I

(Akti, sprejeti v skladu s Pogodbo ES/Pogodbo Euratom, katerih objava je obvezna)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (ES) št. 273/2008

z dne 5. marca 2008

o določitvi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 1255/1999 o analitskih metodah in ocenjevanju kakovosti mleka in mlečnih proizvodov

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Uredbe Sveta (ES) št. 1255/1999 z dne 17. maja 1999 o skupni organizaciji trga mleka in mlečnih izdelkov [1] ter zlasti členov 10 in 15 ter členov 26(3), 29(1) in 31(4) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Uredba Komisije (ES) št. 213/2001 [2] določa podrobna pravila za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 1255/1999 o analitskih metodah in ocenjevanju kakovosti mleka in mlečnih proizvodov. Ob upoštevanju znanstvenega in tehničnega razvoja so na področju analitske metodologije potrebne bistvene spremembe. Zaradi preglednosti in učinkovitosti ter glede na število in vrsto predlogov sprememb je treba Uredbo (ES) št. 213/2001 razveljaviti in nadomestiti z novo uredbo.

(2) Preveriti je treba, ali se dosledno izpolnjujejo zahteve glede sestave in kakovosti mleka in mlečnih proizvodov, navedene v ureditvah, določenih v Uredbi (ES) št. 1255/1999.

(3) Referenčne metode za tako preverjanje so pogosto metode, ki jih objavijo mednarodne organizacije, kot so Evropski odbor za standardizacijo (CEN), Mednarodna organizacija za mleko (IDF), Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO) in Znanstveno združenje za odličnost analitičnih metod (AOAC International), ki jih tudi redno osvežujejo. V nekaterih primerih je določena referenčna metoda Skupnosti, medtem ko v drugih primerih ni v pravilih Skupnosti opredeljena nobena referenčna metoda. Da bi bilo zagotovljeno enotno izvajanje referenčnih metod, je treba sestaviti seznam referenčnih metod in omogočiti Komisiji, da ga po potrebi prilagodi.

(4) Uporaba rutinskih metod se ne sme izključiti. Zato je treba natančno določiti osnovne pogoje za njihovo uporabo.

(5) Uvesti je treba tudi enotne postopke, da se zagotovi enotno ocenjevanje rezultatov analiz pri senzoričnem ocenjevanju zadevnih proizvodov in ponovnem pregledu spornih rezultatov.

(6) Za nekatere analize trenutno ni nobenih mednarodno validiranih referenčnih metod, zato ni na voljo podatkov o odstopanju rezultatov analiz od laboratorija do laboratorija. Zato je treba na ravni Skupnosti določiti metode, ki so validirane v skladu z mednarodno sprejetimi pravili in se uporabljajo kot referenčne metode.

(7) Uredba Komisije (ES) št. 1898/2005 [3] določa podrobna pravila za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 1255/1999, kar zadeva ukrepe za prodajo smetane, masla in zgoščenega masla na trgu Skupnosti, in predvideva sledenje smetani, maslu in zgoščenemu maslu v nekaterih okoliščinah, da bi se zagotovila pravilna končna uporaba teh proizvodov. Sledenje je pomembno za pravilno delovanje sistema. Za zagotovitev enakovrednega obravnavanja tistih, ki so vključeni v ta sistem, je treba uvesti enotne metode za določitev nekaterih od teh sledilcev.

[1] UL L 160, 26.6.1999, str. 48. Uredba, kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (ES) št. 1152/2007 (UL L 258, 4.10.2007, str. 3). Uredba (ES) št. 1255/1999 bo 1. julija 2008 nadomeščena z Uredbo (ES) št. 1234/2007 (UL L 299, 16.11.2007, str. 1).

[2] UL L 37, 7.2.2001, str. 1.

[3] UL L 308, 25.11.2005, str. 1. Uredba, kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (ES) št. 1546/2007 (UL L 337, 21.12.2007, str. 68).

(8) V skladu s členom 9 Uredbe (ES) št. 1255/1999 se lahko dodeli pomoč za zasebno skladiščenje sira, izdelanega iz ovčjega mleka. Po členu 31 navedene uredbe se lahko za te proizvode dodeli posebno povračilo. Sir, izdelan iz ovčjega, kozjega in bivoljega mleka ter mešanic ovčjega, kozjega in bivoljega mleka, se lahko uvaža v Skupnost po sporazumih o preferenčnem obravnavanju iz nekaterih tretjih držav. V skladu z zgoraj navedenim so potrebni primerni pregledi za zagotovitev, da v take proizvode ni dodano kravje mleko. Zato je treba na ravni Skupnosti uvesti metodo za ugotavljanje kravjega mleka ne glede na uporabo rutinskih metod, če izpolnjujejo nekatera merila.

(9) V skladu z Uredbo Komisije (EGS) št. 2921/90 z dne 10. oktobra 1990 o pomoči za proizvodnjo kazeina in kazeinatov iz posnetega mleka [1] v proizvodu ne smejo biti prisotne koliformne bakterije. Mednarodno sprejeta referenčna metoda za ugotavljanje koliformnih bakterij v mleku in mlečnih proizvodih je ISO 4831. Referenčna metoda za ugotavljanje koliformnih bakterij na ravni Skupnosti je bila določena na podlagi navedenega standarda.

(10) Uredba Sveta (EGS) št. 2658/87 z dne 23. julija 1987 o tarifni in statistični nomenklaturi ter skupni carinski tarifi [2] določa različne carinske stopnje za krmne mešanice, ki spadajo pod tarifno številko 2309 glede na vsebnost mlečnega proizvoda. Določiti je treba splošno priznano metodo za analizo vsebnosti laktoze, ki jo morajo uporabljati vse države članice, da bi zagotovile enotno izvajanje zadevnih pravil.

(11) V skladu z Uredbo (ES) št. 1255/1999 morata maslo in posneto mleko v prahu, namenjena intervenciji, ali posneto mleko v prahu, namenjeno tudi uporabi za živalsko krmo, izpolnjevati nekatere kakovostne zahteve. Določiti je treba referenčne metode, s katerimi se preveri, ali so te zahteve izpolnjene.

(12) Nekatere metode so v tej uredbi prvič predstavljene. Zagotoviti je treba ustrezno obdobje od začetka veljavnosti te uredbe, da se laboratorijem omogoči pravilna uvedba in uporaba teh metod, to pomeni, da imajo po začetku veljavnosti te uredbe na voljo šest mesecev za začetek uporabe teh novih metod. Kadar koli Organizacija za razvoj standardov prenovi in objavi referenčno metodo iz Priloge I, imajo laboratoriji šest mesecev časa za posodobitev analitskih postopkov, da jih uskladijo z novim standardom.

(13) Ukrepi iz te uredbe, so v skladu z mnenjem Upravljalnega odbora za mleko in mlečne proizvode –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

POGLAVJE I

SPLOŠNE DOLOČBE

Člen 1

Vsebina urejanja in področje uporabe

1. Ta uredba določa nekatere referenčne metode za kemično, fizikalno in mikrobiološko analizo ter senzorično oceno mleka in mlečnih proizvodov, ki se uporabljajo v skladu z režimi za skupno ureditev trga z mlekom in mlečnimi proizvodi, določenimi v Uredbi (ES) št. 1255/1999, in pravila za uporabo teh metod.

2. Seznam referenčnih metod, primernih za analize, kakor so navedene v odstavku 1, vključuje Priloga I k tej uredbi.

3. Komisija osveži seznam po postopku iz člena 42 Uredbe (ES) št. 1255/1999.

Člen 2

Rutinske metode

Rutinske metode se lahko uporabljajo za analize, ki jih zahtevajo pravila Skupnosti, če so pravilno umerjene in se redno preverjajo glede na referenčne metode. Rezultati se primerjajo ob upoštevanju stalne pristranskosti, ponovljivosti in obnovljivosti.

V primeru odstopanja so odločilni rezultati, dobljeni z referenčno metodo.

Države članice obvestijo Komisijo o uporabi rutinskih metod v analizah iz člena 1.

POGLAVJE II

ANALITSKE METODE

Člen 3

Ocena skladnosti pošiljke s pravno omejitvijo

Priloga II k tej uredbi se uporablja za določanje skladnosti s pravnimi zahtevami glede sestave, razen za analizo sledilcev.

[1] UL L 279, 11.10.1990, str. 22. Uredba, kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (ES) št. 1487/2006 (UL L 278, 10.10.2006, str. 8).

[2] UL L 256, 7.9.1987, str. 1. Uredba, kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo Komisije (ES) št. 1352/2007 (UL L 303, 21.11.2007, str. 3).

Člen 4

Senzorično ocenjevanje

1. Za senzorično ocenjevanje mleka in mlečnih proizvodov razen masla za javno skladiščenje morajo države članice kot referenčno metodo uporabiti standard IDF 99C:1997 ali druge primerljive metode, o katerih uradno obvestijo Komisijo.

Postopki iz Priloge III se uporabljajo za preverjanje dela ocenjevalcev in zanesljivosti rezultatov senzoričnih analiz.

2. Za maslo za javno skladiščenje se uporabljajo postopki iz Priloge III za preverjanje dela ocenjevalcev in zanesljivosti rezultatov senzoričnih analiz.

Postopek iz Priloge IV se uporabi kot referenčna metoda za senzorično ocenjevanje.

Člen 5

Sledilci

1. Kot referenčna metoda za določanje vsebnosti trigliceridov enantične kisline v maslu, maslenem olju in smetani se uporablja analitska metoda iz Priloge V.

2. Kot referenčna metoda za določanje vsebnosti vanilina v zgoščenem maslu, maslu in smetani se uporablja analitska metoda iz Priloge VI.

3. Kot referenčna metoda za določanje vsebnosti etil estra beta-apo-8' karotenske kisline v zgoščenem maslu in maslu se uporablja analitska metoda iz Priloge VII.

4. Kot referenčna metoda za določanje vsebnosti β-sitosterola ali stigmasterola v maslu in zgoščenem maslu se uporablja analitska metoda iz Priloge VIII.

5. Sledenje zgoščenemu maslu, maslu in smetani se opravlja v skladu z ustreznimi pravili Skupnosti, če so dobljeni rezultati skladni s specifikacijami iz točk 10 in 11 Priloge V in iz točke 8 prilog VI, VII in VIII.

Člen 6

Ugotavljanje kazeina kravjega mleka

1. Za zagotovitev, da sir, izdelan izključno iz ovčjega, kozjega ali bivoljega mleka ali iz mešanice ovčjega, kozjega in bivoljega mleka, dejansko ne vsebuje kazeina kravjega mleka, se uporablja referenčna analitska metoda iz Priloge IX.

Če je vsebnost kazeina kravjega mleka v analiziranem vzorcu enaka ali višja od vsebnosti v referenčnem vzorcu, ki vsebuje 1 % kravjega mleka, kakor je opisano v Prilogi IX, se šteje, da je kazein kravjega mleka prisoten.

2. Rutinske metode za ugotavljanje kazeina kravjega mleka v siru, kakor je navedeno v odstavku 1, se lahko uporabijo, če:

(a) je meja zaznavnosti največ 0,5 % in

(b) ni napačnih pozitivnih rezultatov ter

(c) se kazein kravjega mleka lahko odkrije z zahtevano občutljivostjo tudi po daljših obdobjih zorenja, kakor se lahko dogaja v običajnih trgovinskih pogojih.

Če nobena od navedenih zahtev ni izpolnjena, se uporabijo referenčne metode iz Priloge IX.

Člen 7

Ugotavljanje koliformnih bakterij

Ugotavljanje prisotnosti koliformnih bakterij v maslu, posnetem mleku v prahu, kazeinu in kazeinatih se opravlja v skladu z referenčno metodo iz Priloge X.

Člen 8

Določanje vsebnosti laktoze

Vsebnost laktoze v proizvodih, ki spadajo pod oznako KN 2309, se določa v skladu z referenčno metodo iz Priloge XI.

Člen 9

Ugotavljanje siriščne sirotke

1. Siriščna sirotka v posnetem mleku v prahu za javno skladiščenje se ugotavlja v skladu z referenčno metodo iz Priloge XII.

2. Siriščna sirotka v posnetem mleku v prahu in mešanice za živalsko krmo se ugotavljajo v skladu z referenčno metodo iz Priloge XII. Če se ugotovi prisotnost siriščne sirotke, je treba izvajati ukrepe iz Priloge XIII.

Člen 10

Ugotavljanje pinjenca

Pinjenec v posnetem mleku v prahu se določa v skladu z referenčno metodo iz Priloge XIV.

Člen 11

Ugotavljanje antimikrobnih ostankov

Antimikrobni ostanki v posnetem mleku v prahu se ugotavljajo v skladu z referenčno metodo iz Priloge XV.

Člen 12

Določanje vsebnosti posnetega mleka v prahu

Vsebnost posnetega mleka v prahu v krmnih mešanicah se določa v skladu z referenčno metodo iz Priloge XVI.

Člen 13

Ugotavljanje škroba

Škrob v posnetem mleku v prahu, denaturiranem mleku v prahu in krmnih mešanicah se ugotavlja v skladu z referenčno metodo iz Priloge XVII.

Člen 14

Določanje vsebnosti vlage v smetani v prahu

Vsebnosti vlage v smetani v prahu se določa v skladu z referenčno metodo iz Priloge XVIII.

Člen 15

Določanje vsebnosti vlage kislega pinjenca v prahu

Vsebnosti vlage v kislem pinjencu v prahu, namenjenem uporabi v krmi, se določa v skladu z referenčno metodo iz Priloge XIX.

Člen 16

Določanje čistosti mlečne maščobe

Čistost mlečne maščobe se določa v skladu z referenčno metodo iz Priloge XX.

POGLAVJE III

SPLOŠNE IN KONČNE DOLOČBE

Člen 17

Zagotavljanje kakovosti

Analize se opravijo v laboratorijih, ki izvajajo analitski sistem zagotavljanja kakovosti vključno z notranjimi postopki nadzora kakovosti. Neakreditirani laboratoriji vsaj enkrat na leto sodelujejo v shemah preskušanja strokovnosti, pri čemer njihovi rezultati ne smejo odstopati za več kot $2\sigma_R$ (standardni odklon obnovljivosti referenčne metode) od uradne vrednosti. Na voljo mora biti podroben opis uporabljenega sistema za posvetovanje v laboratoriju. Laboratoriji, ki so akreditirani v skladu s standardi iz člena 12 Uredbe (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali ([1]), so izključeni iz obveznosti sodelovanja pri preskušanju strokovnosti.

Člen 18

Vzorčenje in nesoglasja glede rezultatov analiz

1. Vzorčenje se izvaja v skladu z ustrezno uredbo za zadevne proizvode. Če ni določb o vzorčenju, se uporablja določba iz standarda ISO 707|IDF 50, mleko in mlečni proizvodi – navodila za vzorčenje.

2. Laboratorijska poročila o rezultatih analiz morajo vsebovati zadostne podatke za oceno rezultatov, ki se opravi v skladu s Prilogo II in Prilogo XXI.

3. Za analize, ki jih predvidevajo pravila Skupnosti, je treba vzeti dvojne vzorce.

4. Kadar se izvajalec ne strinja z rezultati analize, je treba uporabiti postopek iz Priloge XXI.

5. Če lahko proizvajalec v petih dneh po vzorčenju dokaže, da postopek vzorčenja ni potekal pravilno, je treba vzorčenje ponoviti, kadar je mogoče. Če vzorčenja ni mogoče ponoviti, je treba analizirano pošiljko sprejeti.

Člen 19

Prehodno obdobje

Ocenjevanje skladnosti na podlagi Priloge II k tej uredbi se izvede v 12 mesecih po začetku veljavnosti Uredbe. Države članice bodo po potrebi poročale Komisiji takoj, ko se v tem obdobju v zvezi s postopkom statističnega nadzora pojavi večja težava.

Člen 20

Razveljavitve

Uredba (ES) št. 213/2001 se razveljavi.

Sklicevanja na razveljavljene uredbe veljajo kot sklicevanja na to uredbo in se razlagajo v skladu s korelacijsko tabelo v Prilogi XXII.

([1]) UL L 165, 30.4.2004, str. 1.

Člen 21

Začetek veljavnosti

Ta uredba začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Uporablja se od 31. marca 2008.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 5. marca 2008

Za Komisijo
Mariann FISCHER BOEL
Članica Komisije

PRILOGA I

(Člen 1)

SEZNAM REFERENČNIH METOD

Seznam okrajšav Min. = najmanj, Maks. = največ, Priloga = priloga k navedeni uredbi, SNF = suha snov brez maščobe, PV = peroksidno število, A = videz, F = aroma, C = konsistenca, TBC = skupno število bakterij, Term. = število termofilnih bakterij, MS = država članica, IDF = International Dairy Federation (Mednarodno združenje za mlekarstvo), ISO = International Standards Organisation (Mednarodna organizacija za standardizacijo), IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry (Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo), ADPI = American Dairy Products Institute (Ameriški inštitut za mlečne proizvode), SCM = sladkano zgoščeno mleko, EMC = evaporirano mleko ali smetana.

