърша в рамките на 12 месеца след влизането му в сила. Държавите-членки незабавно уведомяват Комисията при необходимост за всеки съществен проблем, възникнал в рамките на този период в областта на процедурата за статистически контрол.

Член 20

Отмяна

Регламент (ЕО) № 213/2001 се отменя.

Позоваванията на отменения регламент се считат за позовавания на настоящия регламент и следва да се четат в съответствие с таблицата на съответствие в приложение XXII.

[1] ОВ L 165, 30.4.2004 г., стр. 1.

Член 21

Влизане в сила

Настоящият регламент влиза в сила на третия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Той се прилага от 31 март 2008 г.

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

Съставено в Брюксел на 5 март 2008 година.

За Комисията
Mariann FISCHER BOEL
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

(член 1)

СПИСЪК НА РЕФЕРЕНТНИТЕ МЕТОДИ

Индекс мин. = минимум, макс. = максимум, приложение = приложение към цитирания регламент, СВБМ = сухо вещество без мазнини, ПЧ = пероксидно число, ВВ = външен вид, В = вкус, К = консистенция, ОБЧ = общо бактериално число, Терм. = термофилно бактериално число, ДЧ = държава-членка, IDF = Международна федерация на млякото, ISO = Международна организация по стандартизация, IUPAC = Международен съюз за теоретична и приложна химия, ADPI = Американски институт по млечните продукти, ПКМ = подсладено кондензирано мляко, СМС = сгъстено мляко или сметана.

ЧАСТ А

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница [1]	Референтен метод	Забележки
Регламент (ЕО) № 2771/1999 — Публично складиране	Неосолено масло	Мазнини	мин. 8 2 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Вода	до 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		СВБМ	до 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Киселинност на мазнината	1,2 mmol/100g мазнина	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		ПЧ (макс.)	0,3 meq. кислород/1 000 g мазнина	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Забележка 1
		Форми на коли бактерии	Не се откриват в 1 g	Приложение X	Забележка 3
		Немлечна мазнина	Не се открива чрез триглицериден анализ	Приложение XX	
		Стеролни маркери за проследяване	Не се открива, β-ситостерин ≤ 40 mg/kg	Приложение VIII	
		Други маркери за проследяване			
		— ванилин	Не се открива	Приложение VI	
		— етилов естер на каротинова киселина	≤ 6 mg/kg	Приложение VII	
		— триглицериди на енантова киселина	Не се открива	Приложение V	
		Сензорни характеристики	Най-малко 4 от 5 точки за външен вид, вкус и консистенция	Приложение IV	

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница (1)	Референтен метод	Забележки
		Водна дисперсия	Най-малко 4 точки	ISO 7586:1985 — IDF 112A:1989	
Регламент (ЕО) № 2771/1999 — Частно складиране	Неосолено масло	Мазнини	мин. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Вода	до 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		СВБМ	до 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
Регламент (ЕО) № 2771/1999 — Частно складиране	Осолено масло	Мазнини	мин. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Вода	до 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		СВБМ (с изключение на сол)	до 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Сол	до 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Регламент (ЕО) № 1898/2005, глава II	Неосолено масло	Мазнини	мин. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Немлечна мазнина		Приложение XX	
		Вода	до 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		СВБМ	до 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Маркери за проследяване:			
		— стероли	Виж приложение VIII	Приложение VIII	
		— ванилин	Виж приложение VI	Приложение VI	
		— етилов естер на каротинова киселина	Виж приложение VII	Приложение VII	
		— триглицериди на енантова киселина	Виж приложение V	Приложение V	
Регламент (ЕО) № 1898/2005, глава II	Осолено масло	Мазнини	мин. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Немлечна мазнина		Приложение XX	
		Вода	до 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		СВБМ (с изключение на сол)	до 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Сол	до 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Маркери за проследяване:			
		— стероли	Виж приложение VIII	Приложение VIII	
		— ванилин	Виж приложение VI	Приложение VI	

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница (1)	Референтен метод	Забележки
		— етилов естер на каротинова киселина	Виж приложение VII	Приложение VII	
		— триглицериди на енантова киселина	Виж приложение V	Приложение V	
Регламент (ЕО) № 1898/2005, глава II	Концентрирано масло	Мазнини	мин. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	
		Вода и СВБМ	до 0,2 % m/m	ISO 5536:2002|IDF 23:2002 (влага) IDF 24:1964 (СВБМ)	
		Киселинност на мазнината	1,2 mmol/100g мазнина	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		ПЧ (макс.)	0,5 meq. кислород/1 000 g мазнина	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Забележка 1
		Немлечна мазнина	Отсъствие	Приложение XX	
		Вкус	Чист		
		Мирис	Липса на странични миризми		
		Други	Липса на неутрализиращи агенти, антиоксиданти и консерванти		
		Маркери за проследяване:			
		— стероли	Виж приложение VIII	Приложение VIII	
		— ванилин	Виж приложение VI	Приложение VI	
		— етилов естер на каротинова киселина	Виж приложение VII	Приложение VII	
		— триглицериди на енантова киселина	Виж приложение V	Приложение V	
Регламент (ЕО) № 1898/2005, глава II	Сметана	Мазнини	мин. 35 % m/m	ISO 2450:1999/IDF 16 C:1987	
		Немлечна мазнина		Приложение XX	
		Маркери за проследяване:			
		— стероли	Виж приложение VIII		Забележка 2
		— ванилин	Виж приложение VI	Приложение VI	
		— етилов естер на каротинова киселина	Виж приложение VII		Забележка 2
		— триглицериди на енантова киселина	Виж приложение V	Приложение V	

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница ([1])	Референтен метод	Забележки
Регламент (ЕО) № 1898/2005, глава III	Концентрирано масло	Мазнини	мин. 96 % m/m		Забележка 2
		Немлечна мазнина		Приложение XX	
		СВБМ	до 2 % m/m		Забележка 2
		Маркери за проследяване:			
		— стигмастерол (95 % m/m)	15 g/100 kg концентрирано масло	Приложение VIII	
		— стигмастерол (85 % m/m)	17 g/100 kg концентрирано масло	Приложение VIII	
		— триглицериди на енантова киселина	10,34 kg/t концентрирано масло	Приложение V	
		— етилов естер на бутирова киселина и стигмастерол		— етилов естер на бутирова киселина — стигмастерол: приложение VIII	Забележка 2
		— етилов естер на бутирова киселина и триглицериди на енантова киселина		— етилов естер на бутирова киселина — триглицериди на енантова киселина: приложение V	Забележка 2
		лецитин (E 322)	до 0,5 % m/m		Забележка 2
		NaC1	до 0,75 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Киселинност на мазнината	1,2 mmol/100g мазнина	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		ПЧ (макс.)	до 0,5 meq. кислород/1 000 g мазнина	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Забележка 1
		Вкус	Чист		
		Мирис	Липса на странични миризми		
		Други	Липса на неутрализиращи агенти, антиоксиданти и консерванти		
Регламент (ЕО) № 1898/2005, глава IV	Неосолено масло	Мазнини	мин. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Вода	до 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		СВБМ	до 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
Регламент (ЕО) № 1898/2005, глава IV	Осолено масло	Мазнини	мин. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница (1)	Референтен метод	Забележки
		Вода	до 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		СВБМ (с изключение на сол)	до 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Сол	до 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Член 9 и раздел II от Регламент (ЕО) № 1255/1999	Сирене от овче и/или козе мляко	Краве мляко	< 1 % m/m	Приложение IX	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение I — Кисел казеин	Вода	до 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Мазнини	до 1,75 % m/m	ISO 5543:2004|IDF127:2004	
		Свободна киселинност	до 0,30 ml от 0,1 N NaOH разтвор/g	ISO 5547:1978/IDF 91:1979	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение I — Сирищен казеин	Вода	до 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Мазнини	до 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Шлака	мин. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978/IDF 90:1979	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение I — Казеинати	Вода	до 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Млечен протеин	мин. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978/IDF 92:1979	
		Мазнини и шлака	до 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Фиксирана шлака		ISO 5544:1978/IDF 89:1979	
		Шлака		ISO 5545:1978/IDF 90:1979	
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение II — Кисел казеин	Вода	до 10,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Мазнини	до 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Свободна киселинност	до 0,20 ml от 0,1 N NaOH разтвор/g	ISO 5547:1978/IDF 91:1979	
		ОБЧ (макс.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Забележка 3
		Форми на коли бактерии	Отсъствие в 0,1 g	Приложение X	Забележка 3
		Терм. (макс.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Забележки 3 и 4
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение II — Сирищен казеин	Вода	до 8,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Мазнини	до 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Шлака	мин. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978/IDF 90:1979	
		ОБЧ (макс.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Забележка 3
		Форми на коли бактерии	Отсъствие в 0,1 g	Приложение X	Забележка 3

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница (1)	Референтен метод	Забележки
		Терм. (макс.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Забележки 3 и 4
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение II — Казеинати	Вода	до 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Млечен протеин	мин. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978/IDF 92:1979	
		Мазнини и шлака	до 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004 ISO 5544:1978/IDF 89:1979 или ISO 5545:1978/IDF 90:1979	
		ОБЧ (макс.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Забележка 3
		Форми на коли бактерии	Отсъствие в 0,1 g	Приложение X	Забележка 3
		Терм. (макс.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Забележки 3 и 4
Регламент (ЕИО) № 2921/90	Приложение III — Казеинати	Вода	до 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Млечен протеин	мин. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978/IDF 92:1979	
		Мазнини	до 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Лактоза	до 1,00 % m/m	ISO 5548:2004|IDF 106:2004	
		Шлака	до 6,50 % m/m	ISO 5544:1978/IDF 89:1979 или ISO 5545:1978/IDF 90:1979	
		ОБЧ (макс.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Забележка 3
		Форми на коли бактерии	Отсъствие в 0,1 g	Приложение X	Забележка 3
		Терм. (макс.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Забележки 3 и 4
Регламент (ЕО) № 2799/1999	Комбинирани фуражи и обезмаслено мляко на прах (ОМП) (за използване в храна за животни)	Вода (кисела мътеница на прах)	до 5 % m/m	Приложение XIX	
		Протеин	31,4 % m/m (мин.) от сухото вещество без мазнини	ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
		Вода (ОМП)	до 5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Мазнини (ОМП)	до 11 % m/m	ISO 1736:2000/IDF 9C:1987	
		Сиришна суроватка (ОМП)	Отсъствие	Приложение XIII	Забележка 6
		Скорбяла (ОМП)	Отсъствие	Приложение XVII	
		Вода (смеси)	До 5 % m/m от сухото вещество без мазнини	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Мазнини (смеси)		Директива 84/4/ЕИО на Комисията (ОВ L 15, 18.1.1984 г., стр. 29)	

Регламент на Комисията	Продукт	Параметър	Граница (1)	Референтен метод	Забележки
		Сиришна суроватка (смеси)	Отсъствие	Приложение XIII	
		ОМП съдържание (на крайния продукт)	мин. 50 % m/m	Приложение XVI	
		Мазнини (в крайния продукт)	мин. 2,5 % m/m или 5 % m/m	Директива 84/4/ЕИО на Комисията (ОВ L 15, 18.1.1984 г., стр. 29)	Забележка 7
		Скорбяла (в крайния продукт)	мин. 2 % m/m	Приложение XVII	Забележка 8
		Мед (в крайния продукт)	25 ppm	Директива 78/633/ЕИО на Комисията (ОВ L 206, 26.7.1987 г., стр. 43)	
Регламент (ЕО) № 214/2001	ОМП (спрей)	Мазнини	до 1,0 % m/m	ISO 1736:2000/IDF 9C:1987	
		Протеин	31,4 % (2)m/m (мин.) от сухото вещество без мазнини	ISO 8968-1|2:2001|IDF 20-1|2:2001	
		Вода	до 3,5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Киселинност	до 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10g сухо вещество без мазнини	ISO 6091:1980/IDF 86:1981	
		Лактати	до 150 mg/100g сухо вещество без мазнини	ISO 8069:2005|IDF 69:2005	
		Фосфати	Отрицателно	ISO 11816-1:2006|IDF 155-1:2006	
		Индекс на неразтворимост	до 0,5 ml при 24 °C	ISO 8156:2005|IDF 129:2005	
		Обгорели частички	Филтър А или Б (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		ОБЧ	40 000/ g	ISO 4833:2003	Забележка 3
		Форми на коли бактерии	Отрицателно/0,1 g	Приложение X	Забележка 3
		Мътеница	Отрицателно	Приложение XIV	
		Сиришна суроватка	Отрицателно	Приложение XII	
		Кисела суроватка	Отрицателно		Забележка 2
		Антимикробни агенти		Приложение XV	

(1) Без да се засягат разпоредбите на съответния специален регламент.

(2) Минималното съдържание на протеин ще бъде 34 % към 1 септември 2009 г.

ЧАСТ Б

Референтните методи, изброени в част Б, могат да бъдат използвани за анализ на продуктите, обхванати от всеки един от регламентите, изброени в колона 1.

Регламент на Комисията	Продукт	Код по КН	Параметър	Граница	Референтен метод	Бележка
Регламент (ЕИО) № 2658/87 Регламент (ЕО) № 2535/2001 Регламент (ЕО) № 1282/2006	Мляко и сметана, неконцентрирани, нито подсладени със захар или друг подсладител	0401	Мазнина (≤ 6 % m/m)	Границите са тези, определени в описанието на кода по КН за съответния продукт, дефинирани допълнително, когато е приложимо, в Регламент (ЕИО) № 3846/87 на Комисията (ОВ L 366, 24.12.1987 г., стр. 1), част 9 от експортната номенклатура или Регламент (ЕО) № 2535/2001 (ОВ L 341, 22.12.2001 г., стр. 29)	ISO 1211:2001/IDF 1D:1996	
			Мазнина (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999/IDF 16C:1987	
	Мляко и сметана, концентрирани или с прибавка на захар или друг подсладител	0402	Мазнини (течна форма)		ISO 1737:1999/IDF 13C:1987	
			Мазнини (твърда форма)		ISO 1736:2000/IDF 9C:1987	
			Протеин		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			Захароза (нормално съдържание)		ISO 2911:2004| IDF 35:2004	
			Захароза (ниско съдържание)			Забележка 2
			Сухо вещество (ПКМ)		ISO 6734:1989/IDF 15B:1991	
			Сухо вещество (СМС)		ISO 6731:1989/IDF 21B:1987	
			Вода (мляко на прах)		ISO 5537:2004/IDF 26:2004	
			Вода (сметана на прах)		Приложение XVIII	
	Мътеница, ферментирали или подкиселени млека и сметана, концентрирани или неконцентрирани, с прибавка на захар или друг подсладител	0403	Мазнини		ISO 1211:2001/IDF 1D:1996 ISO 1736:2000/IDF 9C:1987 ISO 2450:1999/IDF 16 C:1987 ISO 7208:1999/IDF 22B:1987 ISO 8262-3:2005/IDF 124-3:2005	

Регламент на Комисията	Продукт	Код по КН	Параметър	Граница	Референтен метод	Бележка
			Протеин		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			Захароза (нормално съдържание)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Захароза (ниско съдържание)			Забележка 2
			Вода (кисела мътеница на прах)		Приложение XIX	
			Вода (сладка мътеница на прах)		ISO 5537:2004|IDF26:2004	
			Сухо вещество (други продукти)		Методи, одобрени от компетентния орган	
	Суроватка, дори концентрирана или с прибавка на захар или други подсладители; продукти от естествени съставки на млякото	0404	Мазнини		ISO 1736:2000|IDF 9C:1987 ISO 2450:1999|IDF 16C:1987 ISO 7208:1999|IDF 22B:1987	
			Протеин		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			Захароза (нормално съдържание)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Захароза (ниско съдържание)			Забележка 2
		0404 90	Протеин		ISO 8968 1|2 2001|IDF 20-1|2:2001	
			Вода		IDF 21B:1987	
			Сухо вещество		ISO 6734:1989|IDF 15B:1991	
			(Концентрирани продукти)		ISO 6731:1989|IDF 21B:1987	
	Масло и други млечни мазнини; млечни пасти за намазване	0405	Мазнина (ако ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Масло	Вода		ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
			СВБМ		ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	

Регламент на Комисията	Продукт	Код по КН	Параметър	Граница	Референтен метод	Бележка
			NaCl		ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
			Мазнина (ако > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	Млечна мазнина (butteroil)		Вода (ако мазнината е < 99 % m/m)		ISO 5536:2002|IDF 23:2002	
	Сирена и извара	0406	Мазнини		ISO 1735:2004|IDF 5:2004	
			Сухо вещество		ISO 5534:2004|IDF 4:2004	
			Сухо вещество (Рикота)		ISO 2920:2004|IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006|IDF 88:2006	
			Лактоза		ISO 5765-1|2:2002|IDF 79-1|2:2002	
Регламент (ЕИО) № 2658/87	Комбинирани фуражи	2309	Лактоза		Приложение XI	

Забележки към списъка на референтните методи на Европейския съюз:
Забележка 1: Изолиране на млечни мазнини, както е описано в ISO 1740:1991 (защита от светлина).
Забележка 2: Не е създаден референтен метод. Методи, одобрени от компетентния орган.
Забележка 3: Следва да бъде подготвена проба в съответствие с ISO 8261:2001|IDF 122:2001.
Забележка 4: Инкубация за 48 часа при температура от 55 °C; следва да се положат грижи за предотвратяване изсушаването на средата на пробата.
Забележка 5: % m/m СВБМ = % m/m сухо вещество — % m/m мазнина.
Забележка 6: Директива 84/4/ЕИО на Комисията.
Забележка 7: Регламент (ЕО) № 2799/1999 на Комисията (ОВ L 340, 31.12.1999 г., стр. 3-27).
Забележка 8: Директива 78/633/ЕИО на Комисията.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

(член 3)

ОЦЕНКА НА СЪОТВЕТСТВИЕТО НА ДАДЕНА ПАРТИДА СЪС ЗАКОННО УСТАНОВЕНИТЕ ГРАНИЧНИ СТОЙНОСТИ

1. ПРИНЦИП

В случаите, в които съответното законодателство предвижда подробни процедури за вземане на проби, се следват тези процедури. Във всички останали случаи се използва проба от най-малко три единични проби, взети на случаен принцип от партидата, подлежаща на контрол. Възможно е подготвянето на съставна проба. Полученият резултат се сравнява с установените гранични стойности чрез изчисляване на 95 % доверителен интервал като 2 x стандартно отклонение, където съответното стандартно отклонение зависи от това дали: 1. методът е валидиран посредством международно сътрудничество със стойности за σ_r и σ_R, или 2. в случай на вътрешно валидиране, е била изчислена вътрешната възпроизводимост. Този доверителен интервал в такъв случай ще се равнява на неопределеността на резултата при измерването.

2. МЕТОДЪТ Е ВАЛИДИРАН ПОСРЕДСТВОМ МЕЖДУНАРОДНО СЪТРУДНИЧЕСТВО

В такъв случай стандартното отклонение при повторяемост σ_r и стандартното отклонение при възпроизводимост σ_R са установени и лабораторията може да покаже съответствие с работните характеристики на валидирания метод.

Изчисляване на аритметичната стойност $\bar{x}$ на n пъти повторените измервания.

Изчисляване на разширената неопределеност ($k = 2$) на $\bar{x}$ като

$$U = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n}\sigma_r^2}$$

Ако крайният резултат x от измерването се изчислява с използването на формула от вида: $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$, или $x = y_1 / y_2$, трябва да се спазват обичайните процедури за съчетаване на стандартни отклонения в подобни случаи.

Партидата се преценява като несъответстваща с горната законно установена гранична стойност *UL*, ако

$$\bar{x} - U > UL$$

в противен случай се преценява като съответстваща на *UL*.

Партидата се преценява като несъответстваща с долната законно установена гранична стойност *LL*, ако

$$\bar{x} + U < LL$$

в противен случай се преценява като съответстваща на *LL*.

3. ВЪТРЕШНО ВАЛИДИРАНЕ С ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА СТАНДАРТНОТО ОТКЛОНЕНИЕ НА ВЪТРЕШНА ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

В случаите, когато се използват методи, непосочени в настоящия регламент, и не са били въведени измервания за точност, следва да се извърши вътрешно валидиране. Във формулите за изчисляване на разширената неопределеност U е необходимо да се използват стандартното отклонение на вътрешна повторяемост s_{ir} и стандартното отклонение на вътрешна възпроизводимост s_{iR} вместо съответно σ_r и σ_R.

Правилата за вземане на решение са същите като по точка 1. Ако обаче партидата се прецени като несъответстваща със законно установената гранична стойност, измерванията следва да бъдат повторени с метода, посочен в настоящия регламент, и решението да бъде взето съгласно описаното в 1.

ПРИЛОЖЕНИЕ III

(член 4)

ОЦЕНКА НА ОЦЕНИТЕЛИТЕ И НАДЕЖДНОСТТА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ СЕНЗОРНИТЕ 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. Обикновено това се извършва на няколко етапа. Резултатите за отделните характеристики на продукта се оценяват чрез използване на следната формула:

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

където:

w_I: :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 качествен обхват. w_I не би следвало да превишава 1,5 (5-точкови скали).

Б. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА „ИНДЕКСА НА ОТКЛОНЕНИЕ“

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

Следната формула се използва за оценка на резултатите:

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

където:

x_{i1}; x_{i2}: виж раздел А

$\bar{x}_{i1}$:$\bar{x}_{i2}$: 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, трябва да покриват широк качествен обхват. D_I не трябва да превишава 1,5 (5-точкови скали).

Държавите-членки трябва да съобщават за всички трудности, срещнати при прилагането на тази процедура.

Ако бъде установено, че конкретните оценители надвишават границата от 1,5 за отклонение или повторяемост, експертите на официалния орган трябва да извършат една или повече случайни повторни проверки на работата по проби, оценени от тези оценители през последните няколко седмици, или да проведат една или повече съвместни проверки с тях. Необходим е задълбочен мониторинг, за да бъде решено дали ще се използват техните услуги. Констатациите се документират и запазват като доказателство за последващи действия.

B. СРАВНЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ, ПОЛУЧЕНИ В РАЗЛИЧНИ РЕГИОНИ НА ДЪРЖАВА-ЧЛЕНКА И В РАЗЛИЧНИ ДЪРЖАВИ-ЧЛЕНКИ

Когато е приложимо, най-малко веднъж годишно трябва да бъде организиран тест за сравняване на резултатите, които са получени от оценители от различни региони. Ако се наблюдават значителни разлики, се предприемат необходимите стъпки за идентифициране на причините и получаване 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 са предмет на задълбочено проучване с цел получаването на сравними резултати.

Държавите-членки уведомяват Комисията за резултатите от тези сравнения.

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

(член 4)

СЕНЗОРНА ОЦЕНКА НА МАСЛО

1. ОБХВАТ

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

За повече подробности да се направи справка с настоящия международен IDF стандарт за мляко и млечни продукти, IDF 99 — части 1, 2, 3 за сензорната оценка.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

„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.

„Оценител“ се дефинира като лице, избрано заради способността му да извършва сензорен тест. Този вид оценител може да има ограничен опит.

„Оценител експерт“ се дефинира като лице с висока степен на сензорна чувствителност и опит в сензорната методология, което може да извършва последователни и достоверни сензорни оценки на различни продукти. Този вид оценител има добра дългосрочна сензорна памет.

„Оценка на резултатите“ означава сензорна оценка от панел чрез използване на цифрова скала. Трябва да бъде използвана номенклатура на дефектите.

„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 и за отчитане на химически състав.)

3. СТАЯ ЗА ТЕСТОВЕ

За повече подробности да се направи справка с ISO 8589 и ISO/DIS 22935—2 | IDF 99—2, част 7.

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

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

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 термостатичен контрол, така че да се осигури поддържане на постоянна температура на маслото. По време на оценяването маслото следва да бъде с температура 12 °C (± 2 °C).

4. ИЗБОР НА ОЦЕНИТЕЛИ

Оценителят трябва да е запознат с продуктите от масло и да е компетентен да извършва сензорно оценяване. Неговата/нейната компетентност се контролира редовно (най-малко веднъж годишно) от компетентния орган.

4.1. За подробности относно общи изисквания и скринингови тестове, които могат да се използват преди официалното използване на нов оценител, да се направи справка с ISO/DIS 22935—1| IDF 99—1 част 4 (набиране) и част 5.1.

От основна важност е осигуряването на непрекъснато обучение и редовното провеждане на общи сесии. За обучението на панелите да се направи справка с ISO 8586—1.

4.2. Първоначалното обучение обхваща следното:

— обща теория и практическа важност на сензорното оценяване,

— методи, скали и описание на сензорните усещания,

— откриване и разпознаване на сензорни характеристики и специфични сензорни термини,

— обучение за познания в областта на производството на масло,

— валидирани референции и проби, които да помогнат на оценителя да идентифицира специфични вкусове и интензивност на вкусове в продукта.

5. ИЗИСКВАНИЯ ЗА ПАНЕЛА

Броят на оценителите в панела не трябва да е четен, като минималният брой е трима души. Множеството оценители трябва да бъдат служители на компетентния орган или упълномощени лица, които не работят в млечната промишленост.

За цялата процедура отговаря ръководител на панела, който също може да участва в работата му.

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 се заменя в панела от друг,

— лицата трябва да се явяват навреме, 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 за след бръснене, дезодорант и т. н. и избягват храни със силен вкус (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. ПОСТИЖЕНИЯ

Всички оценители трябва да участват редовно в панели за сензорно оценяване, за да поддържат уменията си. Честотата ще зависи от обема и производството на масло и, когато е възможно, следва да бъде най-малко един панел месечно.

Старшите оценители също трябва да участват в определен брой панели всяка година и, когато е възможно, най-малко веднъж на тримесечие.

7. ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ И ПОДГОТОВКА НА ПРОБИТЕ

От основна важност е идентичността на пробите да не бъде разкривана по време на оценката, за да се избягва всяка възможна грешка. Пробите са кодирани.

Това трябва се организира преди оценяването. Необходимо е да се определят изисквания за температурата на маслото по време на транспортирането му до стаята за тестове (6 °C ± 2 °C).

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 се взема най-малко 500 g проба. По време на оценяването маслото трябва да е с температура 12 °C (± 2 °C) (за справка ISO/DIS 22935—2 | IDF 99—2, където температурата за оценяване на маслото е 14 °C ± 2 °C). На всяка цена се избягват големи отклонения от тази температура.

8. ОЦЕНКА НА СТОЙНОСТТА НА ВСЕКИ БЕЛЕГ

8.1. Сензорната оценка се извършва по отношение на следните три белега: външен вид, консистенция и вкус.

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

Консистенцията включва следните характеристики: плътност, текстура и твърдост. Способността за намазване може да се контролира чрез физически средства, ако дадена държава-членка пожелае да я провери, за да задоволи изискванията на потребителите. Комисията може да реши в бъдеще да хармонизира методологията.

Тялото е термин, препращащ към добрата плътност на продукта при консумация. Обикновено се свързва с твърдостта и способността за намазване и трябва да бъде еднородна в целия продукт. Тялото е тясно свързано с текстурата и представлява способността на продукта да стои под въздействието на собственото си тегло. То се определя от съпротивлението при рязане и може да бъде измерено механично чрез опитване в уста и опипване с пръсти.

Вкусът е характеристиката такава, каквато се усеща в устата, предимно от вкусовите папили на езика.

Мирисът е характеристика, възприемана от носа и обонянието.

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

Оценяването на маслото трябва да се отложи, ако температурата излиза извън препоръчаните граници.

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

8.3. С оглед постигането на унифициране може да е небходимо, преди началото на оценката, оценителите да оценяват заедно външния вид, консистенцията и вкуса на една или две референтни проби.

8.4. Оценките на резултатите са, както следва:

Да се направи справка с част 7 — Номенклатура и описание на критериите за оценяване.

	Максимална оценка	Изисквана оценка
Външен вид	5	4
Консистенция	5	4
Вкус/мирис	5	4

— Когато необходимата оценка не е получена, следва да бъде дадено описание на дефекта.

— Оценката, дадена от всеки оценител за всеки белег, трябва да бъде записана в контролния документ.

— Продуктът се приема или отхвърля на базата на решение, прието с мнозинство.

— Случаи, в които разликите между индивидуалните оценки за всеки белег са по-големи от 1 точка, не би следвало да възникват често (не повече от веднъж на 20 проби). В противен случай ръководителят на панела проверява компетентността на панела.

9. НАДЗОР

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

10. НОМЕНКЛАТУРА

Да се направи справка с приложената таблица 2.

11. ЗА СПРАВКА

FIL-IDF 99C:1997 Сензорно оценяване на млечни продукти чрез скала на резултатите — Референтен метод

ISO/DIS 22935 | IDF 99 Международен стандарт за мляко и млечни продукти — Сензорен анализ — части 1—3

ISO 8586—1 Сензорен анализ — Общи насоки за подбор, обучение и мониторинг на оценителите — част 1

ISO 8589 Сензорен анализ — Общи насоки за стаите за тестове

FIL-IDF 112A:1989 Масло — Определяне на стойността на водната дисперсия

Таблица 1

Оценяване на резултатите на масло

Външен вид			Консистенция			Вкус + мирис		
Точки	№ [1]	Забележки	Точки (клас на качество)	№ [1]	Забележки	Точки (клас на качество)	№ [1]	Забележки
5		*Много добър* идеален тип най-високо качество (еднакво сух)	5		*Много добра* идеален тип най-високо качество (добра способност за намазване)	5		*Много добър* идеален тип най-високо качество (абсолютно чист и фин мирис)
4		*Добър* [2] без видими дефекти	4	 17 18	*Добра* [2] твърда мека	4		*Добър* [2] без видими дефекти
3		*Задоволителен (леки дефекти)*	3		*Задоволителна (леки дефекти)*	3		*Задоволителен (леки дефекти)*
	1	воднисто, влага		14	сипкава, трошлива, на бучки		21	нечист
	2	нееднакво, двуцветно		15	тестява, мазна		22	чужд привкус
	3	неравномерно оцветено		16	лепкава		25	кисел
	4	изпъстрено като мрамор		17	твърда		27	вкус на печено вкус на прегорено
	5	на петна		18	мека		33	вкус на фураж
	6	отделяне на течна мазнина					34	стипчив, горчив
	7	прекалено оцветено					35	пресолен
	8	слаба, пореста консистенция						
2		*Незадоволителен (видими дефекти)*	2		*Незадоволителна (видими дефекти)*	2		*Незадоволителна (видими дефекти)*
	1	воднисто, влага		14	сипкава, трошлива, на бучки		21	нечист
	3	неравномерно оцветено		15	тестява, мазна		22	чужд привкус
	4	изпъстрено като мрамор		16	лепкава		23	вкиснал
	5	на петна		17	твърда		25	кисел
	6	отделяне на течна мазнина		18	мека		32	привкус на окислено, метален привкус
	10	чужди съставки					33	вкус на фураж
	11	плесенясало					34	стипчив, горчив
	12	неразтворена сол					35	пресолен
							36	тинест, застоял, гнил
							38	химически вкус
1		*Лош (големи дефекти)*	1		*Лоша (големи дефекти)*	1		*Лош (големи дефекти)*
	1	воднисто, влага		14	сипкава, трошлива, на бучки		22	чужд привкус
	3	неравномерно оцветено		15	тестява, мазна		24	сиренен, привкус на кисело сирене
	4	изпъстрено като мрамор		16	лепкава		25	кисел
	5	на петна		17	твърда		26	ферментирал
	6	отделяне на течна мазнина		18	мека		28	вкус на мухъл
	7	прекалено оцветено					29	гранясал
	9	зърнесто					30	мазен, с вкус на риба
	10	чужди съставки					31	лоен
	11	плесенясало					32	привкус на окислено, метален привкус
	12	неразтворена сол					34	стипчив, горчив
							35	пресолен
							36	тинест, застоял, гнил
							37	малцов
							38	химически вкус

[1] Таблица 2.

[2] Дефектите, включени в графа „добър“, са само много малки отклонения от идеалния тип.

Таблица 2

Таблица на дефектите на масло

I.	Външен вид
1.	воднисто, влага
2.	нееднакво, двуцветно
3.	неравномерно оцветено
4.	изпъстрено като мрамор
5.	на петна
6.	отделяне на течна мазнина
7.	прекалено оцветено
8.	слаба, пореста консистенция
9.	зърнисто
10.	чужди съставки
11.	плесенясало
12.	неразтворена сол
II.	Консистенция
14.	сипкава, трошлива, на бучки
15.	тестява, мазна
16.	лепкава
17.	твърда
18.	мека
III.	Вкус и мирис
20.	без вкус
21.	нечист ([1])
22.	чужд привкус
23.	вкиснал
24.	сиренен, привкус на кисело сирене
25.	кисел
26.	ферментирал
27.	а) вкус на печено
	б) вкус на прегорено
28.	вкус на мухъл
29.	гранясал
30.	мазен, с вкус на риба
31.	лоен
32.	а) привкус на окислено
	б) метален вкус
33.	вкус на фураж
34.	стипчив, горчив
35.	пресолен
36.	тинест, застоял, гнил
37.	малцов
38.	химически вкус

([1]) Това наименование следва да се използва възможно най-рядко и само когато дефектът не може да бъде описан по-точно.

ПРИЛОЖЕНИЕ V

(член 5)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ТРИГЛИЦЕРИД НА ЕНАНТОВАТА КИСЕЛИНА В МАСЛО, МЛЕЧНА МАЗНИНА (BUTTEROIL) И СМЕТАНА ЧРЕЗ ГАЗОВ ХРОМАТОГРАФСКИ АНАЛИЗ НА ТРИГЛИЦЕРИДИ

1. ОБХВАТ

Този метод постановява метод за определяне на съдържанието на триглицерид на енантовата киселина в масло, млечна мазнина (butteroil) и сметана.

2. ТЕРМИНИ И ДЕФИНИЦИЯ

Съдържание на енантова киселина: съдържанието на триглицерид на енантовата киселина, определено чрез процедурата, изложена в този метод.

Забележка: Съдържанието на енантова киселина се изразява в килограми на тон продукт за млечна мазнина (butteroil) и масло и в килограми на тон млечна мазнина за сметана.

3. ПРИНЦИП

Млечната мазнина се извлича от различните продукти съгласно ISO 14156 | IDF 172:2001. Количественото определяне на съдържанието на триглицерид на енантовата киселина в извлечената мазнина се извършва чрез капилярна газова хроматография (GC). Резултатът, получен за пробата, се оценява чрез съпоставяне с триглицерида на капроновата киселина като вътрешен стандарт.

Забележка: Бе установено, че трибутиринът също е задоволителен вътрешен стандарт.

4. РЕАГЕНТИ

Използват се само реагенти с признато аналитично качество.

4.1. n-хексан

4.2. Стандартен триглицерид на капроновата киселина с чистота най-малко 99 %

4.3. Стандартен триглицерид на енантовата киселина с чистота най-малко 99 %

4.4. Натриев сулфат (анхидрид) (Na_2SO_4)

5. АПАРАТУРА

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално следното:

5.1. Аналитична везна с чувствителност 1 mg

5.2. Мерителни колби с капацитет 10 ml и 20 ml

5.3. Центрофужни епруветки с капацитет 30 ml

5.4. Ротативен изпарител

5.5. Пещ, в която може да бъде поддържана температура 50 °C ± 5 °C

5.6. Филтърна хартия, средно филтриране, диаметър около 15 cm

5.7. Оборудване за газова хроматография

5.7.1. Газов хроматограф, оборудван с инжектор със/без разделяне на пробата или с колонен инжектор и пламъчно-йонизационен детектор (ПИД)

5.7.2. Колона за газов хроматограф с неподвижна фаза, която е била успешно използвана за отделяне на триглицерид (100 % диметилполисилоксан или 5 % фенил-95 % метилполисилоксан). Избира се неподвижната фаза, дължината на колоната (между 4 m и 15 m), вътрешния диаметър (между 0,22 mm и 0,50 mm) и дебелината на слоя (0,12 μm или повече), като се взема предвид лабораторният опит и използваната инжекционна система. Във всички случаи избраната колона трябва да осъществява както пълно разделяне между пика на разтворителя и триглицерида на капроновата киселина, така и разделяне до основната линия между пиковете на триглицерида на капроновата и на енантовата киселина. По-долу са изложени примери за приложими условия.

5.7.2.1. Пример за приложими условия с използване на инжектор с разделяне на пробата:

— газ носител: хелий

— входно налягане в колоната: 100 KPa

— колона: кварцова капилярна колона с дължина 12 m, вътрешен диаметър 0,5 mm, дебелина на слоя 0,1 μm

— неподвижна фаза: 100 % диметилполисилоксан или 5 % фенил-95 % диметилполисилоксан (например HT5)

— температура на колоната: първоначална температура 130 °C, поддържана в продължение на 1 минута, увеличавана с по 20 °C на минута до 260 °C, след това увеличавана с 30 °C на минута до 360 °C; поддържана в продължение на 10 минути на 360 °C

— температура на детектора: 370 °C

— температура на инжектора: 350 °C

— съотношение на разделяне 1:30

— впръскано количество от пробата: 1 μl.

5.7.2.2. Пример за приложими условия с използване на колонен инжектор:

— газ носител: водород (система на постоянен поток)

— входно налягане в колоната: 89 kPa

— колона: кварцова капилярна колона с дължина 4 m, вътрешен диаметър 0,32 mm, дебелина на слоя 0,25 μm

— неподвижна фаза: 5 % фенил, 95 % диметилполисилоксан

— температура на колоната: първоначална температура 60 °C, поддържана в продължение на 2 минути, увеличавана с 35 °C на минута до 340 °C, поддържана при тази температура в продължение на 5 минути

— температура на детектора: 350 °C

— впръскано количество от пробата: 1 μl.

5.8. Спринцовка за впръскване с капацитет 5 μl.

6. ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

Важно е лабораторията да получи проба, която да е напълно представителна и да не е била повредена или подменена по време на транспортирането или съхранението.

Вземането на проби не е част от метода, уточнен в този международен стандарт. Препоръчителен метод за вземане на проби се дава в IDF: стандарт 50C:1995 или ISO 707—1997 — Мляко и млечни продукти — Методи за вземане на проби.

7. ПРОЦЕДУРА

7.1. **Подготовка на тестовата проба и тестовата доза**

Действа се съгласно ISO 14156 | IDF 172:2001

7.1.1. *Млечна мазнина (butteroil), масло*

7.1.1.1. Разтапят се 50 g до 100g от тестовата проба в пещта (5.5)

7.1.1.2. Поставят се 0,5 g до 1,0 g натриев сулфат анхидрид (5.4) в сгъната филтърна хартия

7.1.1.3. Мазнината се филтрира през филтърната хартия, съдържаща натриев сулфат анхидрид, като филтратът се събира в бехерова чаша, държана в пещта (5.5). Когато се отцежда разтопеното масло върху филтърната хартия, да се внимава да не се изсипе и суроватка

7.1.2. *Сметана*

7.1.2.1. Тестовата проба се загрява до температура 20 °C±2 °C

7.1.2.2. Пробата се разбърква внимателно

7.1.2.3. Разрежда се подходящо количество от тестовата проба така, че да се получи 100 ml тестова доза с приблизително 4 % масов процент на мазнина.

7.1.2.4. Работи се както със сурово или с хомогенизирано мляко (вж. ISO 14156|IDF 172:2001, §8.3) за извличане на мазнината от сметаната

7.1.2.5. В мерителна колба от 10 ml (5.2) се претегля 1 g от извлечената мазнина с точност до 1 mg. Прибавя се 1 ml от разтвор 7.2.2. Долива се до 10 ml с n-хексан (4.1) и се хомогенизира

7.1.2.6. 1 ml от разтвора 7.1.1.2 се сипва в мерителна колба от 10 ml (5.2) и се разрежда до 10 ml с n-хексан (4.1)

7.2. **Приготвяне на стандартите за калибриране**

7.2.1. Разтварят се 100 mg триглицерид на енантовата киселина (4.3) в 10 ml n-хексан (4.1)

7.2.2. Разтварят се 100 mg триглицерид на капроновата киселина (4.2) в 10 ml n-хексан (4.1).

7.2.3. 1 ml от разтвор 7.2.2 се сипва в 10 ml мерителна колба (5.2). Допълва се до 10 ml с n-хексан (4.1)

7.2.4. 1 ml от разтвор 7.2.1 и 1 ml от разтвор 7.2.2 се сипват в 10 ml мерителна колба (5.2). Допълва се до 10 ml с n-хексан (4.1)

7.2.5. 1 ml от разтвор 7.2.4 се сипва в мерителна колба от 10 ml (5.2) и се допълва до 10 ml с n-хексан (4.1)

7.3. **Хроматографско определяне**

7.3.1. Впръсква се 1 µl от стандартния разтвор 7.2.5 двукратно.

7.3.2. Впръсква се по 1 µl от всеки пробен разтвор

Забележка: Ако е възприета системата с колонен инжектор, следва да се приложи по-голямо разреждане както към стандартния, така и към пробните разтвори.

7.3.3. Операция 7.3.1 се повтаря на всеки 3 проби, така че пробите да се обхванат между двойни стандартни впръсквания. Резултатите се базират на средните коефициенти на чувствителност от стандартните хроматограми

8. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

За всяка хроматограма се интегрира площта на пика, свързана с триглицеридите на енантовата киселина и на капроновата киселина.

Тези инструкции се спазват за всяка обхваната серия, т.е. за набор от обградени проби, като стандартът, двукратно впръскан непосредствено преди тях, е STD_1, а стандартът, двукратно впръскан непосредствено след тях, е STD_2.

8.1. **Калибриране**

8.1.1. Изчисляване на коефициента на чувствителност за всяко дублиране на STD_1, Rf_1(а) и Rf_1(б)

Rf_1 (а) или (б) = (Площ на пика за триглицерид на капроновата киселина/Площ на пика за триглицерид на енантовата киселина) × 100

Изчисляване на средния коефициент на чувствителност, Rf_1

$$Rf_1 = (Rf_1(а) + Rf_1(б) / 2$$

8.1.2. По същия начин се изчислява средният коефициент на чувствителност STD_2, Rf_2

8.1.3. Изчислява се средният коефициент на чувствителност Rf

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) /2$$

8.2. **Тестови проби**

За всяка хроматограма на проба, получена между STD_1 и STD_2, се изчислява съдържанието на енантова киселина C (kg/t):

C = (Площ на пика за триглицерид на енантовата киселина × Rf × 100) / (Площ на пика за триглицерид на капроновата киселина × Wt × 1 000)

където:

— Wt = тегло на взетата мазнина (g),

— 100 = обем на разтваряне за пробата,

— 1 000 = преобразуващ коефициент (от μg/g в kg/t)

За проби от масло се взема под внимание съдържанието на мазнина в маслото и се изчислява коригирана стойност на концентрация, $C_{масло}$ (kg/t масло)

$$C_{масло} = C_{мазнина} × F$$

където F е съдържанието на мазнина в маслото.

9. ТОЧНОСТ

В точка 12 са дадени подробности за междулабораторен тест съгласно ISO 5725—1 и ISO 5725—2 относно метода за точност.

Стойностите за границата на повторяемост и възпроизводимост са изразени за равнище на вероятност от 95 % и могат да не са приложими към редове и матрици на концентрация, различни от дадените.

9.1. **Повторяемост**

Абсолютните разлики между два индивидуални единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в същата лаборатория от един и същ оператор, използващ едно и също оборудване в рамките на кратък период от време, надвишават 0,35 kg/t в не повече от 5 % от случаите.

9.2. **Възпроизводимост**

Абсолютните разлики между два индивидуални единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в различни лаборатории от различни оператори, използващи различно оборудване, надвишават 0,66 kg/t в не повече от 5 % от случаите.

10. ГРАНИЦИ НА ТОЛЕРАНС: ДОЛНИ ГРАНИЦИ (СЛУЧАЙ С НЕДОСТАТЪЧНИ КОЛИЧЕСТВА)

10.1. **От маркирания продукт трябва да бъдат взети три проби за проверка на коректността на маркирането на продукта.**

10.2. **Масло и концентрирано масло**

10.2.1. Количеството за смесване е 11 kg от най-малко 95 % триглицерид на чиста енантова киселина на тон масло, т.е. 10,45 kg/t.

10.2.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 9,51 kg/t (95 % от минималния размер за смесване на триглицерид на 95 % чиста енантова киселина, еднократно определяне),

— 6,89 kg/t (70 % от минималния размер за смесване на триглицерид на 95 % чиста енантова киселина, еднократно определяне),

— използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация съответно между 9,51 kg/t и 6,89 kg/t.

10.3. **Сметана**

10.3.1. Количеството за смесване е 10 kg от най-малко 95 % триглицерид на чиста енантова киселина на тон млечна мазнина (butteroil), т.е. 9,50 kg/t маркирана млечна мазнина.

10.3.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на степента на хомогенност на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 8,60 kg/t (95 % от минималния размер за смесване на триглицерид на 95 % чиста енантова киселина, еднократно определяне).

— 6,23 kg/t (70 % от минималния размер за смесване на триглицерид на 95 % чиста енантова киселина, еднократно определяне).

— Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат, заедно с интерполация съответно между 8,60 kg/t и 6,23 kg/t.

11. ГРАНИЦИ НА ТОЛЕРАНС: ГОРНИ ГРАНИЦИ (СЛУЧАЙ С ПРЕВИШАВАНЕ НА КОЛИЧЕСТВОТО С ПОВЕЧЕ ОТ 20 %)

11.1. **От маркирания продукт трябва да бъдат взети три проби за проверка на коректността на маркирането на продукта**

11.2. **Масло и концентрирано масло**

11.2.1. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като средната стойност на тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— горната граница е 12,96 kg/t

11.3. **Сметана**

11.3.1. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като средната стойност на тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— горната граница е 11,82 kg/t.

12. ДОПЪЛНИТЕЛНА ИНФОРМАЦИЯ: СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА ТРИХЕПТАНОАТ В МАЗНИНАТА В МАСЛОТО ЧРЕЗ АНАЛИЗ НА ТРИГЛИЦЕРИДИ

Бяха проведени четири съвместни опита за определяне на съдържанието на трихептаноат в маркирано масло.

В първия кръг на тестовете участваха девет лаборатории, като не бяха дадени спецификации за това какви аналитични методи да бъдат използвани.

Във втория кръг на тестовете участваха десет лаборатории и бяха приложени 4 различни метода:

— Количествено определяне на метилхептаноат чрез използване на n-нонан или метилнонаноат като вътрешен стандарт

— Количествено определяне на трихептаноат чрез използване на трикапроат като вътрешен стандарт

— Количествено определяне на метилхептаноат чрез използване на проба/смес за калибриране

— Количествено определяне на метилхептаноат чрез използване на смес за калибриране.

Освен това при анализа на FAME бяха използвани два различни метода за метилиране (De Francesco и Christopherson & Glass).

Въз основа на получените резултати бяха избрани два метода за извършване на третия кръг от тестове:

— Количествено определяне на метилхептаноат чрез използване на n-нонан или метилнонаноат като вътрешен стандарт

— Количествено определяне на трихептаноат чрез използване на трикапроат като вътрешен стандарт.

Резултатите на 7 лаборатории показаха, че методът FAME създава по-голяма вариативност, поради което бе решено да се използва само определянето на трихептаноат като триглицерид съгласно процедурата за количествено определяне на трихептаноат чрез използване на трикапроат като вътрешен стандарт. Освен това анализът на триглицеридите трябваше да се извършва с капилярна колона.

В четвъртия кръг на тестовете бяха изпратени четири проби (А, Б, В, Г), а девет лаборатории върнаха резултати (таблици 1—2).

Две лаборатории (DE и UE) анализираха пробите с използване на метода FAME.

Поради ограничения брой лаборатории статистическото изчисляване бе извършено както върху целия обем от данни (фигури 1—2), включително резултатите от FAME, така и върху данните, получени от анализа на триглицериди

Тестове за извънредни стойности:

— проба А. Тестове по Dixon, Cochran и Grubbs на равнища 1 и 5 % показаха един лабораторен случай на извънредни стойности.

— проба Б. Тест по Grubbs на равнище 5 % показа един лабораторен случай на извънредни стойности.

— проба В. Тестове по Dixon и Grubbs на равнища 1 и 5 % показаха един лабораторен случай на извънредни стойности.

— проба Г. Тестове по Dixon и Grubbs на равнища 1 и 5 % показаха един лабораторен случай на извънредни стойности.

Случаят с извънредни стойности бе изключен от изчислението.

Съществено е да се отбележи, че резултатите, получени чрез метода FAME, никога не са били разглеждани като извънредни стойности от приложените тестове.

Параметри за точност

В таблици 1 и 2 са изложени резултатите от всички лаборатории и параметрите за точност, изчислени за приемлив брой (8) лаборатории, но които за съжаление не произтичат от един и същ аналитичен метод.

В таблици 3 и 4 са изложени резултатите, произтичащи само от триглициридния метод и съответните параметри за точност. Приемането на тези параметри е обусловено от приемането на малкия брой лаборатории (6).

На фигури 2 и 3 са показани тенденциите за Sr и SR, изчислени въз основа на 4-те проби от двата комплекта данни, описани по-горе.

В таблица 5 са изложени стойностите на Sr и SR, както и съответните групирани стойности и общи параметри r и R.

Накрая критичната разлика бе изчислена на равнище на вероятност 95 %.

Таблица 1

Статистически резултати от триглициридния метод и метода FAME*

Проба А		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на извънредните стойности	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Извънредни стойности	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Средна стойност	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Реална стойност	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr%)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Повторяемост r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Относителна повторяемост r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,23
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR%)	2,04
					Възпроизводимост R (95 %)	0,84
					Относителна възпроизводимост R %	5,71
Проба Б		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на извънредните стойности	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Извънредни стойности	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Средна стойност	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Реална стойност	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr%)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Повторяемост r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Относителна повторяемост r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,35
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR%)	2,61
					Възпроизводимост R (95 %)	0,99
					Относителна възпроизводимост R %	7,31

Таблица 2

Статистически резултати от триглициридния метод и метода FAME*

Проба В		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на извънредните стойности	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Извънредни стойности	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Средна стойност	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Реална стойност	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr%)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Повторяемост r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Относителна повторяемост r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,17
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR%)	1,82
					Възпроизводимост R (95 %)	0,47
					Относителна възпроизводимост R %	5,10

Проба Г		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на извънредните стойности	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Извънредни стойности	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Средна стойност	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Реална стойност	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Повторяемост r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Относителна повторяемост r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,24
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR %)	11,43
					Възпроизводимост R (95 %)	0,67
					Относителна възпроизводимост R %	32,00

Таблица 3

Статистически резултати от триглициридния метод и метода FAME*

Проба А		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на извънредните стойности	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Извънредни стойности	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Средна стойност	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Реална стойност	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr%)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Повторяемост r (95 %)	0,25
					Относителна повторяемост r %	2,24
					Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,13
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR%)	1,16
					Възпроизводимост R (95 %)	0,36
					Относителна възпроизводимост R %	3,25
Проба Б		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на нетипичните случаи	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Извънредни стойности	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Средна стойност	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Реална стойност	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr%)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Повторяемост r (95 %)	0,42
					Относителна повторяемост r %	3,16
					Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,33
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR%)	2,48
					Възпроизводимост R (95 %)	0,93
					Относителна възпроизводимост R %	6,94

Таблица 4

Статистически резултати от триглициридния метод

Проба В		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на извънредните стойности	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Извънредни стойности	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Средна стойност	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Реална стойност	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr%)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Повторяемост r (95 %)	0,42
					Относителна повторяемост r %	4,51
					Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,19
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR%)	2,04
					Възпроизводимост R (95 %)	0,53
					Относителна възпроизводимост R %	5,71
Проба Г		R_1	R_2	Средно	Брой избрани лаборатории след елиминиране на извънредните стойности	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Брой извънредни стойности	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Извънредни стойности	DK
					Средна стойност	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Реална стойност	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Стандартно отклонение на възпроизводимост (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Стандартно относително отклонение на повторяемост (RSDr%)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Повторяемост r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Относителна повторяемост r %	12,01
					Стандартно отклонение на възпроизводимост (SR)	0,25
					Стандартно относително отклонение на възпроизводимост (RSDR%)	11,90
					Възпроизводимост R (95 %)	0,69
					Относителна възпроизводимост R %	33,32

Таблица 5

Повторяемост и възпроизводимост (с FAME*)

	Брой	Извънредни	Повторяемост Sr (95 %)	Възпроизводимост SR (95 %)
Проба А	8	1	0,09	0,23
Проба Б	8	1	0,14	0,35
Проба В	8	1	0,14	0,17
Проба Г	8	1	0,08	0,24
Групирана стойност			0,116	0,256
			r	**R**
Групирана стойност* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40

Минимална чистота, установена за трихептаноат = 95 %

Минимална граница, установена за трихептаноат в мазнината на масло = 11 kg/t

Като се вземе предвид критичната разлика за равнище на вероятност 95 %, стойността на двата резултата следва да бъде не по-малка от:
в случай на прибавяне на 95 % чист трихептаноат 10,05 kg/t.

Повторяемост и възпроизводимост (без FAME)

	Брой лаборатории	Извънредни	Повторяемост Sr (95 %)	Възпроизводимост SR (95 %)
Проба А	6	1	0,09	0,13
Проба Б	6	1	0,15	0,33
Проба В	6	1	0,15	0,19
Проба Г	6	1	0,09	0,25
Групирана стойност			0,124	0,237
			r	**R**
Групирана стойност* 2,8			**0,347**	**0,663**

CrD95 = 0,36

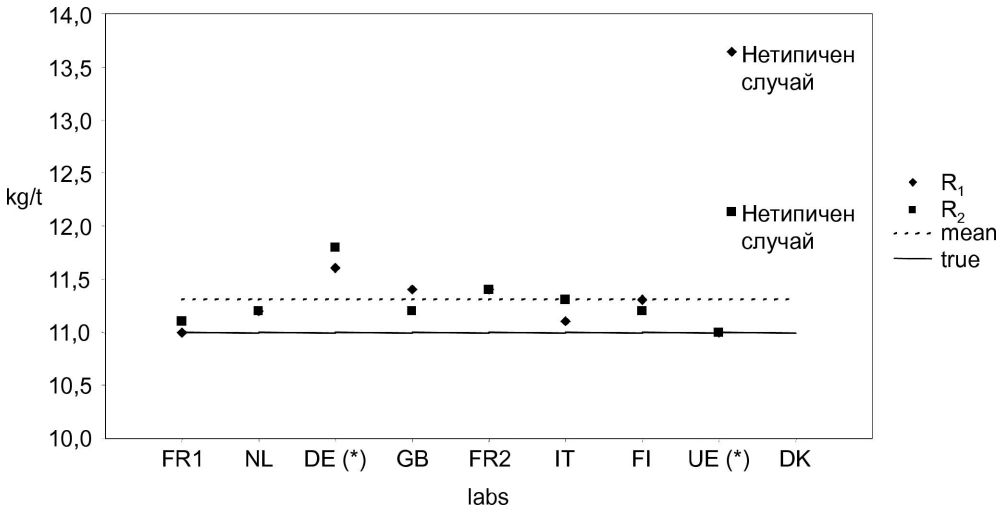
Минимална чистота, установена за трихептаноат = 95 %

Минимална граница, установена за трихептаноат в мазнината на масло = 11 kg/t

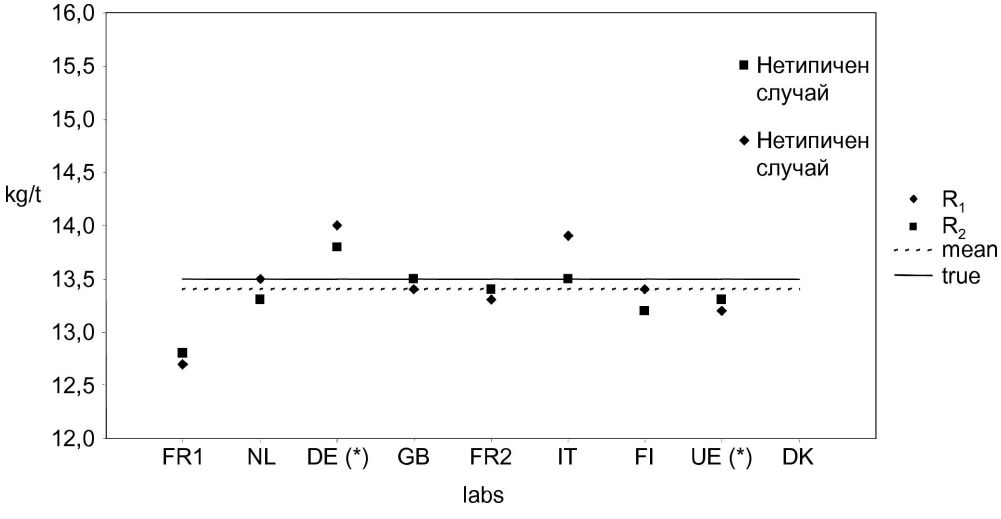
Като се вземе предвид критичната разлика за равнище на вероятност 95 %, стойността на двата резултата следва да бъде не по-малка от: в случай на прибавяне на 95 % чист трихептаноат 10,09 kg/t.

Фигура 1 (*)

Опитни резултати: проба А

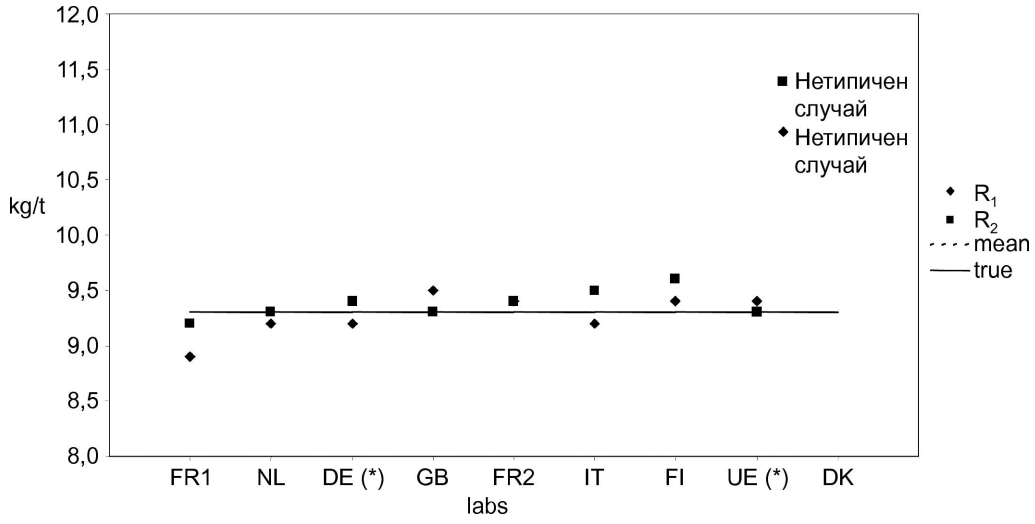


Опитни резултати: проба Б

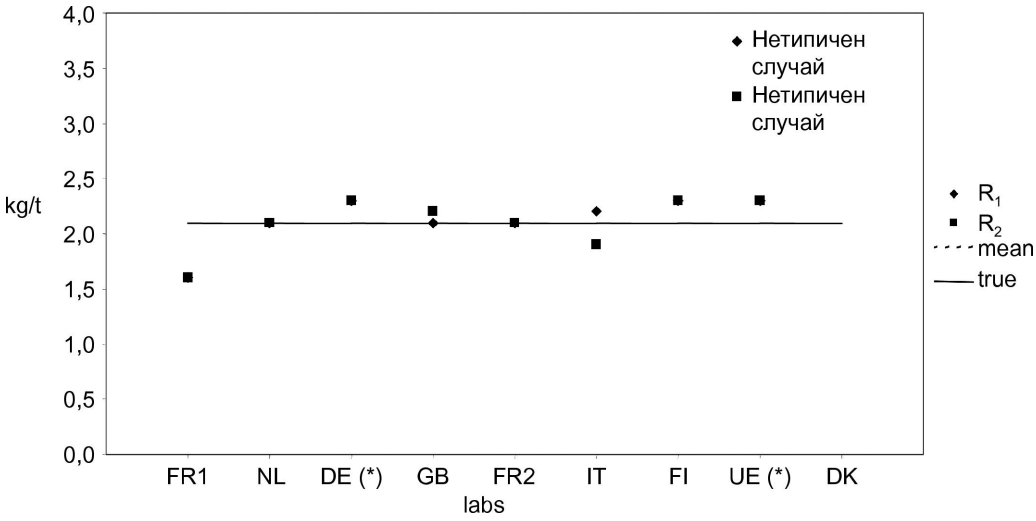


(*) Метод FAME.