DEL A:

Uredba Komisije	Proizvod	Parameter	Meja ([1])	Referenčna metoda	Pripomba
Uredba (ES) št. 2771/1999 – Javno skladiščenje	Nesoljeno maslo	Maščoba	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Voda	Do 16 % m/m	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		SNF	Do 2 % m/m	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Kislost maščobe	1,2 mmol/100 g maščobe	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		PV (maks.)	0,3 mekv. kisika/1 000 g maščobe	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Opomba 1
		Koliformne bakterije	Pod mejo zaznavnosti v 1 g	Priloga X	Opomba 3
		Nemlečna maščoba	Pod mejo zaznavnosti za analizo trigliceridov	Priloga XX	
		Sterolni sledilci	Pod mejo zaznavnosti, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	Priloga VIII	
		Drugi sledilci			
		— vanilin	Pod mejo zaznavnosti	Priloga VI	
		— etil ester karotenske kisline	≤ 6 mg/kg	Priloga VII	
		— trigliceridi heptanojske kisline	Pod mejo zaznavnosti	Priloga V	
		Senzorične lastnosti	Najmanj 4 od 5 točk za A, F in C	Priloga IV	

Uredba Komisije	Proizvod	Parameter	Meja ([1])	Referenčna metoda	Pripomba
		Disperzija vode	Najmanj 4 točke	ISO 7586:1985|IDF 112A:1989	
Uredba (ES) št. 2771/1999 – Zasebno skladiščenje	Nesoljeno maslo	Maščoba	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Voda	Do 16 % m/m	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		SNF	Do 2 % m/m	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
Uredba (ES) št. 2771/1999 – Zasebno skladiščenje	Soljeno maslo	Maščoba	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Voda	Do 16 % m/m	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		SNF (razen soli)	Do 2 % m/m	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Sol	Do 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Uredba (ES) št. 1898/2005, poglavje II	Nesoljeno maslo	Maščoba	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Nemlečna maščoba		Priloga XX	
		Voda	Do 16 % m/m	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		SNF	Do 2 % m/m	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Sledilci:			
		— steroli	Glej Prilogo VIII	Priloga VIII	
		— vanilin	Glej Prilogo VI	Priloga VI	
		— etil ester karotenske kisline	Glej Prilogo VII	Priloga VII	
		— trigliceridi heptanojske kisline	Glej Prilogo V	Priloga V	
Uredba (ES) št. 1898/2005, poglavje II	Soljeno maslo	Maščoba	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Nemlečna maščoba		Priloga XX	
		Voda	Do 16 % m/m	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		SNF (razen soli)	Do 2 % m/m	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Sol	Do 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Sledilci:			
		— steroli	Glej Prilogo VIII	Priloga VIII	
		— vanilin	Glej Prilogo VI	Priloga VI	

Uredba Komisije	Proizvod	Parameter	Meja [1]	Referenčna metoda	Pripomba
		— etil ester karotenske kisline	Glej Prilogo VII	Priloga VII	
		— trigliceridi heptanojske kisline	Glej Prilogo V	Priloga V	
Uredba (ES) št. 1898/2005, poglavje II	Zgoščeno maslo	Maščoba	Min. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	
		Voda in SNF	Do 0,2 % m/m	ISO 5536:2002|IDF 23:2002 (vlaga) IDF 24:1964 (SNF)	
		Kislost maščobe	1,2 mmol/100 g maščobe	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		PV (maks.)	0,5 mekv. kisika/1 000 g maščobe	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Opomba 1
		Nemlečna maščoba	Ni prisotna	Priloga XX	
		Aroma	Čista		
		Vonj	Odsotnost tujih vonjav		
		Drugo	Odsotnost nevtralizacijskih sredstev, antioksidantov in konzervansov		
		Sledilci:			
		— steroli	Glej Prilogo VIII	Priloga VIII	
		— vanilin	Glej Prilogo VI	Priloga VI	
		— etil ester karotenske kisline	Glej Prilogo VII	Priloga VII	
		— trigliceridi heptanojske kisline	Glej Prilogo V	Priloga V	
Uredba (ES) št. 1898/2005, poglavje II	Smetana	Maščoba	Min. 35 % m/m	ISO 2450:1999|IDF 16C:1987	
		Nemlečna maščoba		Priloga XX	
		Sledilci:			
		— steroli	Glej Prilogo VIII		Opomba 2
		— vanilin	Glej Prilogo VI	Priloga VI	
		— etil ester karotenske kisline	Glej Prilogo VII		Opomba 2
		— trigliceridi heptanojske kisline	Glej Prilogo V	Priloga V	

Uredba Komisije	Proizvod	Parameter	Meja ([1])	Referenčna metoda	Pripomba
Uredba (ES) št. 1898/2005, poglavje III	Zgoščeno maslo	Maščoba	Min. 96 % m/m		Opomba 2
		Nemlečna maščoba		Priloga XX	
		SNF	Do 2 % m/m		Opomba 2
		Sledilci:			
		— stigmasterol (95 % m/m)	15 g/100 kg zgoščenega masla	Priloga VIII	
		— stigmasterol (85 % m/m)	17 g/100 kg zgoščenega masla	Priloga VIII	
		— trigliceridi heptanojske kisline	10,34 kg/100 kg zgoščenega masla	Priloga V	
		— etil ester maslene kisline in stigmasterol		— etil ester maslene kisline — stigmasterol: Priloga VIII	Opomba 2
		— etil ester maslene kisline in trigliceridi heptanojske kisline		— etil ester maslene kisline — trigliceridi heptanojske kisline: Priloga V	Opomba 2
		lecitin (E 322)	Do 0,5 % m/m		Opomba 2
		NaCl	Do 0,75 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Kislost maščobe	1,2 mmol/100 g maščobe	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		PV (maks.)	Do 0,5 mekv. kisika/1 000 g maščobe	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Opomba 1
		Aroma	Čista		
		Vonj	Odsotnost tujih vonjav		
		Drugo	Odsotnost nevtralizacijskih sredstev, antioksidantov in konzervansov		
Uredba (ES) št. 1898/2005, poglavje IV	Nesoljeno maslo	Maščoba	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Voda	Do 16 % m/m	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		SNF	Do 2 % m/m	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
Uredba (ES) št. 1898/2005, poglavje IV	Soljeno maslo	Maščoba	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	

Uredba Komisije	Proizvod	Parameter	Meja ([1])	Referenčna metoda	Pripomba
		Voda	Do 16 % m/m	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		SNF (razen soli)	Do 2 % m/m	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Sol	Do 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Člen 9 in naslov II Uredbe (ES) št. 1255/1999	Sir iz ovčjega in/ali kozjega mleka	Kravje mleko	< 1 % m/m	Priloga IX	
Uredba (EGS) št. 2921/90	Priloga I – kisli kazein	Voda	Do 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Maščoba	Do 1,75 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Prosta kislost	Do 0,30 ml 0,1 N raztopine NaOH/g	ISO 5547:1978|IDF 91:1979	
Uredba (EGS) št. 2921/90	Priloga I – siriščni kazein	Voda	Do 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Maščoba	Do 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Pepel	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
Uredba (EGS) št. 2921/90	Priloga I – kazeinati	Voda	Do 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Mlečne beljakovine	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Maščoba in pepel	Do 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Določen pepel		ISO 5544:1978|IDF 89:1979	
		Pepel		ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
Uredba (EGS) št. 2921/90	Priloga II – kisli kazein	Voda	Do 10,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Maščoba	Do 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Proste kisline	Do 0,20 ml 0,1 N raztopine NaOH/g	ISO 5547:1978|IDF 91:1979	
		TBC (maks.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Opomba 3
		Koliformne bakterije	Pod mejo zaznavnosti v 0,1 g	Priloga X	Opomba 3
		Term. (maks.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Opombi 3 in 4
Uredba (EGS) št. 2921/90	Priloga II – siriščni kazein	Voda	Do 8,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Maščoba	Do 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Pepel	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		TBC (maks.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Opomba 3
		Koliformne bakterije	Pod mejo zaznavnosti v 0,1 g	Priloga X	Opomba 3

Uredba Komisije	Proizvod	Parameter	Meja ([1])	Referenčna metoda	Pripomba
		Term. (maks.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Opombi 3 in 4
Uredba (EGS) št. 2921/90	Priloga II – kazeinati	Voda	Do 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Mlečne beljakovine	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Maščoba in pepel	Do 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004 ISO 5544:1978|IDF 89:1979 ali ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		TBC (maks.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Opomba 3
		Koliformne bakterije	Pod mejo zaznavnosti v 0,1 g	Priloga X	Opomba 3
		Term. (maks.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Opombi 3 in 4
Uredba (EGS) št. 2921/90	Priloga III – kazeinati	Voda	Do 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Mlečne beljakovine	Min. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Maščoba	Do 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Laktoza	Do 1,00 % m/m	ISO 5548:2004|IDF 106:2004	
		Pepel	Do 6,50 % m/m	ISO 5544:1978|IDF 89:1979 ali ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		TBC (maks.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Opomba 3
		Koliformne bakterije	Pod mejo zaznavnosti v 0,1 g	Priloga X	Opomba 3
		Term. (maks.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Opombi 3 in 4
Uredba (ES) št. 2799/1999	Krmne mešanice in posneto mleko v prahu (SMP) (kadar se uporablja kot krma)	Voda (kisli pinjenec v prahu)	Do 5 % m/m	Priloga XIX	
		Beljakovine	31,4 % m/m (min.) na suho snov brez maščobe	ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
		Voda (SMP)	Do 5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Maščobe (SMP)	Do 11 % m/m	ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
		Siriščna sirotka (SMP)	Ni prisotna	Priloga XIII	Opomba 6
		Škrob (SMP)	Ni prisoten	Priloga XVII	
		Voda (mešanice)	Do 5 % suhe snovi brez maščobe	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Maščobe (mešanice)		Direktiva Komisije 84/4/EGS (UL L 15, 18.1.1984, str. 29)	

Uredba Komisije	Proizvod	Parameter	Meja (1)	Referenčna metoda	Pripomba
		Siriščna sirotka (mešanice)	Ni prisotna	Priloga XIII	
		Vsebina SMP (v končnem proizvodu)	Min. 50 % m/m	Priloga XVI	
		Maščobe (v končnem proizvodu)	Min. 2,5 % m/m ali 5 % m/m	Direktiva Komisije 84/4/EGS (UL L 15, 18.1.1984, str. 29)	Opomba 7
		Škrob (v končnem proizvodu)	Min. 2 % m/m	Priloga XVII	Opomba 8
		Baker (v končnem proizvodu)	25 ppm	Direktiva Komisije 78/633/EGS (UL L 206, 26.7.1987, str. 43)	
Uredba (ES) št. 214/2001	SMP (sprej metoda)	Maščoba	Do 1,0 % m/m	ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
		Beljakovine	31,4 % (2)m/m (min.) na suho snov brez maščobe	ISO 8968–1/2:2001|IDF 20–1/2:2001	
		Voda	Do 3,5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Kislost	Do 19,5 ml 0,1 N NaOH, 10 g suhe snovi brez maščobe	ISO 6091:1980|IDF 86:1981	
		Laktati	Do 150 mg/100 g suhe snovi brez maščobe	ISO 8069:2005|IDF 69:2005	
		Fosfataza	Negativna	ISO 11816–1:2006|IDF 155–1:2006	
		Indeks netopnosti	Do 0,5 ml pri 24 °C	ISO 8156:2005|IDF 129:2005	
		Sežgani delci	Plošča A ali B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		TBC	40 000/g	ISO 4833:2003	Opomba 3
		Koliformne bakterije	Negativno/0,1 g	Priloga X	Opomba 3
		Pinjenec	Negativno	Priloga XIV	
		Siriščna sirotka	Negativno	Priloga XII	
		Kisla sirotka	Negativno		Opomba 2
		Protimikrobna sredstva		Priloga XV	

(1) Ne glede na zahteve določene uredbe.
(2) 1. septembra 2009 bi bila najmanjša vsebnost beljakovin 34 %.

DEL B

Referenčne metode, naštete v delu B, se lahko uporabijo za analizo proizvodov, zajetih v kateri koli od uredb iz stolpca 1.

Uredba Komisije	Proizvod	Oznaka KN	Parameter	Meja	Referenčna metoda	Pripomba
Uredba (EGS) št. 2658/87 Uredba (ES) št. 2535/2001 Uredba (ES) št. 1282/2006	Mleko in smetana, nezgoščena in brez dodanega sladkorja ali drugih sladil	0401	Maščoba (≤ 6 % m/m)	Veljajo omejitve, določene v opisu oznake KN za določeni proizvod, ki so podrobneje določene, kadar je primerno, v Uredbi Komisije (EGS) št. 3846/87 (UL L 366, 24.12.1987, str. 1), delu 9 izvozne nomenklature ali Uredbi (ES) št. 2535/2001 (UL L 341, 22.12.2001, str. 29).	ISO 1211:2001|IDF 1D:1996	
			Maščoba (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999|IDF 16C:1987	
	Mleko in smetana, zgoščena ali z dodanim sladkorjem ali drugim sladilom	0402	Maščoba (v tekoči obliki)		ISO 1737:1999|IDF 13C:1987	
			Maščoba (v trdni obliki)		ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
			Beljakovina		ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
			Saharoza (običajna vsebnost)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Saharoza (nizka vsebnost)			Opomba 2
			Trdne snovi (SCM)		ISO 6734:1989|IDF 15B:1991	
			Trdne snovi (EMC)		ISO 6731:1989|IDF 21B:1987	
			Voda (mleko v prahu)		ISO 5537:2004/IDF 26:2004	
			Voda (smetana v prahu)		Priloga XVIII	
	Pinjenec, fermentirano ali kislo mleko in smetana, zgoščena ali nezgoščena, z dodanim sladkorjem ali drugim sladilom	0403	Maščoba		ISO 1211:2001|IDF 1D:1996 ISO 1736:2000|IDF 9C:1987 ISO 2450:1999|IDF 16C:1987 ISO 7208:1999|IDF 22B:1987 ISO 8262–3:2005|IDF 124–3:2005	

Uredba Komisije	Proizvod	Oznaka KN	Parameter	Meja	Referenčna metoda	Pripomba
			Beljakovine		ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
			Saharoza (običajna vsebnost)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Saharoza (nizka vsebnost)			Opomba 2
			Voda (kisli pinjenec v prahu)		Priloga XIX:	
			Voda (sladki pinjenec v prahu)		ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
			Trdne snovi (drugi proizvodi)		Metode, ki jih odobri pristojni organ	
	Sirotka, koncentrirana ali nekoncentrirana, ali sirotka, ki vsebuje dodan sladkor ali druga sladila; proizvodi iz naravnih mlečnih sestavin	0404	Maščoba		ISO 1736:2000|IDF 9C:1987 ISO 2450:1999|IDF 16C:1987 ISO 7208:1999|IDF 22B:1987	
			Beljakovina		ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
			Saharoza (običajna vsebnost)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Saharoza (nizka vsebnost)			Opomba 2
		0404 90	Beljakovina		ISO 8968 1/2 2001|IDF 20–1/2:2001	
			Voda		IDF 21B:1987	
			Trdne snovi		ISO 6734:1989|IDF 15B:1991	
			(koncentrirani proizvodi)		ISO 6731:1989|IDF 21B:1987	
	Maslo in druge maščobe, pridobljene iz mleka; mlečni namazi	0405	Maščoba (če je ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Maslo	Voda		ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
			SNF		ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	

Uredba Komisije	Proizvod	Oznaka KN	Parameter	Meja	Referenčna metoda	Pripomba
			NaCl		ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
			Maščoba (če je > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	Masleno-mlečna maščoba		Voda (če je maščoba < 99 % m/m)		ISO 5536:2002|IDF 23:2002	
	Sir in skuta	0406	Maščoba		ISO 1735:2004|IDF 5:2004	
			Trdne snovi		ISO 5534:2004|IDF 4:2004	
			Trdne snovi (ricotta)		ISO 2920:2004|IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006|IDF 88:2006	
			Laktoza		ISO 5765–1/2:2002|IDF 79–1/2:2002	
Uredba (EGS) št. 2658/87	Krmne mešanice	2309	Laktoza		Priloga XI	

Opombe k seznamu referenčnih metod Evropske unije
Opomba 1: Izolacija mlečne maščobe, kakor je opisana v standardu ISO 1740:1991 (zavarovano pred svetlobo).
Opomba 2: Uvedena ni bila nobena referenčna metoda. Metode, ki jih odobri pristojni organ.
Opomba 3: Vzorec je treba pripraviti v skladu s standardom ISO 8261:2001|IDF 122:2001.
Opomba 4: Inkubacija 48 ur pri temperaturi 55 °C, preprečiti je treba izsušitev umetnega gojišča.
Opomba 5: % m/m SNF = % m/m suhe snovi – % m/m maščobe.
Opomba 6: Direktiva Komisije 84/4/EGS.
Opomba 7: Uredba Komisije (ES) št. 2799/1999 (UL L 340, 31.12.1999, str. 3–27).
Opomba 8: Direktiva Komisije 78/633/EGS.