Опитни резултати: проба B

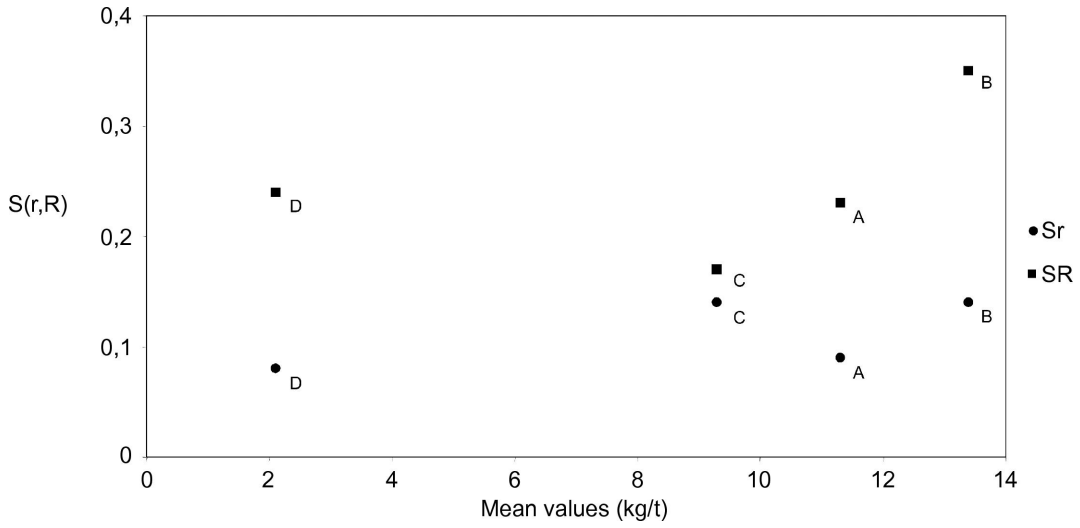


Опитни резултати: проба Г



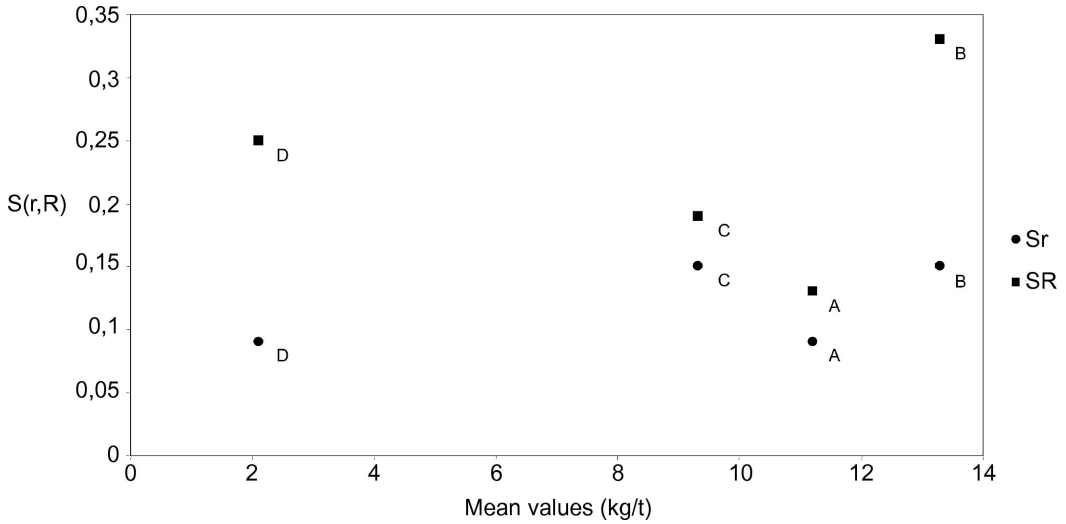
Фигура 2

Repeatability and Reproducibility standard deviation at different levels (TG+FAME)



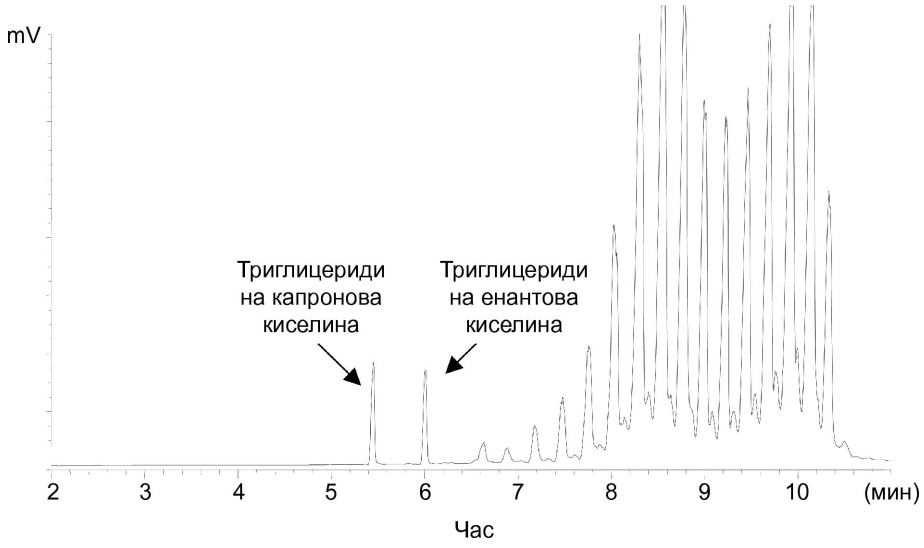
Фигура 3

Repeatability and Reproducibility standard deviation at different levels (TG)



Фигура 4

Пример с използване на колонен инжектор



ПРИЛОЖЕНИЕ VI

(член 5)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВАНИЛИН В КОНЦЕНТРИРАНО МАСЛО, МАСЛО ИЛИ СМЕТАНА ЧРЕЗ ВИСОКОЕФЕКТИВНА 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 от изопропанол/етанол/ацетонитрил (1:1:2). Утаяване на по-голямата част от мазнините чрез охлаждане между – 15 °C и – 20 °C, последвано от центрофугиране.

След разреждане с вода, определяне на съдържанието на ванилин чрез високоефективна течна хроматография (HPLC).

3. АПАРАТУРА

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално следното:

3.1. Хладилник с температура на охлаждане от – 15 °C до – 20 °C

3.2. Еднократни спринцовки с обем от 2 ml

3.3. Мембранни микрофилтри с размер на порите 0,45 µm, резистентни на разтвор, съдържащ 5 % екстрактен разтвор (4.4)

3.4. Система за течна хроматография, състояща се от помпа (поток от 1,0 ml/min), инжектор (20 µl впръскване, автоматично или ръчно), UV-детектор (функциониращ при 306 nm, 0,01 ÅU цялата скала), пишещо устройство или интегратор, и колонен термостат, функциониращ при 25 °C

3.5. Аналитична колона (250 mm × 4,6 mm ID), запълнена с LiChrospher RP 18 (Merck, 5 µm) или еквивалентен материал

3.6. Предпазна колона (около 20 mm × 3 mm ID), запълнена с LiChrospher RP 18 (от 5 до 10 µm) или еквивалентен материал

3.7. Центрофуга, работеща с 2 000 оборота в минута.

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

Смесват 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) ≥ 98 %

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

Около 50 mg (CM mg) ванилин (4.5) се претегля с точност до 0,1 mg в 100 ml мерителна колба, добавят 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 мерителна колба от 250 ml и се долива вода.

4.5.3. *Метанол с качество за HPLC*

4.5.4. *Оцетна киселина на кристали*

4.5.5. *Вода с качество за HPLC*

4.5.6. *HPLC-мобилна фаза*

300 ml метанол (4.5.3) се смесват с около 500 ml вода (4.5.5) и 20 ml оцетна киселина (4.5.4) в мерителна колба от 1 000 ml и се долива вода (4.5.5). 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 прегряване над около 30 °C. Във всички случаи маслото не бива да се разделя на две фракции. Когато пробата стане достатъчно пластична, се хомогенизира чрез разклащане. Маслото се разбърква за 15 секунди преди вземането на пробата. Около 5g (SM g) масло се претеглят с точност до 1 mg в 100 ml мерителна 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 силно бъркане. Около 4g (SM g) концентрирано масло се претегля с точност до 1 mg в 100 ml мерителна 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 °C. Тя трябва да изглежда хомогенна, в противен случай процедурата следва да бъде повторена. Около 10g (SM g) сметана се претегля с точност до 1 mg в 100 ml мерителна колба.

5.2. **Подготовка на тестовия разтвор**

Прибавят 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 поставят 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 об./мин. и веднага се прелива. Прелетият разтвор се оставя да се охлади до стайна температура. 5 ml от прелетия разтвор се капват в 100 ml мерителна колба и се долива вода. Една аликвотна част се филтрира през мембранен филтър (3.3) с помощта на спринцовка (3.2). Филтратът е готов за определяне чрез HPLC.

5.3. **Калибриране**

5 ml стандартен разтвор ванилин (4.5.2) се капват в 100 ml мерителна колба. Добавят се 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 около 30 минути. Впръсква се стандартният разтвор (5.3). Това се повтаря, докато разликата в площта на пика или височината на пика между две последователни впръсквания стане по-малка от 2 %. При описаните условия времето на задържане на ванилина е около 9 минути. Стандартният разтвор (5.3) се анализира двукратно чрез впръскване на 20 μl. Впръскват се 20 μl от тестовите разтвори (5.2). Определят се получените площ на пика или височина на пика за ванилина. Двукратното впръскване на стандартния разтвор (5.3) се повтаря след 10 впръсквания на тестови проби (5.2).

6. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Изчислява се средната площ (или височина) на пика (AC) на ванилина, свързана с обграждащите двукратни впръсквания за всяка партида от тестовите разтвори (общо четири площи или височини).

Изчислява се коефициентът на чувствителност (R):

$$R = AC / CM$$

където CM е масата на ванилина в mg (4.5.1).

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

$$C = \left|\left(AS \times 20 \times 0{,}96\right) / \left(SM \times R\right)\right|$$

където:

AS = площ или височина на пика на ванилина в тестовата проба

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

Забележка: Когато се анализира сметана за съдържание на ванилин, концентрацията на маркера трябва да бъде изразена като mg маркер/kg млечни мазнини. Това се извършва чрез умножаване на C по 100/f, където f е съдържанието на мазнини в сметаната, изразено в проценти (m/m).

20 = коефициент, който взема предвид разреждането в стандартната и в тестовата проба

0,96 = корекционен коефициент за съдържанието на мазнини в първото разреждане на тестовата проба

Забележка: Вместо площта на пика могат да бъдат използвани височините на пика (виж 8.3).

7. ТОЧНОСТ НА ПРОЦЕДУРАТА

7.1. **Повторяемост (r)**

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 тестов материал, не трябва да надвишава 16 mg/kg.

7.2. **Възпроизводимост (R)**

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на различна апаратура върху идентичен тестов материал, не може да надвишава 27 mg/kg.

8. ГРАНИЦИ НА ТОЛЕРАНС

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

8.2. Маркерите се получават или от ванилин, или от синтетичен ванилин.

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

8.2.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 220,8 mg/kg (95 % от минималния размер за смесване),

— 158,3 mg/kg (70 % от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация между 220,8 mg/kg и 158,3 mg/kg.

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

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

8.3.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 78,3 mg/kg (95 % от минималния размер за смесване),

— 53,3 mg/kg (70 % от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат, заедно с интерполация между 78,3 mg/kg и 53,3 mg/kg.

9. ЗАБЕЛЕЖКИ

9.1. Откриването на добавен ванилин в 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 %.

9.2. Стандартният разтвор съдържа 5 % екстрактен разтвор, за да се компенсира разширяването на пика, причинено от присъствието на 5 % екстрактен разтвор на тестовите проби. Това позволява количествено определяне чрез височината на пика.

9.3. Анализът се базира на нормална линия на калибриране с нулева отсечка.

9.4. Чрез използване на подходящи разреждания на стандартния разтвор (4.5.2) линейността би следвало да бъде проверена първия път, когато се извършва анализът, а след това — на редовни интервали от време и при промени или ремонтиране на оборудването за HPLC. Ванилинът може да бъде разложен до ванилинова киселина, диванилин и други съставки от вътрешните ензими в непастьоризирана сметана или продукти от такава сметана.

ПРИЛОЖЕНИЕ VII

(член 5)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕТИЛОВ ЕСТЕР НА БЕТА-АПО-8'-КАРОТИНОВА 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'-каротинова киселина (апокаротинов естер) в концентрирано масло и масло. Апо-каротинният естер е сборът 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 и абсорбцията се измерва при 440 nm. Съдържанието на апокаротинен естер се определя чрез външен стандарт.

3. АПАРАТУРА

3.1. Капкомери — градуирани, с капацитет 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 1 cm.

3.3. Мерителни колби, 20 ml и 100 ml

3.4. Аналитична везна с чувствителност от 0,1 mg, претегляща с точност 1 mg, с деления на 0,1 mg

3.5. Пещ, 45 °C ± 1 °C

3.6. Бързофилтриращи безпепелни филтри.

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:

Суспензията се загрява между 45 °C и 50 °C и се хомогенизира в неотворената оригинална опаковка. Претеглят се около 400 mg в мерителна колба (100 ml), разтварят се в 20 ml хлороформ (4.4) и обемът се допълва с циклохексан (4.5). 5 ml от този разтвор се разреждат в 100 ml циклохексан (разтвор А). 5 ml от разтвор А се разтварят до 100 ml в циклохексан. Абсорбцията се измерва при 447—449 nm (измерва се максимумът спрямо циклохексана като празна проба с използване на кювети с 1 cm оптична дължина на траекторията).

Съдържанието на апокаротинов естер P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000) / (M_{susp} \times 2\,550)$ **или** развито: $(Abs_{max} / 2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100 / M_{susp})$

Abs_{max} = максимална абсорбция на измервания разтвор

M_{susp} = маса на суспензията (g)

2 550 = референтна Abs (1 %, 1 cm) стойност

P = чистота (съдържание) на суспензията (%)

Забележка: Суспензията на апо-каротинен естер е чувствителна към въздух, топлина и светлина. В затворен, оригинален съд (запечатан в азотна среда) и на хладно място тя може да бъде съхранявана около 12 месеца. След отварянето съдържанието трябва да се използва за кратък период от време.

4.1.2. Стандартен разтвор на апо-каротинен естер, прибл. 0,2 mg/ml

Около 0,100g суспензия на апо-каротинен естер (4.1.1) (W) се измерва с точност до 1 mg и се разтваря в петролен етер (4.2); количеството се прехвърля в мерителна колба с вместимост 100 ml и се долива до маркировката с петролен етер.

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

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

4.2. Петролен етер (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 стапя в пещта при приблизително 45 °C.

5.1.2. *Масло*

Пробата се стапя в пещта при приблизително 45 °C и представителна доза от нея се филтрира през филтър, който съдържа около 10g дехидратиран натриев сулфат (4.3), в среда, защитена от силна естествена и изкуствена светлина, и при постоянно поддържана температура от 45 °C. Взема се подходящо количество мазнина.

5.2. **Определяне**

Отмерва се с точност до 1 mg приблизително 1g концентрирано масло (или извлечена мазнина от масло (5.1.2), (M). Количеството се прехвърля в 20 ml (V) мерителна колба с използване на петролен етер (4.2), допълва се до маркировката и внимателно се смесва.

Една аликвотна част се прехвърля в кювета от 1 cm и се измерва абсорбцията при 440 nm, като се сравнява с празна проба на петролен етер. Концентрацията на апо-каротинен естер в разтвора се получава чрез позоваване на графиката на стандарта (C µ/ml).

5.3. **Калибриране**

0, 0,25, 0,5, 0,75 и 1,0 ml стандартен разтвор на апо-каротинен естер (4.1.2) се капват съответно в пет 100 ml мерителни колби. Разрежда се до допълване на обема с петролен етер (4.2) и се разбърква.

Приблизителните концентрации на разтворите са в обхвата от 0 до 2 µg/ml и се изчисляват точно чрез позоваване на 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 петролен етер (4.2).

Стойностите на абсорбцията се записват в y-координатата срещу концентрацията на апо-каротинен естер в x-координатата. Изчислява се уравнението на стандартната крива.

6. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

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

Концентрирано масло: (C × V)/M

Масло: 0,82 (C × V)M

където:

C = съдържание на апо-каротинен естер, μg/ml, разчетено от графиката на калибриране (5.3)

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

M = маса (g) на тестовата доза (5.2)

0,82 = корекционен коефициент за съдържанието на мазнини в масло.

7. ТТОЧНОСТ НА ПРОЦЕДУРАТА

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 тестов материал, не трябва да надвишава 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 тестов материал, не трябва да надвишава 1,6 mg/kg

7.2. **Възпроизводимост**

7.2.1. *Анализ на масло*

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на различна апаратура върху идентичен тестов материал, не трябва да надвишава 4,7 mg/kg.

7.3. **2. Анализ на концентрирано масло**

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на различна апаратура върху идентичен тестов материал, не трябва да надвишава 5,3 mg/kg.

7.4. **Източник на данните за точност**

Данните за точност бяха определени от експеримент, проведен през 1995 г. и обхващащ 11 лаборатории и 12 маркирани проби (шест празни дублирания) за масло и 12 маркирани проби (шест празни дублирания) за концентрирано масло.

8. ГРАНИЦИ НА ТОЛЕРАНС

8.1. От маркирания продукт трябва да бъдат взети три проби за проверка на коректността на маркирането 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. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 17,7 mg/kg (95 % от минималния размер за смесване),

— 12,2 mg/kg (70 % от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация между 17,7 mg/kg и 12,2 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.

Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 19,2 mg/kg (95 % от минималния размер за смесване),

— 13,2 mg/kg (70 % от минималния размер за смесване).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация между 19,2 mg/kg и 13,2 mg/kg.

ПРИЛОЖЕНИЕ VIII

(член 5)

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, като другите ситостерини се приемат за незначителни.

2. ПРИНЦИП

Маслото или концентрираното масло се хидролизира с разтвор на калиев хидроксид и нехидролизираните съставки се извличат с диетилов етер.

Стеролите се превръщат в триметил-силил етери и се анализират чрез газова хроматография с капилярна колона, с бетулин като вътрешен стандарт.

3. АПАРАТУРА

3.1. 150 ml колба за хидролиза с обратен хладник с връзки от шлифовано стъкло

3.2. Делителни фунии от 500 ml

3.3. Колби от 250 ml

3.4. Фунии за изравняване на налягането от 250 ml или подобни за събирането на остатъка от диетиловия естер

3.5. Стъклена колона, 350 mm × 20 mm, със запушалка от синтеровано стъкло

3.6. Водна баня или кожух

3.7. Реакционни епруветки от 2 ml

3.8. Газова хроматография, подходяща за използване с капилярна колона, снабдена със система за разделяне, състояща се от:

3.8.1. термостатична камера за колони, в която може да се поддържа желаната температура с точност ± 1 °C;

3.8.2. отделение за изпаряване с настройване на температурата;

3.8.3. пламъчно-йонизационен детектор и преобразувател-усилвател;

3.8.4. интегратор-пишещо устройство, подходящ за използване с преобразувател-усилвателя (3.8.3)

3.9. Кварцова капилярна колона, изцяло обвита с BP1 или еквивалентен материал (или всякаква друга колона с най-малко същата степен на разделяне) с равномерна дебелина от 0,25 μm; колоната трябва да може да разделя триметил-силил производни на ланостерин и ситостерин. Подходяща е колона с дължина 12 m и вътрешен диаметър от 0,2 mm.

3.10. Микроспринцовка от 1 μl за газова хроматография със закалена игла

4. РЕАГЕНТИ

Всички реагенти трябва да бъдат с признато аналитично качество. Използваната вода трябва да е дестилирана или да с еквивалентна степен на чистота.

4.1. Етанол с чистота най-малко 95 %

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, най-малко 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, следва да бъде 1,0 mg/ml

4.3.1.2. Концентрацията на бетулиновия разтвор, използван за определянето на стигмастерол, следва да бъде 0,4 mg/ml

4.4. Диетилов етер с аналитична степен на чистота (без прекиси или утайки)

4.5. Натриев сулфат, дехидратиран, гранулат, 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, разяждащ и е възможно да е канцерогенен. Лабораторният персонал трябва да е запознат с данните за безопасност във връзка с TRI-SIL и да вземе необходимите предпазни мерки.)

4.7. Ланостерин

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

Забележка 1: Степента на чистота на използваните стандартни материали за калибриране трябва да бъде определена чрез използване на метода на нормализиране. Приема се, че всички стероли, налични в пробата, са представени върху хроматограмата, като общата площ на пика представлява 100 % от стеролните съставки, и че стеролите дават един и същ детекторен сигнал. Линейността на системата трябва да бъде валидирана за разглежданите равнища на концентрация.

4.8.1. Стандартен разтвор на ситостерин — 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. Стигмастерол с известна степен на чистота, с не по-малко от 90 % чисто съдържание (P)

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

4.10. Тестов разтвор за проверка на разделянето. 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 стандартен разтвор едновременно с добавянето му към хидролизираната проба (вж. 5.2.2).

5.1.1. Стандартен хроматографски разтвор на ситостерин: 1 ml стандартен разтвор на ситостерин (4.8.1) се поставя във всяка от двете реакционни епруветки (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. Стандартен хроматографски разтвор на стигмастерол: 1 ml стандартен разтвор на стигмастерол (4.9.1) се поставя във всяка от двете реакционни епруветки (3.7) и диетиловият етер се отстранява чрез струя азот. Добавя се 1 ml вътрешен стандартен разтвор (4.3.1.2) и диетиловият етер се отстранява чрез струя азот

5.2. **Подготовка на нехидролизираните съставки**

5.2.1. Пробата масло се стопява при температура, която не надвишава 35 °C и се смесва старателно 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 обратният хладник и се загрява до приблизително 75 °C за 30 минути. Обратният хладник се откача и колбата се охлажда до температура, близка до стайната.

5.2.2. В колбата се добавя 1,0 ml вътрешен стандартен разтвор (4.3.1.1), ако трябва да се определи ситостеринът или (4.3.1.2) ако трябва да се определи стигмастеролът. Смесва се старателно. Съдържанието на колбата се прехвърля 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 аликвотни части вода от по 100 ml

Забележка 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 се образува емулсия, тя може да бъде разрушена с прибавяне на 5—10 ml етанол. Ако се добавя етанол, е важно да се извършат две допълнителни енергични измивания с вода.

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

Забележка 3: Ако екстрактите от пробата бъдат напълно изсушени при прекалено висока температура, може да настъпи загуба на стерол.

5.3. **Приготвяне на триметилсилил етери**

5.3.1. Етеровият разтвор, останал в колбата, се поставя в 2 ml реакционна епруветка (3.7) заедно с 2 ml диетилов етер, след което етерът се отстранява чрез струя азот. Колбата се измива с две допълнителни аликвотни части от 2 ml диетилов етер, който се поставя в епруветката и всеки път се отстранява с азот.

5.3.2. Пробата се силилира чрез добавяне на 1 ml TRI-SIL (4.6). Епруветката се затваря и се разклаща силно, за да се разтвори. Ако разтварянето е непълно, се подгрява до 65—70 °C. Оставя се да престои най-малко пет минути преди впръскването в газовия хроматограф. Стандартите се силилират по същия начин като пробите. Тестовият разтвор за проверка на разтварянето (4.10) се силилира по същия начин като пробите.

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

5.4. **Газовохроматографски анализ**

5.4.1. *Избор на оперативни условия*

Газовият хромотограф се настройва съгласно инструкциите на производителя.

Ориентировъчните условия на работа са, както следва:

— температура на колоната: 265 °C

— температура на инжектора: 265 °C

— температура на детектора: 300 °C

— скорост на струята на газа носител: 0,6 ml/min

— налягане на водорода: 84 kPa,

— налягане на въздуха: 155 kPa

— разделяне на пробата: 10:1 до 50:1; съотношението на разделяне трябва да бъде оптимизирано съгласно инструкциите на производителя и линейността на отговора на детектора и след това да бъде валидирано за стойностите на концентрация, които ни интересуват.

Забележка 5: Изключително важно е тръбичката на инжектора да се почиства редовно.

— количество на впръсканата субстанция: 1 μl разтвор TMSE.

Преди започването на какъвто и да е анализ системата се оставя да се уравновеси и да даде удовлетворителен постоянен сигнал отговор.

Тези условия трябва да варират в светлината на характеристиките на колоната и на газовия хроматограф, така че да се получат хроматограми, които изпълняват следните условия:

— пикът на ситостерин трябва да бъде добре отделен от ланостерина. На фигура 1 е показана типична хроматограма, която следва да се получи от силилирания тестов разтвор за проверка на разделянето (4.10),

— относителното време на задържане на следните стероли следва да бъде приблизително:

холестерол: 1,0

стигмастерол: 1,3

ситостерин: 1,5

бетулин: 2,5,

— времето на задържане за бетулин следва да бъде приблизително 24 минути.

5.4.2. *Аналитична процедура*

Впръсква се 1 μl силилиран стандартен разтвор (стигмастерол или ситостерин) и се настройват параметрите за калибриране на интегратора.

Впръсква се допълнително 1 μl силилиран стандартен разтвор, за да се определят коефициентите на чувствителност по отношение на бетулина.

Впръсква се 1 μl силилиран разтвор на пробата и се измерват площите на пика. Всяка хроматографска серия трябва да бъде обграждана с впръскване на стандарти.

Като указание във всяка обградена серия следва да са включени шест впръсквания на проба.

Забележка 6: Интегрирането на пика на стигмастерол следва да включва всички размивания на пика, както са определени от точки 1, 2 и 3 на фигура 2б.

Интегрирането на ситостериновия пик би следвало да включва площта на пика на 22-дихидро-β-ситостерин (стигмастанол), който се елуира веднага след ситостерина (вж. фигура 3б), когато се оценява общото съдържание на ситостерин.

6. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

6.1. Площта на пика на стерол и на бетулин се определя в двата стандарта, обграждащи дадена партида, и се изчислява R_1:

R_1 = (средна площ на пика на стерол в стандарта)/(средна площ на пика на бетулин в стандарта)

Определя се площта на пика на стерол (стигмастерол и ситостерин) и на бетулин в пробата и се изчислява R_2:

R_2 = (площ на пика на стерол в пробата)/(площ на пика на бетулин в пробата)

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

W_2 = тегло на пробата (g) (5.2.1)

P = чистота на стандартния стерол (4.8 или 4.9)

Съдържание на стерол в пробата (mg/kg) = $((R_2) / (R_1)) \times ((W_1) / (W_2)) \times P \times 10$

7. ТОЧНОСТ НА МЕТОДА

7.1. **Масло**

7.1.1. *Повторяемост*

7.1.1.1. Стигмастерол

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 тестов 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 тестов материал, не трябва да надвишава 23,0 mg/kg

7.1.2. *Възпроизводимост*

7.1.2.1. Стигмастерол

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на различна апаратура върху идентичен тестов 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 при използване на различна апаратура върху идентичен тестов материал, не трябва да надвишава 8,7 % спрямо средната стойност от определянето.

7.1.3. *Източник на данните за точност*

Данните за точност бяха определени от експеримент, проведен през 1992 г. и обхващащ осем лаборатории и шест проби (три празни дублирания) за стигмастерол и шест проби (три празни дублирания) за ситостерин.

7.2. **Концентрирано масло**

7.2.1. *Повторяемост*

7.2.1.1. Стигмастерол

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 тестов 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 тестов материал, не трябва да надвишава 3,6 % спрямо средната стойност от определянето.

7.2.2. *Възпроизводимост*

7.2.2.1. Стигмастерол

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на различна апаратура върху идентичен тестов материал, не трябва да надвишава 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Ситостерин

Разликата между резултатите от две определяния, извършени от оператори в различни лаборатории и при използване на различна апаратура върху идентичен тестов материал, не трябва да надвишава 8,9 % спрямо средната стойност от определянето.

7.2.3. *Източник на данните за точност*

Данните за точност бяха определени от експеримент, проведен през 1991 г. и обхващащ девет лаборатории и шест проби (три празни дублирания) за стигмастерол и шест проби (три празни дублирания) за ситостерин.

8. ГРАНИЦИ НА ТОЛЕРАНС

8.1. От маркирания продукт трябва да бъдат взети три проби за проверка на коректността на маркирането на продукта.

8.2. **Масло**

8.2.1. *Стигмастерол*

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

8.2.1.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 115,8 mg/kg (95 % от минималното количество за смесване за 95 % чист стигмастерол),

— 117,7 mg/kg (95 % от минималното количество за смесване за 85 % чист стигмастерол),

— 80,1 mg/kg (70 % от минималното количество за смесване за 95 % чист стигмастерол),

— 81,5 mg/kg (70 % от минималното количество за смесване за 85 % чист стигмастерол).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация съответно между 115,8 mg/kg и 80,1 mg/kg, или 117,7 mg/kg и 81,5 mg/kg.

8.2.2. *Ситостерин*

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

8.2.2.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 482,6 mg/kg (95 % от минималното количество за смесване за 90 % чист ситостерин),

— 347,6 mg/kg (70 % от минималното количество за смесване за 90 % чист ситостерин).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация между 482,6 mg/kg и 347,6 mg/kg.

8.3. **Концентрирано масло**

8.3.1. *Стигмастерол*

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

8.3.1.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 118,5 mg/kg (95 % от минималното количество за смесване за 95 % чист стигмастерол),

— 120,4 mg/kg (95 % от минималното количество за смесване за 85 % чист стигмастерол),

— 82,9 mg/kg (70 % от минималното количество за смесване за 95 % чист стигмастерол),

— 84,3 mg/kg (70 % от минималното количество за смесване за 85 % чист стигмастерол).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация съответно между 118,5 mg/kg и 82,9 mg/kg, или 120,4 mg/kg и 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Ситостерин*

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

8.3.2.2. Резултатите от трите проби, получени от анализа на продукта, се използват за проверяване на размера и хомогенността на смесване на маркера, като най-ниският от тези резултати се сравнява със следните гранични стойности:

— 480,9 mg/kg (95 % от минималното количество за смесване за 90 % чист ситостерин),

— 345,9 mg/kg (70 % от минималното количество за смесване за 90 % чист ситостерин).

Използва се концентрацията на маркера в пробата с най-ниския резултат заедно с интерполация между 480,9 mg/kg и 345,9 mg/kg.

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.

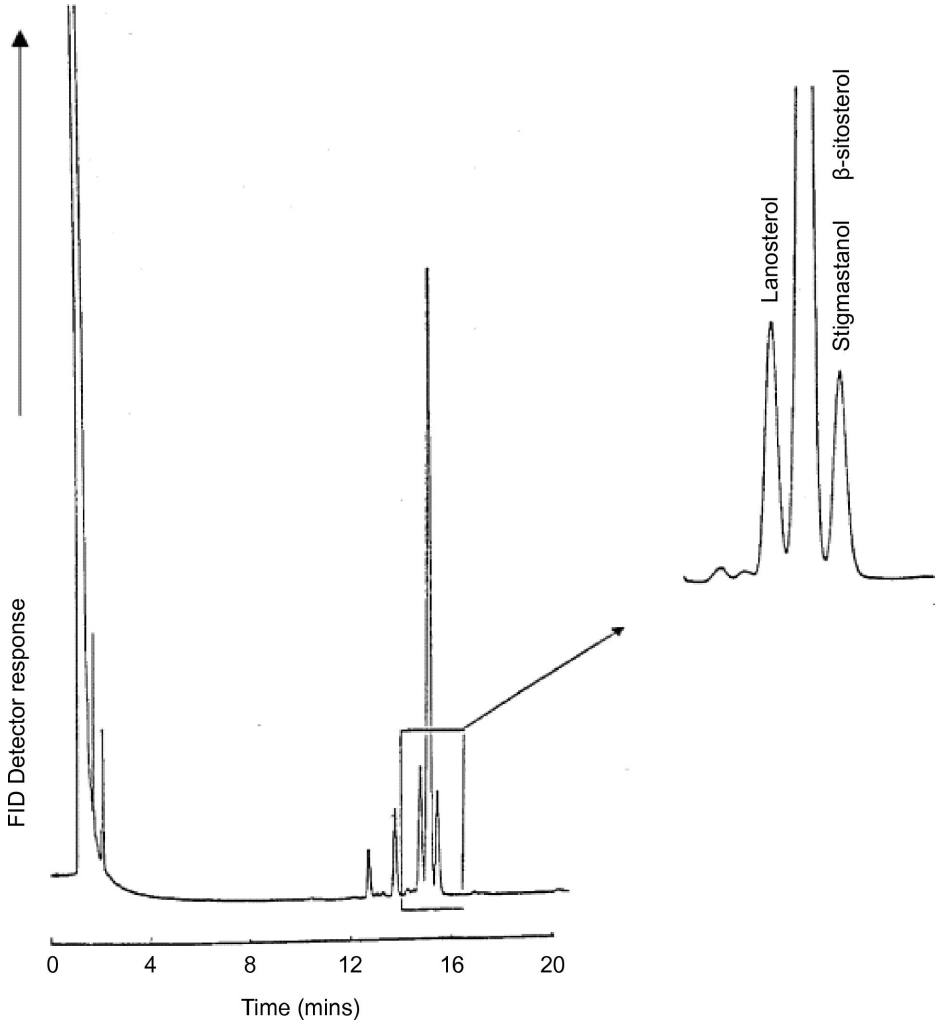


Figure 2a

Stigmasterol standard

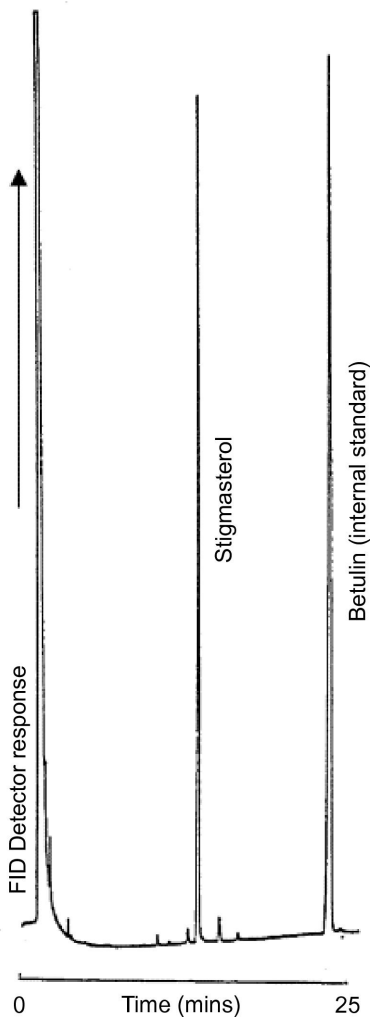
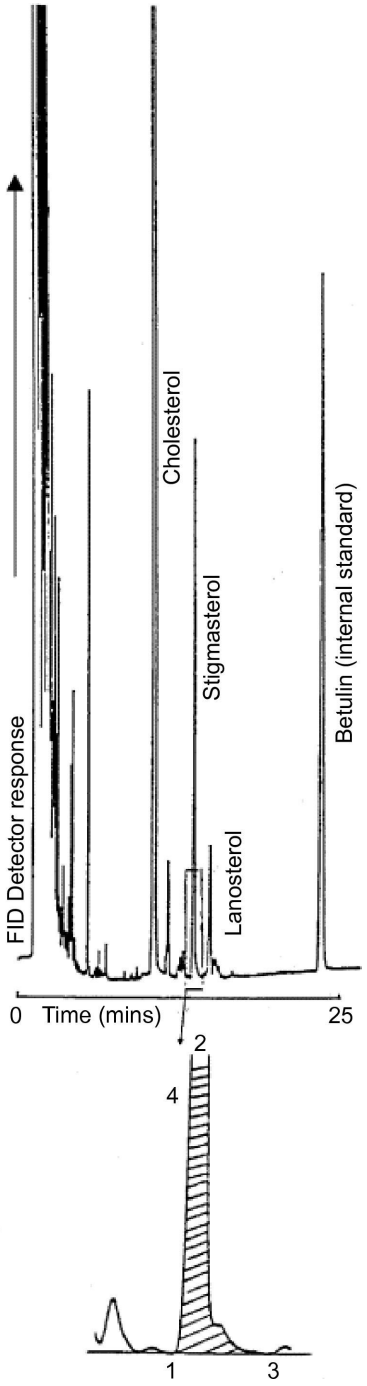


Figure 2b

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

Sistosterol standard

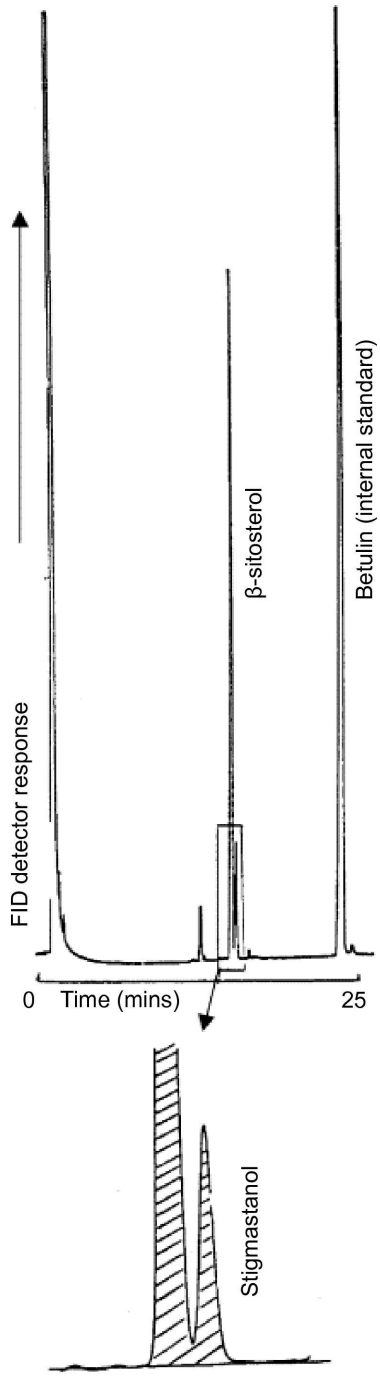
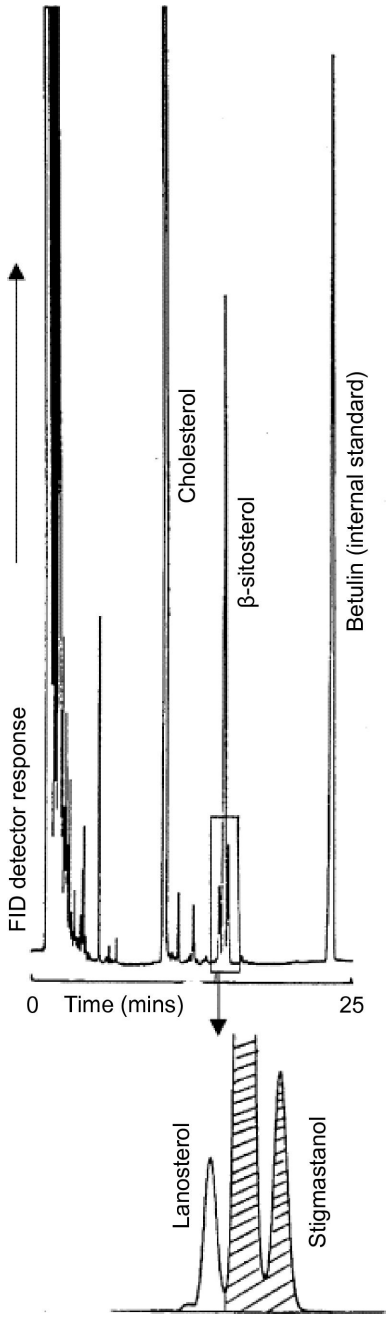


Figure 3b

Butter sample denatured with β-Sitosterol



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.

ПРИЛОЖЕНИЕ IX

(член 6)

РЕФЕРЕНТЕН МЕТОД ЗА ОТКРИВАНЕ НА КРАВЕ МЛЯКО И КАЗЕИНАТИ 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 казеинати в сирена, произведени от овче мляко, козе мляко, биволско мляко, или смеси от овче, козе и биволско мляко чрез изоелектрическо фокусиране на γ-казеини след плазминолиза.

2. ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Методът е подходящ за чувствително и специфично откриване на натурално и топлинно обработвано краве мляко и казеинати 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 откриване на подправяне на мляко и сирене чрез топлинно обработени концентрати на суроватъчен протеин от краве мляко.

3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

3.1. Изолиране на казеини от сирене и от референтните проби.

3.2. Разтваряне на изолираните казеини и разграждане чрез плазмин (ЕС.3.4.21.7).

3.3. Изоелектрическо фокусиране на обработени с плазмин казеини в присъствието на урея и оцветяване на протеините

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 с еквивалента степен на чистота.

Забележка: Указанията по-долу 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, може да е необходимо коригиране на условията за отделяне.

Изоелектрическо фокусиране

4.1. **Реагенти за получаване на полиакриламидни гелове, съдържащи урея**

4.1.1. *Основен разтвор на гел*

Разтварят се:

4,85 g акриламид

0,15 g N, N'-метиленбисакриламид (BIS)

48,05 g урея

15,00 g глицерин (87 % w/w),

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

Забележка: Вместо цитираните определени дози невротоксични акриламиди може да се използва готов разтвор акриламид/BIS, наличен в търговската мрежа. 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 μS, той се дейонизира чрез разклащане с 2 g Амберлит MB-3 за 30 минути, след това се филтрира през мембрана от 0,45 μm.

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.l).

9,0 ml основен разтвор

24 mg β-аланин

500 µl амфолит pH 3,5—9,5 [1]

250 µl амфолит pH 5—7 [1]

250 µl амфолит pH 6—8 [1].

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

Забележка: Разтворът на гел се приготвя непосредствено преди изливането му (вж. 6.2).

4.1.3. *Катализаторни разтвори*

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

4.1.3.2. 40 % w/v амониев персулфат (PER):

800 mg PER се разтварят във вода и се долива до 2 ml

Забележка: Винаги се използва прясно приготвен разтвор на PER.

4.2. **Контактна течност**

Керосин или течен парафин

4.3. **Аноден разтвор**

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

4.4. **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. *Разредена оцетна киселина (25,0 ml ледена 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 долива до 50 ml

Забележка: Съхранява се в хладилник, максимална годност — една седмица.

4.7. **Реагенти за разграждане на казеини чрез плазмин**

4.7.1. *Неутрализатор — амониев карбонат*

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

[1] Продуктите Ampholine® pH 3,5—9,5 (Pharmacia) и Resolyte® pH 5—7 и pH 6—8 (BDH, Merck) са се доказали като особено подходящи за получаване на необходимото отделяне на γ-казеини.

4.7.2. *Говежди плазмин (ЕС. 3.4.21.7) с активност най-малко 5 U/ml*

4.7.3. *Разтвор на ε-аминокапронова киселина за инхибиране на ензими*

2,624 g ε-аминокапронова киселина (6 амино-n-хексанова киселина) се разтварят в 100 ml 40 % (v/v) етанол.

4.8. **Стандарти**

4.8.1. *Сертифицирани референтни стандартни проби от смес от подсирени овче и козе обезмаслено мляко, съдържащи 0 % и 1 % краве мляко, могат да се намерят от Института за референтни материали и метрология на Комисията, B-2440 Гил, Белгия.*

4.8.2. *Подготовка на вътрешни лабораторни стандартни проби от подсирено биволско мляко, съдържащо 0 % и 1 % краве мляко*

Обезмасленото мляко се приготвя чрез центрофугиране на сурово непакетирано биволско или краве мляко при 37 °C (2 500 g, 20 минути). След бързо охлаждане на съда и съдържанието му до 6—8 °C горният слой мазнина 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 1l бехерова чаша и се постига pH 6,4 чрез прибавяне на разредена млечна киселина (10 % w/v). Температурата се довежда до 35 °C и се прибавят 100 µl телешко сирище (активност 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 съдържанието да се съсири. След образуването на съсирека цялото подсирено мляко се суши чрез сублимиране без предварително хомогенизиране или отцеждане на суроватката. След сушенето чрез сублимиране то се смила ситно на хомогенен прах. За подготовката на 0 %-на стандартна проба се извършва същата процедура с използване на натурално биволско обезмаслено мляко. Стандартните проби трябва да бъдат съхранявани при – 20 °C.

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

Реагенти за оцветяване на протеин

4.9. **Фиксатор**

150 g трихлороцетна киселина се разтварят във вода и се долива до 1 000 ml.

4.10. **Обезцветяващ разтвор**

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

Забележка: 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) ледена 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 с използване на магнитна бъркалка (приблизително 45 минути), филтрира се през два нагънати филтъра.

4.11.2. *Оцветяващ разтвор (основен разтвор 2)*

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

4.11.3. *Оцветяващ разтвор (работен разтвор)*

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

Забележка: Оцветяващият разтвор следва да бъде приготвен в деня, в който се използва.

5. ОБОРУДВАНЕ

5.1. Стъклени плочи (265 × 125 × 4 mm); каучукова ролка (ширина 15 cm); маса с регулируема височина

5.2. Лист носител на гел (265 × 125 mm)

5.3. Покривен лист (280 × 125 mm). По двете му дължини отстрани се поставя самозалепваща лента (280 × 6 × 0,25 mm) (вж. фигура 1)

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

5.5. Криостат с циркулация, термостатно контролиран на 12 ± 0,5 °C

5.6. Центрофуга, регулируема за 3 000 g

5.7. Електродни ленти (с дължина ≥ 265 mm)

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. Ножици, скалпели и пинсети от неръждаема стомана

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

5.12. Приспособим хомогенизатор (с диаметър на оста 10 mm), от 8 000 до 20 000 оборота в минута.

5.13. Магнитна бъркалка

5.14. Ултразвукова баня

5.15. Апарат за залепване на листовете

5.16. 25 µl микрокапкомери

5.17. Вакуумен концентратор или сушилня чрез сублимиране

5.18. Термостатично контролирана водна баня, регулируема за 35 и за 40 ± 1 °C с възможност за разбъркване

5.19. Денсиметър, четящ при $\lambda = 634$ nm

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. **Подготовка на проби**

6.1.1. *Изолиране на казеини*

Количество, еквивалентно на 5 g сухо вещество сирене, или референтните стандартни проби се претеглят в 100 ml центрофужна епруветка, прибавя се 60 g дестилирана вода и се хомогенизира с хомогенизатор (от 8 000 до 10 000 rpm). Регулира се до pH 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 pH 4,5 с разредена оцетна киселина (4.5.1), добавят 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 фази (вж. 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 през нагъната филтърна хартия. Утайката върху филтъра се измива с две отделни части от 25 ml ацетон и се оставя да се изсуши на въздух или в струя азот, след което се стрива на фин прах в хаван.

Забележка: Сухият изолиран казеин следва да бъде съхраняван при – 20 °C.

6.1.2. *Разграждане чрез плазмин на β-казеини за интензифициране на γ-казеини*

25 mg изолирани казеини (6.1.1) се разпръскват в 0,5 ml неутрализатор — амониев карбонат (4.7.1) и се хомогенизират за 20 минути, например чрез използване на ултразвук. Подгрява се до 40 °C и се добавя 10 µl плазмин (4.7.2), смесва се и се инкубира за един час при 40 °C с непрекъснато разклащане. За да се инхибира ензимът, се добавя 20 µl разтвор на ε-аминокапронова киселина (4.7.3), след това се добавят 200 mg твърда урея и 2 mg дитиотрейтол.

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

6.2. **Приготвяне на полиакриламидни гелове, съдържащи урея**

С помощта на няколко капки вода листът носител на гел (5.2) се разстила върху стъклена плоча (5.1), като излизащата навън вода се отстранява с хартиена салфетка. По същия начин покривният лист (5.3) с ограничители (0,25 mm) се разстила върху друга стъклена плоча. Плочата се поставя хоризонтално върху нивелирана маса.

Към приготвения и с отстранен въздух разтвор на гел (4.1.2) се добавят 10 µl Temed (4.1.3.1), разклаща се и се добавят 10 µl разтвор на PER (4.1.3.2), внимателно се смесва и веднага се излива равномерно в центъра на покривния лист. Единият край на плочата с носителя на гела (с листа надолу) се поставя върху плочата с покривния лист и плочата се сваля бавно надолу, така че между листовете да се образува и разстеле равномерно филм от гел, без да се образуват мехурчета (фигура 3). Плочата с носителя на гела се оставя внимателно да легне напълно с помощта на тънка шпатула и върху нея се поставят още три стъклени плочи за тежест. След завършването на полимеризацията (около 60 минути) полимеризираният гел върху плочата носител на гела и върху покривния лист се изважда чрез разделяне на стъклените плочи. Обратната страна на листа носител се почиства внимателно, за да се отстранят остатъците от гела и уреята. „Гел-сандвичът“ се навива и залепва на тръбичка и се съхранява в хладилник (максимум шест седмици).

Забележка: Покривният лист с ограничителите може да бъде използван повторно. Полиакриламидният гел може да бъде нарязан 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 × 5 cm).

6.3. **Изоелектрическо фокусиране**

Настройва се охлаждащият термостат на 12 °C. Обратната страна на листа носител на гел се избърсва с керосин, след това в центъра на охлаждащия блок се капват няколко капки керосин (4.2.). След това „гел-сандвичът“ се разстила върху него със страната на носителя надолу, като се внимава да не се образуват мехурчета. Излишният керосин се избърсва и покривният лист се отстранява. Електродните ленти се напояват с електродните разтвори (4.3, 4.4), изрязват се до дължината на гела и се поставят на предвидените места (разстояние на електродите 9,5 cm).

Условия за изоелектрическо фокусиране:

6.3.1. *Размер на гела 265 × 125 × 0,25 mm*

Стъпка	Време (min)	Напрежение (V)	Ток (mA)	Мощност (W)	Волтчасове (Vh)
1. Предварително фокусиране	30	максимум 2 500	максимум 15	постоянна 4	около 300
2. Фокусиране на пробата (1)	60	максимум 2 500	максимум 15	постоянна 4	около 1 000
3. Окончателно фокусиране	60	максимум 2 500	максимум 5	максимум 20	около 3 000
	40	максимум 2 500	максимум 6	максимум 20	около 3 000
	30	максимум 2 500	максимум 7	максимум 25	около 3 000

(1) Поставяне на пробата: след предварителното фокусиране (стъпка 1) върху апликаторите на проби (10 × 5 mm) се капват 18 µl от пробата и от стандартните разтвори, поставят се върху гела на разстояние 1 mm един от друг и на 5 mm надлъжно от анода и се притискат леко. Извършва се фокусирането при горните условия, като апликаторите на проби се отстраняват внимателно след 60 минути фокусиране.

Забележка: Ако плътността или ширината на геловете се променят, 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. *Пример за програмиране на автоматично устройство за електрофореза (2 гела с размери 5,0 × 4,5 cm); електродите без ленти се поставят направо върху гела*

Стъпка	Напрежение	Ток	Мощност	Температура	Волтчасове
1. Предварително фокусиране	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Фокусиране на пробата	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

В стъпка 2 апликаторът на пробата се поставя на 0 Vh.

В стъпка 2 апликаторът на пробата се отстранява при 30 Vh.

6.4. **Оцветяване на протеин**

6.4.1. *Фиксиране на протеин*

Електродните ленти се отстраняват веднага след изключване на захранването и гелът незабавно се поставя в съд за оцветяване/обезцветяване, пълен с 200 ml фиксатор (4.9); оставя се за 15 минути, като непрекъснато се разклаща.

6.4.2. *Изливане и оцветяване на плочата с гел*

Фиксаторът се отцежда внимателно и плочата с гел се измива два пъти за по 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 плочата с гел*

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

Забележка 1: Фиксирането, измиването, оцветяването и обезцветяването се извършват при 20 °C. Не се използват високи температури.

Забележка 2: Ако се предпочита по-чувствително оцветяване със сребро (напр. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code No 17—1150—01), пробите от казеин, третирани с плазмин, следва да бъдат разредени до 5 mg/ml

7. ОЦЕНЯВАНЕ

Оценяването се извършва чрез сравняване на ивиците на протеините в непознатата проба с референтни проби върху същия гел. Откриването на краве мляко в сирена, произведени от овче мляко, козе мляко, биволско мляко, или смеси от овче, козе и биволско мляко се извършва чрез γ_3- и γ_2-казеини, чийто обхват на изоелектрически точки е между pH 6,5 и pH 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“ на фигури 4 а и б и фигура 5). След това количеството на кравето мляко (по-малко от, равно на или по-голямо от 1 %) в непознатата проба може да бъде оценявано директно чрез сравняване на интензитета на краве γ_3- и γ_2-казеини (виж „γ_3 C“ и „γ_2 C“ на фигури 4 а, б и фигура 5) с тези на 0 % и 1 % референтни стандарти (овца, коза) или вътрешнолабораторни стандарти (биволица).

7.2. **Денсиметрична оценка**

Ако е приложимо, за определянето на съотношението на площта на пика на краве спрямо овчи, кози и/или биволски γ_2- и γ_3-казеини (вж. фигура 5) се използва денситометър (5.19). Тази стойност се сравнява със съотношението на площта на пика на γ_2- и γ_3-казеини от 1 % референтния стандарт (овца, коза) или вътрешнолабораторен стандарт (биволица), анализирани върху същия гел.

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

Пробата се оценява като положителна, ако двата краве γ_2- и γ_3-казеина или съответните съотношения на площта на пиковете са равни или по-големи от нивото на 1 % референтен стандарт.

8. ЗА СПРАВКА

1. *Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I, Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2-caseins. Milchwissenschaft 45, 708—711 (1990).*

2. *Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. Milchwissenschaft 50, 83—85 (1995).*

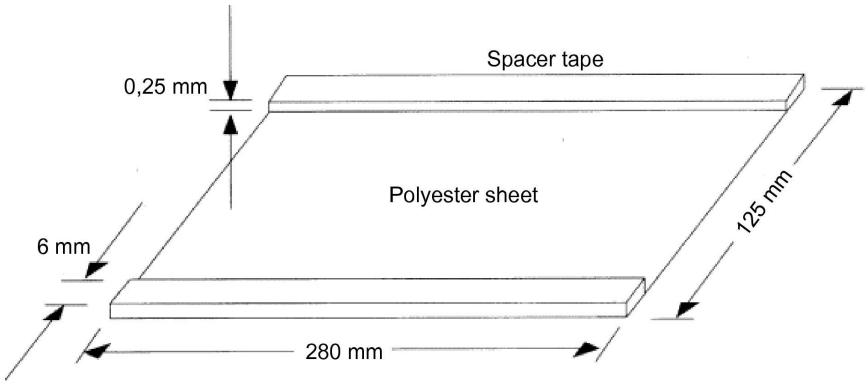
3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. in: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389—393, Bode-Verlag, München (1989).*

4. *Krause I., Belitz H.—D., Kaiser K.—P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195—199 (1982).*

5. *Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50—100 μm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. Electrophoresis 1, 43—56 (1980).*

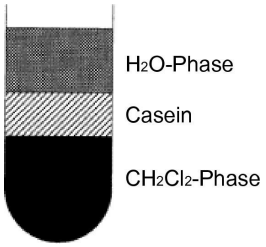
Фигура 1

Схематично представяне на покривния лист



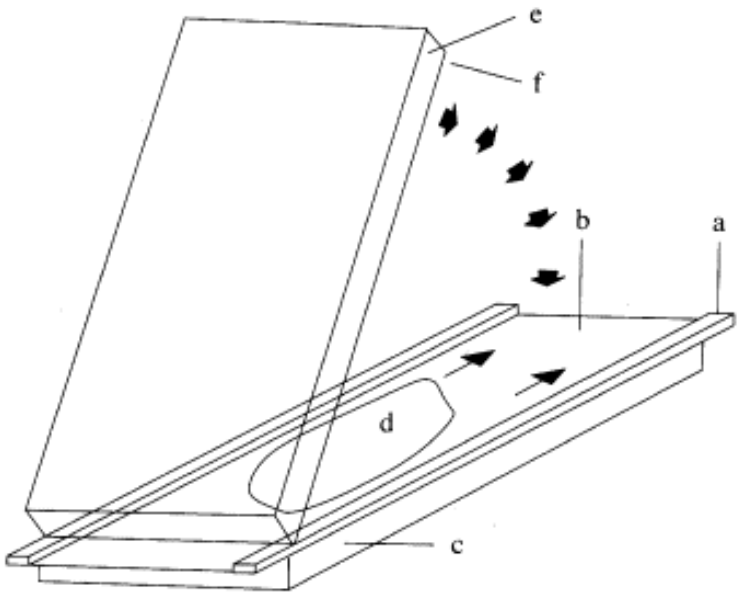
Фигура 2

Слой казеин между водната и органичната фази след центрофугиране



Фигура 3

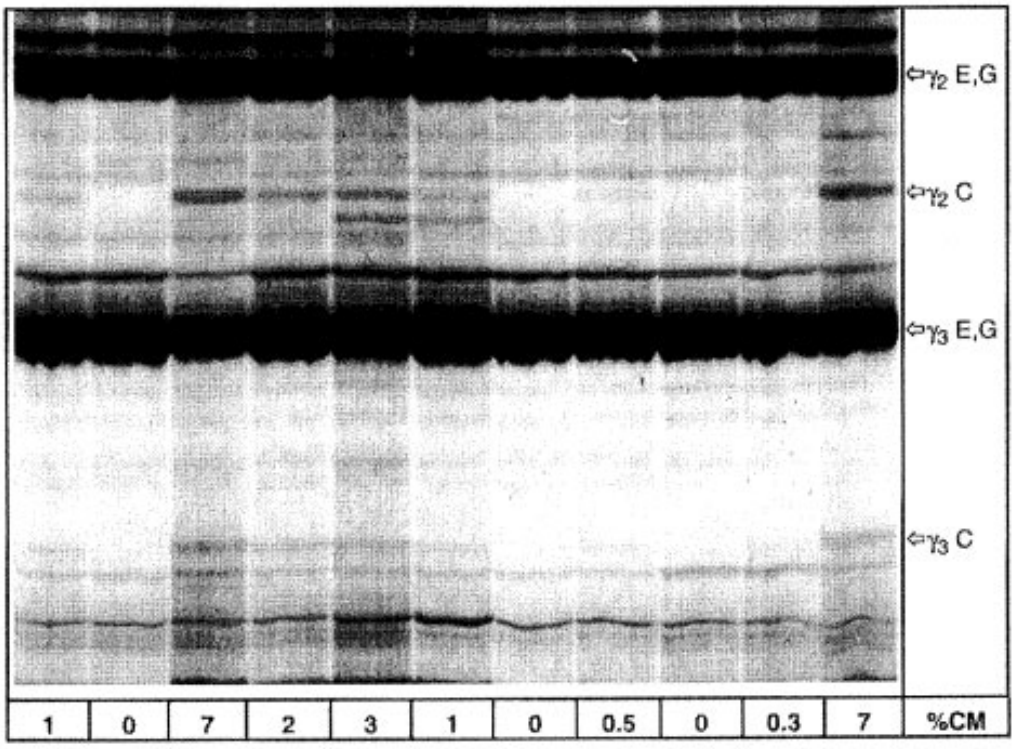
Техника на захлупване за изливане на свръхтънки полиакриламидни гелове



a = разделителна лента (0,25 mm); b = покривен лист (5.3); c, e = стъклени плочи (5.1); d = разтвор на гел (4.1.2); f = лист носител на гел (5.2)

Фигура 4а

Изоелектрическо фокусиране на третирани с плазмин казеини от сирене, произведено от овче или от козе мляко, съдържащи различни количества краве мляко

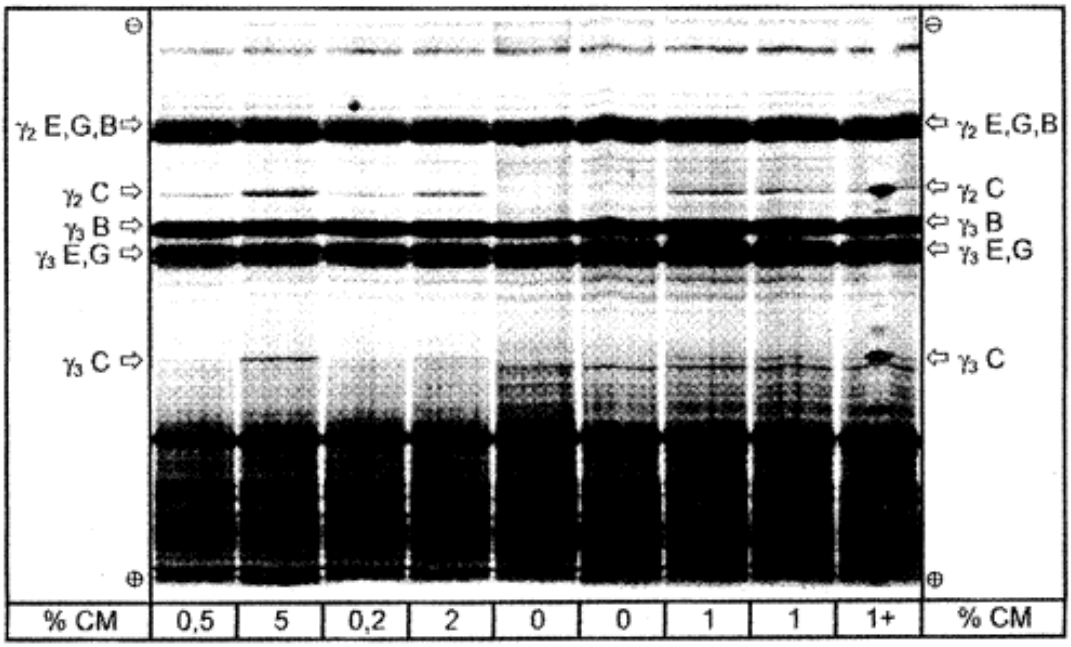


% CM = процент краве мляко, C = крава, E = овца, G = коза

Показана е горната половина на гел IEF.