PRILOGA II

(Člen 3)

OCENA SKLADNOSTI POŠILJKE S PRAVNO OMEJITVIJO

1. POSTOPEK

Če zadevna zakonodaja podrobno določa postopke vzorčenja, se uporabljajo ti postopki. V vseh drugih primerih se uporabi vzorec vsaj treh vzorčnih enot, naključno izbranih iz pošiljke, ki se predloži v pregled. Pripravi se lahko sestavljen vzorec. Pridobljeni rezultat se primerja s pravnimi omejitvami z izračunom 95-odstotne stopnje natančnosti kot dvakratnega standardnega odmika, pri čemer je ustrezni standardni odmik odvisen od tega, (1) ali se metoda potrdi z mednarodnim sodelovanjem z vrednostmi za σr in σ_R ali (2) se v primeru znotrajlaboratorijske validacije izračuna interna obnovljivost. Ta stopnja natančnosti bo nato enaka merilni negotovosti rezultata.

2. METODA JE VALIDIRANA Z MEDNARODNIM SODELOVANJEM

V tem primeru se določita standardni odmik ponovljivosti σr in standardni odmik obnovljivosti σ_R, medtem ko lahko laboratorij dokaže skladnost z učinkovitostjo validirane metode.

Izračunajte aritmetično sredino $\overline{x}$ za *n* ponovljenih meritev.

Izračunajte razširjeno negotovost (*k* = 2) $\overline{x}$ kot

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

Če se končni rezultat *x* merjenja izračuna s formulo v obliki $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 . y_2$ ali $x = y_1 / y_2$ je treba uporabiti običajne postopke za združevanje standardnih odmikov v takšnih primerih.

Obravnava se, da pošiljka ni v skladu z zgornjo pravno omejitvijo *UL*, če je

$\overline{x} - U > UL$;

sicer se obravnava, da je v skladu z *UL*.

Obravnava se, da pošiljka ni v skladu s spodnjo pravno omejitvijo *LL*, če je

$\overline{x} + U < LL$;

sicer se obravnava, da je v skladu z *LL*.

3. ZNOTRAJLABORATORIJSKA VALIDACIJA Z IZRAČUNOM STANDARDNEGA ODMIKA INTERNE OBNOVLJIVOSTI

Če se uporabljajo metode, ki niso določene v tej uredbi, in niso določeni ukrepi za natančnost, je treba izvesti znotrajlaboratorijsko validacijo. V formulah za izračun razširjene negotovosti *U* je treba ustrezno uporabiti standardni odmik interne ponovljivosti s_{ir} in standardni odmik interne obnovljivosti s_{iR} namesto σ_r in σ_R.

Veljajo pravila za odločanje iz točke 1. Če se pošiljka obravnava kot neskladna s pravno omejitvijo, je treba meritve ponoviti na podlagi metode iz te uredbe ter sprejeti odločitev v skladu s točko 1.

PRILOGA III

(Člen 4)

OCENA OCENJEVALCEV IN ZANESLJIVOST REZULTATOV PRI SENZORIČNIH ANALIZAH

Pri uporabi točkovalnih postopkov se uporabljajo naslednji postopki (standard IDF 99C:1997).

A. DOLOČEVANJE „INDEKSA PONOVLJIVOSTI“

Ocenjevalec analizira najmanj deset slepih vzorcev v vzporednih izvajanjih v roku 12 mesecev. To se navadno dogaja v več stopnjah. Rezultati za značilnosti posameznih proizvodov se ovrednotijo po naslednji enačbi:

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

kjer je:

w_1: :indeks ponovljivosti

x_{i1}: :točke prve ocenitve vzorca x_i

x_{i2}: :točke druge ocenitve vzorca x_i

n: :število vzorcev

Ocenjevani vzorci morajo kazati visoko kakovost; w_I ne sme presegati 1,5 točke (na lestvici s petimi točkami).

B. DOLOČEVANJE „INDEKSA ODKLONA“

Ta indeks je treba uporabiti za preverjanje, ali ocenjevalec uporablja enako lestvico za kakovostno ocenjevanje kot izkušena skupina za ocenjevanje. Točke, ki jih dobi ocenjevalec, se primerjajo s povprečjem točk, ki jih dobi skupina za ocenjevanje.

Za ovrednotenje rezultatov se uporablja naslednja enačba:

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

kjer je:

x_{i1}; x_{i2}: glej oddelek A

$\bar{x}_{i1}$; $\bar{x}_{i2}$: povprečno število točk ocenjevalne skupine za prvo in drugo ocenjevanje vzorca x_i

n: število vzorcev (najmanj deset na 12 mesecev).

Vzorci, ki se ocenjujejo, morajo kazati visoko kakovost. D_I ne sme presegati 1,5 točke (na lestvici s petimi točkami).

Države članice morajo javiti vsakršne težave, na katere naletijo pri uporabi tega postopka.

Če se ugotovi, da so posamezni ocenjevalci presegli mejo 1,5 točke za indeks odklona ali ponovljivosti, mora(-jo) strokovnjak(-i) uradnega organa izvesti enega ali več naključnih ponovnih pregledov uspešnosti na vzorcih, ki se bodo ocenjevali v naslednjih nekaj tednih, ali skupaj s temi ocenjevalci izvesti enega ali več „spremljevalnih“ pregledov. Natančno spremljanje je nujno za odločitev, ali naj se te storitve ohranijo. Ugotovitve je treba dokumentirati in shraniti kot dokazila o nadaljnjih ukrepih.

C. PRIMERJAVA REZULTATOV, PRIDOBLJENIH V RAZLIČNIH REGIJAH DRŽAVE ČLANICE IN V RAZLIČNIH DRŽAVAH ČLANICAH

Preskus je treba, kadar je to primerno, organizirati najmanj enkrat na leto zaradi primerjave rezultatov, ki jih dobijo ocenjevalci iz različnih regij. Če se opazijo pomembne razlike, je treba sprejeti potrebne ukrepe, da se ugotovijo vzroki zanje in dosežejo primerljivi rezultati.

Države članice lahko organizirajo preskuse za primerjavo rezultatov, ki jih dobijo njihovi lastni ocenjevalci, z rezultati ocenjevalcev iz sosednjih držav članic. Večje razlike morajo sprožiti poglobljeno preiskavo za dosego primerljivih rezultatov.

Države članice morajo o rezultatih teh primerjav obvestiti Komisijo.

PRILOGA IV

(Člen 4)

SENZORIČNO OCENJEVANJE MASLA

1. PODROČJE UPORABE

Namen tega postopka za senzorično ocenjevanje masla je zagotoviti enoten postopek, ki bi se uporabljal v vseh državah članicah.

Za nadaljnje informacije glej sedanji mednarodni standard IDF za mleko in mlečne proizvode, IDF 99 – deli 1, 2 in 3 o senzoričnem ocenjevanju.

2. OPREDELITEV POJMOV

„Senzorično ocenjevanje“ (ovrednotenje) pomeni preverjanje lastnosti proizvoda s čutili.

„Skupina ocenjevalcev“ pomeni skupino izbranih ocenjevalcev, ki ocenjujejo brez medsebojne komunikacije in zunanjega vpliva.

„Ocenjevalec“ je opredeljen kot oseba, izbrana zaradi sposobnosti izvajanja senzoričnega preskusa. Izkušnje tega tipa ocenjevalca so lahko omejene.

„Strokovni ocenjevalec“ je opredeljen kot oseba z visoko stopnjo senzorične občutljivosti in izkušnjami na področju senzorične metodologije, ki je sposoben doslednega in zanesljivega ocenjevanja različnih proizvodov. Ta tip ocenjevalca ima dober dolgoročni senzorični spomin.

„Določanje indeksa odklona“ pomeni senzorično ocenjevanje skupine ocenjevalcev, ki uporablja številčno lestvico. Uporabljati je treba nomenklaturo pomanjkljivosti.

„Točkovanje“ pomeni razvrščanje po kakovosti, ki poteka na podlagi doseženih točk.

„Ocenjevalne listine“: listine, ki se uporabljajo za beleženje posameznih točk za vsako lastnost in končno razvrstitev proizvoda. (Ta listina se lahko uporabi tudi za zapis kemične sestave.)

3. PROSTOR ZA OCENJEVANJE

Za nadaljnje informacije glej standarda ISO 8589 in ISO/DIS 22935–2|IDF 99–2, odstavek 7.

Poskrbeti je treba, da na ocenjevalce v prostoru za ocenjevanje ne vplivajo zunanji dejavniki.

V prostoru za ocenjevanje ne sme biti tujih vonjev in mora biti enostaven za čiščenje. Stene morajo biti svetle barve in od njih se svetloba ne sme odbijati.

Prostor za ocenjevanje in njegova osvetlitev morata biti takšna, da ne vplivata na lastnosti ocenjevanih proizvodov.

Prostor mora biti opremljen z ustrezno napravo za uravnavanje temperature za ohranjanje stalne temperature masla. Temperatura masla med ocenjevanjem mora biti 12 °C (± 2 °C).

4. IZBOR OCENJEVALCEV

Ocenjevalec mora poznati proizvode iz masla in biti usposobljen za razvrščanje teh proizvodov v kakovostne razrede na podlagi senzoričnega ocenjevanja. Njegovo/njeno usposobljenost mora redno (najmanj enkrat na leto) oceniti pristojni organ.

4.1 Za podrobnosti o splošnih zahtevah in izločilnih preskusih, ki se lahko uporabijo pred uradno zaposlitvijo novega ocenjevalca, glej ISO/DIS 22935–1|IDF 99–1, odstavek 4 (zaposlovanje) in odstavek 5.1.

Bistveno je, da usposabljanje poteka stalno in da splošna srečanja potekajo redno. Za informacije o usposabljanju skupine ocenjevalcev glej ISO 8586–1.

4.2 Začetno usposabljanje mora vključevati:

— splošno teorijo in praktičen pomen senzoričnega ocenjevanja,

— metode, lestvice in opis senzoričnih vtisov,

— odkrivanje in prepoznavanje senzoričnih lastnosti in posebnih senzoričnih izrazov,

— osnovno usposabljanje o proizvodnji masla,

— potrjene reference in primerke, ki lahko ocenjevalcu pomagajo pri opredelitvi posebnih okusov in intenzivnosti okusa v proizvodu.

5. ZAHTEVE ZA SKUPINO OCENJEVALCEV

Število ocenjevalcev v skupini mora biti neparno, najmanjše število članov je tri. Večina od njih mora biti zaposlena pri pristojnem organu ali pa morajo biti to pristojne osebe, ki niso zaposlene v mlekarski industriji.

Vodja skupine za ocenjevanje je odgovoren za celoten postopek in lahko sodeluje v skupini za ocenjevanje.

Pred ocenjevanjem je treba upoštevati številne dejavnike, da se doseže optimalna uspešnost članov skupine:

— član ne sme imeti bolezni, ki bi lahko vplivala na njegovo uspešnost; če jo ima, mora zadevnega ocenjevalca v skupini zamenjati nekdo drug,

— člani morajo z ocenjevanjem začeti pravočasno in poskrbeti, da imajo za ocenjevanje dovolj časa,

— člani ne smejo uporabljati intenzivno dišečih sredstev, kot so parfum, losjoni po britju, dezodoranti itd., ter ne smejo uživati močno aromatične (npr. zelo začinjene) hrane itd.,

— člani pol ure pred začetkom ocenjevanja ne smejo kaditi in jesti. Pijejo lahko le vodo.

6. USPEŠNOST

Vsi ocenjevalci morajo redno sodelovati v skupinah za senzorično ocenjevanje za ohranjanje svoje usposobljenosti. Pogostost bo odvisna od mase in količine masla na enoto časa in je, kadar je to mogoče, vsaj ena skupina za ocenjevanje na mesec.

Višji ocenjevalci morajo vsako leto sodelovati v več skupinah za ocenjevanje in, kadar je to mogoče, vsaj enkrat na tri mesece.

7. VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCA

Bistveno je, da je identiteta vzorcev med ocenjevanjem prikrita, da se tako prepreči kakršna koli pristranskost. Vzorcem je treba dodeliti šifre.

To je treba organizirati pred ocenjevanjem. Določiti je treba zahtevano temperaturo masla med prevozom v prostor za ocenjevanje (6 °C ± 2 °C).

Kadar se senzorično ocenjevanje izvaja v hladilnicah, se vzorci odvzamejo s pripomočkom za vzorčenje masla. Če pa se ocenjuje maslo iz drugih skladišč, je treba odvzeti najmanj 500 g vzorca. Med ocenjevanjem mora biti temperatura masla 12 °C (± 2 °C) (vir: v ISO/DIS 22935–2|IDF 99–2 je temperatura za ocenjevanje masla 14 °C ±2 °C). Velikemu odstopanju se je treba na vsak način izogniti.

8. OCENJEVANJE VREDNOSTI POSAMEZNIH LASTNOSTI

8.1 Senzorično ocenjevanje se izvaja za naslednje lastnosti: zunanji videz, konsistenca in aroma.

„Zunanji videz“ obsega naslednje značilnosti: barvo, vidno čistost, odsotnost fizičnega onesnaženja in nastajanja plesni ter enotna razporeditev vode. Razporeditev vode se ugotavlja po standardu IDF 112A/1989.

„Konsistenca“ zajema naslednje značilnosti: gostoto, teksturo in čvrstost. Mazavost se lahko spremlja s fizičnimi sredstvi, če to želi posamezna država članica, da bi izpolnila zahteve stranke. Komisija se lahko odloči, da bo v prihodnje uskladila metodologijo.

„Gostota“ je izraz, ki se uporablja za konsistenco proizvoda, ko se zaužije. Ponavadi se povezuje s trdnostjo in mazavostjo ter mora biti enaka v celotnem proizvodu. Tesno je povezana s teksturo in pomeni lastnost proizvoda, da se ne sesede pod lastno težo. Dokazuje jo upor pri rezanju in se lahko meri mehansko ali preveri z jezikom ali prstom.

„Okus“ je lastnost, ki se zazna v ustih, zlasti z okušalnimi brbončicami na jeziku.

„Aroma“ je lastnost, ki se zazna z nosom in vohom.

Znatno odstopanje od priporočene temperature onemogoča zanesljivo ocenjevanje konsistence in okusa. Temperatura je odločilnega pomena.

Če je temperatura zunaj priporočenega območja, je treba ocenjevanje masla preložiti.

8.2 Vsako lastnost je treba senzorično oceniti ločeno. Točke se določijo v skladu s tabelo 1.

8.3 Zaželeno je lahko, da ocenjevalci pred začetkom ocenjevanja skupaj določijo točke enemu ali več referenčnim vzorcem za zunanji videz, konsistenco in okus, da se tako zagotovi enotnost.

8.4 Točkovanje za sprejemljivost proizvoda je naslednje:

Glej del 7 – Nomenklatura in opis meril za točkovanje

	Največje število	Zahtevano število
Zunanji videz	5	4
Konsistenca	5	4
Okus/aroma	5	4

— Kadar proizvod ne doseže zahtevanega števila točk, je treba pripraviti opis pomanjkljivosti.

— Število točk, ki so jih posamezni ocenjevalci dali za posamezno lastnost, je treba zabeležiti v ocenjevalni list.

— Proizvod se sprejme ali zavrne na podlagi odločitve večine.

— Primeri, ko so razlike med določitvami točk posameznikov za posamezno lastnost večje od ene točke navzgor ali navzdol, se ne smejo pojavljati pogosto (najpogosteje enkrat na 20 vzorcev). Sicer mora usposobljenost skupine ocenjevalcev preveriti njihov vodja.

9. NADZOR

Vodja skupine ocenjevalcev, ki mora biti uradno zaposlen pri pristojnem organu in je lahko član skupine, mora biti na splošno odgovoren za celoten postopek. V ocenjevalni list mora zapisovati posamezne točke za vsako lastnost in potrditi sprejem ali zavrnitev proizvoda.

10. NOMENKLATURA

Glej priloženo tabelo 2.

11. VIRI

FIL-IDF 99C:1997 Senzorično ocenjevanje mlečnih proizvodov z določanjem točk – referenčna metoda.

ISO/DIS 22935|IDF 99 Mednarodni standard za mleko in mlečne proizvode – Senzorična analiza – deli 1–3.

ISO 8586–1 Senzorična analiza – Splošne smernice za izbor, usposabljanje in nadzor ocenjevalcev – del 1.

ISO 8589 Senzorična analiza – Splošne smernice za zasnovo prostorov za ocenjevanje.

FIL-IDF 112A:1989 Maslo – Določitev vrednosti za razporeditev vode.