Фигура 4б

Изоелектрическо фокусиране на третирани с плазмин казеини от сирене, произведено от смеси от овче, козе и биволско мляко и съдържащо различни количества краве мляко

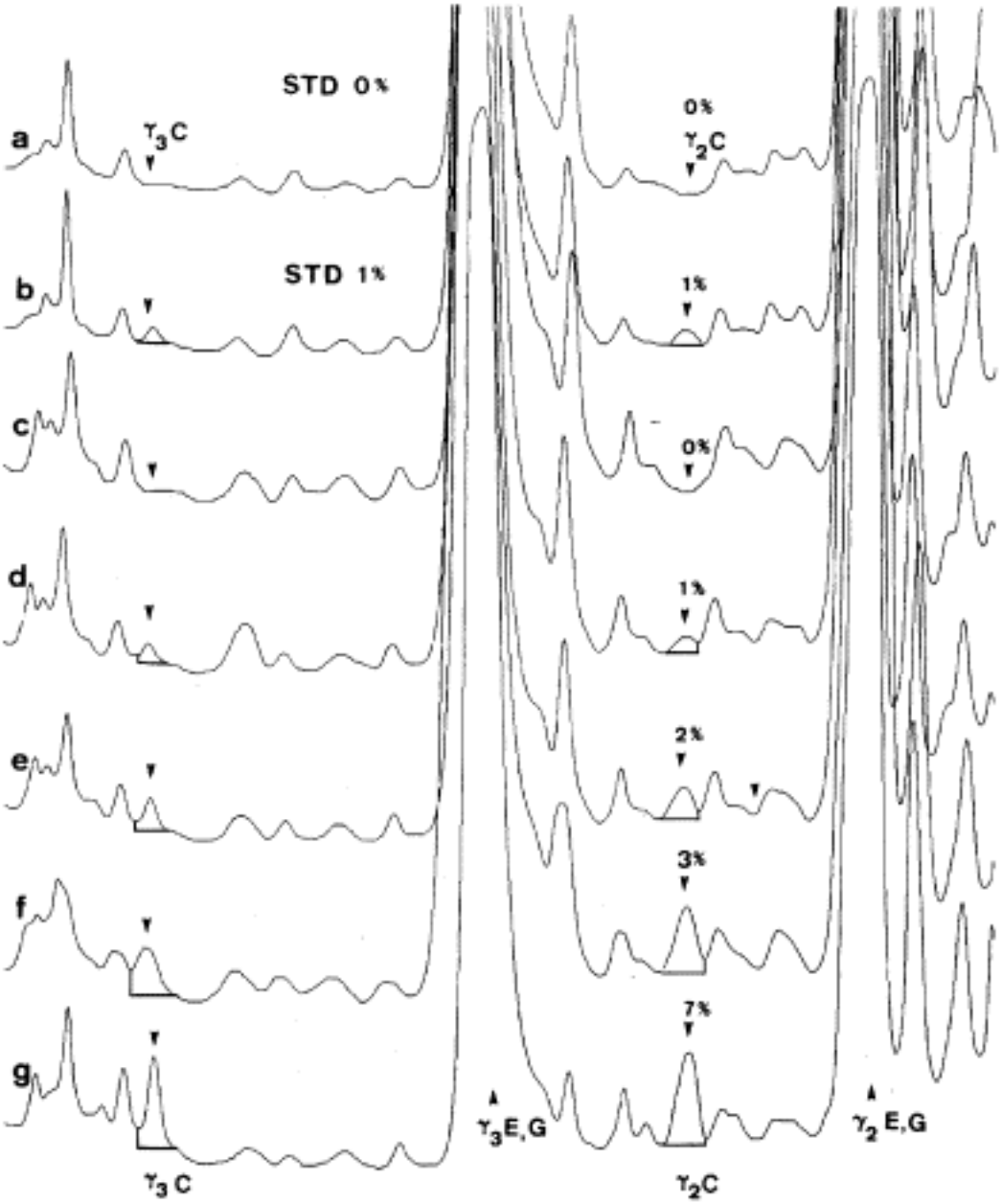


% CM = процент краве мляко; 1 + = проба, съдържаща 1 % краве мляко и прибавен чист краве казеин в средата на пътеката. C = крава, E = овца, G = коза, B = биволица

Показано е общото разстояние на разделяне на гела IEF.

Фигура 5

Наслагване на денситограмите на стандартните проби (STD) и пробите сирене, произведено от смес от овче и козе мляко, след изоелектрическо фокусиране



a,b = стандарти, съдържащи 0 и 1 % краве мляко; c-g = проби сирене, съдържащи 0, 1, 2, 3 и 7 % краве мляко. C = крава, E = овца, G = коза. Сканирана е горната половина от гела IEF при λ = 634 nm.

ПРИЛОЖЕНИЕ X

(член 7)

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

1. ПРИГОТВЯНЕ НА ПРОБИТЕ

   Стандарт ISO 8261

2. ПРОЦЕДУРА

   Стандарт ISO 4831

   В културата се инокулират проби, съответстващи на 1 g масло или 0,1 g обезмаслено мляко на прах или казеин/казеинати.

   За всяка проба се инокулират три епруветки.

3. РЕЗУЛТАТИ

   Ако трите епруветки дадат три отрицателни резултата, то резултатът е „съответстващ“.

   Ако трите епруветки дадат 2 или 3 положителни резултата, то резултатът е „несъответстващ“.

   Ако трите епруветки дадат 2 отрицателни резултата, то анализът се повтаря двукратно (с две епруветки)

   — Ако двата резултата са отрицателни, то резултатът е „съответстващ“.

   — Ако най-малко 1 резултат е положителен, резултатът е „несъответстващ“.

ПРИЛОЖЕНИЕ XI

(член 8)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЛАКТОЗА В КОМБИНИРАНИ ФУРАЖИ

1. ОБХВАТ И ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

Определяне на съдържанието на лактоза в комбинирани фуражи.

2. ЗА СПРАВКА

Съдържанието на лактоза се дефинира като процент от масата, както е определено в описаната процедура.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържанието на дехидратирана лактоза се изразява в g на 100 g.

4. ПРИНЦИП

Комбинираният фураж се възстановява с вода. Към разредена аликвотна част се прибавя разтвор „Biggs“, за да пресече фракциите на мазнината и на протеиновата съставка в комбинираните фуражи. Пробата се филтрира (или центрофутира) и филтратът (или супернатантът) се впръсква в катионообменна колона за високоефективна течна хроматография (HPLC) със свързана фаза, като се използва вода с качество за HPLC като подвижна фаза. Елуираната лактоза се открива с диференциален рефрактометър ([i]).

5. РЕАГЕНТИ

5.1. **Общи положения**

Използват се само реагенти с признато аналитично качество, освен ако не е указано друго, и дегазирана вода с качество за HPLC.

5.2. **Лактоза**

D-лактозен монохидрат ($C_{12}H_{22})O_{11}.H_2O$) може да поеме допълнителна влага. Преди използване се определя реалното водно съдържание по Karl-Fisher или се отнема допълнителната влага чрез поставяне на лактозата в пещ при 105 °C за 8 часа (при тази обработка лактозата не загубва кристалната си вода).

5.3. **Концентриран разтвор на Biggs/Szijarto** ([ii])

Разтварят се 9,10 g цинков ацетат дихидрат ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) и 5,46 g фосфо-волфрамова киселина монохидрат ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) в около 70 ml с вода с качество за HPLC в измерителна колба от 100 ml.

Добавя се 5,81 ml ледена оцетна киселина (CH_3COOH). Разрежда се до белега за 100 ml с вода с качество за HPLC (6.8) и се разбърква. Разтворът може да се съхранява при стайна температура в продължение на 1 година.

5.4. **Разреден разтвор на Biggs/Szijarto**

Разрежда се 25 ml концентриран разтвор на Biggs/Szijarto (5.3) с вода до 500 ml в измерителна колба. Разтворът може да се съхранява при стайна температура в продължение на 1 месец.

5.5. **Подготовка на вода с качество за HPLC**

Свръхчистата вода (6.8) се филтрира с помощта на система за вакуумно филтриране (6.9). За подобряване на работата на помпата и получаване на стабилна основна линия подвижната фаза следва да се дегазира ежедневно чрез една от наличните техники като система с поток от хелий, с ултразвук, с вакуум или с редово дегазиране.

Забележка: За удължаване живота на колоната е от основна важност съдържанието на въглероден диоксид в елуента да е възможно най-ниско и да се предотвратява повторно извличане.

6. АПАРАТУРА

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално следното:

6.1. **HPLC колона от йонообменна смола**

Пълнеж на колоната: 8 % кръстосано свързан полистирол-дивинилбензол съполимер, функционализиран с катионобменни групи със свързана фаза.

Размери на колоната: дължина 300 mm, вътрешен диаметър около 8 mm

Възможно е използването и на други диаметри, стига скоростта на потока да се адаптира съответно.

6.2. **Предпазна колона**

Предпазната колона съчетава отделен катионен обменник (H^+) и анионен обменник (CO_3-), всеки от които поставен в колони с размери около 30 mm x 4,6 mm (L × ID) (т.е. микропредпазни колони в микропредпазен държач) и свързани в серия или под формата mixed bed, състояща се от AG 50W-X4, -400 mesh (H^+) и AG3-X4A, 200—400 mesh (OH-) в съотношение 35:65 (m/m), напълнени ръчно в колона с размери около 20 × 9 mm (L × ID).

6.3. **Пълнеж на колоната:**

Пещ, поддържаща постоянна температура 85 °C ± 1 °C.

6.4. **Помпа за HPLC**

Помпа, създаваща постоянна скорост на потока (< 0,5 % промени) при 0,2—1,0 m/min.

6.5. **Инжекционно устройство за HPLC**

Автоматичен уред за вземане на проби, който може да впръсква 25 µL и има повторяемост < 0,5 %.

Като вариант може да се използва и ръчен уред (при същите изисквания както за автоматичния).

6.6. **Детектор за HPLC**

Детектор с високочувствителен индекс на рефракция, с шум < $5{,}10^{-9}$ RI единици.

6.7. **Интегратор**

Софтуерен или специален интегратор за събиране на данни, обработване и генериране на площи на пика и височини на пика, които могат да бъдат преобразувани в концентрации на лактоза.

6.8. **Устройство за пречистване на вода**

Система, способна да осигури свръхчиста вода (тип 1) със съпротивление > 14 MΩ.cm.

6.9. **Устройство за филтриране на разтворителя**

Система, позволяваща филтриране на водата с мембранен филтър с размер на порите 0,45 µm.

Забележка: Много устройства за пречистване на вода (6.8) имат вградено филтриране при 0,45 или 0,2 µm. Допълнителното филтриране може да се пропусне, ако тази вода се използва директно.

6.10. **Аналитична везна**

Везна с отчитане с точност до 0,1 mg.

6.11. **Водна баня**

Водна баня, поддържаща температура 40 °C (± 0,5).

6.12. **Центрофуга**

С капацитет да генерира най-малко 3 000 g за епруветки тип „Епендорф“ или еквивалентни или по-големи типове епруветки.

6.13. **Измерителна колба от 50 mL**

Капацитет 50 mL, клас А.

Забележка: Може да се използват колби с друга вместимост, като се вземе предвид факторът обем.

6.14. **Измерителна колба от 100 mL**

Капацитет 100 mL, клас А.

6.15. **Градуиран капкомер**

Градуиран капкомер от 10 mL

Забележка: Може да се използва ръчен капкомер с капацитет 5 mL, като се прибави два пъти обемът на 5 mL реагент (5.3).

7. Вземане на проби

Важно е лабораторията да получи проба, която да е взета съгласно ISO 707/IDF 50 [iii], да е напълно представителна и да не е била повредена по време на транспортирането или съхранението.

8. Приготвяне на стандартен разтвор на лактоза

8.1. **Стандарт 1**

Разтваря се прецизно (с точност до 0,1 mg) претеглено количество от около 50 mg лактозен монохидрат (5.2) в измерителна колба от 100 mL (6.14) и се долива до белега с вода.

8.2. **Стандарт 2**

Разтваря се прецизно (с точност до 0,1 mg) претеглено количество от около 100 mg лактозен монохидрат (5.2) в измерителна колба от 100 mL (6.14) и се долива до белега с вода.

Забележка: Стандартният разтвор може да се съхранява най-много 1 месец при приблизително 5 °C.

9. ПОДГОТОВКА НА ТЕСТОВАТА ПРОБА

9.1. **Възстановяване на пробата**

Претеглят се около 5 g от праха в колба от 50 mL (6.13) и грижливо се отбелязва теглото с точност до 1 mg (W_1, (11). Прибавят се 50 mL вода и увеличаването на теглото се отбелязва (W_2 (11) с точност 0,01 g. Затворената колба се поставя във водна баня (6.11) за 30 min, като през това време се обръща няколко пъти. След това се оставя да се охлади на стайна температура.

9.2. **Обработване на пробата**

Взема се около 1 g от този разтвор и се поставя в 50 mL измерителна колба (6.13), отбелязва се теглото с точност 1 mg (W_3 (11), добавят се 20 mL вода, а след това и 10 mL разреден реагент на Biggs/Szijarto (5.4), долива се до белега с вода. Колбата се обръща внимателно няколко пъти през първите 30 минути.

След 1 час се взема аликвотна част и се центрофугира (6.12) при 3 000 g за 10 min (може да се използва и по-голямо ускорение при съответно по-кратко време). За HPLC анализ се използва аликвот от супернатанта.

10. ОПРЕДЕЛЯНЕ ЧРЕЗ HPLC

10.1. **Предварителна подготовка на HPLC**

10.1.1. *Поставяне на колоната и предколоната*

Предколоната (6.2) се поставя извън пещта на колоната (6.3) и колоната (6.1) се поставя в пещта.

Забележка: Ако в пещта няма тръби за предварително загряване на елуента, необходимо е елуентът да се прекара през около 15 cm тръбичка от неръждаема стомана в пещта, преди да влезе в колоната (абсолютно необходимо е елуентът да е предварително загрят, преди да влезе в колоната, в противен случай ще се получи разширяване на пика).

10.1.2. *Детектор и първоначален поток*

За получавана на стабилна основна линия детекторът (6.6) се включва най-малко 24 часа преди започването на анализа. Вътрешната температура на детектора се регулира на 35 °C. Скоростта на струята се регулира на 0,2 ml/min (6.4) за най-малко 20 min, докато пещта на колоната (6.3) е включена на стайна температура.

10.1.3. *Пещ на колоната и крайна скорост на потока*

Пещта на колоната (6.3) се регулира на 85 °C. Когато се достигне тази температура, след 30 min постепенно се увеличава скоростта на потока от 0,2 ml/min на 0,6 ml/min (6.4). Системата се оставя да се стабилизира с тази скорост на потока и при 85 °C за 2 часа или до получаване на стабилна основна линия.

10.1.4. *Интегриране*

Грижливо се подбират параметрите за събиране и интегриране (6.7) като скорост на данните, чувствителност, времева константа, ширина на пика и праг.

Времето на задържане на лактозата е около 11 min.

Забележка: Много софтуерни програми за събиране на данни (6.7) дават възможност за лесно измерване на броя на теоретичните тарелки. Измерва се редовно броят на теоретичните тарелки на стандарт 1 (8.1) и колоната (6.1) се заменя, когато броят на тарелките е по-нисък с 25 % от този на първоначалната стойност на нова колона.

10.1.5. *Тест на предпазната колона*

Редовно (най-малко веднъж на всяка опитна серия) се проверява способността на предпазната колона да елиминира соли от пробата чрез впръскване на 25 µL от 0,05 % разтвор на натриев хлорид. При поява на пикове предпазната колона следва да бъде подменена.

10.2. **Анализиране на стандартите**

В началото на всяка серия от анализи се впръскват 25 µL (6.5) от стандарт 1 (8.1) и след това от стандарт 2 (8.2). Това се повтаря на всеки 10 до 20 проби и се прави също и в края на серията.

10.3. **Анализиране на пробите**

Впръскват се 25 µL от супернатанта (9.2) на пробата.

11. ИЗЧИСЛЯВАНЕ И ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

11.1. **Калибриране**

Обикновено за изчисляване на резултатите се използват височините на пика, но ако сигналът не съдържа твърде много шум, могат да се използват площите на пика (количественото определяне чрез височината на пика в по-малка степен се повлиява от пиковете на съставки с ниска концентрация и които частично, но недостатъчно, са отделени от пика на лактозата).

Софтуерът (6.7) трябва да изчисли линейна калибрираща крива, минаваща през старта. Проверява се кривата за възможна нелинейност (привидната нелинейност най-често се дължи на грешка при приготвянето на стандартите 1 (8.1) или 2 (8.2), лошо интегриране и, с по-малка вероятност, на зле функциониращ инжектор.)

Като входни данни се използват изчислените концентрации на лактоза в mg/mL от стандартите 1 (8.1) или 2 (8.2) като безводна лактоза.

Кривата (RF) на калибриращата линия се определя от площ/концентрация в mg/mL.

11.2. **Проби**

Резултатът от анализа се получава в g/100 g и се изчислява със софтуера (6.7) или с използване на следната формула:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0{,}1$$

където:

C: концентрация на лактоза в g/100 g прах

H: височина на пика на лактоза в пробата

RF: коефициент на чувствителност (или крива) на графиката на калибриране в mV/mg/mL

W_1: тегло на пробата на прах в g (9.1)

W_2: Тегло на прибавената вода в g към пробата на прах (9)

W_3: тегло на пробата от възстановен разтвор на праха в g (9.2)

50: Обем на измерителната колба, използвана в (9.2)

0,1: прехвърляне на резултата в g/100 g

12. ТОЧНОСТ

Стойностите, получени от този вътрешнолабораторен тест, могат да не са приложими към редове и матрици на концентрация, различни от посочените. Стойностите за повторяемост и възпроизводимост ще се изведат от резултата от междулабораторен тест, проведен съгласно ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Повторяемост**

Абсолютната разлика между два единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в същата лаборатория от един и същ оператор, използващ едно и също оборудване в рамките на кратък период от време, надвишава xxx (стойността да се определи в съвместен опит) в не повече от 5 % от случаите ([v]).

12.2. **Възпроизводимост**

Абсолютната разлика между два единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в различни лаборатории от различни оператори, използващи различно оборудване, надвишават 0,5 g/100 g (стойността да се определи в съвместен опит) в не повече от 5 % от случаите.

13. ЗА СПРАВКА

([i]) J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89—106.

([ii]) D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

([iii]) ISO 707 (IDF 50), Мляко и млечни продукти — Методи за вземане на проби.

([iv]) ISO 5725-1, Точност (вярност и прецизност) на методи за измерване и резултати. Част 1: Общи принципи и определения.

([v]) ISO 5725-2, Точност (вярност и прецизност) на методи за измерване и резултати. Част 2: Основен метод за определяне на повтаряемостта и възпроизводимостта на стандартен метод за измерване.

ПРИЛОЖЕНИЕ XII

(член 9)

ОТКРИВАНЕ НА СИРИЩНА СУРОВАТКА В ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ, ПРЕДНАЗНАЧЕНО ЗА ОБЩЕСТВЕНО СКЛАДИРАНЕ ЧРЕЗ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА КАЗЕИНОМАКРОПЕПТИДИ ЧРЕЗ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC)

1. ОБХВАТ И ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

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

2. ЗА СПРАВКА

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

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържанието на сухо вещество на сиришна суроватка се дефинира като процент от масата, както е определено от казеиномакропептидното съдържание чрез описаната процедура.

4. ПРИНЦИП

— Възстановяване на обезмасленото мляко на прах, отстраняване на мазнините и протеините с трихлороцетна киселина, последвано от центрофугиране или филтриране.

— Определяне на количеството казеиномакропептиди (CMP) в супернатанта чрез високоефективна течна хроматография (HPLC).

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

5. РЕАГЕНТИ

Всички реагенти трябва да бъдат с признато аналитично качество. Използваната вода трябва да е дестилирана или да е с еквивалентна степен на чистота.

5.1. **Разтвор на трихлороцетна киселина**

240 g трихлороцетна киселина (CCl_3COOH) се разтварят във вода и се долива до 1 000 ml. Разтворът трябва да бъде прозрачен и безцветен.

5.2. **Елуентен разтвор, pH 6,0**

1,74 g дикалиев хидроген фосфат (K_2HPO_4), 12,37 g калиев дихидроген 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.

Забележка: Съставът на елуента може да се актуализира така, че да съответства със сертификата на стандартите или с препоръките на производителя на пълнежа на колоната.

Елуентният разтвор се филтрира, преди да се използва, през мембранен филтър с 0,45 μm диаметър на порите.

5.3. **Промиващ разтворител**

Един обем ацетонитрил (CH_3CN) се смесва с девет обема вода. Преди да се използва, сместа се филтрира през мембранен филтър с 0,45 μm диаметър на порите.

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

5.4. **Стандартни проби**

5.4.1. *Обезмаслено мляко на прах, което изпълнява изискванията за такова разделяне (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, която може да достигне центробежна сила от 2 200 g, снабдена със запушени центрофужни епруветки с капацитет около 50 ml

6.3. Механичен шейкър

6.4. Магнитна бъркалка

6.5. Стъклени фунии с диаметър около 7 cm

6.6. Филтърна хартия, средно филтриране, диаметър около 12,5 cm

6.7. Стъклено оборудване за филтриране с мембранен филтър с диаметър на порите 0,45 μm

6.8. Градуирани пипети, които позволяват подаване на 10 ml (ISO 648, клас A, или ISO/R 835), или система, която може да подаде 10,0 ml за две минути

6.9. Система за подаване, която може да подаде 20,0 ml вода при приблизително 50 °C

6.10. Термостатна водна баня, регулирана на 25 ±0,5 °C

6.11. Оборудване за HPLC, състоящо се от:

6.11.1. Помпа

6.11.2. Инжектор, ръчен или автоматичен, с капацитет от 15 до 30 μl

6.11.3. Две последователно свързани колони TSK 2 000-SW (дължина 30 cm, вътрешен диаметър 0,75 cm) или еквивалентни колони (например единична TSK 2 000-SWxl, единична Agilent Technologies Zorbax GF 250) и предколона (3 cm × 0,3 cm), запълнена с I 125 или материал с еквивалентна ефективност

6.11.4. Термостатична колонна пещ, програмирана на 35 ± 1 °C

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

6.11.6. Интегратор с възможност за „valley-to-valley“ интеграция

Забележка: Възможно е да се работи с колони, държани при стайна температура, но тяхната ефективност на разделяне е малко по-ниска. В този случай в рамките на една аналитична серия температурата би следвало да варира с по-малко от ± 5 °C.

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 горепосочения 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. Млечният прах се смесва добре чрез многократно обръщане на съда.

8.2. **Тестова доза**

Претеглят се 2,000 ± 0,001 g от пробата за анализ в центрофужна епруветка (6.2) или подходяща запушена колба (50 ml).

8.3. **Отстраняване на мазнината и протеините**

8.3.1. Към тестовата доза се прибавят 20,0 ml топла вода (50 °C). Прахът се разтваря чрез разклащане за пет минути при използването на механичен шейкър (6.3). Епруветката се поставя във водната баня (6.10) и се оставя да се темперира до 25 °C.

8.3.2. Прибавят се 10,0 ml разтвор на трихлороцетна киселина (5.1.) с температура около 25 °C за две минути, като същевременно се разбърква енергично с магнитната бъркалка (6.4). Епруветката се поставя във водната баня (6.10) и се оставя за 60 минути.

8.3.3. Центрофугира се (6.2) в продължение на 10 минути при 2 200 g или се филтрира през хартия (6.6), като се изхвърлят първите 5 ml филтрат.

8.4. **Хроматографско определяне**

8.4.1. От 15 до 30 µl точно измерен супернатант или филтрат (8.3.3) се впръскват в апаратурата за HPLC (6.11), оперираща със скорост на потока от 1,0 ml елуентен разтвор (5.2) на минута.

Забележка 1. Може да се използва и друга скорост на потока в зависимост от вътрешния диаметър на използваните колони или указанията на производителя на колоните.

Забележка 2. По време на хроматографския анализ елуентният 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 предпазни мерки с подобен ефект.

Забележка 3. Колоните се изплакват с вода при всяко прекъсване. Елуентният разтвор (5.2) никога не се оставя в тях.

Преди всяко прекъсване за повече от 24 часа колоните се изплакват с вода, след това се измиват с разтвор (5.3) за най-малко три часа при скорост на потока 0,2 ml на 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 задържане RT, както следва:

Пик II:	Вторият пик на хроматограмата с RT от около 12,5 минути
Пик III:	Третият пик на хроматограмата, съответстващ на CMP, с RT от 15,5 минути

Изборът на колоните може съществено да повлияе на времето на задържане на отделните пикове.

Интеграторът (6.11.6) автоматично изчислява площта A на всеки пик:

A_{II}:	площта на пик II
A_{III}:	площта на пик III

Съществено е да се изследва вида на всяка хроматограма преди количественото тълкуване, за 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.

Анализът се повтаря, ако има съмнения.

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 CMP се разрушават в 8 %-на трихлороцетна среда. Загубата се оценява на 0,2 % на час при 30 °C.

8.5.2. Преди хроматографското определяне на пробите колоните се подготвят чрез многократно впръскване на стандартната проба (5.4.2) в разтвора (8.5.1), докато площта и времето на задържане на пика, съответстващ на CMP, станат постоянни.

8.5.3. Определят се факторите на сигнала R чрез впръскване на същия обем филтрати (8.5.1), какъвто е използван за пробите.

9. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

9.1. **Метод за изчисляване и формули**

9.1.1. *Изчисляване на факторите на сигнала R:*

Пик II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

където:

R_{II} = факторите на сигнала на пиковете II,

A_{II} [0] = площите на пиковете II на стандартната проба [0], получени в 8.5.3.

Пик III:	$R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$

където:

R_{III} = факторът на сигнала на пик III,

A_{III} [0] и A_{III} [5] = площите на пиковете III на стандартните проби [0] и [5], получени съответно в 8.5.3,

W = количеството суроватка в стандартната проба [5], т.е. 5.

9.1.2. *Изчисляване на относителната площ на пиковете в пробата [E]*

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

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

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

където:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV}[E] = относителните площи съответно на пикове II, III и IV на проба [E],

A_{II} [E], A_{III}[E] = площите съответно на пикове II и III на проба [E], получени в 8.4.2,

R_{II}, R_{III} = факторите на сигнала, изчислени в 9.1.1.

9.1.3. *Изчисляване на относителното време на задържане на пик III на проба [E]: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

където:

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

RT_{III} [E] = време на задържане на пик III на проба [E], получено в 8.4.2,

RT_{III} [5] = време на задържане на пик III на контролната проба [5], получено в 8.5.3.

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

— RRT_{III} [E] е < 1,000, когато съдържанието на суроватка е > 5 %,

— RRT_{III} [E] е ≥ 1,000, когато съдържанието на суроватка е ≤ 5 %.

Допустимата неопределеност за стойностите на RRT_{III} е ± 0,002.

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

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

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

където:

W	=	процент (m/m) сиришна суроватка в пробата [E];
S_{III} [E]	=	относителната площ на пик III на тестова проба [E], получена както в 9.1.2;
1,3	=	представлява относителната средна площ на пик III, изразена в грамове сиришна суроватка за 100 g, определена в неподправено обезмаслено мляко на прах от различен произход. Тази цифра бе получена експериментално;
S_{III} [0]	=	представлява относителната площ на пик III, която е равна на $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Тези стойности са получени съответно в 9.1.1 и в 8.5.3;
(S_{III} [0] – 0,9)	=	представлява корекцията, която следва да бъде направена спрямо относителната средна площ 1,3, когато S_{III} [0] не е равно на 0,9. За експеримента относителната средна площ на пик III на контролната проба [0] е 0,9.

9.3. **Точност на процедурата**

9.3.1. *Повторяемост*

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

9.3.2. *Възпроизводимост*

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

9.4. **Интерпретация**

9.4.1. Приема се, че липсва суроватка, ако относителната площ на пик III, S_{III} [E], изразена в грамове сиришна суроватка за 100 g продукт, е ≤ 2,0+(S_{III} [0] – 0,9), където

2,0	=	максимално допустимата стойност за относителната площ на пик III, т.е. 1,3, като се вземе предвид неопределеността, която се дължи на вариациите в състава на обезмасленото мляко на прах, както и възпроизводимостта на метода (9.3.2), |
(S_{III} [0] – 0,9)	=	корекцията, която следва да бъде направена, когато площта S_{III} [0] е различна от 0,9 (вж. 9.2)

9.4.2. Ако относителната площ на пик III, S_{III} [E], е > 2,0+(S_{III} [0] – 0,9) и относителната площ 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 площ на пик III, S_{III} [E], е > 2,0+(S_{III} [0] – 0,9) и относителната площ 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, чиито коефициенти са изчислени чрез метода на най-малките квадрати.

Пунктираната права линия определя горната граница на относителната площ на пик III с вероятност, че няма да се надвишава в 90 % от случаите.

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

S_{III} = 0,376 P % – 10,7	(графика 1),
S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93	(графика 2),

където съответно:

S_{III} = относителната площ на пик III, изчислена или съобразно общото съдържание на протеин, или съобразно относителната площ на пик S_{III} [E],

P % = общото тегловно съдържание на протеин, изразено като процент,

(S_{II} [E] = относителната площ на пробата, изчислена в точка 9.1.2.

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

Разликата (T_1 и T_2) между относителната площ S_{III} [E] и относителната площ S_{III} се изразява чрез следното: $T_1 = S_{III}[E] – [(0,376\ P\ \% – 10,7) + (S_{III}[0] – 0,9)] T_2 = S_{III}[E] – [(0,0123\ S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] – 0,9)]$

9.4.3.2.

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

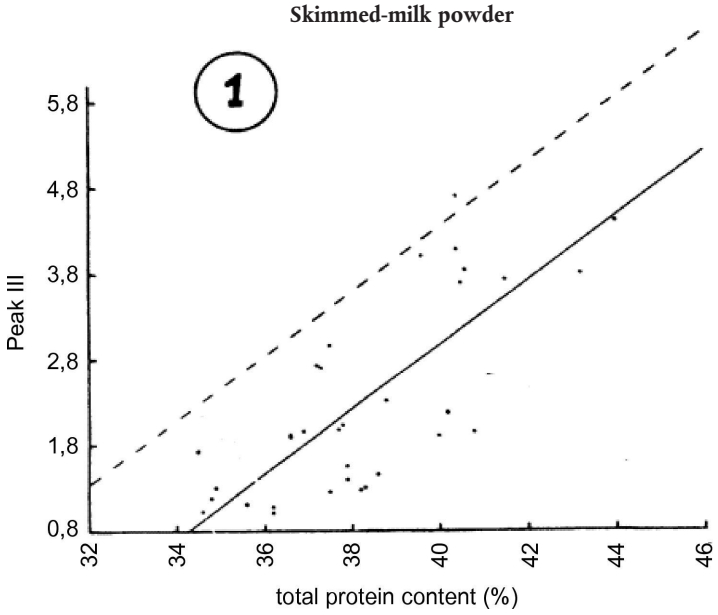
Ако T_1 и T_2 са по-големи от нула, има наличие на сирищна суроватка.

Съдържанието на сирищна суроватка се изчислява по следната формула: $W = T_2 + 0,91$

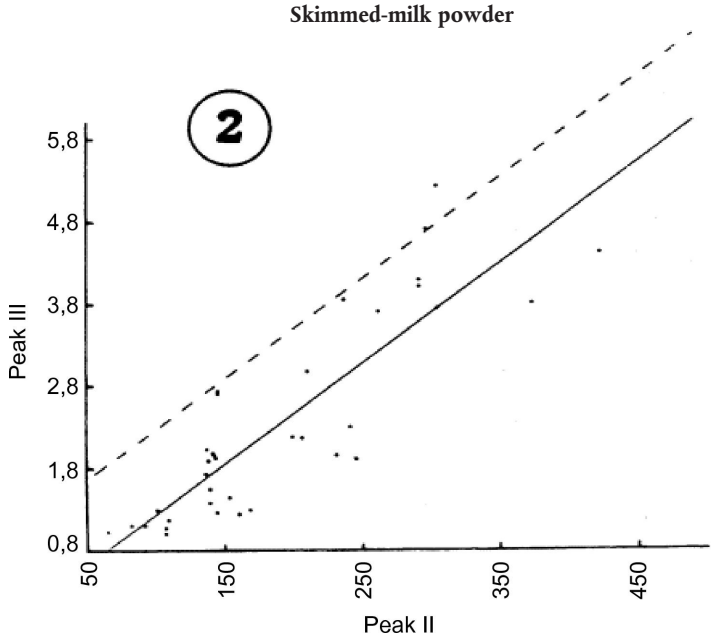
където:

0,91 е разстоянието на вертикалната ос между непрекъснатата и пунктираната прави линии.

Skimmed-milk powder



Skimmed-milk powder



ПРИЛОЖЕНИЕ XIII

(член 9)

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

1. ЦЕЛ: ОТКРИВАНЕ НА ПРИБАВЯНЕТО НА СУХО ВЕЩЕСТВО НА СИРИЩНА СУРОВАТКА КЪМ:

а) обезмаслено мляко на прах, дефинирано в член 2 от Регламент (ЕО) № 2799/1999, и

б) смеси, дефинирани в член 4 от Регламент (ЕО) № 2799/1999.

2. ЗА СПРАВКА: МЕЖДУНАРОДЕН СТАНДАРТ ISO 707

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържанието на сухо вещество на сиришна суроватка се дефинира като процент от масата, както е определено от казеиномакропептидното съдържание чрез описаната процедура.

4. ПРИНЦИП

Съдържанието на казеиномакропептиди се определя съгласно приложение XII. Пробите, които дават положителни резултати, се анализират за казеиномакропептид А с високоефективна течна хроматография с обърнати фази (процедура за HPLC). Друга възможност е пробите да се анализират директно с процедура за HPLC с обърнати фази. Оценката на резултата се получава чрез позоваване на стандартни проби, съдържащи обезмаслено мляко на прах със или без известен процент суроватка на прах. Резултатите, които са по-високи от 1 % (m/m), показват наличие на сухо вещество на сиришна суроватка.

5. РЕАГЕНТИ

Всички реагенти трябва да бъдат с признато аналитично качество. Използваната вода трябва да е дестилирана или да с еквивалентна степен на чистота. Ацетонитрилът следва да бъде със спектроскопично качество или с HPLC-качество.

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

Реагенти за HPLC с обърнати фази.

5.1. **Разтвор на трихлороцетна киселина**

240 g трихлороцетна киселина (CCl_3COOH) се разтварят във вода и се долива до 1 000 ml. Разтворът трябва да бъде прозрачен и безцветен.

5.2. **Елуенти А и Б**

Елуент А: 150 ml ацетонитрил (CH_3CN), 20 ml изопропанол ($CH_3CHOHCH_3$) и 1,00 ml трифлуороцетна киселина (TFA, CF_3COOH) се поставят в 1 000 ml мерителна колба. Долива се до 1 000 ml с вода.

Елуент Б: 550 ml ацетонитрил, 20 ml изопропанол и 1,00 ml TFA се поставят в 1 000 ml мерителна колба. Долива се до 1 000 ml с вода. Елуентният разтвор се филтрира, преди да се използва, през мембранен филтър с 0,45 μm диаметър на порите.

5.3. **Съхранение на колоната**

След анализа колоната се изплаква с елуент Б (чрез градиент) и впоследствие се изплаква с ацетонитрил (чрез градиент за 30 минути). Колоната се съхранява в ацетонитрил.

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 представена в приложение XII към настоящия регламент.

6.1. Аналитична везна

6.2. Центрофуга, която може да достигне центробежна сила от 2 200 g, снабдена със запушени центрофужни епруветки с капацитет около 50 ml

6.3. Механичен шейкър

6.4. Магнитна бъркалка

6.5. Стъклени фунии с диаметър около 7 cm

6.6. Филтърна хартия, средно филтриране, диаметър около 12,5 cm

6.7. Стъклено оборудване за филтриране с мембранен филтър с диаметър на порите 0,45 μm

6.8. Градуирани капкомери, които позволяват подаване на 10 ml (ISO 648, клас A, или ISO/R 835), или система, която може да подаде 10,0 ml за две минути.

6.9. Система за подаване, която може да подаде 20,0 ml вода при приблизително 50 °C

6.10. Термостатна водна баня, регулирана на 25 ±0,5 °C

6.11. Оборудване за HPLC, състоящо се от:

6.11.1. Бинарна помпена система за градиентна работа

6.11.2. Ръчен или автоматичен инжектор с капацитет 100 μl

6.11.3. Колона Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (дължина 25 cm, 0,46 cm вътрешен диаметър) или еквивалентна широка кварцова колона с обърната фаза

6.11.4. Термостатична колонна пещ, програмирана на 35 ± 1 °C

6.11.5. 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 ÂU

6.11.6. Интегратор с възможност за програмиране на интеграция до общата основна линия или „valley-to-valley“

Забележка: Използването на колоната при 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 задържане на CMP_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.

(1) Сирищната суроватка на прах със стандартен състав и подправеното обезмаслено мляко на прах могат да се намерят от NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 — NL-6710 BA Ede. Могат обаче да се използват и продукти на прах, които дават еквивалентни резултати с тези на NIZO.

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. Млечният прах се смесва добре чрез многократно обръщане на съда.

8.2. **Тестова доза**

Претеглят се 2,00 ±0,001 g от пробата за анализ в центрофужна епруветка (6.2) или подходяща запушена колба (50 ml).

Забележка: Когато се анализират смеси, се претегля такова количество от тестовата проба, че обезмасленатa порция от пробата да съответства на 2,00 g.

8.3. **Отстраняване на мазнината и протеините**

8.3.1. Към тестовата доза се прибавят 20,0 ml топла вода (50 °C). Прахът се разтваря чрез разклащане за пет минути или за 30 минути — в случай на кисела мътеница, при използване на механичен шейкър (6.3). Епруветката се поставя във водна баня (6.10) и се оставя да се темперира до 25 °C.

8.3.2. Прибавят се 10,0 ml разтвор на трихлороцетна киселина с температура около 25 °C (5.1) постоянно за две минути, като същевременно се разбърква енергично с магнитната бъркалка (6.4). Епруветката се поставя във водната баня (6.10) и се оставя за 60 минути.

8.3.3. Центрофугира се (6.2) в продължение на 10 минути при 2 200 g или се филтрира през хартия (6.6), като първите 5 ml филтрат се изхвърлят.

8.4. **Хроматографско определяне**

8.4.1. Извършва се HPLC-анализ, както е описан в приложение XII. Ако е получен отрицателен резултат, анализираната проба не съдържа сухо вещество на сиришна суроватка в количества, които могат да се открият. Ако резултатът е положителен, се прилага HPLC-процедура с обърната фаза, както е описана по-долу. Друга възможност е да се приложи директно процедурата за HPLC с обърната фаза. Наличието на кисела мътеница на прах може да причини фалшиви положителни резултати при използване на метода, описан в приложение XII. HPLC-методът с обърната фаза изключва такава възможност.

8.4.2. Преди извършването на HPLC анализа с обърната фаза условията на градиента следва да бъдат оптимизирани. Времето на задържане от 26 ± 2 минути за CMP_A е оптимално за системите с градиент с мъртъв обем от около 6 ml (обем от точката, в която разредителите се събират, до обема на пръстена на инжектора включително). Системите с градиент с по-малък мъртъв обем (напр. 2 ml) следва да използват 22 минути като оптимално време за задържане.

Вземат се разтвори от стандартните проби (5.4) без и със 50 % сиришна суроватка.

100 µl супернатант или филтрат (8.3.3) се впръскват в HPLC-апаратурата, която функционира при условията на градиент, дадени в таблица 1.

Таблица 1

Условия на градиента за оптимизиране на хроматографията

Време (min)	Дебит (ml/min)	% А	% Б	Крива
Първоначално	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	линейна
32	1,0	10	90	линейна
37	1,0	10	90	линейна
42	1,0	90	10	линейна

Сравнението на двете хроматограми трябва да разкрива мястото 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 (вж. 8.4.3): % Б = 10 – 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 30 / 27 % Б = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 1,11

където:

RT_{cmpA}: времето на задържане на CMP_A в тестовия градиент

10: първоначалният % Б на тестовия градиент

2,5: % Б на половината време минус % Б първоначално в нормалния градиент

13,5: половината време на тестовия градиент

26: изисквано време на задържане на CMP_A

6: съотношение на кривите на тестовия и нормалния градиент

30: % Б първоначално минус % Б при 27 минути в тестовия градиент

27: време на преминаване на тестовия градиент.

8.4.3. Анализ на разтвори на тестови проби

100 µl точно измерен супернатант или филтрат (8.3.3) се впръсква в апаратура HPLC, функционираща при скорост на потока от 1,0 ml елуентен разтвор (5.2) на минута.

Съставът на елуента в началото на анализа се получава съгласно 8.4.2. Той обичайно е близък до А:Б = 76:24 (5.2). Непосредствено след впръскването се стартира линеен градиент, което води до 5 % по-висок процент на Б след 27 минути. След това се стартира линеен градиент, с който съставът на елуента става 90 % Б за пет минути. Този състав се поддържа пет минути, след което съставът се променя чрез линеен градиент за пет минути към първоначалния състав. В зависимост от вътрешния обем на помпената система следващото впръскване може да бъде направено 15 минути след постигането на първоначалните условия.

Забележки 1: Времето на задържане на CMP_A следва да бъде 26 ± 2 минути. Това може да бъде постигнато чрез вариране на изходните и крайните условия на първия градиент. Разликата обаче в % Б за изходните и крайните условия на първия градиент трябва да остане 5 % Б.

Забележка 2: Елуентите следва да бъдат дегазирани в достатъчна степен и да се запазят такива. Това е от основна важност за доброто функциониране на помпената система за градиента. Стандартното отклонение за времето на задържане на пика CMP_A трябва да бъде по-малко от 0,1 минути (n = 10).

Забележка 3: Референтната проба (5) трябва да бъде впръсквана на всеки 5 проби и използвана за изчисляване на нов фактор на сигнала R (9.1.1)

8.4.4. Резултатите от хроматографския анализ на тестовата проба (E) се получават под формата на хроматограма, в която пикът CMP_A се идентифицира чрез времето си на задържане от около 26 минути.

Интеграторът (6.11.6) автоматично изчислява височината H на пика CMP_A. Във всяка хроматограма следва да се проверява мястото на основната линия. Анализът или интегрирането трябва да бъдат повторени, ако основната линия е определена неправилно.

Забележка: Ако пикът на CMP_A е достатъчно отделен от другите пикове, следва да се използва „valley-to-valley“ основна линия, а в противен случай — перпендикулярите, слизащи към обща основна линия, които би трябвало да започват близо до пика на CMP_A (но не при t = 0 min!). За стандарта и за пробите се използва един и същ тип интегриране и при използване на обща основна линия се проверява нейната релевантност за пробите и за стандарта.

Съществено е да се изследва вида на всяка хроматограма преди количественото тълкуване, за 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. Анализът се повтаря, ако има съмнения.

8.5. **Калибриране**

8.5.1. Процедурата, описана в точки 8.2—8.4.2, се прилага с точност за стандартните проби (от 5.4.1 до 5.4.2). Използват се прясно приготвени разтвори, тъй като CMP се разрушават в 8 %-на трихлороцетна среда при стайна температура. При 4 °C разтворът остава стабилен 24 часа. В случай на дълги аналитични серии е желателно в автоматичния инжектор да се използва охладена подложка за проби.

Забележка: 8.4.2. може да бъде пропусната, ако % Б при първоначалните условия е известен от предходни анализи.

Хроматограмата на референтната проба [5] трябва да е аналогична с представеното на фигура 1. На тази фигура пикът на CMP_A се предхожда от два малки пика. Важно е да се получи подобно разделяне.

8.5.2. Преди хроматографското определяне на пробите се впръскват 100 µl стандартна проба без сирищна суроватка [0] (5.4.1).

Хроматограмата не следва да показва пик във времето на задържане на пика CMP_A.

8.5.3. Определят се факторите на сигнала R чрез впръскване на същия обем филтрат (8.5.1) като използвания за пробите.

9. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

9.1. **Метод за изчисляване и формули**

9.1.1. *Изчисляване на фактора на сигнала R:*

Пик на CMP_A: $R = W/H$

където:

R = фактор на сигнала на пика CMP_A

H = височина на пика CMP_A

W = количество суроватка в стандартната проба [5].

9.2. **Изчисляване на процента на сирищна суроватка на прах в пробата**

$W(E) = R \times H(E)$

където:

W(E) = процент (m/m) сирищна суроватка в пробата (E)

R = фактор на сигнала на пика CMP_A (9.1.1)

H(E) = височина на пика на CMP_A на пробата (E)

Ако W(E) надвишава 1 % и разликата между времето на задържане и това на стандартната проба [5] е по-малка от 0,2 минути, тогава има наличие на сухо вещество на сирищна суроватка.

9.3. **Точност на процедурата**

9.3.1. *Повторяемост*

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

9.3.2. *Възпроизводимост*

Не е определена.

9.3.3. *Линейност*

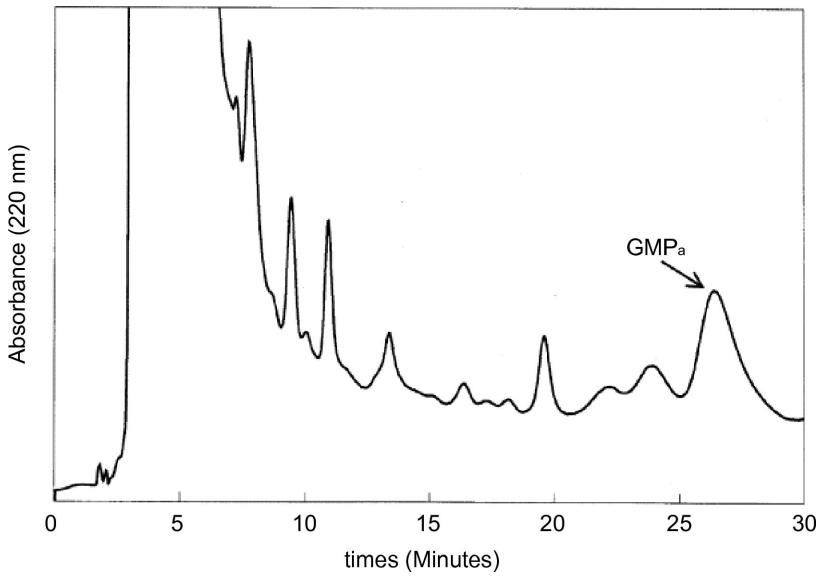
От 0 до 16 % сирищна суроватка трябва да даде линейна зависимост с коефициент на корелация > 0,99.

9.4. **Интерпретация**

Границата от 1 % се определя в съответствие с разпоредбите на точки 9.2 и 9.4.1 от приложение XIX към Регламент (ЕО) № 214/2001, които включват неопределеността, свързана с възпроизводимостта.

Table 1

Ni –4,6 standard



ПРИЛОЖЕНИЕ XIV

(член 10)

ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ: КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФОСФАТИДИЛСЕРИН И ФОСФАТИДИЛЕТАНОЛАМИН

Метод: HPLC 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 (ОМП) и е подходящ за откриване на сухо вещество на мътеница в ОМП.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

PS +PE съдържание: масов процент на субстанцията, определена чрез използване на тук посочената процедура. Резултатът е изразен в милиграми фосфатидилетаноламин дипалмитоил (PEDP) на 100 g прах.

3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Извличане на аминофосфолипиди с метанол от възстановено мляко на прах. Определяне на PS и PE като о-фталдиалдехид (OPA) производни чрез HPLC с обърнати фази и флуоресцентно откриване. Определяне на количеството на PS и PE, съдържащи се 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. **Материал за стандарта: PEDP с чистота най-малко 99 %**

Забележка: Стандартният материал трябва да бъде съхраняван при –18 °C.

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 M воден разтвор

4.3.2. Борна киселина, 0,4 M воден разтвор, регулиран до pH 10,0 с натриев хидроксид (4.3.1)

4.3.3. 2-меркаптоетанол

4.3.4. о-фталдиалдехид (OPA)

4.4. **HPLC-елуиращи разтворители**

4.4.1. Елуиращите разтворители трябва да бъдат приготвени с използване на реагенти за HPLC.

4.4.2. Вода за HPLC

4.4.3. Метанол с флуоритметична тествана чистота

4.4.4. Тетрахидрофуран

4.4.5. Натриев дихидроген фосфат

4.4.6. Натриев ацетат

4.4.7. Оцетна киселина

5. АПАРАТУРА

5.1. Аналитична везна с чувствителност от 0,1 mg, претегляща с точност 1 mg, с деления на 0,1 mg

5.2. Бехерови чаши с обем от 25 и 100 ml

5.3. Капкомери, с които могат да се подават 1 и 10 ml

5.4. Магнитна бъркалка

5.5. Градуирани капкомери, които могат да подават 0,2, 0,5 и 5 ml

5.6. Мерителни колби с обем от 10, 50 и 100 ml

5.7. Спринцовки с обем 20 и 100 µl

5.8. Ултразвукова баня

5.9. Центрофуга, работеща при 27 000 × g

5.10. Стъклени съдове с обем около 5 ml

5.11. Градуиран цилиндър с обем 25 ml

5.12. Измервател на pH с точност до 0,1 pH единици

5.13. Оборудване за HPLC

5.13.1. Градиентна помпена система с възможност да функционира с 1,0 ml/min при 200 bar

5.13.2. Автоматичен уред за вземане на проби с възможност за дериватизация

5.13.3. Колонен нагревател, който може да поддържа колоната на 30 °C ± 1 °C

5.13.4. Флуоресцентен детектор, работещ при 330 nm дължина на вълната при възбуждане и 440 nm дължината на вълната при емитиране.

5.13.5. Интегратор или софтуер за обработка на данни, с възможност за измерване на площи на пика

5.13.6. Колона Lichrosphere — 100 (250 × 4,6 mm) или еквивалентна колона, запълнена с октадецилсилан (C 18) с размер на частиците 5 µm.

6. ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

Вземането на проби трябва да се извършва в съответствие с стандарт ISO 707.

7. ПРОЦЕДУРА

7.1. **Приготвяне на вътрешния стандартен разтвор**

7.1.1. 30,0 ± 0,1 mg триптамин-монохлорхидрат (4.2.3) се претеглят в 100 ml мерителна колба (5.6) и се долива до белега с метанол (4.2.1).

7.1.2. Капва се 1 ml (5.3) от този разтвор в 10 ml мерителна колба (5.6) и се долива до белега с метанол (4.2.1), с оглед да се получи концентрация на триптамин от 0,15 mM.

7.2. **Подготовка на разтвор на тестовата проба**

7.2.1. Претегля се 1,000 ± 0,001 g от ОМП-пробата в 25 ml бехерова чаша (5.2). Добавят се 10 ml дестилирана вода при 40 °C ± 1 °C с капкомер (5.3) и се разбърква с магнитна бъркалка (5.4) за 30 минути, за да се разтворят всички бучки.

7.2.2. От възстановеното мляко се капват 0,2 ml (5.5) в 10 ml мерителна колба (5.6), добавят се 100 µl от 0,15 mM триптаминов разтвор (7.1) със спринцовка (5.7) и се долива до обема с метанол (4.2.1). Разбърква се внимателно с преобръщане и се извършва дисперсия с помощта на ултразвук (5.8) за 15 min.

7.2.3. Центрофугира се (5.9) при 27 000 g × g за 10 минути и супернатантът се събира в стъклен съд (5.10).

Забележка: Разтворът на тестовата проба следва да се съхранява при 4 °C, докато се извърши HPLC-анализ.

7.3. **Подготовка на външния стандартен разтвор**

7.3.1. 55,4 mg PEDP (4.1) се отмерват в 50 ml мерителна колба (5.6) и се добавят около 25 ml хлороформ (4.2.2), като се използва градуиран цилиндър (5.11). Затворената колба се загрява до 50 °C ± 1 °C и се разбърква внимателно, докато се разтвори PEDP. Колбата се охлажда до 20 °C, обемът се долива с метанол (4.2.1) и се разбърква с преобръщане.

7.3.2. Капва се 1 ml (5.3) от този разтвор в 100 ml мерителна 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 мерителна колба (5.6), добавят се 100 µl (5.7) от 0,15 mM триптаминов разтвор (7.1) и обемът се долива с метанол (4.2.1). Разбърква се с преобръщане.

Забележка: Разтворът на стандартната проба следва да се съхранява при 4 °C, докато се извърши HPLC-анализ.

7.4. **Подготовка на дериватизиращия реагент**

В 10 ml мерителна колба (5.6) се отмерват 25,0 ± 0,1 mg OPA (4.3.4), добавя се 0,5 ml (5.5) метанол (4.2.1) и се разбърква внимателно, за да се разтвори OPA. Долива се до белега с разтвор на борна киселина (4.3.2) и се добавят 20 µl от 2-меркаптоетанол (4.3.3) със спринцовка (5.7).

Забележка: Дериватизиращият реагент следва да се съхранява при 4 °C в тъмен флакон; той е годен една седмица.

7.5. **Определяне чрез HPLC**

7.5.1. *Елуиращи разтворители (4.4)*

Разтворител А: Разтвор на 0,3 mM натриев дихидроген фосфат и разтвор на 3 mM натриев ацетат (регулиран до pH 6,5 ± 0,1 с оцетна киселина): метанол: тетрахидрофуран = 558:440:2 (v/v/v)

Разтворител Б: метанол

7.5.2. *Предложен елуиращ градиент:*

Време (min)	Разтворител А (%)	Разтворител Б (%)	Скорост на потока (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

Забележка: Елуиращият градиент може да изисква лека модификация, с оглед да се постигне разделянето, показано на фигура 1.

Температура на колоната: 30 °C.

7.5.3. *Инжекционен обем: 50 µl дериватизиращ реагент и 50 µl разтвор на пробата*

7.5.4. *Балансиране на колоната*

При ежедневното пускане на системата колоната се промива със 100 % разтворител Б за 15 минути, след това се настройва на А:Б = 40:60 и се балансира при 1 ml/min за 15 минути. Чрез впръскването на метанол (4.2.1) се извършва празна серия.

Забележка: Забележка: Преди дългосрочно съхранение колоната се промива с метанол:хлороформ = 80: 20 (v/v) в продължение на 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 задържане. Външният стандартен разтвор (7.3) се впръсква на всеки 5—10 разтвора на тестовите проби, с оглед да се оцени коефициентът на чувствителност 0.*

Забележка: Колоната трябва да бъде почиствана чрез промиване със 100 % разтворител Б (7.5.1) за най-малко 30 минути на всеки 20—25 серии.

7.6. **Метод на интегриране**

7.6.1. *Пик на PEDP*

PEDP се елуира като единствен пик. Площта на пика се определя чрез „valley-to-valley“ интегриране.

7.6.2. *Пик на триптамина*

Триптаминът се елуира като единствен пик (фигура 1). Площта на пика се определя чрез „valley-to-valley“ интегриране.

7.6.3. *Групи на пикове PS и PE*

При описаните условия (фигура 1) PS се елуира като два основни частично неразделени пика, предшествани от по-малък пик. PE се елуира като три основни частично неразделени пика. Определя се цялата площ на всяка група пикове, като се очертава основната линия, както е показано на фигура 1.

8. ИЗЧИСЛЯВАНЕ И ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Съдържанието на PS и PE в тестовата проба се изчислява, както следва: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

където:

C = съдържанието на PS или PE (mg/100 g прах) в тестовата проба

A_1 = площ на пика на PEDP в разтвора на стандартната проба (7.3)

A_2 = площ на пика на PS или PE в разтвора на тестовата проба (7.2)

T_1 = площ на пика на триптамин в разтвора на стандартната проба (7.3)

T_2 = площ на пика на триптамин в разтвора на тестовата проба (7.2).

9. ТОЧНОСТ НА ПРОЦЕДУРАТА

Забележка: Стойностите за повторяемост бяха изчислени в съответствие с международен стандарт IDF ([1]). Временната граница за възпроизводимост бе изчислена в съответствие с процедурата, определена в приложение III, буква б) към настоящото.

9.1. **Повторяемост**

Относителното стандартно отклонение на повторяемостта, което изразява варирането на резултатите от независим аналитичен анализ, получени от същия оператор чрез използване на същата апаратура и при същите условия върху същия тестов материал и в кратък период от време, не трябва да надвишава относителната стойност от 2 %. Ако при тези условия са получени две определяния, относителната разлика между двата резултата не трябва да бъде по-голяма от 6 % от средноаритметичната стойност на резултатите.

([1]) Международен стандарт IDF 135B/1991. Мляко и млечни продукти. Характеристики за точност на аналитичните методи. Описание на процедурата за съвместни изследвания.

9.2. **Възпроизводимост**

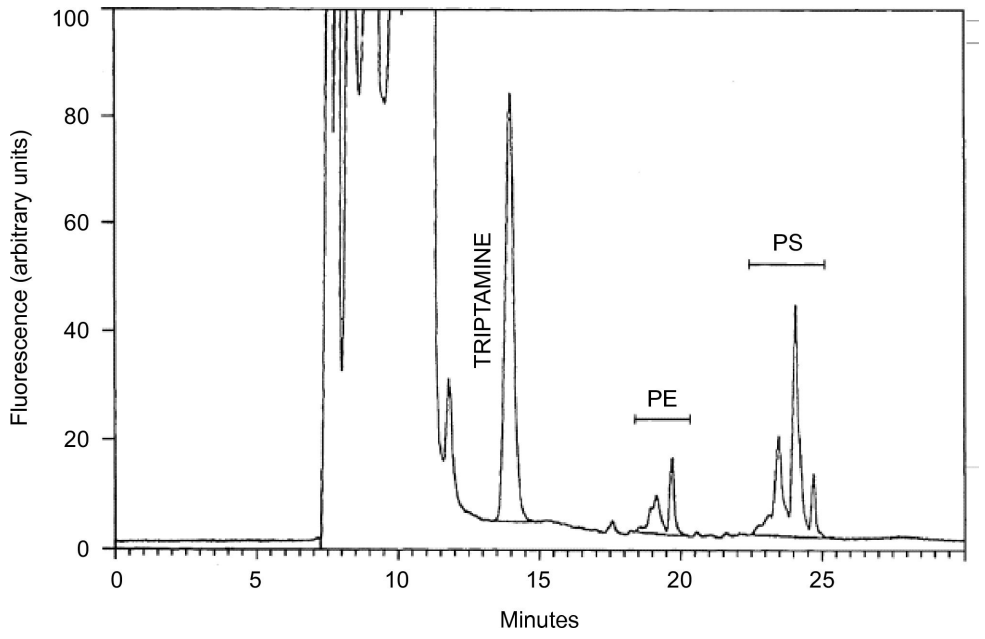
Ако са направени две определяния от оператори в различни лаборатории чрез използване на различна апаратура, при различни условия за анализа на същия тестов материал, относителната разлика между двата резултата не трябва да бъде по-голяма от 11 % от средноаритметичната стойност на резултатите.

10. ЗА СПРАВКА

10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., „Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids.“ Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).*

Фигура 1

HPLC-модели на OPA-производни на фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилетаноламин (PE) в метанолов екстракт от възстановено обезмаслено мляко на прах. Представен е методът на интегриране за пиковете на PS, PE и триптамин (вътрешен стандарт)



ПРИЛОЖЕНИЕ XV

(член 11)

ОТКРИВАНЕ НА АНТИМИКРОБНИ УТАЙКИ В ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ

Използва се скрининг тест за микробен инхибитор, използващ *Geobacillus stearotepmophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (идентичен на щам C953) като тестов микроорганизъм, който е достатъчно чувствителен да открива 4 μg бензилпеницилин на kg мляко и 100 μg сулфадимидин на kg мляко. Могат да се използват наличните в търговската мрежа комплекти за тестове, ако имат необходимата чувствителност за бензилпеницилин и сулфадимидин.

За теста се използва възстановено обезмаслено мляко на прах (1g прах + 9 ml дестилирана вода). Тестът се извършва, както е описано в ISO/TS 26844:2006 Мляко и млечни продукти — Определяне на антимикробиотични утайки — Тест IDF — бюлетин № 258/1991, раздел 1, глава 2, или съобразно инструкциите на производителя на теста ([1]).

Положителните резултати следва да се тълкуват, както следва:

1. Присъствието на β-лактами може да се потвърди чрез повтаряне на теста, като към тестовата система се добави пеницилиназа ([2]):

   Отрицателен резултат: Инхибиращото вещество е β-лактам антибиотик.

   Положителен резултат: Инхибиращото вещество не може да бъде открито чрез тази процедура, продължава се с 2.

2. Присъствието на сулфонамиди може да се потвърди чрез повтаряне на теста, като към тестовата система се добави p-аминобензоатна киселина:

   Отрицателен резултат: Инхибиращото вещество е сулфонамид.

   Положителен резултат: Инхибиращото вещество не може да бъде открито чрез тази процедура, продължава се с 3.

3. Присъствието на съчетание от β-лактами и сулфонамиди може да се потвърди чрез повтаряне на теста, като към тестовата система се добави пеницилиназа + p-аминобензоатна киселина:

   Отрицателен резултат: Инхибиращите вещества са β-лактам антибиотик и сулфонамид.

   Положителен резултат: Инхибиращото вещество не може да бъде открито чрез тази процедура.

([1]) Важна информация: при анализиране на обезмаслено мляко е възможно да се получат фалшиви положителни резултати. Затова е важно да се проверява дали използваната система за тестове не създава фалшиви положителни резултати.

([2]) Някои β-лактами са по-малко чувствителни към β-лактамаза. В такива случаи се препоръчва допълнителна обработка на пробата (1 ml от тестовата проба с 0,3 ml пеназа концентрат при 37 °C за 2 часа).

ПРИЛОЖЕНИЕ XVI

(член 12)

КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ В КОМБИНИРАНИ ФУРАЖИ ЧРЕЗ ЕНЗИМНА КОАГУЛАЦИЯ НА ПАРАКАЗЕИН

1. ЦЕЛ

Количествено определяне на обезмаслено мляко на прах в комбинирани фуражи чрез ензимна коагулация на параказеин.

2. ОБХВАТ

Този метод се прилага за комбинирани фуражи, съдържащи най-малко 10 % обезмаслено мляко на прах; наличието на големи количества мътеница и/или на определени немлечни протеини може да доведе до интерференции.

3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

3.1. Разтваряне на казеин, съдържащ се в комбинираните фуражи, чрез екстракция с разтвор на натриев цитрат.

3.2. Регулиране на калциево-йонната концентрация до изискваното равнище, за да се утаи параказеинът, чрез добавяне на сирищно вещество.

3.3. Азотното съдържание на параказеиновата утайка се определя чрез метода Kjeldahl, както е описан в стандарт ISO 8968—2:2001|IDF 20—2:2001; количеството на обезмасленото мляко на прах се изчислява на базата на минимално съдържание на казеин от 27,5 % (виж 8.1).