Tabela 1

Določanje točk maslu

Zunanji videz			Konsistenca			Okus + aroma		
Točke	Št. (1)	Opombe	Točke (kakovostni razred)	Št. (1)	Opombe	Točke (kakovostni razred)	Št. (1)	Opombe
5		*Zelo dober* odličen vzorec najvišja kakovost (enakomerno suho)	5		*Zelo dobra* odličen vzorec najvišja kakovost (dobro mazavo)	5		*Zelo dobra* odličen vzorec najvišja kakovost (popolnoma čista fina aroma)
4		*Dober* (2) brez očitnih pomanjkljivosti	4	17 18	*Dobra* (2) trdo mehko	4		*Dobra* (2) brez očitnih pomanjkljivosti
3		*Primeren (manjše pomanjkljivosti)*	3		*Primerna (manjše pomanjkljivosti)*	3		*Primerna (manjše pomanjkljivosti)*
	1	izločena voda		14	prhko, krhko, drobljivo		21	nečisto
	2	neenotno, dvobarvno		15	testeno, oljnato		22	tuja aroma
	3	progasto		16	lepljivo		25	kislo
	4	pisano, marmorirano		17	trdo		27	okus po kuhanem, okus po zažganem
	5	lisasto		18	mehko			
	6	izločena maščoba					33	okus po krmi
	7	preizrazita barva					34	grenko, trpko
	8	premalo čvrsto					35	preslano
2		*Slab (očitne pomanjkljivosti)*	2		*Slaba (očitne pomanjkljivosti)*	2		*Slaba (očitne pomanjkljivosti)*
	1	izločena voda		14	prhko, krhko, drobljivo		21	nečisto
	3	progasto		15	testeno, oljnato		22	tuja aroma
	4	pisano, marmorirano		16	lepljivo		23	plesnivo
	5	lisasto		17	trdo		25	kislo
	6	izločena maščoba		18	mehko		32	oksidiran okus, kovinski okus
	10	tuji delčki						
	11	plesnivo					33	okus po krmi
	12	neraztopljena sol					34	grenko, trpko
							35	preslano
							36	zatohel, gniloben okus
							38	okus po kemikalijah
1		*Zelo slab (velike pomanjkljivosti)*	1		*Zelo slaba (velike pomanjkljivosti)*	1		*Zelo slaba (velike pomanjkljivosti)*
	1	izločena voda		14	prhko, krhko, drobljivo		22	tuja aroma
	3	progasto		15	testeno, oljnato		24	sirasto, sirasto kislo
	4	pisano, marmorirano		16	lepljivo		25	kislo
	5	lisasto		17	trdo		26	kvasasto
	6	izločena maščoba		18	mehko		28	okus po plesni
	7	preizrazita barva					29	žarek okus
	9	zrnasto					30	okus po olju, ribah
	10	tuji delčki					31	okus po loju
	11	plesnivo					32	oksidiran okus, kovinski okus
	12	neraztopljena sol						
							34	grenko, trpko
							35	preslano
							36	zatohel, gniloben okus
							37	okus po sladu
							38	okus po kemikalijah

(1) Tabela 2.

(2) Pomanjkljivosti pri oceni „dober“ pomenijo le zelo majhno odstopanje od odličnega vzorca.

Tabela 2

Tabela pomanjkljivosti masla

I.	Zunanji videz
1.	izločena voda
2.	neenotno, dvobarvno
3.	progasto
4.	pisano, marmorirano
5.	lisasto
6.	izločena maščoba
7.	preizrazita barva
8.	premalo čvrsto
9.	zrnasto
10.	tuji delčki
11.	plesnivo
12.	neraztopljena sol
II.	Konsistenca
14.	prhko, krhko, drobljivo
15.	testeno, oljnato
16.	lepljivo
17.	trdo
18.	mehko
III.	Aroma in vonj
20.	brez arome
21.	nečisto [1]
22.	tuja aroma
23.	plesnivo
24.	sirast, mlečno sirasto
25.	kislo
26.	kvasasto
27.	(a) okus po kuhanem
	(b) okus po zažganem
28.	okus po plesni
29.	žarek okus
30.	okus po olju, ribah
31.	okus po loju
32.	(a) oksidiran okus
	(b) kovinski okus
33.	okus po krmi
34.	grenko, trpko
35.	preslano
36.	zatohel, gniloben okus
37.	okus po sladu
38.	okus po kemikalijah

[1] Ta oznaka naj se uporablja čim redkeje in samo v primerih, ko pomanjkljivosti ni mogoče opisati natančneje.

PRILOGA V

(Člen 5)

DOLOČANJE VSEBNOSTI TRIGLICERIDOV ENANTIČNE KISLINE V MASLU, MASLENO-MLEČNI MAŠČOBI IN SMETANI S PLINSKO KROMATOGRAFSKO ANALIZO TRIGLICERIDOV

1. PODROČJE UPORABE

Ta metoda določa metodo za določanje vsebnosti trigliceridov enantične kisline v maslenem olju, maslu in smetani.

2. IZRAZI IN OPREDELITEV POJMOV

Vsebnost enantične kisline: vsebnost trigliceridov enantične kisline, ki se ugotavlja s postopkom iz te metode.

Opomba: Vsebnost enantične kisline je za masleno olje in maslo izražena v kilogramih na tono proizvoda, za smetano pa v kilogramih na tono mlečne maščobe.

3. POSTOPEK

Mlečna maščoba se iz različnih proizvodov ekstrahira v skladu s standardom ISO 14156|IDF 172:2001. Količinsko določanje vsebnosti trigliceridov enantične kisline v ekstrahirani maščobi se določi s kapilarno plinsko kromatografijo. Rezultat, pridobljen za vzorec, se oceni glede na trigliceride kaprojske kisline kot interni standard.

Opomba: Kot ustrezen interni standard se je izkazal tudi tributirin.

4. REAGENTI

Uporabijo se le reagenti priznane analitske čistosti.

4.1 N-heksan

4.2 Standardni trigliceridi kaprojske kisline z vsaj 99-odstotno čistostjo

4.3 Standardni trigliceridi enantične kisline z vsaj 99-odstotno čistostjo

4.4 Brezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4)

5. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

5.1 Analitska tehtnica s točnostjo 1 mg

5.2 Merilne bučke s prostornino 10 in 20 ml

5.3 Epruvete za centrifugiranje s prostornino 30 ml

5.4 Rotacijski izparilnik

5.5 Sušilnik, ki lahko ohranja temperaturo 50 °C ± 5 °C

5.6 Filtrirni papir, srednje porozen, s premerom približno 15 cm

5.7 Oprema za plinsko kromatografijo

5.7.1 Plinski kromatograf z injektorjem z deljenjem vzorca ali brez deljenja vzorca v koloni ali injektorjem za vbrizgavanje v kolono in s plamenskim ionizacijskim detektorjem.

5.7.2 Kolona plinskega kromatografa s stacionarno fazo, ki se je uspešno uporabila za ločevanje trigliceridov (100 % dimetilpolisiloksan ali 5 % fenil- in 95 % metilpolisiloksan). Izberite stacionarno fazo, dolžino kolone (4–15 m), notranji premer (0,22–0,50 mm) in debelino nanosa (0,12 μm ali več) ob upoštevanju laboratorijskih izkušenj in uporabljenega sistema za vbrizgavanje. V vsakem primeru mora izbrana kolona zagotoviti popolno ločevanje vrha topila in trigliceridov kaprojske kisline ter osnovno ločbo med vrhovi trigliceridov kaprojske in enantične kisline. Primeri veljavnih pogojev so navedeni spodaj.

5.7.2.1 Primer veljavnih pogojev pri uporabi injektorja z deljenjem vzorca

— nosilni plin: helij

— tlak v glavi kolone: 100 KPa

— kolona: dolžina 12 m, notranji premer 0,5 mm, debelina nanosa 0,1 μm, kolona iz zlitega silicijevega dioksida

— stacionarna faza: 100 % dimetilpolisiloksan ali 5 % fenil–95 % dimetilpolisiloksan (za prejšnji HT5)

— temperatura kolone: začetna temperatura 130 °C se ohranja eno minuto, nato se povečuje po stopnji 20 °C/min do 260 °C ter nato po stopnji 30 °C/min do 360 °C; temperatura 360 °C se ohrani 10 minut

— temperatura detektorja: 370 °C

— temperatura injektorja: 350 °C

— cepitveno razmerje: 1:30

— količina vbrizganega vzorca: 1 μl.

5.7.2.2 Primer veljavnih pogojev pri uporabi injektorja za vbrizgavanje v kolono

— nosilni plin: vodik (sistem stalnega pretoka)

— tlak v glavi kolone: 89 kPa

— kolona: dolžina 4 m, notranji premer 0,32 mm, debelina nanosa 0,25 μm, kolona iz zlitega silicijevega dioksida

— stacionarna faza: 5 % fenil, 95 % dimetilpolisiloksan

— temperatura kolone: začetna temperatura 60 °C se ohranja 2 minuti, nato pa se povečuje po stopnji 35 °C/minuto do 340 °C ter se pri tej temperaturi ohrani 5 minut

— temperatura detektorja: 350 °C

— količina vbrizganega vzorca: 1 μl.

5.8 Brizgalka s prostornino 5 μl.

6. VZORČENJE

Laboratorij mora prejeti vzorec, ki je resnično reprezentativen in ni bil poškodovan ali spremenjen med prevozom ali skladiščenjem.

Vzorčenje ni del metode, ki je opredeljena v tem mednarodnem standardu. Priporočena metoda vzorčenja je navedena v IDF: standard 50C:1995 ali ISO 707–1997 – mleko in mlečni proizvodi – metode vzorčenja

7. POSTOPEK

7.1 **Priprava vzorca in deleža za analizo**

V skladu s standardom ISO 14156|IDF 172:2001.

7.1.1 *Masleno olje, maslo*

7.1.1.1 V pečici raztopite 50–100 g preskusnega vzorca (5.5).

7.1.1.2 Na prepognjen filtrirni papir dodajte 0,5–1,0 g brezvodnega natrijevega sulfata (5.4).

7.1.1.3 Maščobo prefiltrirajte skozi filtrirni papir z brezvodnim natrijevim sulfatom, pri čemer se filtrat zbira v čaši v sušilniku (5.5). Pri dekantiranju stopljenega masla na filtrirni papir bodite pozorni, da se ne prenese serum.

7.1.2 *Smetana*

7.1.2.1 Preskusni vzorec segrejte na temperaturo 20 °C ± 2 °C.

7.1.2.2 Vzorec temeljito premešajte ali pretresite.

7.1.2.3 Raztopite ustrezno količino preskusnega vzorca, da pridobite 100 ml preskusnega deleža s približno 4-odstotnim masnim deležem maščobe.

7.1.2.4 Kot pri surovem in homogeniziranem mleku (glej standard ISO 14156|IDF 172:2001, odstavek 8.3) ekstrahirajte maščobo iz smetane.

7.1.2.5 V 10-mililitrski merilni bučki (5.2) na 1 mg natančno odmerite 1 g ekstrahirane maščobe. Dodajte 1 ml raztopine 7.2.2. Do oznake 10 ml dolijte n-heksan (4.1) in premešajte.

7.1.2.6 V 10-mililitrsko merilno bučko (5.2) vlijte 1 ml raztopine 7.1.1.2 in razredčite z 10 ml n-heksana (4.1).

7.2 **Priprava kalibracijskih standardov**

7.2.1 Raztopite 100 mg trigliceridov enantične kisline (4.3) v 10 ml n-heksana (4.1).

7.2.2 Raztopite 100 mg trigliceridov kaprojske kisline (4.2) v 10 ml n-heksana (4.1).

7.2.3 V 10-mililitrsko merilno bučko (5.2) vlijte 1 ml raztopine 7.2.2. Do oznake 10 ml dolijte n-heksan (4.1).

7.2.4 V 10-mililitrsko merilno bučko (5.2) vlijte 1 ml raztopine 7.2.1 in 1 ml raztopine 7.2.2. Do oznake 10 ml dolijte n-heksan (4.1).

7.2.5 V 10-mililitrsko merilno bučko (5.2) vlijte 1 ml raztopine 7.2.4 in dolijte 10 ml n-heksana (4.1).

7.3 **Kromatografsko določanje**

7.3.1 Dvakrat vbrizgajte 1 µl standardne raztopine 7.2.5.

7.3.2 Vbrizgajte 1 µl vsake preskusne raztopine.

Opomba: Če se uporablja sistem injektorja za vbrizgavanje v kolono, je treba standardno in preskusno raztopino bolj razredčiti.

7.3.3 Postopek 7.3.1 ponovite na vsake 3 vzorce, tako da zajamete vzorce med dve vbrizganji standarda. Rezultati temeljijo na povprečnih odzivnih faktorjih iz standardnih kromatogramov.

8. IZRAČUN REZULTATOV

Za vsak kromatogram povežite površino vrhov, povezanih s trigliceridi enantične in kaprojske kisline.

Upoštevajte navodila za vsak zajet niz, tj. serijo zajetih vzorcev; standard, ki se vbrizga dvakrat takoj pred njimi, je STD_1, standard, ki se vbrizga dvakrat tako po njih, je STD_2.

8.1 **Kalibracija**

8.1.1 Izračunajte odzivni faktor za vsak dvojni STD_1, Rf_1(a) in Rf_1(b)

Rf_1 (a) ali (b) = (površina vrha za trigliceride kaprojske kisline/površina vrha za trigliceride enantične kisline) × 100

Izračunajte povprečni odzivni faktor, Rf_1

$$Rf_1 = (Rf_1 (a) + Rf_1 (b)) / 2$$

8.1.2 Podobno izračunajte povprečni odzivni faktor za STD_2, Rf_2.

8.1.3 Izračunajte povprečni odzivni faktor, Rf.

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

8.2 **Preskusni vzorci**

Za vsak kromatogram vzorcev med STD_1 in STD_2 izračunajte vsebnost enantične kisline, C (kg/t):

C = (površina vrha za trigliceride enantične kisline × Rf × 100)/(površina vrha za trigliceride kaprojske kisline × Wt × 1 000)

kjer je:

— Wt = masa odvzete maščobe (g),

— 100 = volumen razredčitve za vzorec,

— 1 000 = pretvorbeni faktor (z µg/g v kg/t).

Za vzorce masla upoštevajte vsebnost maščobe v maslu in izračunajte popravljeno vrednost koncentracije, C_{maslo} (kg/t masla)

$$C_{maslo} = C_{maščoba} \times F$$

kjer je F vsebnost maščobe v maslu.

9. NATANČNOST

V točki 12 so navedene podrobnosti medlaboratorijskega preskusa masla na podlagi standardov ISO 5725–1 in ISO 5725–2 glede natančnosti metode.

Vrednosti za mejo ponovljivosti in obnovljivosti sta izraženi pri 95-odstotni stopnji verjetnosti ter mogoče ne bosta ustrezali razponom koncentracij in matricam, ki se od danih razlikujejo.

9.1 **Ponovljivost**

Absolutne razlike med rezultatoma dveh posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v istem laboratoriju pri istem izvajalcu, ki je uporabljal enako opremo, v kratkem časovnem obdobju, bodo le v največ 5 % primerov večje od 0,35 kg/t.

9.2 **Obnovljivost**

Absolutne razlike med rezultatoma dveh posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v različnih laboratorijih pri različnih izvajalcih, ki so uporabljali različno opremo, bodo le v največ 5 % primerov večje od 0,66 kg/t.

10. DOVOLJENO ODSTOPANJE: SPODNJE MEJE (PRIMER NEZADOSTNIH KOLIČIN)

10.1 **Od sledenega proizvoda je treba vzeti tri vzorce, da se preveri pravilno sledenje proizvoda.**

10.2 **Maslo in zgoščeno maslo**

10.2.1 Stopnja vključitve je 11 kg trigliceridov enantične kisline s čistostjo najmanj 95 % na tono masla, tj. 10,45 kg/t.

10.2.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 9,51 kg/t (95 % najmanjše stopnje vključitve trigliceridov enantične kisline s 95-odstotno čistostjo, posamezna določitev),

— 6,89 kg/t (70 % najmanjše stopnje vključitve trigliceridov enantične kisline s 95-odstotno čistostjo, posamezna določitev),

— koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 9,51 kg/t in 6,89 kg/t.

10.3 **Smetana**

10.3.1 Vključitev je 10 kg trigliceridov enantične kisline s čistostjo najmanj 95 % na tono mlečne maščobe, tj. 9,50 kg/t sledene mlečne maščobe.

10.3.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje homogenosti vključenosti sledila, najnižji od treh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 8,60 kg/t (95 % najmanjše stopnje vključitve trigliceridov enantične kisline s 95-odstotno čistostjo, posamezna določitev),

— 6,23 kg/t (70 % najmanjše stopnje vključitve trigliceridov enantične kisline s 95-odstotno čistostjo, posamezna določitev),

— koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 8,60 kg/t in 6,23 kg/t.

11. DOVOLJENO ODSTOPANJE: ZGORNJE MEJE (V PRIMERU PRESEŽENE KOLIČINE ZA VEČ KOT 20 %)

11.1 **Od sledenega proizvoda je treba vzeti tri vzorce, da se preveri pravilno sledenje proizvoda.**

11.2 **Maslo in zgoščeno maslo**

11.2.1 Rezultati treh vzorcev, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, povprečje teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— zgornja meja je 12,96 kg/t.

11.3 **Smetana**

11.3.1 Rezultati treh vzorcev, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, povprečje teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— zgornja meja je 11,82 kg/t.

12. DODATNI PODATKI: STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV DOLOČITVE TRIENANTOATA V MASLENI MAŠČOBI Z ANALIZO TRIGLICERIDOV.

Za določitev vsebnosti trienantoata v sledenem maslu so bila izvedena štiri medlaboratorijska preskušanja.

Pri prvem testu primerljivosti je sodelovalo devet laboratorijev in specifikacije o analitski metodi niso bile predložene.

Pri drugem testu primerljivosti je sodelovalo deset laboratorijev in uporabljene so bile štiri različne metode:

— količinska opredelitev metilheptanoata z n-nonanom ali metilnonanoatom kot internim standardom,

— količinska opredelitev trienantoata s trikaproatom kot internim standardom,

— količinska opredelitev metileheptanoata s kalibracijskim vzorcem/mešanico,

— količinska opredelitev metilheptanoata s kalibracijsko mešanico.

Poleg tega sta bila za analizo metilestrov maščobnih kislin (FAME) uporabljena dva različna postopka metiliranja (De Francesco ter Christopherson in Glass).

Glede na dobljene rezultate sta bili za izvajanje tretjega testa primerljivosti izbrani dve metodi:

— količinska opredelitev metilheptanoata z n-nonanom ali metilnonanoatom kot internim standardom,

— količinska opredelitev trienantoata s trikaproatom kot internim standardom.

Rezultati sedmih laboratorijev so pokazali, da je metoda FAME povzročila večjo spremenljivost, zato so sklenili, da se uporabi le določitev trienantoata kot triglicerida po postopku količinske opredelitve q za trienantoat z uporabo trikaproata kot internega standarda. Poleg tega je treba analizo trigliceridov izvajati s kapilarno kolono.

Pri četrtem testu primerljivosti so bili obravnavani štirje vzorci (A, B, C, D) in devet laboratorijev je predložilo rezultate (tabele 1–2).

Dva laboratorija (DE in UE) sta analizirala vzorce z metodo FAME.

Zaradi manj laboratorijev je bil statistični izračun narejen za celoten sklop (sliki 1 in 2) podatkov, vključno z rezultati FAME, in za podatke, dobljene z analizo TG.

Preskusi za ubežnike:

— Vzorec A. Dixonov, Cochranov in Grubbsov preskus na ravni 1 in 5 % so pokazali enega laboratorijskega ubežnika.

— Vzorec B. Grubbsov preskus na ravni 5 % je pokazal enega laboratorijskega ubežnika.

— Vzorec C. Dixonov in Grubbsov preskus na ravni 1 in 5 % sta pokazala enega laboratorijskega ubežnika.

— Vzorec D. Dixonov in Grubbsov preskus na ravni 1 in 5 % sta pokazala enega laboratorijskega ubežnika.

Ubežnik je bil izključen iz izračuna.

Pomembno je opozoriti, da rezultati, pridobljeni z metodo FAME, pri opravljenih preskusih nikoli niso veljali za ubežnike.

Parametri natančnosti

Tabeli 1 in 2 prikazujeta rezultate vseh laboratorijev in parametrov natančnosti, izračunanih ob sprejemljivem številu (8) laboratorijev, vendar ti žal niso pridobljeni z enako analitsko metodo.

Tabeli 3 in 4 prikazujeta rezultate, ki so nastali le z metodo TG in ustreznimi parametri natančnosti. Sprejemljivost teh parametrov je pogojena s sprejemljivostjo majhnega števila laboratorijev (6).

Sliki 2 in 3 prikazujeta trend Sr in SR, izračunan za štiri vzorce dveh navedenih sklopov podatkov.

Tabela 5 prikazuje vrednosti Sr in SR z ustreznimi združenimi vrednostmi ter celotnima parametroma r in R.

Izračunana je bila tudi kritična razlika za 95-odstotno verjetnostno stopnjo.

Tabela 1

Statistični rezultati metod TG in FAME*

Vzorec A		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Ubežniki	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Povprečna vrednost	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Dejanska vrednost	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Ponovljivost r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Relativna ponovljivost r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,23
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	2,04
					Obnovljivost R (95 %)	0,84
					Relativna obnovljivost R %	5,71
Vzorec B		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Ubežniki	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Povprečna vrednost	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Dejanska vrednost	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Ponovljivost r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Relativna ponovljivost r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,35
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	2,61
					Obnovljivost R (95 %)	0,99
					Relativna obnovljivost R %	7,31

Tabela 2

Statistični rezultati metod TG in FAME*

Vzorec C		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Ubežniki	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Povprečna vrednost	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Dejanska vrednost	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Ponovljivost r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Relativna ponovljivost r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,17
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	1,82
					Obnovljivost R (95 %)	0,47
					Relativna obnovljivost R %	5,10

Vzorec D		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Ubežniki	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Povprečna vrednost	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Dejanska vrednost	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Ponovljivost r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Relativna ponovljivost r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,24
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	11,43
					Obnovljivost R (95 %)	0,67
					Relativna obnovljivost R %	32,00

Tabela 3

Statistični rezultati metod TG in FAME*

Vzorec A		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Ubežniki	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Povprečna vrednost	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Dejanska vrednost	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Ponovljivost r (95 %)	0,25
					Relativna ponovljivost r %	2,24
					Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,13
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	1,16
					Obnovljivost R (95 %)	0,36
					Relativna obnovljivost R %	3,25
Vzorec B		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Ubežniki	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Povprečna vrednost	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Dejanska vrednost	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Ponovljivost r (95 %)	0,42
					Relativna ponovljivost r %	3,16
					Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,33
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	2,48
					Obnovljivost R (95 %)	0,93
					Relativna obnovljivost R %	6,94

Tabela 4

Statistični rezultati metode TG

Vzorec C		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Ubežniki	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Povprečna vrednost	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Dejanska vrednost	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Ponovljivost r (95 %)	0,42
					Relativna ponovljivost r %	4,51
					Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,19
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	2,04
					Obnovljivost R (95 %)	0,53
					Relativna obnovljivost R %	5,71
Vzorec D		R_1	R_2	Povprečje	Št. laboratorijev po izločitvi ubežnikov	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Št. ubežnikov	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Ubežniki	DK
					Povprečna vrednost	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Dejanska vrednost	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Standardni odmik ponovljivosti (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relativni stand. odmik ponovljivosti (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Ponovljivost r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Relativna ponovljivost r %	12,01
					Standardni odmik obnovljivosti (SR)	0,25
					Relativni stand. odmik obnovljivosti (RSDR %)	11,90
					Obnovljivost R (95 %)	0,69
					Relativna obnovljivost R %	33,32

Tabela 5

Ponovljivost in obnovljivost (s FAME)

	Št. laboratorijev	Ubežnik	Ponovljivost Sr (95 %)	Obnovljivost SR (95 %)
Vzorec A	8	1	0,09	0,23
Vzorec B	8	1	0,14	0,35
Vzorec C	8	1	0,14	0,17
Vzorec D	8	1	0,08	0,24
Združena vrednost			0,116	0,256
			R	**R**
Združena vrednost* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Najmanjša čistost, določena za trienantoat = 95 %
Najmanjša mejna vrednost, določena za trienantoat v masleni maščobi = 11 kg/t
Ob upoštevanju kritične razlike za 95-odstotno verjetnostno stopnjo povprečje dveh rezultatov ni manjše kot:
v primeru vključitve 95-odstotno čistega trienantoata 10,05 kg/t.

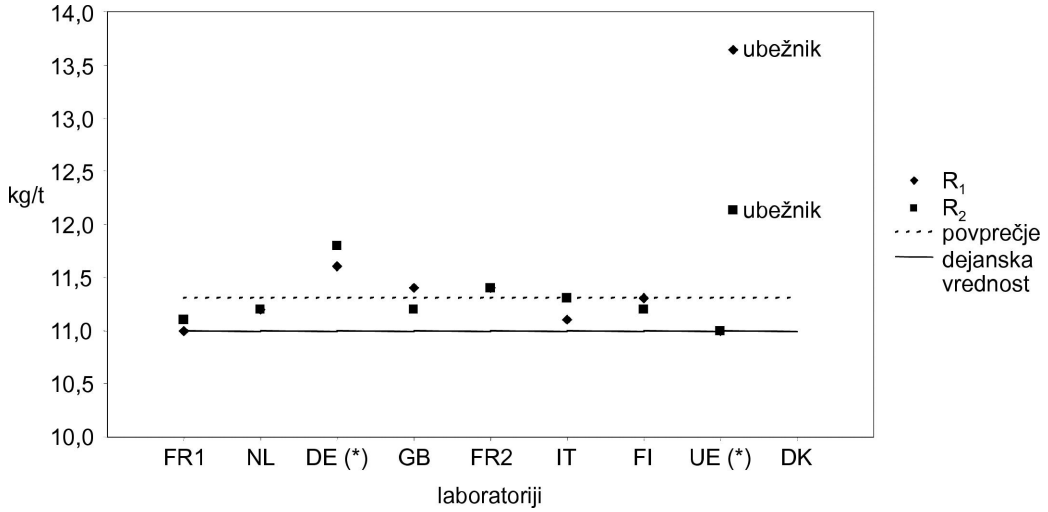
Ponovljivost in obnovljivost (brez FAME)

	Št. laboratorijev	Ubežnik	Ponovljivost Sr (95 %)	Obnovljivost SR (95 %)
Vzorec A	6	1	0,09	0,13
Vzorec B	6	1	0,15	0,33
Vzorec C	6	1	0,15	0,19
Vzorec D	6	1	0,09	0,25
Združena vrednost			0,124	0,237
			r	**R**
Združena vrednost* 2,8			**0,347**	**0,663**

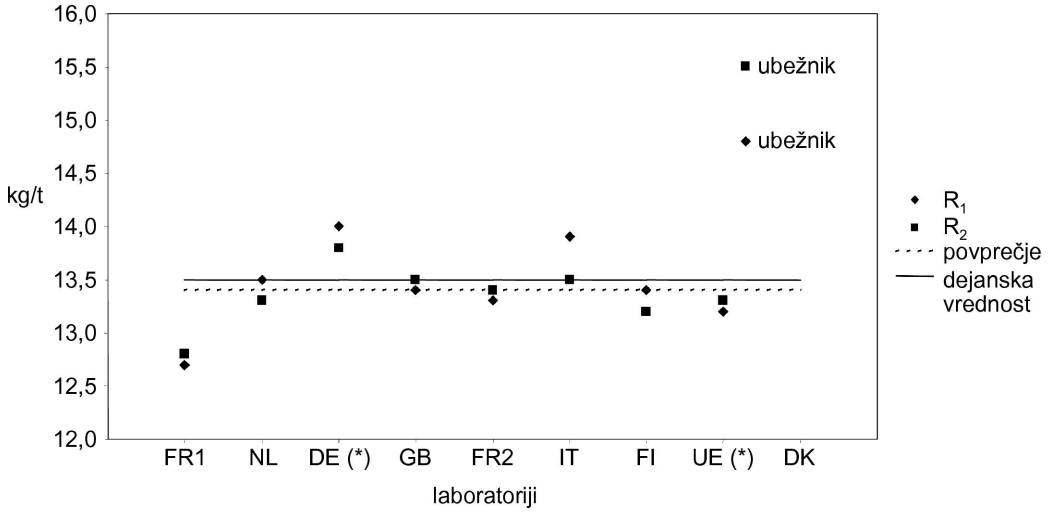
CrD95 = 0,36
Najmanjša čistost, določena za trienantoat = 95 %.
Najmanjša mejna vrednost, določena za trienantoat v masleni maščobi = 11 kg/t.
Ob upoštevanju kritične razlike za 95-odstotno verjetnostno stopnjo povprečje dveh rezultatov ni manjše kot:
v primeru vključitve 95-odstotno čistega trienantoata 10,09 kg/t.

Slika 1 (*)

Rezultati preskusa: Vzorec A

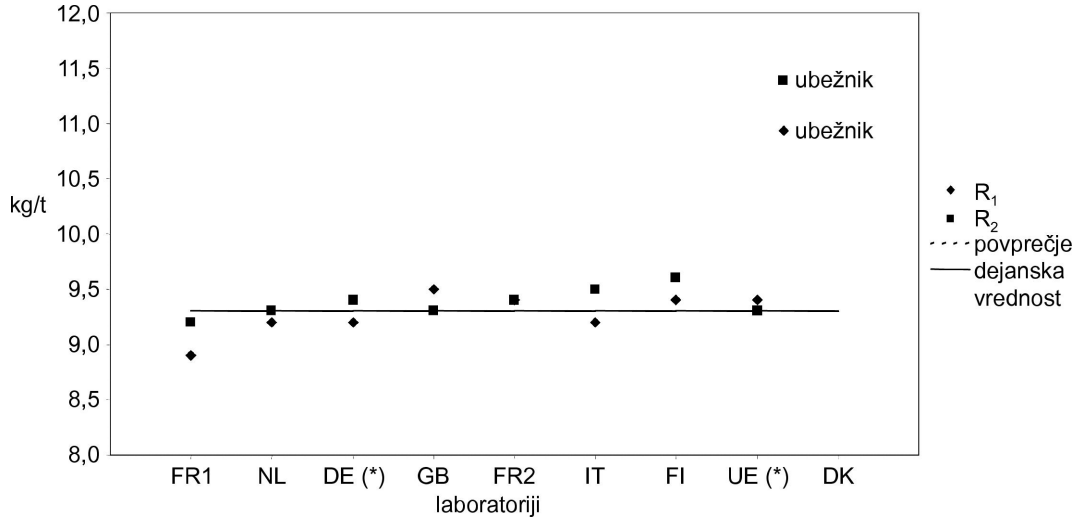


Rezultati preskusa: Vzorec B

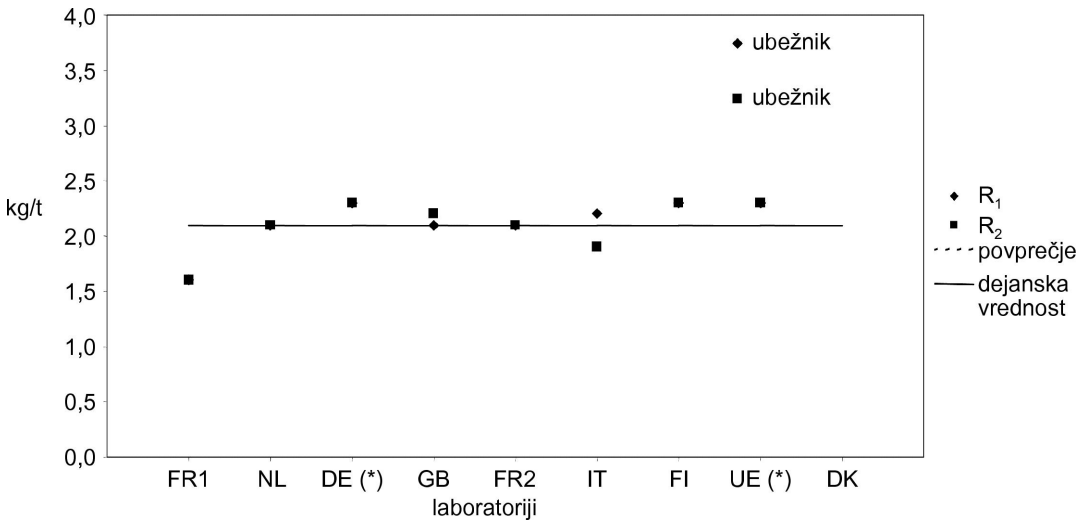


(*) = Metoda FAME.