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 са свободни от азотни вещества.

4.1. Тринатриев цитрат дихидрат (1 % w/v разтвор)

4.2. Калциев хлорид (около 5 M разтвор)

75g $CaCl_2$ 2 H_2O се разтварят в 100 ml дестилирана вода чрез разклащане (внимание: екзотермична реакция). Разтворът се оставя до следващия ден, след което се филтрира. Разтворът се съхранява в хладилник.

4.3. 0,1 N натриев хидроксид

4.4. 0,1 N солна киселина

4.5. Течно телно сирище (активност около 100 IMCU/ml съгласно стандарт ISO 11815|IDF 157). Съхранява се в хладилник от 4 до 6 °C.

4.6. Реагенти за количествено определяне на азот в съответствие с Kjeldahl-метода, както е описан в стандарт ISO 8968—2:2001|IDF 20—2:2001.

5. АПАРАТУРА

Обичайна лабораторна апаратура, включваща:

5.1. Хаван или хомогенизатор

5.2. Аналитична везна, претегляща с точност 1 mg, с деления на 0,1 mg.

5.3. Настолна центрофуга (500 g или от 2 000 до 3 000 rpm) с 50 ml епруветки и 2 000 g

5.4. Магнитна бъркалка с (10 до 15 mm) механизми

5.5. 150 до 200 ml бехерови чаши

5.6. 250 и 500 ml колби

5.7. Стъклени фунии с диаметър от 60 до 80 mm

5.8. Бързофилтриращи безпепелни филтри с диаметър от 150 mm (Whatman № 41 или еквивалентни)

5.9. Капкомери с различен номинален обем

5.10. Термостатно контролирана водна баня при 37 °C ± 1° C

5.11. Измервател на pH с точност до 0,1 единици

5.12. Термометри с точност до 1 °C

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. **Приготвяне на пробата**

10 до 20 грама от пробата се стриват в хавана или се хомогенизират в мелницата до получаване на хомогенна смес.

6.2. **Разтваряне на млякото на прах и отделяне на неразтворимата утайка**

6.2.1. 1,000 ± 0,002 g от добре хомогенизирания комбиниран фураж (6.1) се претегля направо в 50 ml центрофужна епруветка. Добавят се 30 ml разтвор на тринатриев цитрат (4.1), предварително загрят до 45 °C ± 2 °C. Смесва се с помощта на магнитната бъркалка за най-малко пет минути или с енергично ръчно разклащане.

6.2.2. Центрофугира се на 500 g (2 000 до 3 000 об./мин) за 10 минути и бистрият воден супернатант се прелива в 150—200 ml стъкленица, като се внимава да не се изкачи нагоре материал от дъното.

6.2.3. Извършват се две допълнителни екстракции на утайката в съответствие със същата процедура, като екстрактите се добавят към първия.

6.2.4. Ако на повърхността се образува слой мазнина, се охлажда в хладилник, докато мазнината се втвърди, след което твърдият слой се отстранява със шпатула.

6.3. **Коагулиране на казеин с ензими на сирище**

6.3.1. При непрекъснато разбъркване се прибавя на капки 2 ml наситен разтвор на калциев хлорид (4.2) към общия воден екстракт (около 100 ml). Регулира се до pH 6,4—6,5 с разтвори на NaOH (4.3) или HCl (4.4). Поставя се в термостатично контролирана водна баня при 37 °C +/-1 °C за 15 до 20 минути, за да се постигне солеви баланс. Това се вижда чрез образуването на лека мътилка.

6.3.2. Течността се прехвърля в центрофужна епруветка и при 2 000 g се центрофугира за 10 минути, за да се отстрани утаеният материал. Супернатантът се прехвърля, без да се измива седимента, в друга центрофужна епруветка.

6.3.3. Температурата на супернатанта се регулира отново до 37 °C ± 1 °C. При разбъркване на екстракта се прибавя на капки 0,5 ml течно сирище (4.5). Коагулацията настъпва след две минути.

6.3.4. Пробата се връща във водната баня и се оставя при температура 37 °C ± 1 °C за 15 минути. Пробата се изважда от банята и коагулатът се прекъсва чрез разбъркване. Центрофугира се при 2 000 g за 10 минути. Супернатантът се филтрира през подходяща филтърна хартия (5.8), като филтърната хартия се запазва. Утайката се измива в центрофужната епруветка с 50 ml вода при приблизително 35 °C с разбъркване.

Центрофугира се отново при 2 000 g за 10 минути. Супернатантът се филтрира през предварително запазената филтърна хартия.

6.4. **Определяне на азот в казеин**

6.4.1. След измиването количеството утайка се прехвърля върху филтърната хартия, запазена в 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 стандарт ISO 8968—2:2001|IDF 20—2:2001.

7. ПРАЗЕН ТЕСТ

7.1. Необходимо е редовно да се прави празен тест, като се използва безпепелна филтърна хартия (5.8), навлажнена със смес от 90 ml разтвор на натриев цитрат (4.1), 2 ml разтвор на калциев хлорид (4.2), 0,5 ml течно сирище (4.5); измива се с 3 × 15 ml дестилирана вода преди минерализацията чрез Kjeldahl-метода, описан в стандарт ISO 8968—2:2001|IDF 20—2:2001.

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.

8. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

8.1. Процентът обезмаслено мляко на прах в комбинирания фураж се изчислява със следната формула:

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

където:

N е процентът азот в параказеина;

27,5 е коефициентът за конвертиране на определен казеин в процент обезмаслено мляко на прах;

2,81 и 0,908 са корекционните коефициенти, получени от регресионния анализ.

9. ТОЧНОСТ НА ПРОЦЕДУРАТА

9.1. **Повторяемост**

В най-малко 95 % от изследваните случаи двукратен анализ на същата проба от същия оператор в същата лаборатория не трябва да дава разлики в резултатите, по-големи от 2,3 g от обезмаслено мляко на прах в 100 g комбинирани фуражи.

9.2. **Възпроизводимост**

В най-малко 95 % от проучваните случаи анализираната от две лаборатории една и съща проба не трябва да дава разлики в резултатите, по-големи от 6,5 g обезмаслено мляко на прах в 100 g комбинирани фуражи.

10. ЗАБЕЛЕЖКИ

10.1. Прибавянето на големи проценти от някои 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 параказеина на млякото.

10.2. Прибавянето на мътеница може да доведе до сравнително ниски показатели, които се дължат на факта, че се определя само дозата, която е без мазнини. Добавянето на кисела мътеница може даде значително ниски цифри, което се дължи на непълното разтваряне в цитратния разтвор.

10.3. Добавянето на 0,5 % или повече лецитин също могат да доведат до ниски резултати.

10.4. Включването на обезмаслено мляко на прах, загрято до висока температура, може да доведе до прекалено високи данни, които се дължат на съвместното утаяване на определени протеини от суроватка с параказеина на млякото.

ПРИЛОЖЕНИЕ XVII

(член 13)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СКОРБЯЛА В ОБЕЗМАСЛЕНО МЛЯКО НА ПРАХ, ДЕНАТУРИРАНО МЛЯКО НА ПРАХ И КОМБИНИРАНИ ФУРАЖИ

1. ОБХВАТ

Този метод е за откриването на скорбяла като маркер в денатурирано мляко на прах.

Границата на откриване на метода е приблизително 0,05 g скорбяла на 100 g проба.

2. ПРИНЦИП

Реакцията е основана върху подобна, използвана в йодометрията:

— фиксиране чрез колоидите на свободния йод във воден разтвор,

— абсорбция чрез колоидните частици на скорбялата и чрез образуването на цвят.

3. РЕАГЕНТИ

3.1. Йоден разтвор:

— йод: 1,0 g,

— калиев йодид: 2,0 g,

— дестилирана вода: 100 ml,

— разтваря се 1,0 g йод и 2,0 g калиев йодид във вода в 100 ml мерителна колба с белег. Разрежда се до белега за 100 ml с вода и се разбърква.

4. АПАРАТУРА

4.1. Аналитична везна

4.2. Вана с вряща вода

4.3. Тестови епруветки, 25 mm × 200 mm.

5. ПРОЦЕДУРА

1,0 g от пробата се претегля с точност 0,1 g и се прехвърля в тестовата епруветка (4,3).

Прибавят се 20 ml дестилирана вода и се разбърква, за да се получи дисперсия на пробата.

Поставя се в кипящата водна баня (4,2) и се оставя за 5 минути.

Изважда се от банята и се охлажда до стайна температура.

Прибавя се 0,5 ml от йодния разтвор (3,1), разклаща се и се наблюдава полученият цвят.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Синьо оцветяване показва наличие в пробата на натурална скорбяла.

Когато 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. царевична или картофена) и вида на модифицираната скорбяла, която присъства в пробата.

При наличие на модифицирана скорбяла полученият цвят преминава във виолетов, червен или кафяв в зависимост от степента на модификация на кристалната структура на натуралната скорбяла.

ПРИЛОЖЕНИЕ XVIII

(член 14)

ПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЛАГА В СУХА СМЕТАНАО

1. ОБХВАТ

Това приложение излага метод за определяне на съдържанието на влага в суха сметана.

2. ТЕРМИНИ И ДЕФИНИЦИИ

За целите на настоящото приложение се прилагат следните дефиниции.

Съдържание на влага: загубата на маса, определена чрез процедурата, описана в този международен стандарт.

То се изразява като процент от масата.

3. ПРИНЦИП

Изсушаване на тестова доза при 102 ± 2 °C до постоянна маса и претегляне за определяне на загубата на маса.

4. АПАРАТУРА

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално следното:

4.1. Аналитична везна, претегляща с точност 1 mg, с деления на 0,1 mg.

4.2. Сушилна пещ, добре вентилирана, с възможност за термостатично регулиране на 102 ± 2 °C в хода на работния процес.

4.3. Ексикатор, зареден с прясно изсушен силициев гел с индикатор на влажността или с друг ефективен десикант.

4.4. Плоскодънни съдове с дълбочина приблизително 25 mm и диаметър приблизително 50 mm, изработени от подходящ материал (например стъкло, неръждаема стомана, никел или алуминий) с добре прилепващи и лесни за повдигане капаци.

4.5. Бутилки с шлифовани запушалки за смесване на лабораторните проби.

5. ЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

Важно е лабораторията да получи тестова проба, която да е напълно представителна и да не е била повредена или подменена по време на транспортирането или съхранението.

Вземането на проби не е част от метода, уточнен в този международен стандарт. Препоръчителен метод за вземане на проби се дава в ISO 707|IDF 50.

Пробата се съхранява при условия, които предотвратяват увреждане или промяна на състава ѝ.

6. ПОДГОТОВКА НА ТЕСТОВАТА ПРОБА

Тестовата проба се разбърква добре чрез неколкократно разтърсване и преобръщане на съда (ако е необходимо след прехвърляне на всички тестови проби в херметичен съд с достатъчен обем, за да може да бъде осъществена тази операция).

Ако не се постигне пълна хомогенност чрез тази процедура, тестовите дози (за две единични определяния) се вземат от възможно най-отдалечени места от подготвената тестова проба.

7. ПРОЦЕДУРА

7.1. **Подготовка на съда**

7.1.1. Съдът и неговият капак (4.4) се загряват в пещта (4.2) при 102 ± 2 °C за най-малко 1 час.

7.1.2. Капакът се поставя върху съда, веднага се поставя в ексикатора (4.3), оставя се да се охлади до стайна температура и се претегля с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg.

7.2. **Тестова доза**

Прехвърлят се около 1 до 3 g от подготвената тестова проба (6) в съда, покрива се с капака и се претегля с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg.

7.3. **Определяне**

7.3.1. Съдът се отхлупва и се поставя заедно с капака си в пещта (4.2) при 102 ± 2 °C за 2 часа.

7.3.2. Капакът се поставя върху съда, захлупеният съд веднага се поставя в ексикатора, оставя се да се охлади до стайна температура и се претегля с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg.

7.3.3. Съдът се отхлупва и отново се загрява заедно с капака си в пещта за 1 час. След това операция 7.3.2 се повтаря.

7.3.4. Процедурата на загряване и претегляне се повтаря, докато масата не намалее с 1 mg или по-малко, или не се увеличи между две поредни претегляния.

За изчисленията се взема най-ниската регистрирана маса.

8. ИЗЧИСЛЯВАНЕ И ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

8.1. **Изчисляване**

Съдържанието на влага, изразено в g/100g, се равнява на:

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

където:

m_0 е масата в грамове на съда и капака (7.1.2);

m_1 е масата в грамове на съда, капака и тестовата доза преди изсушаване (7.2);

m_2 е масата в грамове на съда, капака и тестовата доза след изсушаване (7.3.4).

Резултатът се закръгля до два десетични знака.

9. ТОЧНОСТ

Забележка: Стойностите за повторяемост и възпроизводимост са изведени от резултатите от междулабораторен тест (виж Steiger, G. Bulletin of IDF № 285/1993, стр. 21—28), проведен съгласно стандарта IDF 135B:1991. Мляко и млечни продукти — Характеристики за точност на аналитичните методи — Описание на процедурата за съвместни изследвания.

9.1. **Повторяемост**

Абсолютната разлика между два индивидуални единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в същата лаборатория от един и същ оператор, използващ едно и също оборудване в рамките на кратък период от време, не трябва да надвишава 0,20g влага на 100g продукт в повече от 5 % от случаите.

9.2. **Възпроизводимост**

Абсолютната разлика между два единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в различни лаборатории от различни оператори, използващи различно оборудване, не трябва да надвишава 0,40g влага на 100g продукт в повече от 5 % от случаите.

10. ОТЧЕТ ЗА ТЕСТА

Отчетът за теста трябва да съдържа:

— цялата необходима информация за пълното идентифициране на пробата;

— използвания метод за вземане на проби, ако е известен;

— използвания тестов метод, съгласно този международен стандарт;

— всички оперативни детайли, които не са уточнени в този международен стандарт или са посочени като незадължителни, заедно с подробности за всички инциденти, които може да са повлияли върху резултата (резултатите) от теста;

получения резултат (резултати) от теста и, ако е правена проверка на повторяемостта, получения окончателен резултат.

ПРИЛОЖЕНИЕ XIX

(член 15)

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЛАГА В КИСЕЛА МЪТЕНИЦА НА ПРАХ

1. ОБХВАТ

Определяне на съдържанието на влага в кисела мътеница на прах, първоначално предназначена за животинска храна.

2. ПРИНЦИП

Пробата се изсушава във вакуум. Загубата на маса се определя чрез претегляне.

3. АПАРАТУРА

3.1. Аналитична везна, претегляща с точност 1 mg, с деления на 0,1 mg

3.2. Съдове от неръждаем метал или от стъкло с капаци, които осигуряват херметично затваряне; работна повърхност, която позволява пробата да бъде разстлана на около 0,3 g/cm^2

3.3. Регулируема електрическа вакуумна пещ, снабдена с маслена помпа и с механизъм за впускане на горещ изсушен въздух през охладителна кула, съдържаща например калциев оксид или калциев сулфат (с маркер за влага).

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 заедно с капака в пещта (3.5) за най-малко един час. Капакът се поставя върху съда, веднага се поставя в ексикатора (3.4), оставя се да се охлади до стайна температура и се претегля с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg.

Съдът се отхлупва и около 5 g от пробата се поставя в съда и се претегля с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg. Съдът заедно с капака се поставя във вакуумната пещ (3.3), загрята предварително до 83 °C. За да не падне прекалено много температурата в пещта, съдът се поставя в нея възможно най-бързо.

Налягането се вдига на 100 тора (13,3 kPa) и се оставя да изсъхне до постоянно тегло (около 4 часа) при това налягане в поток от сух горещ въздух.

Времето за сушене се отчита от момента, в който температурата в пещта отново стане 83 °C. Пещта се връща внимателно към атмосферно налягане. Тя се отваря, капакът веднага се поставя 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, като теглото се записва до 0,1 mg. Изсушава се за още 30 минути във вакуумната пещ (3.3) при 83 °C и отново се претегля. Процедурата на загряване и претегляне се повтаря, докато масата на съда заедно с капака не намалее с 1 mg или по-малко, или не се увеличи между две поредни претегляния. За изчисленията се взема най-ниската регистрирана маса.

5. ИЗЧИСЛЯВАНЕ

% влага = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %

Където:

m_0 е масата в грамове на съда и капака;

m_1 е масата на съда, капака и тестовата доза преди изсушаване;

m_2 е масата на съда, капака и тестовата доза след изсушаване.

Резултатът се отчита с точност до 0,1 g/100 g.

6. ТОЧНОСТ

6.1. **Граница на повторяемост**

Абсолютната разлика между два независими единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в същата лаборатория от един и същ оператор, използващ едно и също оборудване в рамките на кратък период от време, не трябва да надвишава 0,4 g вода на 100 g мътеница на прах в повече от 5 % от случаите.

6.2. **Граница на възпроизводимост**

Абсолютната разлика между два независими единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в различни лаборатории от различни оператори, използващи различно оборудване, не трябва да надвишава 0,6 g вода на 100 g кисела мътеница на прах в повече от 5 % от случаите.

6.3. **Източник на данните за точност**

Данните за точност бяха определени от експеримент, проведен през 1995 г. и включващ осем лаборатории и 12 проби (6 празни дублирания).

ПРИЛОЖЕНИЕ XX

(Член 16)

РЕФЕРЕНТЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧИСТОТА НА МЛЕЧНАТА МАЗНИНА ЧРЕЗ ГАЗОВ ХРОМАТОГРАФСКИ АНАЛИЗ НА ТРИГЛИЦЕРИДИ — РЕВИЗИЯ 2

1. ОБХВАТ И ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

Този стандарт определя референтен метод за определяне на чистота на млечната мазнина чрез газов хроматографски анализ на триглицериди. Могат да бъдат открити както растителни, така и животински мазнини като говежда лой и свинска мас.

Чрез използване на определени формули за триглицериди се определя чистотата на млечната мазнина. Като цяло методът се прилага общо за краве мляко или продукти от краве мляко независимо от условията на хранене, отглеждане или лактация. Само по изключение високи концентрации на чисти растителни мазнини като масло от рапица в храната може да доведе до фалшиви положителни резултати. Млечни продукти, получени от отделни крави, също могат да дадат фалшив положителен резултат.

Методът е приложим по-специално за мазнина, извлечена от млечни продукти, предназначени да съдържат чиста млечна мазнина с непроменен състав като масло, сметана, мляко и мляко на прах. Технологичната обработка на млечната мазнина като премахването на холестерола или фракционирането може да доведе до фалшив положителен резултат. Това е вярно също така и за млечна мазнина, получена от обезмаслено мляко или от мътеница. Методът невинаги е приложим за мазнини, извлечени от сирена, тъй като процесът на зреене може да засегне състава на мазнините толкова много, че да се получи фалшив положителен резултат.

Забележка 1: Бутировата (n-бутанова) киселина (C_4) се среща изключително в млечна мазнина и прави възможно извършването на количествени оценки на ниски до средни стойности млечна мазнина в растителни и животински мазнини. Поради голямата вариация на C_4 приблизително в процентния обхват между 3,1 % и 3,8 % масов процент обаче е трудно да бъде получена качествена и количествена информация при прибавена до 20 % масов процент чужда мазнина към чиста млечна мазнина[1].

Забележка 2: На практика количествените резултати не могат да бъдат получени от стеролното съдържание на растителните мазнини, тъй като то е различно в зависимост от условията на производство и обработка. Нещо повече, качественото определяне на чужди мазнини с използване на стероли е неоднозначно.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Чистота на млечна мазнина: липса на растителни и животински мазнини, определена с процедурата, описана в този стандарт.

Забележка: Чистотата се определя чрез *S*-стойности, които се изчисляват на базата на триглицеридния състав. Масовите проценти триглицериди се изразяват като процент.

3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Мазнината, извлечена от мляко или млечни продукти, се анализира с газова хроматография с използването на колона с пълнеж или на къса капилярна колона за определяне на триглицеридите (TGs), разделени с общи въглеродни числа. Чрез внасяне на масовите проценти на молекулите мазнина с различни размери (от C_{24} до C_{54}, като се използват само четни C номера) в подходящи формули на TG се изчисляват *S*-стойностите. Ако *S*–стойностите надвишават границите, установени с чистата млечна мазнина, има открита чужда мазнина.

Забележка 1: Уместността и еквивалентността в употребата на колони с пълнеж и капилярни колони бяха доказани по-горе[2—4].

Забележка 2: *S*-стойността представлява сума от масовите проценти на TG, умножена съответно по дефинирани коефициенти.

4. РЕАГЕНТИ

Всички реагенти трябва да бъдат с признато аналитично качество.

4.1. Газ носител — азот или като вариант хелий или водород, всички с чистота най-малко 99,995 %.

4.2. Стандарти за мазнина, за стандартизиране на стандарт за млечна мазнина съгласно условия 7.3.3.

4.2.1. Стандарти за триглицериди, наситени, подходящи продукти се намират в търговската мрежа.

4.2.2. Стандарт за холестерол.

4.3. Метанол (CH_3OH), безводен.

4.4. n-хексан ($CH_3(CH_2)4CH_3$).

4.5. n-хептан ($CH_3(CH_2)5CH_3$).

4.6. Други газове, водород, с чистота най-малко 99,995 %, без органични замърсявания (C_nH_m < 1 µl/l); синтетичен въздух, без органични замърсявания (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Безводен натриев сулфат (Na_2SO_4).

5. АПАРАТУРА

Обичайна лабораторна апаратура, и по-специално следното:

5.1. **Високотемпературен газов хроматограф**

Високотемпературният газов хроматограф трябва да работи при температури най-малко 400 °C и да е оборудван с пламъчно-йонизационен детектор (FID). Мембраните, използвани в инжектора, трябва да понасят високи температури и да дават много ниска степен на изтичане. За капилярна газова хроматография се използва колонен инжектор. Винаги се използват графитни семеринги за свързване на колоната и на инжектора, и/или на втулките на детектора (където е приложимо).

5.2. **Хроматографска колона**

5.2.1. *Колона с пълнеж*

Използва се стъклена колона с вътрешен диаметър 2 mm и дължина 500 mm, запълнена с неподвижна фаза на 3 % OV 1 на 125 µm до 150 µm (големина на отворите 100 до 120) Gas ChromQ ([1]). Подготовката, силанизирането, запълването и приготвянето на колоната с пълнеж са описани в приложение A.

Като вариант може да се използва капилярна колона (5.2.2).

5.2.2. *Капилярна колона*

Използва се къса капилярна колона с дължина 5 m с неполярна неподвижна фаза, която може да издържи температури до 400 °C или повече ([2]). Колоната се подготвя чрез провеждане на 20 анализа на разтвор на млечна мазнина (7.2) в рамките на 2 или 3 дни с използване на настройките, дадени в 7.3.4.2. След това коефициентите на чувствителност (7.3.3) трябва да са близки до 1 и по-малки от 1,20.

Забележка: Могат да се използват колони с различни размери и различни неполярни и устойчиви на висока температура фази, стига техните показатели да съответстват на този стандарт. Вж. също 7.3.4.2.

5.3. Колона от Extrelut с капацитет 1 ml до 3 ml, запълнена със силициев гел, необходима само за извличането на млечна мазнина съгласно 7.1.3.

5.4. Графитни семеринги, които издържат температури най-малко 400 °C; за свързване на колоната за GC и за инжектора, и/или за втулките на детектора.

5.5. Водна баня, поддържаща температура 50 °C ± 2 °C.

5.6. Пещ, работеща при 50 °C ± 2 °C и 100 °C ± 2 °C.

5.7. Микролитров капкомер.

([1]) Пример за подходящ продукт, наличен в търговската мрежа. Тази информация се дава за удобство на потребителите на този международен стандарт и не представлява специална подкрепа на този продукт.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) е пример за подходящ продукт, наличен в търговската мрежа. Тази информация се дава за удобство на потребителите на този международен стандарт и не представлява специална подкрепа на този продукт.

5.8. Градуиран капкомер с капацитет 5 ml.

5.9. Колба с кръгло дъно, с капацитет 50 ml

5.10. Ерленмайерова колба с номинална вместимост 250 ml.

5.11. Фуния.

5.12. Филтърна хартия с фини пори.

5.13. Ротационен изпарител.

5.14. Ампули с номинален обем 1 ml, затворени с алуминиева плътно прилягаща или винтова запушалка, облечена с политетрафлуоретилен.

5.15. Спринцовка за инжектиране с бутало, което не достига до края на иглата (колона с пълнеж за GC).

Забележка: С тези спринцовки се получава по-добра повторяемост на резултатите.

5.16. Аналитична везна, претегляща с точност 1 mg, с деления на 0,1 mg

6. ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

В лабораторията трябва да е била изпратена представителна проба. Тя не трябва да е била повредена или подменена по време на транспортирането или съхранението.

Вземането на проби не е част от метода, уточнен в този международен стандарт. Препоръчителен метод за вземане на проби се дава в ISO 707|IDF 50[5].

7. ПРОЦЕДУРА

7.1. **Подготовка на тестовата проба**

За подготовка на тестовата проба се използва един от следните три метода за извличане на млечна мазнина:

7.1.1. *Изолиране от масло или млечна мазнина (butteroil)*

Разтопяват се 50 g до 100 g тестова проба при 50 °C с използване на водна баня (5.5) или пещ (5.6). Поставят се 0,5 g до 1,0 g натриев сулфат (4.7) в сгъната филтърна хартия (5.12). 250 ml ерленмайерова колба (5.10) и фуния (5.11) с филтърна хартия в нея се загряват в пещта (5.6) до 50 °C. Филтрира се слоят мазнина от стопената проба, като предварително затоплената колба, фунията и вмъкнатият в нея филтър се държат в пещта. Да се проследи да не се изсипе и суроватка.

Само в случаите, когато е налично ограничено количество от тестовата проба, може да се използва по-малка тестова проба, а процедурата следва да бъде съответно адаптирана. Същевременно работата с по-малка доза тест води до по-висок риск от получаване на непредставителна проба.

Забележка 1: Масло може да се получи от сметана чрез биене и грижливо измиване на получените зрънца масло.

Забележка 2: Млечната мазнина, получена чрез процедурата по 7.1.1, ще е почти без фосфолипиди.

7.1.2. *Извличане с гравиметричния метод на Röse — Gottlieb*

Извлича се фракцията мазнина от тестовата проба с използване на гравиметричния метод, описан в един от стандартите ISO 1211 IDF 001D, ISO 2450IDF 016C или ISO 7328IDF 116A.

Забележка: Ако в получената млечна мазнина има фосфолипиди, ще се получи холестеролов пик, увеличен с приблизително 0,1 %. Съставът на TG, стандартизиран до 100 % включително холестеролът, следователно се повлиява само пренебрежимо малко.

7.1.3. *Извличане от мляко с използване на колони със силициев гел*

С микролитров капкомер (5.7) се добавят 0,7 ml от тестовата проба, темперирани до 20 °C, към 1 ml до 3 ml колона Extrelut (5.3). Оставя се да се разпредели равномерно по силициевия гел за около 5 min.

За денатуриране на протеино-липидните комплекси се прибавя с градуиран капкомер (5.8) 1,5 ml метанол (4.3) в колоната Extrelut. След това се извлича фракцията на мазнина от тестовата проба с 20 ml *n*-хексан (4,4). *n*-хексанът се прибавя бавно и в малки количества. Отцеждащият се разтворител се събира в 50 ml колба с кръгло дъно (5,9), предварително изсушена до константа, известната маса претеглена с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg.

Колоната се оставя да се отцеди напълно след извличането. Разтворителите се дестилират от елуата в ротационен изпарител (5.13), чиято водна баня е регулирана между 40 °C и 50 °C. След дестилирането на разтворителите колбата с кръгло дъно и съдържанието ѝ се изсушават и след това се претеглят с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg. Определя се добива на мазнина в тегловно изражение, като масата на изсушената празна колба с кръгло дъно се извади от така получената маса.

Забележка: Методите за екстракция на мазнина по 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 значителни количества частични глицериди или фосфолипиди. Поради това приложението на този международен стандарт е ограничено по отношение на някои продукти, по-специално сирене.

7.2. **Приготвяне на разтвор на пробата**

За газова хроматография с колона с пълнеж се използва 5 %-ен (обемен процент) разтвор на мазнината (получена съгласно 7.1) в *n*-хексан (4.4) или *n*-хептан (4.5). В зависимост от размерите на колоната се използва концентрация от 1 % (0,53 mm, ID wide-bore) или по-ниска за колонно впръскване с капилярна колона.

В зависимост от използваната колона и получената в 7.1.3 маса мазнина се определя количеството разтворител (4.4 или 4.5), което да се прибави към материала от тестовата проба в колбата на базата на претегляне с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg. Остатъкът се разтваря напълно.

Прехвърля се около 1 ml от разтвора на пробата в ампула (5.14).

7.3. **Хроматографско определяне на триглицериди**

7.3.1. *Дрейф на основната линия*

За да се намали до минимум покачването на основната линия, колоната трябва да бъде подготвена, както е посочено в 5.2.2 (за капилярна колона) или в приложение A.4 (за колона с пълнеж).

Забележка: Поради високата температура в колоната анализът на триглицеридите е особено изложен на покачване на основната линия в редицата на високите въглеродни числа.

7.3.2. *Техника за впръскване*

7.3.2.1. Колона с пълнеж

За да се избегнат дискриминиращи ефекти, се прилага техниката на горещо впръскване за подобряване на количественото определяне на триглицеридните компоненти, кипящи при високи температури. Иглата се пълни с въздух чрез изтегляне на разтвора на мазнина в спринцовката. Иглата се вмъква в инжектора и се затопля преди впръскването за приблизително три секунди. После съдържанието на спринцовката се впръсква бързо.

7.3.2.2. Капилярна колона

Когато се използва студено колонно впръскване (7.3.4.2), иглата на спринцовката се вмъква и съдържанието се впръсква незабавно. Времето на задържане на иглата в порта на инжектора трябва да е такова, че да се избегне широко размиване на пика на разтвора в опашката.

Забележка: Оптималното време на задържане обикновено е около 3 сек.

7.3.3. *Калибриране*

7.3.3.1. Общи положения

За калибриране на тестовите проби се извършват два до три анализа на стандартизирана млечна мазнина в началото на всеки ден. Последният анализ на стандартизирана млечна мазнина се използва за определяне на коефициентите на чувствителност RF_{si} (масов процент/процент на площта) на триглицеридите и холестерола, които се прилагат към последващите тестови проби (вж. 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

където:

w_{si} е масовият процент на всеки триглицерид или холестерол в стандартизираната млечна мазнина;

A_{si} е цифровата стойност на площта на пика на всеки триглицерид или холестерол в стандартизираната млечна мазнина;

Използват се 7.3.3.2 или 7.3.3.3 за получаване на стандартизирана млечна мазнина с известен триглицериден състав.