Rezultati preskusa: Vzorec C

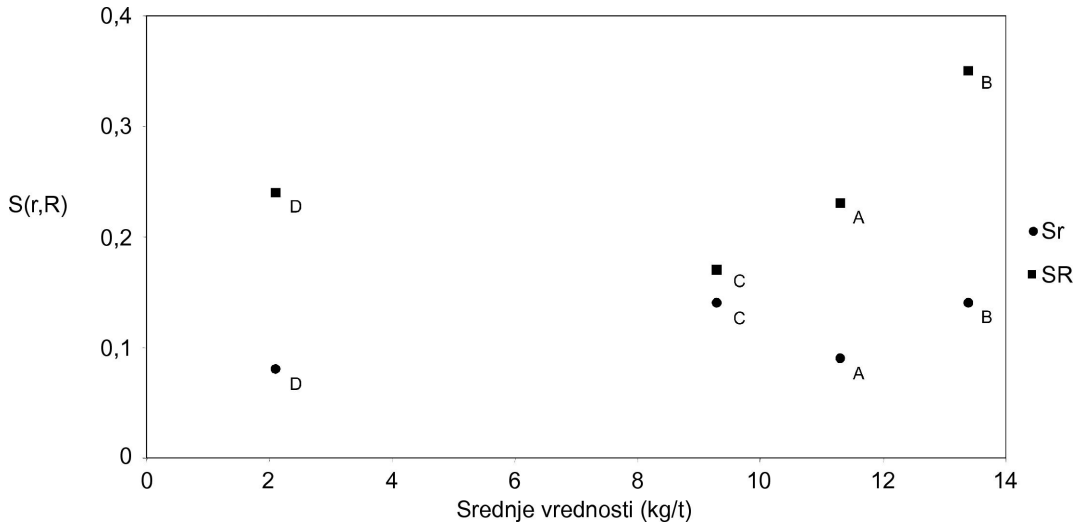


Rezultati preskusa: Vzorec D



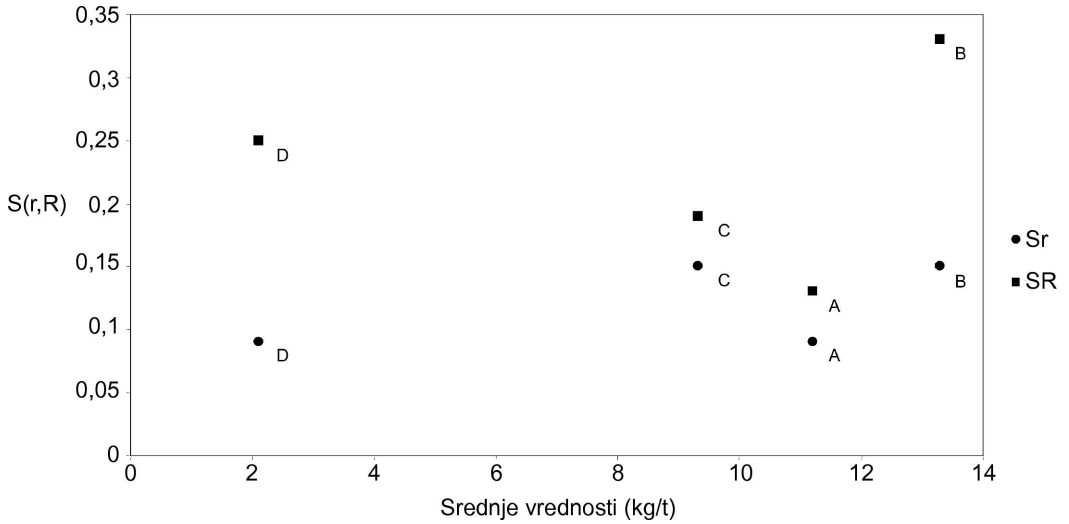
Slika 2

Standardni odmik ponovljivosti in obnovljivosti na različnih stopnjah (TG+FAME)



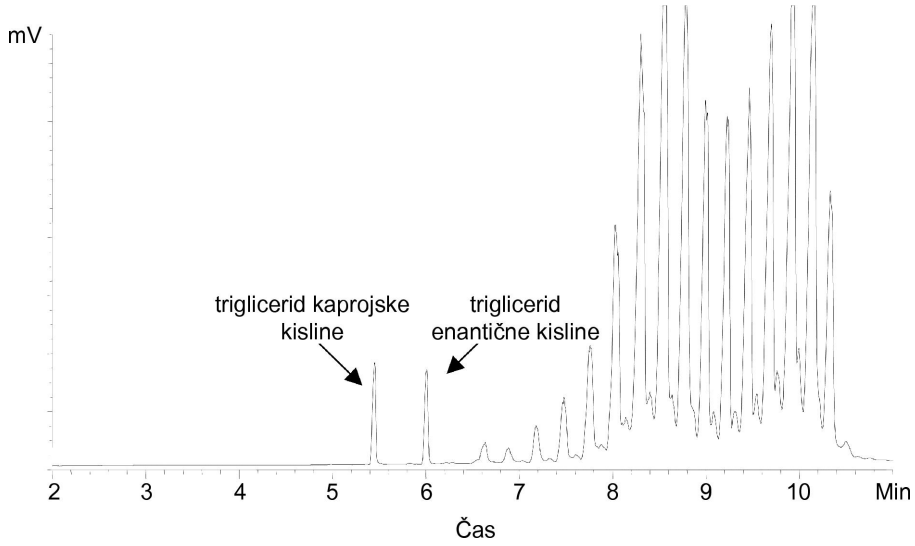
Slika 3

Standardni odmik ponovljivosti in obnovljivosti na različnih stopnjah (TG)



Slika 4

Primer z injektorjem za vbrizgavanje v kolon



PRILOGA VI

(Člen 5)

DOLOČITEV VSEBNOSTI VANILINA V ZGOŠČENEM MASLU, MASLU ALI SMETANI S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Metoda opisuje postopek za količinsko določanje vanilina v zgoščenem maslu, maslu ali smetani.

2. POSTOPEK

Ekstrakcija znane količine vzorca z mešanico izopropanola/etanola/acetonitrila (1:1:2). Sedimentacija večine maščobe z ohladitvijo med – 15 °C in – 20 °C, ki ji sledi centrifugiranje.

Po razredčenju z vodo sledi določitev vsebnosti vanilina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

3. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema, zlasti naslednja:

3.1 Zamrzovalnik, ki deluje pri temperaturnem razponu – 15 °C do – 20 °C

3.2 Brizgalke z razpoložljivo prostornino 2 ml

3.3 Membranski mikrofiltri z velikostjo luknjic 0,45 µm, odporni na raztopino, ki vsebuje 5 % ekstrakcijske raztopine (4.4)

3.4 Sistem za tekočinsko kromatografijo, ki vsebuje črpalko (pretok 1,0 ml/min), injektor (z injekcijsko prostornino 20 µl, samodejni ali ročni), UV-detektor (ki deluje pri 306 nm, 0,01 AU celotne lestvice), zapisovalnik ali integrator in grelnik kolone, ki deluje pri 25 °C

3.5 Analitska kolona (250 mm × 4,6 mm ID), napolnjena z LiChrospherjem RP 18 (Merck, 5 µm) ali enakovrednim polnilom

3.6 Varovalna kolona (pribl. 20 mm × 3 mm ID), suho polnjena z LiChrospherjem RP 18 (5 do 10 µm) ali enakovrednim polnilom

3.7 Centrifuga, ki deluje pri 2 000 rpm.

4. REAGENTI

Vsi uporabljeni reagenti morajo biti priznane analitske kakovosti.

4.1 Izopropanol

4.2 Etanol 96 % (v/v)

4.3 Acetonitril

4.4 Ekstrakcijska raztopina

Pripravite zmes izopropanola (4.1), etanola (4.2) in acetonitrila (4.3) v razmerju 1:1:2 (v/v).

4.5 Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid) ≥ 98 %

4.5.1 *Osnovna raztopina vanilina (= 500 µg/ml)*

V 100-mililitrsko merilno bučko natehtajte približno 50 mg (CM mg) vanilina (4.5) na 0,1 mg natančno, dodajte 25 ml ekstrakcijske raztopine (4.4) in dopolnite z vodo.

4.5.2 *Standardna raztopina vanilina (= 10 µg/ml)*

V 250-mililitrsko merilno bučko odpipetirajte 5 ml osnovne raztopine vanilina (4.5.1) in dopolnite z vodo.

4.5.3 *Metanol, HPLC-čistosti*

4.5.4 *Ledocetna kislina*

4.5.5 *Voda, HPLC-čistosti*

4.5.6 *Mobilna faza HPLC*

V 1 000-mililitrski merilni bučki zmešajte 300 ml metanola (4.5.3) s približno 500 ml vode (4.5.5) in 20 ml ocetne kisline (4.5.4) ter dopolnite z vodo (4.5.5). Zmes prefiltrirajte skozi filter 0,45 µm (3.3).

5. POSTOPEK

5.1 **Priprava preskusnega vzorca**

5.1.1 *Maslo*

Maslo segrevajte toliko časa, da se začne taliti. Maslo se na posameznih mestih ne sme pregreti prek 30 °C. V nobenem primeru se ne sme ločiti v dve fazi. Ko vzorec postane dovolj plastičen, ga homogenizirajte z mešanjem. Maslo mešajte 15 s, preden vzamete vzorec. V 100-mililitrsko merilno bučko natehtajte približno 5 g (SM g) masla na 1 mg natančno.

5.1.2 *Zgoščeno maslo*

Tik pred vzorčenjem postavite posodo z zgoščenim maslom v sušilnik, segret na 40 do 50 °C, dokler se maslo popolnoma ne stali. Vzorec premešajte z vrtenjem ali mešanjem, preprečite nastajanje zračnih mehurčkov zaradi premočnega mešanja. V 100-mililitrsko merilno bučko natehtajte na 1 mg natančno približno 4 g (SM g) zgoščenega masla.

5.1.3 *Smetana*

Vzorec segrejte v vodni kopeli ali inkubatorju pri temperaturi 35 °C do 40 °C. Maščobo enakomerno razporedite z vrtenjem ali, če je treba, z mešanjem. Vzorec na hitro ohladite na 20 ± 2 °C. Vzorec mora biti videti homogen; sicer je treba postopek ponoviti. V 100-mililitrsko merilno bučko natehtajte približno 10 g (SM g) smetane na 1 mg natančno.

5.2 **Priprava preskusne raztopine**

Preskusnemu deležu vzorca (5.1.1, 5.1.2 ali 5.1.3) dodajte približno 75 ml ekstrakcijske raztopine (4.4), približno 15 minut dobro mešajte ali stresajte, nato dolijte ekstrakcijsko raztopino (4.4). Približno 10 ml tega ekstrakta prenesite v epruveto z zamaškom. Postavite epruveto v zamrzovalnik (3.1) in jo pustite v njem približno 30 minut. Centrifugirajte hladni ekstrakt pet minut pri približno 2 000 vrtljajih na minuto in ga takoj oddekantirajte. Pustite, da se odcejena raztopina ohladi na temperaturo okolice. Odpipetirajte 5 ml oddekantirane raztopine v 100-mililitrsko merilno bučko in dopolnite vodo. Prefiltrirajte alikvot skozi membranski mikrofilter (3.3) z brizgalko (3.2). Filtrat je pripravljen za HPLC-določitev.

5.3 **Kalibracija**

Odpipetirajte 5 ml standardne raztopine vanilina (4.5.2) v 100-mililitrsko merilno bučko. Dodajte 5 ml ekstrakcijske raztopine (4.4) in dopolnite z vodo do oznake. Ta raztopina vsebuje 0,5 µg/ml vanilina.

5.4 **HPLC-določitev**

Pustite kromografski sistem približno 30 minut, da se umiri. Vbrizgajte standardno raztopino (5.3). To ponavljate, dokler razlika na površini vrha ali višini vrha med dvema zaporednima vbrizganjema ne znaša manj kot 2 %. Pri opisanih pogojih znaša retenzijski čas vanilina približno 9 minut. Opravite dve vzporedni analizi standardne raztopine (5.3) z vbrizganjem 20 µl. Vbrizgajte 20 µl preskusne raztopine (5.2). Določite površino ali višino dobljenega vrha vanilina. Ponovite vzporedno vbrizganje standardne raztopine (5.3) po 10 vbrizganjih preskusnih vzorcev (5.2).

6. IZRAČUN REZULTATOV

Izračunajte povprečno površino vrha (ali višino) (AC) vrhov za vanilin v povezavi z določenim številom vzporednih vbrizganj za vsako serijo preskusne raztopine (skupaj štiri površine ali višine).

Izračunajte odzivni faktor (R):

$$R = AC / CM$$

kjer je CM masa vanilina v mg (4.5.1).

Vsebnost (mg/kg) vanilina (C) v preskusnem vzorcu se izračuna:

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

kjer je:

AS = površina ali višina vrha vanilina pri preskusnem vzorcu

SM = masa preskusnega vzorca v g (5.1.1, 5.1.2 ali 5.1.3)

Opomba: Pri analizi vanilina v smetani mora biti koncentracija sledila izražena v mg sledila/kg mlečne maščobe. To se naredi tako, da se C pomnoži s 100/f, kjer je f vsebnost maščobe v smetani, izražena v odstotkih (m/m).

20 = faktor, ki upošteva redčenje standardnega in preskusnega vzorca

0,96 = korekcijski faktor za vsebnost maščobe pri prvem redčenju preskusnega vzorca

Opomba: Opomba: Namesto površine vrha se lahko uporabi višina vrha (glej 8.3).

7. TOČNOST METODE

7.1 **Ponovljivost (r)**

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju isti izvajalec izvede v najkrajšem možnem časovnem presledku z isto opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 16 mg/kg.

7.2 **Obnovljivost (R)**

Razlika med rezultatoma dveh določitev izvajalcev v različnih laboratorijih z različno opremo na enakem preskusnem materialu ne sme presegati 27 mg/kg.

8. DOVOLJENO ODSTOPANJE

8.1 Od sledenega proizvoda je treba vzeti tri vzorce, da se preveri homogenost.

8.2 Sledilo, pridobljeno iz vanilina ali sintetičnega vanilina

8.2.1 Stopnja vključitve za 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid je 250 g na tono zgoščenega masla ali masla. Pri sledenju smetane znaša stopnja vključitve 250 g na tono mlečne maščobe.

8.2.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 220,8 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve),

— 158,3 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve).

Koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 220,8 mg/kg in 158,3 mg/kg.

8.3 Sledila, dobljena izključno iz vanilijevih zrn ali njihovih integralnih ekstraktov:

8.3.1 Stopnja vključitve za 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid je 100 g na tono zgoščenega masla ali masla. Pri sledenju smetane znaša stopnja vključitve 100 g na tono mlečne maščobe.

8.3.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 78,3 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve),

— 53,3 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve).

Koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 78,3 mg/kg in 53,3 mg/kg.

9. OPOMBE

9.1 Izkoristek dodanega vanilina pri stopnji 250 mg/kg maslenega olja se giblje med 97,0 in 103,8. Povprečna ugotovljena vsebnost je znašala 99,9 % s standardnim odmikom 2,7 %.

9.2 Standardna raztopina vsebuje 5 % ekstrakcijske raztopine, ki uravnava širjenje vrha, ki ga povzroči 5-odstotna ekstrakcijska raztopina preskusnih vzorcev. To omogoča količinsko opredelitev z višino vrha.

9.3 Analiza temelji na linearni kalibracijski krivulji s presečiščem 0.

9.4 Pri ustreznih redčenjih standardne raztopine (4.5.2) je treba preveriti linearnost pri prvem izvajanju analize in nato v rednih časovnih presledkih ali po spremembah ali popravilu HPLC-opreme. Vanilin se lahko razgradi v vanilinsko kislino, divanilin in druge spojine z delovanjem lastnih encimov v nepasterizirani smetani ali proizvodih iz nje.

PRILOGA VII

(Člen 5)

DOLOČITEV ETIL ESTRA BETA-APO-8'-KAROTENSKE KISLINE V ZGOŠČENEM MASLU IN MASLU S SPEKTROFOTOMETRIJO

1. Namen in področje uporabe

Metoda opisuje postopek za količinsko določanje etil estra beta-apo-8'-karotenske kisline (apo-karotenski ester) v zgoščenem maslu in maslu. Apo-karotenski ester je vsota vseh snovi, prisotnih v dekstraktu vzorcev, dobljenih pri pogojih, opisanih v postopku, ki absorbirajo svetlobo pri 440 nm.

2. Postopek

Maslena maščoba se raztopi v petroletru, absorbanca pa se meri pri 440 nm. Vsebnost apo-karotenskega estra se določi s sklicevanjem na eksterni standard.

3. Oprema

3.1 Pipete – polnilne, s prostornino 0,25, 0,50, 0,75 in 1,0 ml

3.2 Spektrofotometer – primeren za uporabo pri 440 nm (in 447–449 nm) in opremljen s kiveto, dolgo 1 cm

3.3 Merilni bučki, 20 ml in 100 ml

3.4 Analitska tehtnica z občutljivostjo 0,1 mg, ki lahko tehta na 1 mg natančno, s čitljivostjo 0,1 mg

3.5 Sušilnik, 45 °C ± 1 °C

3.6 Filtri za hitro filtriranje brez pepela

4. Reagenti

Uporabljeni reagenti morajo biti priznane analitske kakovosti.

4.1 Suspenzija apo-karotenskega estra (približno 20 %)

4.1.1 Ugotovite vsebnost suspenzije na naslednji način:

Segrejte suspenzijo na temperaturi med 45 °C in 50 °C ter homogenizirajte v neodprti prvotni posodi. V merilno bučko (100 ml) natehtajte približno 400 mg, raztopite jo v 20 ml kloroforma (4.4) in prostornino dopolnite s cikloheksanom (4.5). Razredčite 5 ml te raztopine na 100 ml s cikloheksanom (raztopina A). Razredčite 5 ml raztopine A na 100 ml s cikloheksanom. Merite absorbanco pri 447–449 nm (izmeri se največja vrednost proti cikloheksanu kot slepemu vzorcu v 1-centimetrski kiveti).

Vsebnost apo-karotenskega estra P (%) = $(Abs_{maks} \times 40\,000) / (M_{susp} \times 2\,550)$ **ali**: $(Abs_{maks} / 2\,550) \times (100 / 5) \times (100 / 5) \times (100 / M_{susp})$

Abs_{maks} = največja absorbanca merjene raztopine

M_{susp} = masa suspenzije (g)

2 550 = referenčna vrednost Abs (1 %, 1 cm)

P = čistost (vsebnost) suspenzije (%)

Opomba: Suspenzija apo-karotenskega estra je občutljiva na zrak, toploto in svetlobo. V zaprti prvotni posodi (zaprta pod dušikom) in na hladnem mestu se lahko hrani približno eno leto. Po odprtju je treba vsebino čim prej porabiti.

4.1.2 Standardna raztopina apo-karotenskega estra, pribl. 0,2 mg/ml

Natehtajte na 1 mg natančno približno 0,100 g suspenzije apo-karotenskega estra (4.1.1) (W), raztopite jo v petroletru (4.2), količinsko jo prenesite v merilno bučko s prostornino 100 ml in jo dopolnite s petroletrom do oznake.

Ta raztopina vsebuje (W x P)/10 mg/ml apo-karotenskega estra.

Opomba: Raztopino je treba hraniti v hladnem in temnem prostoru. Neporabljeno raztopino po enem mesecu zavrzite.

4.2 Petroleter (40–60 °C)

4.3 Natrijev sulfat, brezvodni, v zrnih, predhodno sušen dve uri pri 102 °C

4.4 Kloroform

4.5 Cikloheksan

5. Postopek

5.1 **Priprava preskusnega vzorca**

5.1.1 *Zgoščeno maslo*

Vzorec raztalite v sušilniku pri temperaturi približno 45 °C.

5.1.2 *Maslo*

Vzorec raztalite v sušilniku pri približno 45 °C in prefiltrirajte reprezentativno količino skozi filter, ki vsebuje približno 10 g brezvodnega natrijevega sulfata (4.3), v okolici, zaščiteni pred močno naravno in umetno svetlobo, in ga hranite pri temperaturi 45 °C. Zberite primerno količino maslene maščobe.

5.2 **Določitev**

Natehtajte na 1 mg natančno približno 1 g zgoščenega masla (ali izločene maslene maščobe (5.1.2)), (M). Količinsko ga prenesite v 20-mililitrsko (V) merilno bučko s petroletrom (4.2), dopolnite do oznake in temeljito premešajte.

Prenesite alikvot v 1-centimetrsko kiveto in izmerite absorbanco pri 440 nm proti petroletru kot slepemu vzorcu. Določite koncentracijo apo-karotenskega estra v raztopini glede na umeritveno krivuljo (C µ/ml).

5.3 **Kalibracija**

Odpipetirajte 0, 0,25, 0,5, 0,75 in 1,0 ml standardne raztopine apo-karotenskega estra (4.1.2) v pet 100-mililitrskih merilnih buč. Dopolnite celotno prostornino s petroletrom (4.2) in zmešajte.

Približne koncentracije raztopin segajo od 0 do 2 µg/ml, točno pa se izračunajo glede na koncentracijo standardne raztopine (4.1.2) (W × P)/10 mg/ml. Izmerite absorbance pri 440 nm proti slepemu vzorcu petroletra (4.2).

Nanesite vrednosti absorbance na os y, koncentracijo apo-karotenskega estra pa na os x. Izračunajte enačbo umeritvene krivulje.

6. Izračun rezultatov

6.1 Vsebnost apo-karotenskega estra, izražena v mg/kg, je podana z:

Zgoščeno maslo: (C × V)/M

maslo: 0,82 (C × V)M

kjer je:

C = vsebnost apo-karotenskega estra, µg/ml, odčitana na umeritveni krivulji (5.3)

V = prostornina (ml) preskusne raztopine (5.2)

M = masa (g) preskusnega deleža (5.2)

0,82 = korekcijski faktor za vsebnost maslene maščobe v maslu

7. Točnost metode

7.1 **Ponovljivost**

7.1.1 *Analiza masla*

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju isti izvajalec izvede v najkrajšem možnem časovnem presledku z isto opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 1,4 mg/kg.

7.1.2 *Analiza zgoščenega masla*

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju isti izvajalec izvede v najkrajšem možnem časovnem presledku z isto opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 1,6 mg/kg.

7.2 **Obnovljivost**

7.2.1 *Analiza masla*

Razlika med rezultatoma dveh določitev izvajalcev v različnih laboratorijih z različno opremo na enakem preskusnem materialu ne sme presegati 4,7 mg/kg.

7.2. **2 Analiza zgoščenega masla**

Razlika med rezultatoma dveh določitev izvajalcev v različnih laboratorijih z različno opremo na enakem preskusnem materialu ne sme presegati 5,3 mg/kg.

7.3 **Vir podatkov natančnosti**

Podatki natančnosti so bili določeni s preskusom leta 1995, pri katerem je sodelovalo 11 laboratorijev in 12 sledenih vzorcev (šest slepih vzporednih izvajanj) za maslo in 12 sledenih (šest slepih vzporednih analiz) za zgoščeno maslo.

8. Dovoljeno odstopanje

8.1 Od sledenega proizvoda je treba vzeti tri vzorce, da se preveri pravilno sledenje proizvoda.

8.2 **Maslo**

8.2.1 Stopnja vključitve za maslo znaša ob upoštevanju absorbance ozadja 22 mg/kg.

8.2.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 17,7 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve),

— 12,2 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve).

Koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 17,7 mg/kg in 12,2 mg/kg.

8.3 **Zgoščeno maslo**

8.3.1 Stopnja vključitve za zgoščeno maslo ob upoštevanju absorbance ozadja znaša 24 mg/kg

Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 19,2 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve),

— 13,2 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve).

Koncentracija sledila vzorca, ki pokaže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 19,2 mg/kg in 13,2 mg/kg.

PRILOGA VIII

(Člen 5)

DOLOČITEV SITOSTEROLA ALI STIGMASTEROLA V MASLU ALI ZGOŠČENEM MASLU S KAPILARNO-PLINSKO KROMATOGRAFIJO

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Metoda opisuje postopek za količinsko določanje sitosterola ali sigmasterola v maslu in zgoščenem maslu. Za sitosterol se vzame vsota β-sitosterola in 22-dihidro-β-sitosterola, za druge sitosterole se predpostavlja, da so nepomembni.

2. POSTOPEK

Maslo ali zgoščeno maslo se umili v etanolski raztopini kalijevega hidroksida, snovi, ki jih ni mogoče umiliti, se ekstrahirajo z dietiletrom.

Steroli se preoblikujejo v trimetil-silil etre in se analizirajo s kapilarno-kolonsko plinsko kromatografijo glede na interni standard/betulin.

3. OPREMA

3.1 150-mililitrska bučka za umiljenje s povratnim hladilnikom z obrusi

3.2 500-mililitrski liji ločniki

3.3 250-mililitrske bučke

3.4 Lijaki za izenačenje tlaka, 250 ml ali podobni, za zbiranje odpadnega dietiletra

3.5 Steklena kolona, 350 mm × 20 mm z zamaškom iz sintranega stekla

3.6 Vodna kopel ali grelna obloga

3.7 Reakcijske stekleničke, 2 ml

3.8 Plinski kromatograf, primeren za uporabo s kapilarno nosilno kolono z razcepitvenim sistemom, ki ga sestavljajo:

3.8.1 termostatski grelnik za kolone, ki lahko ohranja želeno temperaturo do ± 1 °C natančno;

3.8.2 izparjevalnik z možnostjo nastavitve temperature;

3.8.3 detektor plamenske ionizacije (FID) in pretvornik-ojačevalnik;

3.8.4 integrator-zapisovalnik, primeren za uporabo s pretvornikom-ojačevalnikom (3.8.3);

3.9 Kapilarne kolone iz taljenega kremenovega stekla, v celoti prevlečene z BP1 ali enakovrednim materialom (ali katere koli druge kolone z najmanj enako ločljivostjo) z enakomerno debelino 0,25 μm; v koloni mora biti mogoče ločiti trimetil-silil derivate lanosterola in sitosterola. Primerna je kolona z dolžino 12 m in notranjim premerom 0,2 mm;

3.10 1 μl mikrobrizgalka z iglo s trdo konico za plinsko kromatografijo.

4. REAGENTI

Uporabljeni reagenti morajo biti priznane analitske kakovosti. Uporabljena voda mora biti destilirana voda ali voda vsaj enakovredne čistosti.

4.1 Etanol, najmanj 95-odstotno čist

4.2 Kalijev hidroksid, 60-odstotna raztopina, raztopite 600 g kalijevega hidroksida (najmanj 85 %) v vodi in dopolnite do enega litra z vodo

4.3 Betulin, najmanj 99-odstotno čist

4.3.1 Raztopine betulina v dietiletru (4.4)

4.3.1.1 Koncentracija raztopine betulina, ki se uporabi pri določitvi sitosterola, mora biti 1,0 mg/ml.

4.3.1.2 Koncentracija raztopine betulina, ki se uporabi pri določitvi stigmasterola, mora biti 0,4 mg/ml.

4.4 Dietileter, analitsko čist (brez peroksidov ali ostankov)

4.5 Natrijev sulfat, brezvodni, v zrnih, predhodno sušen dve uri pri 102 °C

4.6 Sililacijski reagent, na primer TRI–SIL (na voljo pri Pierce Chemical Co, kat. št. 49001) ali enakovreden (pomembno: TRI–SIL je vnetljiv, strupen, koroziven in morebiti rakotvoren. Laboratorijsko osebje se mora seznaniti z varnostnimi podatki o TRI-SILU in sprejeti ustrezne varnostne ukrepe).

4.7 Lanosterol

4.8 Sitosterol, znane čistosti, ki mora biti najmanj 90 % (P)

Opomba 1: Čistost standardnih materialov, ki se uporabijo za kalibracijo, je treba določiti po postopku normalizacije. Predpostavite, da so vsi steroli, prisotni v vzorcu, prikazani na kromatogramu, celotna površina vrhov pa pomeni 100 % sestavin sterola, in da steroli dajejo enak detektorski odziv. Linearnost sistema je treba potrditi za celotni razpon koncentracij, ki se proučujejo.

4.8.1 Standardna raztopina sitosterola – pripravite raztopino, ki na 0,001 mg/ml natančno vsebuje približno 0,5 mg/ml (W_1) sitosterola (4.8) v dietiletru (4.4).

4.9 Stigmasterol, znane čistosti, ki mora biti najmanj 90 % (P).

4.9.1 Standardna raztopina stigmasterola – pripravite raztopino, ki na 0,001 mg/ml natančno vsebuje približno 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterola (4.9) v dietiletru (4.4).

4.10 Zmes za preverjanje ločbe. Pripravite raztopino, ki vsebuje 0,05 mg/ml lanosterola (4.7) in 0,5 mg/ml sitosterola (4.8) v dietiletru (4.4).

5. POSTOPEK

5.1 **Priprava standardne raztopine za kromatografijo.**

Raztopino internega standarda (4.3.1) je treba dodati ustrezni standardni raztopini sterola hkrati z njenim dodajanjem umiljenemu vzorcu (glej 5.2.2).

5.1.1 Standardna kromatografska raztopina sitosterola: 1 ml standardne raztopine sitosterola (4.8.1) prenesite v vsako od dveh reakcijskih stekleničk (3.7) in odstranite dietileter s tokom dušika. Dodajte 1 ml raztopine internega standarda (4.3.1.1) in odstranite dietileter s tokom dušika.

5.1.2 Standardna kromatografska raztopina stigmasterola: 1 ml standardne raztopine stigmasterola (4.9.1) prenesite v vsako od dveh reakcijskih stekleničk (3.7) in odstranite dietileter s tokom dušika. Dodajte 1 ml raztopine internega standarda (4.3.1.2) in odstranite dietileter s tokom dušika.

5.2 **Priprava neumiljivih snovi**

5.2.1 Raztalite vzorec masla pri temperaturi, ki ne presega 35 °C, in vzorec temeljito premešajte.

V 150-mililitrsko bučko (3.1) na 1 mg natančno natehtajte približno 1 g masla (W_2) ali zgoščenega masla (W_2). Dodajte 50 ml etanola (4.1) in 10 ml raztopine kalijevega hidroksida (4.2). Namestite povratni hladilnik in segrevajte 30 minut pri približno 75 °C. Odstranite kondenzator in bučko ohladite približno na temperaturo okolice.

5.2.2 Pri ugotavljanju sitosterola dodajte v bučko 1,0 ml raztopine internega standarda (4.3.1.1), pri ugotavljanju stigmasterola pa 0,4 mg/ml (4.3.1.2). Temeljito premešajte. Vsebino bučke količinsko prenesite v 500-mililitrski lij ločnik (3.2), nato bučko zaporedoma sperite s 50 ml vode in 250 ml dietiletra (4.4). Dve minuti močno stresajte lij ločnik in nato pustite, da se faze ločijo. Odstranite spodnji vodni sloj in s stresanjem sperite sloj etra s štirimi zaporednimi 100 ml alikvoti vode.

Opomba 2: Da se prepreči nastanek emulzije, je bistveno, da se prvi dve izpiranji z vodo opravita počasi (10 vrtljajev). Pri tretjem spiranju se lahko 30 sekund močno pretresa. Če nastane emulzija, se ta odstrani z dodajanjem 5–10 ml etanola. Če se doda etanol, je zelo pomembno, da se opravita še dve dodatni močni spiranji z vodo.

5.2.3 Čisti sloj etra brez mila spustite skozi stekleno kolono (3.5), ki vsebuje 30 g brezvodnega natrijevega sulfata (4.5). Zberite eter v 250-mililitrsko bučko (3.3). Dodajte vrelni kamenček in izparevajte skoraj do suhega v vodni kopeli ali grelni oblogi, pri tem pa poskrbite, da zberete odpadna topila.

Opomba 3: Če se ekstrakti vzorca popolnoma posušijo pri previsoki temperaturi, se sterol lahko izgubi.

5.3 **Priprava trimetil silil etrov**

5.3.1 Prenesite raztopino etra, ki je ostala v bučki, v 2-mililitrsko reakcijsko stekleničko (3.7) skupaj z 2 ml dietiletra in eter odstranite s tokom dušika. Sperite bučko z dvema dodatnima 2 ml alikvotoma dietiletra, prenesite v stekleničko in vsakič odstranite eter z dušikom.

5.3.2 Sililirajte vzorec z dodatkom 1 ml TRI-SIL-a (4.6). Zaprite stekleničko in močno stresajte, da se vsebina raztopi. Če se ne raztopi popolnoma, stekleničko segrejte na 65–70 °C. Pred vbrizganjem raztopine v plinski kromatograf jo pustite stati najmanj pet minut. Enako kot vzorce sililirajte tudi standardne raztopine. Enako kot vzorce sililirajte tudi zmes za preverjanje ločbe (4.10).

Opomba 4: Sililacija mora potekati v suhem okolju. Nepopolna sililacija betulina se pokaže kot drugi vrh poleg vrha betulina.

Prisotnost etanola v fazi sililacije moti sililacijo. To je lahko posledica nezadostnega spiranja v fazi ekstrakcije. Če se ta težava pojavlja, se v fazi ekstrakcije lahko uvede peto spiranje s 30-sekundnim močnim stresanjem.

5.4 **Analiza s plinskim kromatografom**

5.4.1 *Izbira pogojev za izvajanje*

Namestite plinski kromatograf po navodilih proizvajalca.

Smernice glede pogojev izvajanja so naslednje:

— temperatura kolone: 265 °C

— temperatura injektorja: 265 °C

— temperatura detektorja: 300 °C

— stopnja pretoka nosilnega plina: 0,6 ml/min

— tlak vodika: 84 kPa

— zračni tlak: 155 kPa

— cepitev vzorca: 10:1 do 50:1; cepitveno razmerje mora biti optimizirano glede na navodila proizvajalca in linearnost odziva detektorja, nato ga je treba potrditi za celotno koncentracijsko območja proučevanja.

Opomba 5: Zlasti pomembno je redno čiščenje vložka injektorja.

— količina vbrizgane snovi: 1 µl raztopine TMSE.

Preden začnete kakršno koli analizo, počakajte, da se sistem uravnovesi in odziva dovolj stabilno.

Te pogoje je treba spreminjati glede na značilnosti kolone in plinskega kromatografa, da se dobijo kromatogrami, ki izpolnjujejo naslednje zahteve:

— vrh sitosterola se mora ustrezno ločiti od lanosterola; na sliki 1 je predstavljen značilni kromatogram, ki ga je treba dobiti za sililizirano zmes za preverjanje ločbe (4.10),

— relativni retenzijski časi naslednjih sterolov morajo znašati približno:

holesterol: 1,0

stigmasterol: 1,3

sitosterol: 1,5

betulin: 2,5,

— retenzijski čas za betulin mora znašati približno 24 minut.

5.4.2 *Analitski postopek*

Vbrizgajte 1 µl sililizirane standardne raztopine (stigmasterola ali sitosterola) in prilagodite kalibracijske parametre integratorja.

Vbrizgajte dodatni 1 µl sililizirane standardne raztopine, da določite odzivne faktorje glede na betulin.

Vbrizgajte 1 µl raztopine sililziranega vzorca in izmerite površino vrhov. Vsaka kromatografska serija mora biti omejena z vbrizganjem standardov.

Kot smernico je mogoče navesti, da naj bo v vsako serijo vključenih šest vbrizganj vzorca.

Opomba 6: V integracijo vrha stigmasterola je treba zajeti vsak rep, kakor je določeno v točkah 1, 2 in 3 slike 2b.