7.3.3.2. Стандарт за млечна мазнина, наличен в търговската мрежа

Най-добрият начин за определяне на коефициента на чувствителност на всяка съставляваща на тестовата проба е да се използва стандартизирана млечна мазнина със сертифициран състав на триглицериди.

Забележка: Подходящ стандарт е CRM 519 (безводна млечна мазнина), който може да се намери от Института за референтни материали и метрология (ИРММ) в Geel, Белгия ([1]).

7.3.3.3. Лабораторен стандарт за млечна мазнина

Приготвя се около 1 g смес от стандарти за мазнина (вж. 4.2, съдържащи най-малко наситените триглицериди, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} и C_{54}, както и холестерол; после, за предпочитане, C_{50} и C_{52}) чрез претегляне с точност до 1 mg, като теглото се записва до 0,1 mg, за получаване на относителен триглицериден състав, подобен на млечната мазнина.

Анализира се неколкократно разтвор от смесените стандарти за мазнина в *n*-хексан (4.4) или *n*-хептан (4.5) съгласно 7.3.4. В същата серия се анализира неколкократно млечна мазнина със среден състав.

Определят се коефициентите на чувствителност на триглицеридите от сместа на стандарти за мазнина. Междинните коефициенти на чувствителност на триглицеридите, които не присъстват в сместа, могат да бъдат изчислени чрез математическа интерполация. Получените коефициенти на чувствителност се прилагат към млечната мазнина за получаване на стандартизиран състав. Така получената стандартизирана млечна мазнина може да се съхранява няколко години в азотна среда и при максимална температура -18 °C.

7.3.4. *Хроматографски условия*

Забележка: Използването на колона с пълнеж или на капилярна колона обикновено води до разделяне, подобно на показаното на фигура 1. Разделянето на четните триглицериди обикновено не се наблюдава и трябва да се избягва.

7.3.4.1. Колона с пълнеж

а) Температурна програма: програмира се първоначална температура на пещта от 210 °C. Тази температура се поддържа една минута. След това температурата се увеличава с 6 °C/min до 350 °C. Тази (крайна) температура се поддържа за 5 минути.

б) Температура на детектора и инжектора: и за двата: 370 °C.

в) Газ носител: използва се азот с постоянна скорост на потока от около 40 ml/min. Точните параметри на скоростта на потока на газа-носител се регулират така, че C_{54} да се елуира при 341 °C.

г) Времетраене на анализа: 29,3 min.

д) Инжекционен обем: впръсква се 0,5 µl от 5 % (обемен процент) тестов разтвор.

([1]) Пример за подходящ продукт, наличен в търговската мрежа. Тази информация се дава за удобство на потребителите на този международен стандарт и не представлява специална подкрепа на този продукт.

Ако не се провеждат анализи на триглицериди, първоначалната температура на пещта се поддържа, както е посочено в а), температурите на детектора и инжектора — както е посочено в б), а скоростта на потока на газа-носител — както е посочено във в), на постоянна основа, а също и през нощта, почивните и празничните дни. Това осигурява най-добри резултати на колоната.

7.3.4.2. Капилярна колона

а) Температурна програма: програмира се първоначална температура на пещта от 80 °C. Тази температура се поддържа половин минута. След това температурата се увеличава с 50 °C/min до 190 °C и последователно с 6 °C/min до 350 °C. Тази (крайна) температура се поддържа за 5 минути.

б) Температура на детектора: 370 °C.

в) Газ носител: азот с постоянна скорост на потока от около 3 ml/min.

г) Времетраене на анализа: 34,4 min.

д) Инжекционен обем: впръсква се 0,5 µl от 1 % (обемен процент) тестов разтвор.

Тези настройки се поддържат и при неработеща система за осигуряване на най-добри резултати (вж. 7.3.4.1).

Аналитичните настройки, дадени в 7.3.4.2, са подходящи за използване с wide-bore колона (0,53 mm ID), както е посочено в 5.2.2. Могат да бъдат прилагани различни условия, ако се използва друг размер на колоната или друга фаза.

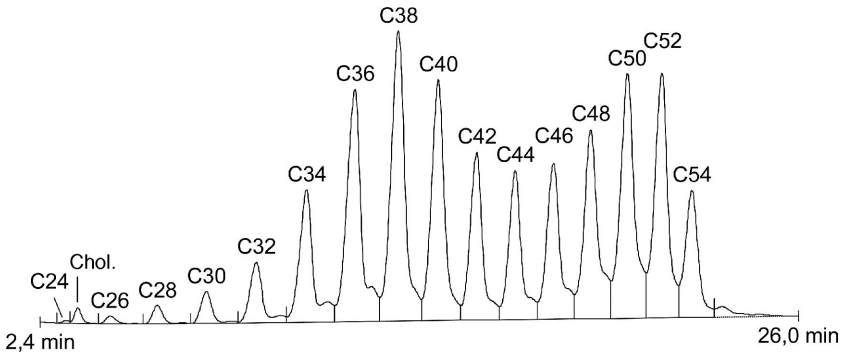
8. ИНТЕГРИРАНЕ, ОЦЕНКА И КОНТРОЛ НА АНАЛИТИЧНИЯ РЕЗУЛТАТ

Пиковете в хроматограмата се оценяват със система за интегриране, която може да чертае и реинтегрира базови линии. На фигура 1 е показана правилно интегрирана хроматограма, докато на фигура 2 се вижда спорадична грешка в края на основната линия след C_{54}, която засяга процентните съдържания на всички триглицериди. Независимо от това елуирането на пиковете след C_{54} се изключва от оценяването.

Триглицериди с нечетно ацил-с число ($2n + 1$) се комбинират с предходното четно число триглицерид ($2n$). Ниските съдържания на C_{56} не се вземат под внимание. Оставащите триглицериди (проценти площ на пиковете), включително холестерол, се умножават по съответните коефициенти на чувствителност на стандартизираната млечна мазнина (последно калибриране) и се нормализират до 100 % съгласно 9.1.

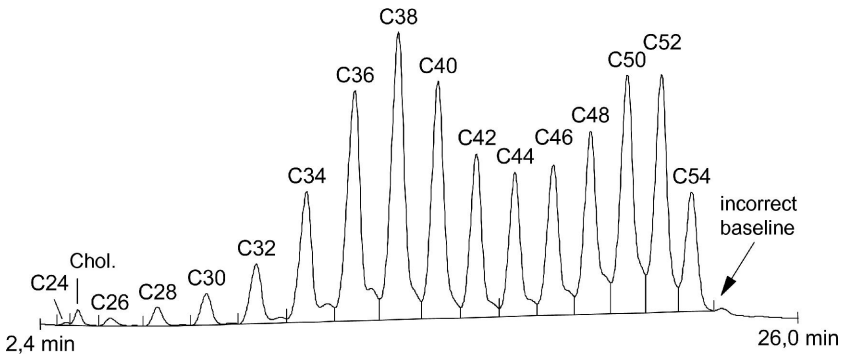
Фигура 1

Пример за хроматограма на триглицеридите на млечната мазнина с правилно определена основна линия



Фигура 2

Пример за хроматограма на триглицеридите на млечната мазнина с неправилно определена основна линия



За контролиране на условията на измерване се прави сравнение с коефициентите на отклонение CV, изразени като проценти, на различните триглицериди, дадени в таблица 1, които са основани на 19 поредни анализа на проби млечна мазнина.

Ако тези коефициенти значително надвишават стойностите, дадени в таблица 1, хроматографските условия са неподходящи.

Забележка: Стойностите, посочени в таблица 1, не са задължителни, но са ориентировъчни за целите на качествения контрол.

В случай обаче на приемането на по-високи стойности на CV границите на повторяемост и възпроизводимост, посочени в условие 10, трябва въпреки това да бъдат спазвани.

Таблица 1

Коефициентите на отклонение на съдържанието на триглицериди (19 поредни анализа)

Триглицерид	CV %
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. ИЗЧИСЛЯВАНЕ И ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

9.1. **Триглицериден състав**

9.1.1. *Изчисляване*

Изчислява се масовият процент на всеки триглицерид (за i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52} и C_{54}) плюс холестерол, w_i, в процентно съдържание от общото съдържание на триглицериди на тестовата проба, чрез използване на следната формула:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum(A_1 \times RF_{si})} \times 100 \qquad (2)$$

където

A_i е цифровата стойност на площта на пика на всеки триглицерид в тестовата проба;

RF_{si} е коефициентът на чувствителност на всеки триглицерид, определен чрез калибриране (7.3.3).

9.1.2. *Изразяване на резултатите от теста*

Резултатите се изразяват с точност до втория десетичен знак.

9.2. ***S*-стойности**

9.2.1. *Изчисляване*

9.2.1.1. Изчисляват се *S*-стойностите в проценти чрез включване на изчисленото w_i (9.1.1) на подходящите проценти на триглицериди във формули от (3) до (7). Използват се всички формули независимо от това наличието на каква чужда мазнина се подозира.

9.2.1.2. Соево масло, слънчогледово масло, маслиново масло, рапично масло, ленено масло, масло от пшенични зародиши, масло от царевични зародиши, масло от памук и рибно масло.

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Кокосово масло и масло от палмова сърцевина.

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Палмово масло и говежда лой.

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Свинска мас.

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6. Общо.

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Изразяване на резултатите от теста*

Резултатите се изразяват с точност до втория десетичен знак.

9.3. **Откриване на чужди мазнини**

Петте *S*-стойности, получени в 9.2.1, се сравняват със съответните *S*-граници, посочени в таблица 2.

Когато и петте *S*-стойности са в границите, посочени в таблица 2, тестовата проба се приема за чиста млечна мазнина. Ако обаче някоя от *S*-стойностите попадне извън съответните граници, се приема, че пробата съдържа чужда мазнина.

Независимо че отделните формули от (3) до (6) са по-чувствителни за някои чужди мазнини, отколкото общата формула (7) (вж. таблица Б.1), положителен резултат, получен само с една от формулите от (3) до (6), не дава основания да се правят заключения за вида на чуждата мазнина.

В приложение Б се описва процедура за изчисляване на съдържанието на растителна или животинска мазнина в подправената млечна мазнина. Тази процедура не е валидирана и е дадена само за сведение.

Таблица 2

***S*-граници за чисти млечни мазнини**

Чужда мазнина	Формула	*S*-граници [a]
Соево масло, слънчогледово масло, маслиново масло, рапично масло, ленено масло, масло от пшенични зародиши, масло от царевични зародиши, масло от памук, рибено масло.	(3)	98,05 до 101,95
Кокосово масло и масло от палмова сърцевина	(4)	99,42 до 100,58
Палмово масло и говежда лой	(5)	95,90 до 104,10
Свинска мас	(6)	97,96 до 102,04
Общо	(7)	95,68 до 104,32

[a] Изчислено при доверително равнище 99 %, така че само се посочва наличието на чужда мазнина, ако границите на съответната формула бъдат превишени (вж. таблица Б.1).

10. ТОЧНОСТ

10.1. **Междулабораторен тест**

Стойностите на повторяемост и възпроизводимост са определени на базата на формули от (3) до (7) с използване на чиста млечна мазнина и могат да не са приложими към матрици, различни от дадените.

10.2. **Повторяемост**

Абсолютната разлика между два единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в същата лаборатория от един и същ оператор, използващ едно и също оборудване в рамките на кратък период от време, могат да надвишават границите, посочени в таблица 3, в не повече от 5 % от случаите.

Таблица 3

Граници на повторяемост r за формули от (3) до (7)

Чужда мазнина	Формула	r %
Соево масло, слънчогледово масло, маслиново масло, рапично масло, ленено масло, масло от пшенични зародиши, масло от царевични зародиши, масло от памук, рибено масло	(3)	0,67
Кокосово масло и масло от палмова сърцевина	(4)	0,12
Палмово масло и говежда лой	(5)	1,20
Свинска мас	(6)	0,58
Общо	(7)	1,49

10.3. **Възпроизводимост**

Абсолютната разлика между два единични тестови резултата, получени с един и същ метод върху идентичен тестов материал в различни лаборатории от различни оператори, използващи различно оборудване, могат да надвишават границите, посочени в таблица 4, в не повече от 5 % от случаите.

Таблица 4

Граници на възпроизводимост R за формули от (3) до (7)

Чужда мазнина	Формула	R %
Соево масло, слънчогледово масло, маслиново масло, рапично масло, ленено масло, масло от пшенични зародиши, масло от царевични зародиши, масло от памук, рибено масло	(3)	1,08
Кокосово масло и масло от палмова сърцевина	(4)	0,40
Палмово масло и говежда лой	(5)	1,81
Свинска мас	(6)	0,60
Общо	(7)	2,07

11. НЕСИГУРНОСТ НА ИЗМЕРВАНЕТОо

С повторяемостта *r* и възпроизводимостта *R* може да се изчисли разширената неопределеност за дадена *S*-стойност.

Включването на разширената неопределеност (на базата на двойни анализи) в *S*-границите в таблица 2 води до разширени *S*-граници, които са представени в таблица 5.

Таблица 5

Разширени *S*-граници за чисти млечни мазнини, включващи разширената неопределеност

Чужда мазнина	Формула	Разширени *S*-граници
Соево масло, слънчогледово масло, маслиново масло, рапично масло, ленено масло, масло от пшенични зародиши, масло от царевични зародиши, масло от памук, рибено масло	(3)	97,36 до 102,64
Кокосово масло и масло от палмова сърцевина	(4)	99,14 до 100,86
Палмово масло и говежда лой	(5)	94,77 до 105,23
Свинска мас	(6)	97,65 до 102,35
Общо	(7)	94,42 до 105,58

12. ОТЧЕТ ЗА ТЕСТА

Отчетът за теста трябва да съдържа:

— цялата необходима информация за пълното идентифициране на пробата,

— използвания метод за вземане на проби, ако е известен,

— използвания тестов метод съгласно този международен стандарт,

— всички оперативни детайли, които не са уточнени в този международен стандарт или са посочени като незадължителни, заедно с подробности за всички инциденти, които може да са повлияли върху резултата (резултатите) от теста,

— получения резултат (резултати) от теста и, ако е правена проверка на повторяемостта, получения окончателен резултат.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(нормативно)

ПОДГОТОВКА НА КОЛОНА С ПЪЛНЕЖ

А.1 РЕАКТИВИ И АПАРАТУРА

А.1.1 **Толуол** ($C_6H_5CH_3$).

А.1.2 **Диметилдихлоросиланов** [$Si(CH_3)2Cl_2$] разтвор.

Разтварят се 50 ml диметилдихлоросилан в 283 ml толуол (А.1.1).

А.1.3 Разтвор на **кокосово масло** с масов процент 5 % кокосово масло в *n*-хексан (4.4) или *n*-хептан (4.5).

А.1.4 **Неподвижна фаза**, 3 % OV-1 на 125 μm до 150 μm (големина на отворите 100 до 120) Gas ChromQ ([1]).

Забележка: Указанието за размера на частиците е преобразувано в микрометри съгласно BS 410 (всички части) [6].

А.1.5 **Стъклена колона** с вътрешен диаметър 2 mm и дължина 500 mm във формата на U.

А.1.6 **Апаратура** за пълнене на колоната с пълнеж.

А.1.6.1 **Колона за пълнене** с горни капаци с винт, снабдена с белег, до който може да бъде пълнено необходимото количество от стационарната фаза.

А.1.6.2 **Фино сито** с големина на отворите около 100 μm, с капак с винт, подходящ за запушване на стъклената колона, съгласно фигура А.3.

А.1.6.3 **Силанизирана стъклена вата**, деактивирана.

А.1.6.4 **Вибратор** за равномерно разпределение на стационарната фаза по време на пълнене.

А.1.6.5 **Устройства за силанизиране** за силанизиране на стъклената повърхност на колоната.

А.1.6.6 *Woulff бутилка*

А.1.6.7 *Водна смукателна помпа.*

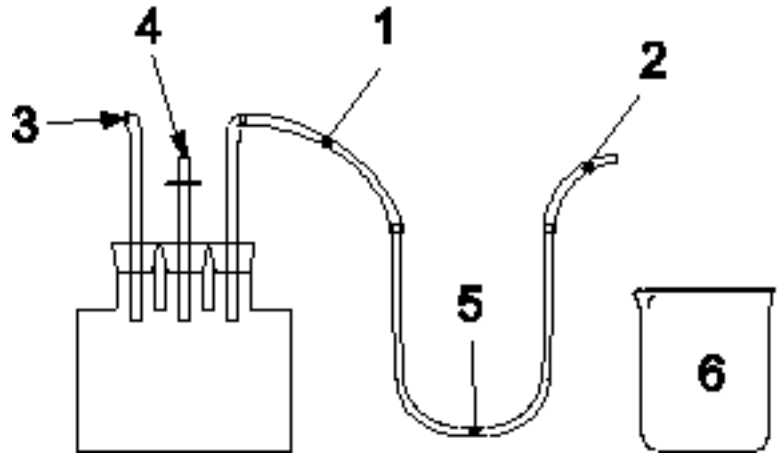
А.2 СИЛАНИЗИРАНЕ (ДЕАКТИВИРАНЕ НА СТЪКЛЕНАТА ПОВЪРХНОСТ)

След свързването на Woulff бутилката (А.1.6.6) към водната смукателна помпа (А.1.6.7) тръбичката 2 се потапя (вж. фигура А.1) в диметилхлоросилановия разтвор (А.1.2). Колоната (А.1.5) се напълва с този разтвор чрез затваряне на спирателния кран. Спирателният кран се отваря отново и последователно се махат двете тръбички. Колоната се закрепва на стойка. Напълва се изцяло с помощта на капкомер с диметилдихлоросиланов разтвор (А.1.2).

([1]) Пример за подходящ продукт, наличен в търговската мрежа. Тази информация се дава за удобство на потребителите на този международен стандарт и не представлява специална подкрепа на този продукт.

Фигура A.1

Апаратура за силанизиране



Легенда

1 тръбичка 1

2 тръбичка 2

3 водна смукателна помпа

4 спирателен кран

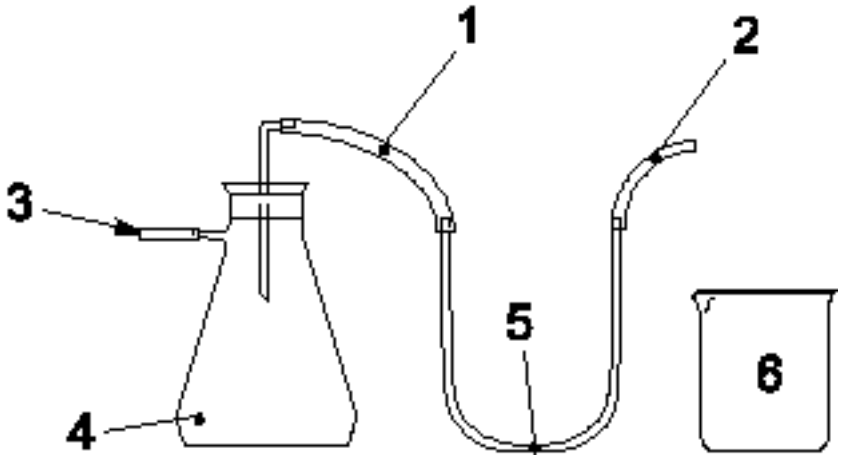
5 стъклена колона

6 диметилдихлоросилан и толуол

Колоната се оставя за 20 до 30 min. После бутилката Woulff се заменя с колба за филтриране. Колоната се изпразва чрез свързване с водната смукателна помпа (A.1.6.7) (вж. фигура A.2). Изпразнената колона се промива последователно със 75 ml толуол (A.1.1) и 50 ml метанол (4.3) чрез потапяне на тръбичка 2 в разтворителя. Изплакнатата колона се изсушава в пещта (5.6), регулирана на 100 °C, за около 30 минути.

Фигура A.2

Апаратура за промиване



Легенда

1 тръбичка 1

2 тръбичка 2

3 водна смукателна помпа

4 колба за филтриране

5 стъклена колона

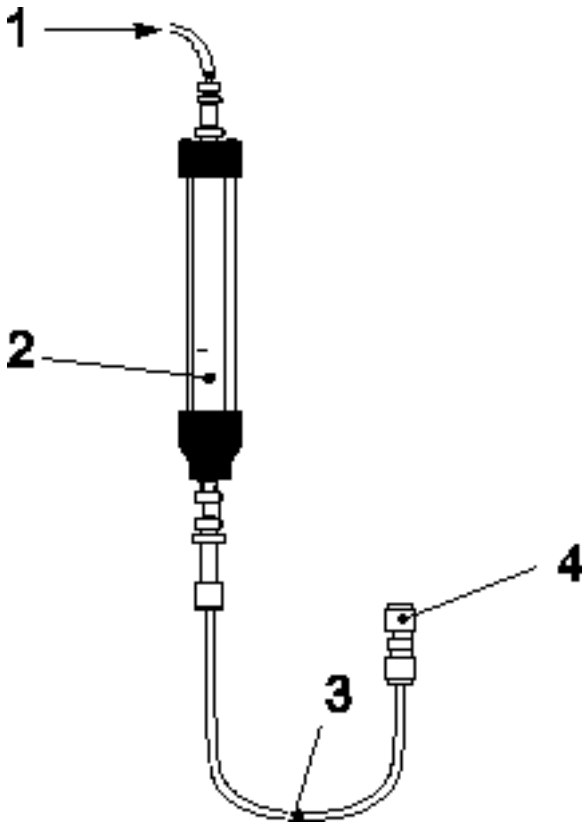
6 агент за промиване

A.3 ПЪЛНЕНЕ

Колоната се напълва с използване на апаратурата, представена на фигура A.3. Неподвижната фаза (A.1.4) се поставя в колоната за пълнене (A.1.6.1) до белега. Долният край на стъклената колона, която ще се пълни, се запушва с около 1 cm дълга запушалка от силанизирана и компресирана стъклена вата (A.1.6.3). Краят на колоната се затваря с финото сито (A.1.6.2).

Фигура A.3

Пълнене на стъклената колона



Легенда

1 вход на азот

2 колона за пълнене, да се напълни до белега с OV-1

3 стъклена колона за напълване

4 винтова запушалка с филтър, в която се притискат стъклената вата и неподвижната фаза

Колоната се напълва под налягане (300 kPa и поток от азот) със стационарната фаза. За да се получи еднакво, непрекъснато и стабилно напълване, докато се пълни, нагоре и надолу по стъклената колона се движи вибратор. След напълване се поставя здрава запушалка от силанизирана стъклена вата (A.1.6.3) на другия край на напълнената колона. Стърчащите краища се отрязват. Запушалката се натъпква в колоната на няколко милиметра дълбочина с шпатула.

A.4 ПОДГОТОВКА

През стъпки от а) до в) не се свързва долният край на колоната с детектора, за да се избегне контаминация. Напълнената колона (A.3) се подготвя по следния начин:

а) колоната се изплаква с азот за 15 min при скорост на потока 40 ml/min и регулиране на хроматографската пещ на 50 °C;

б) колоната се загрява с 1 °C/min до 355 °C, като скоростта на потока на азот е 10 ml/min;

в) колоната се държи при 355 °C за 12 до 15 часа;

г) впръсква се двукратно 1 µl разтвор на кокосово масло (A.1.3) при използване на температурната програма за колона с пълнеж, дадена в 7.3.4.1;

Забележка: Кокосовото масло се състои почти изцяло от кипящи при висока температура триглицериди от C_{50} до C_{54} и по този начин намалява усилието при подготовката на колоната с оглед на съответните коефициенти на чувствителност.

д) впръскват се 20 пъти по 0,5 µl разтвор на млечна мазнина съгласно 7.2 в рамките на 2 или 3 дни с използване на настройките за колона с пълнеж, дадени в 7.3.4.1.

— За анализа на тестовите проби се използват само колони с коефициенти на чувствителност, близки до 1. Коефициентите на чувствителност не бива да надвишават 1,20.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(информативно)

КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЧУЖДА МАЗНИНА

Б.1 ОБЩИ ПОЛОЖЕНИЯ

В таблица Б.1 са посочени границите на откриване за различни чужди мазнини, изчислени при доверително равнище 99 %. В средната колона се показват границите на откриване на най-добрата индивидуална формула от (3) до (6).

Границите на откриване на общата формула (7), показани в най-дясната колона, са донякъде по-високи. По принцип формула (7) е необходима само за количественото определяна на чужда мазнина.

С всички формули могат също така да се откриват и съчетания от различни чужди мазнини. Вариациите в състава на триглицеридите между индивидуални проби от един вид чужда мазнина нямат съществено въздействие върху границите на откриване.

При използване и на отделните формули, и на общата формула се прилагат границите на откриване на отделните формули. Същевременно *S*-стойността на общата формула е необходима за количественото определяне в някои случаи (Б.2).

Таблица Б.1

99 % граници на откриване на чужда мазнина, прибавена към млечна мазнина, в проценти

Чужда мазнина	Отделни формули %	Обща формула %
Соево масло	2,1	4,4
Слънчогледово масло	2,3	4,8
Маслиново масло	2,4	4,7
Кокосово масло	3,5	4,3
Палмово масло	4,4	4,7
Масло от палмова сърцевина	4,6	5,9
Рапично масло	2,0	4,4
Масло от ленено семе	2,0	4,0
Масло от пшенични зародиши	2,7	6,4
Масло от царевични зародиши	2,2	4,5
Масло от памук	3,3	4,4
Свинска мас	2,7	4,7
Говежда лой	5,2	5,4
Хидрогенирано рибено масло	5,4	6,1

Б.2 ИЗЧИСЛЯВАНЕ

Извършва се количествено определяне на чуждата мазнина само ако най-малко една от *S*-границите (таблица 2 или таблица 5) е надвишена. За получаване на количествена информация се изчислява масовият процент на чужда мазнина или масовият процент на смес от чужди мазнини w_f в тестовата проба с помощта на следната формула:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (B.1)$$

където:

S е резултатът, получен чрез включването на данни за триглицеридите от млечна мазнина, към която е била прибавена чужда мазнина или смес от чужди мазнини, в една от формулите от (3) до (7);

S_f е константа, зависеща от вида прибавена чужда мазнина.

Ако видът на прибавената към млечната мазнина чужда мазнина не е известен, се използва обща стойност S_f, равна на 7,46 (таблица Б.2). Винаги се използва *S*-стойността, получена от формула (7), дори и ако *S*-границите не са превишени, но тези в друга формула са.

Когато чуждите мазнини са известни, техните индивидуални S_f-стойности (таблица Б.2) се включват във формулата (Б.1). Избира се съответната формула за чужда мазнина от формули (3) до (6), за да се изчисли *S*.

Таблица Б.2

S_f-стойности на различни чужди мазнини

Чужда мазнина	S_f
Неизвестна	7,46
Соево масло	8,18
Слънчогледово масло	9,43
Маслиново масло	12,75
Кокосово масло	118,13
Палмово масло	7,55
Масло от палмова сърцевина	112,32
Рапично масло	3,30
Масло от ленено семе	4,44
Масло от пшенични зародиши	27,45
Масло от царевични зародиши	9,29
Масло от памук	41,18
Свинска мас	177,55
Говежда лой	17,56
Рибено масло	64,12

Б.3 ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ТЕСТА

Резултатите от теста се изразяват с точност до втория десетичен знак.

Библиография

1. Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82—85
2. Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16—17
3. Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265—270
4. Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791—797
5. ISO 707IDF 50, Мляко и млечни продукти — Указания за вземане на проби
6. BS 410:1988, Тестови филтри — Технически изисквания и тестуване
7. Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, pp. 219—242
8. Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol.*, 93, 1991, pp. 538—544
9. DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Откриване и определяне на чужди мазнини посредством газов хроматографски триглицириден анализ]
10. 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. № VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93
11. Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, pp. 505—510

ПРИЛОЖЕНИЕ XXI

(член 18)

ПРИЛОЖИМА ПРОЦЕДУРА ПРИ ОСПОРВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ АНАЛИЗ (ХИМИЧЕСКИ АНАЛИЗ)

1. Извършва се допълнителен анализ в друга лаборатория, одобрена от компетентния орган, със съответния метод по искане на производителя, при условие че са налични запечатани дублиращи проби от продукта, които се съхраняват по подходящ начин от компетентните органи. Искането се прави в рамките на 7 работни дни от съобщаването на резултатите от първия анализ. Анализът се провежда в рамките на 21 работни дни след получаване на искането. По искане и за сметка на производителя 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.

2. Разширените неопределености ($k = 2$) на средната стойност $\bar{y}_1$ на n_1 повторените измервания в лаборатория 1 и на средната стойност $\bar{y}_2$ на n_2 повторените измервания в лаборатория 2 са:

3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ и $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ съответно, където σ_r е стандартното отклонение на повторяемост, а σ_R е стандартното отклонение на възпроизводимост на съответния метод. Ако крайният резултат y от измерването в лабораториите се изчислява с формула със следната форма: $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ или $y = x_1/x_2$ следва да се спазват обичайните процедури за съчетаване на стандартни отклонения в подобни случаи, за да бъде получена неопределеността.

4. За да се провери дали резултатите на двете лаборатории съответстват на стандартното отклонение на възпроизводимост σ_R на метода, се изчислява разширената неопределеност на разликата $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$:

5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Ако абсолютната стойност на разликата на лабораторните средни стойности $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ не е по-голяма от тяхната неопределеност $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

то резултатите на двете лаборатории съответстват на стандартното отклонение на възпроизводимост σ_r и аритметичната средна стойност на двете лабораторни средни стойности,

$$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2},$$

се дава като крайният резултат. Неговата разширена неопределеност е:

$$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Партидата се отхвърля като несъответстваща с горната законно установена гранична стойност *UL*, ако

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} > UL;$$

в противен случай се приема като съответстваща на *UL*.

Партидата се отхвърля като несъответстваща с долната законно установена гранична стойност *LL*, ако

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} < LL;$$

в противен случай се приема като съответстваща на *LL*.

Ако абсолютната стойност на разликата на лабораторните средни стойности $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ е по-голяма от тяхната неопределеност $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

то резултатите на двете лаборатории не съответстват на стандартното отклонение на възпроизводимост.

В такъв случай партидата се отхвърля като несъответстваща, ако вторият анализ потвърди първия. В обратния случай партидата се приема като съответстваща.

Окончателният резултат трябва да бъде съобщен на производителя от компетентния орган възможно най-бързо. Разходите за втория анализ следва да бъдат поети от производителя, ако партидата бъде отхвърлена.

ПРИЛОЖЕНИЕ XXII

ТАБЛИЦА НА СЪОТВЕТСТВИЕТО

Регламент (ЕО) № 213/2001	Настоящият регламент
Член 1	Член 1
Член 2	Член 1
Член 3	Член 2
—	Член 3
Член 4	—
Член 5	—
Член 6	Член 4
Член 7	Член 18
Член 8	—
Член 9	Член 5
Член 10	Член 6
Член 11	Член 7
Член 12	Член 8
Член 13	Член 9
Член 14	Член 10
Член 15	Член 11
Член 16	Член 12
Член 17	Член 13
—	Член 14
Член 18	Член 15
Член 19	Член 16
	Член 17
	Член 19
Член 20	—
Член 21	—
Член 22	Член 20
Член 23	Член 21