Pri oceni celotnega sitosterola je treba v integracijo vrha sitosterola zajeti površino vrha za 22-dihidro-β-sitosterol (stigmastanol), ki se eluira takoj za sitosterolom (glej sliko 3b).

6. IZRAČUN REZULTATOV

6.1 Določite površino vrhov sterola in vrhov betulina v obeh standardih, ki omejujeta serijo vzorcev, ter izračunajte R_1:

R_1 = (povprečna površina vrha sterola v standardu)/(povprečna površina vrha betulina v standardu)

Določite površino vrha sterola (stigmasterola in sitosterola) in vrha betulina v vzorcu ter izračunajte R_2:

R_2 = (površina vrha sterola v vzorcu)/(površina vrha betulina v vzorcu)

W_1 = vsebnost sterola v standardu (mg), ki ga vsebuje 1 ml standardne raztopine (4.8.1 ali 4.9.1)

W_2 = masa vzorca (g) (5.2.1)

P = čistost standarda sterola (4.8 ali 4.9)

Vsebnost sterola v vzorcu (mg/kg) = $((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$

7. TOČNOST METODE

7.1 **Maslo**

7.1.1 *Ponovljivost*

7.1.1.1 Stigmasterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju isti izvajalec izvede v najkrajšem možnem časovnem presledku z isto opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 19,3 mg/kg.

7.1.1.2 Sitosterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju isti izvajalec izvede v najkrajšem možnem časovnem presledku z isto opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 23,0 mg/kg.

7.1.2 *Obnovljivost*

7.1.2.1 Stigmasterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev izvajalcev v različnih laboratorijih z različno opremo na enakem preskusnem materialu ne sme presegati 31,9 mg/kg.

7.1.2.2 Sitosterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju opravijo izvajalci v različnih laboratorijih z različno opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 8,7 % glede na srednjo vrednost določitve.

7.1.3 *Vir natančnih podatkov*

Podatki natančnosti so bili določeni s preskusom leta 1992, pri katerem je sodelovalo osem laboratorijev in šest vzorcev (tri slepa vzporedna izvajanja) za stigmasterol in šest vzorcev (tri slepa vzporedna izvajanja) za sitosterol.

7.2 **Zgoščeno maslo**

7.2.1 *Ponovljivost*

7.2.1.1 Stigmasterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju isti izvajalec izvede v najkrajšem možnem časovnem presledku z isto opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 10,2 mg/kg.

7.2.1.2 Sitosterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju isti izvajalec opravi v najkrajšem možnem časovnem presledku z isto opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 3,6 % glede na srednjo vrednost določitev.

7.2.2 *Obnovljivost*

7.2.2.1 Stigmasterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev izvajalcev v različnih laboratorijih z različno opremo na enakem preskusnem materialu ne sme presegati 25,3 mg/kg.

7.2.2.2 Sitosterol

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju opravijo izvajalci v različnih laboratorijih z različno opremo na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 8,9 % glede na srednjo vrednost določitev.

7.2.3 *Vir natančnih podatkov*

Podatki natančnosti so bili določeni s preskusom leta 1991, pri katerem je sodelovalo devet laboratorijev in šest vzorcev (tri slepa vzporedna izvajanja) za stigmasterol in šest vzorcev (tri slepa vzporedna izvajanja) za sitosterol.

8. DOVOLJENO ODSTOPANJE

8.1 Od sledenega proizvoda je treba vzeti tri vzorce, da se preveri pravilno sledenje proizvoda.

8.2 **Maslo**

8.2.1 *Stigmasterol*

8.2.1.1 Stopnja vključitve za stigmasterol je 150 g najmanj 95-odstotno čistega stigmasterola na tono masla, tj. 142,5 mg/kg, ali 170 g najmanj 85-odstotno čistega stigmasterola na tono masla, tj. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 115,8 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve za 95-odstotno čist stigmasterol),

— 117,7 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve za 85-odstotno čist stigmasterol),

— 80,1 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve za 95-odstotno čist stigmasterol),

— 81,5 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve za 85-odstotno čist stigmasterol).

Koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 115,8 mg/kg in 80,1 mg/kg ali 117,7 mg/kg in 81,5 mg/kg.

8.2.2 *Sitosterol*

8.2.2.1 Stopnja vključitve za sitosterol je 600 g najmanj 90-odstotno čistega sitosterola na tono masla, tj. 540 mg/kg.

8.2.2.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 482,6 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve za 90-odstotno čist sitosterol),

— 347,6 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve za 90-odstotno čist sitosterol).

Koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 482,6 mg/kg in 347,6 mg/kg.

8.3 **Zgoščeno maslo**

8.3.1 *Stigmasterol*

8.3.1.1 Stopnja vključitve za stigmasterol je 150 g najmanj 95-odstotno čistega stigmasterola na tono zgoščenega masla, tj. 142,5 mg/kg; ali 170 g najmanj 85-odstotno čistega stigmasterola na tono zgoščenega masla, tj. 144,5 mg/kg.

8.3.1.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 118,5 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve za 95-odstotno čist stigmasterol),

— 120,4 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve za 85-odstotno čist stigmasterol),

— 82,9 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve za 95-odstotno čist stigmasterol),

— 84,3 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve za 85-odstotno čist stigmasterol).

Koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 118,5 mg/kg in 82,9 mg/kg ali 120,4 mg/kg in 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitosterol*

8.3.2.1 Stopnja vključitve za sitosterol je 600 g najmanj 90-odstotno čistega sitosterola na tono zgoščenega masla, tj. 540 mg/kg.

8.3.2.2 Rezultati za vse tri vzorce, dobljeni z analizo proizvoda, se uporabijo za preverjanje stopnje in homogenosti vključitve sledila, najnižji od teh rezultatov pa se primerja z naslednjimi mejami:

— 480,9 mg/kg (95 % od najmanjše stopnje vključitve za 90-odstotno čist sitosterol),

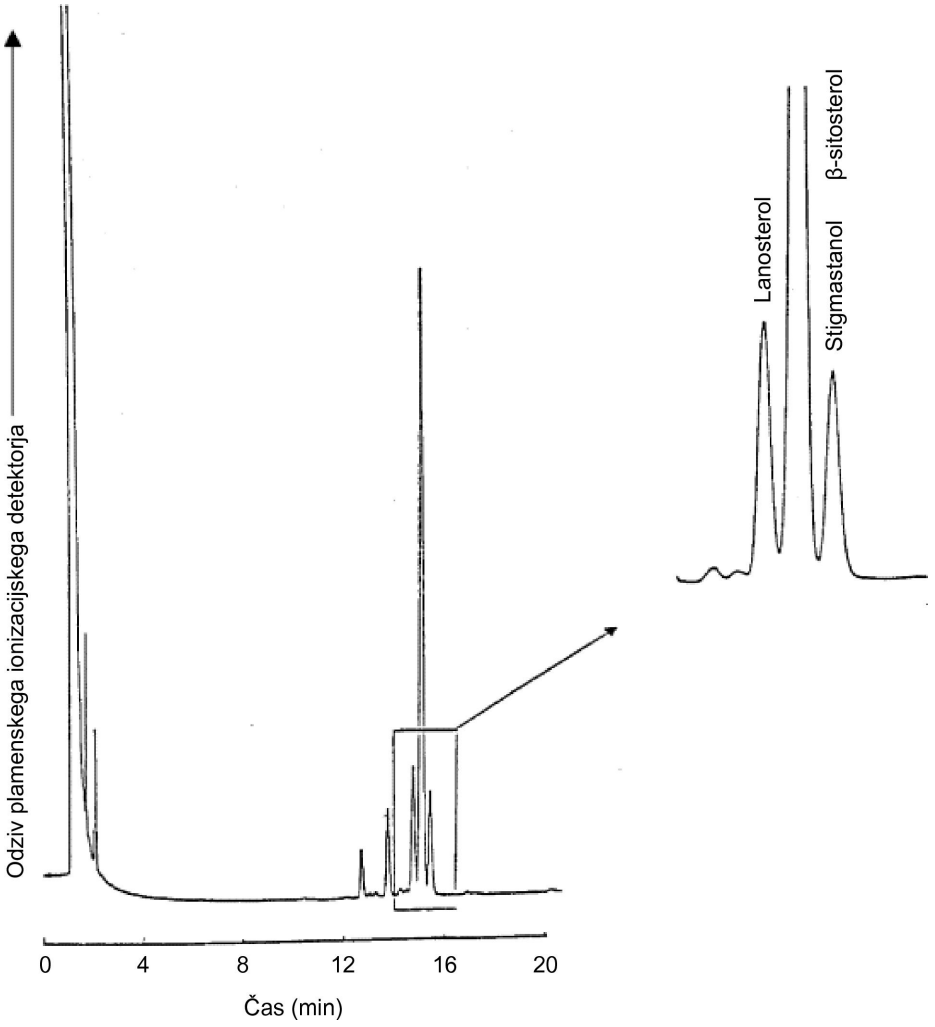
— 345,9 mg/kg (70 % od najmanjše stopnje vključitve za 90-odstotno čist sitosterol).

Koncentracija sledila v vzorcu, s katero se doseže najnižji rezultat, se uporabi v zvezi z interpolacijo med 480,9 mg/kg in 345,9 mg/kg.

Slika 1

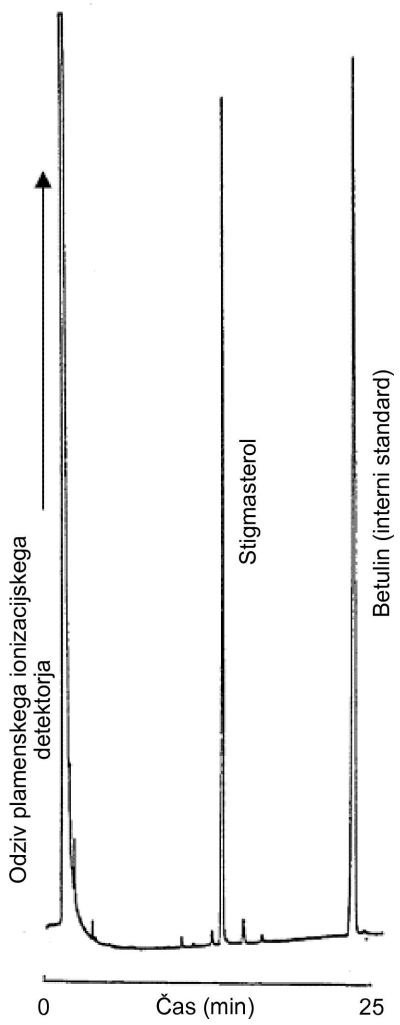
Kromatogram zmesi za preverjanje ločbe.

Zaželena je popolna ločba, tj. vrh krivulje za lanosterol se mora vrniti v izhodišče, preden se dvigne na vrh sitosterola, čeprav je nepopolna ločba dopustna.



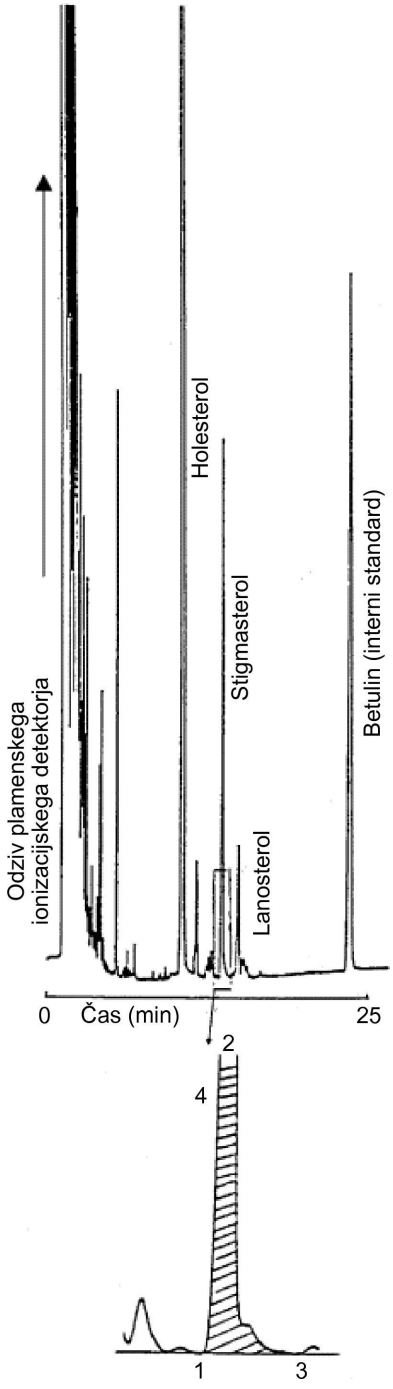
Slika 2a

Standard stigmasterola



Slika 2b

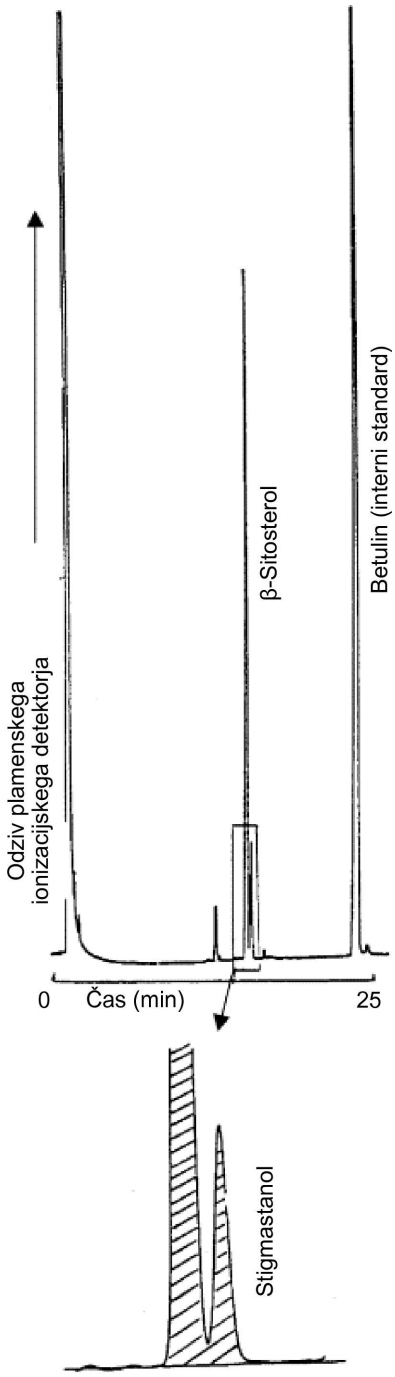
Vzorec masla, denaturiran s stigmasterolom



Hinweis: Die Integration des Stigmasterin-Peaks muss etwaige Tailings gemäß den Ziffern 1, 2 und 3 beinhalten.

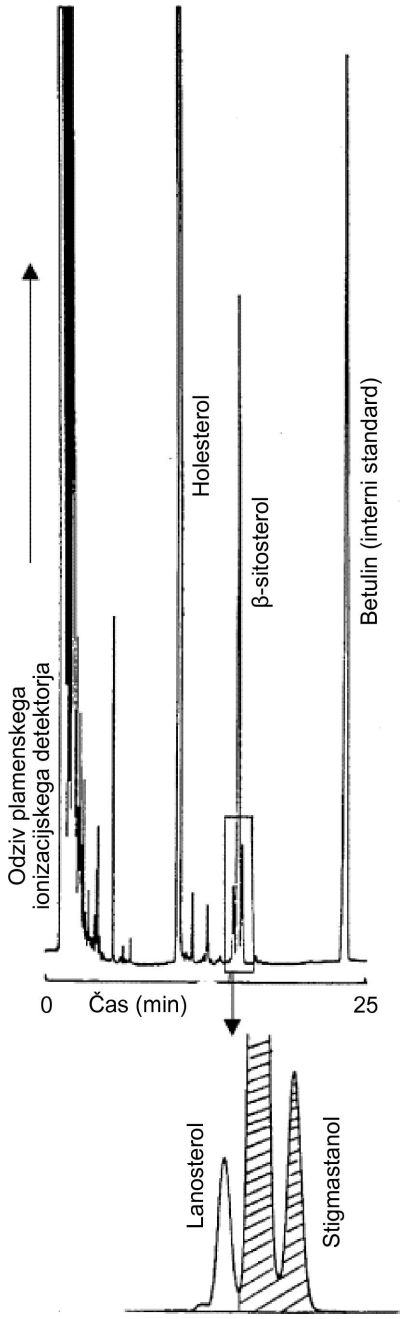
Slika 3a

Standard sitosterola



Slika 3b

Vzorec masla, denaturiran z β-sitosterolom



Opomba: β-sitosterol pogosto vsebuje nečistočo (opredeljeno kot stigmastanol), ki se eluira takoj za β-sitosterolom. Če se ocenjuje skupen β-sitosterol, ki je prisoten, je treba sešteti površine teh dveh vrhov.

PRILOGA IX

(Člen 6)

REFERENČNA METODA ZA UGOTAVLJANJE KRAVJEGA MLEKA IN KAZEINATA V SIRIH IZ OVČJEGA, KOZJEGA ALI BIVOLJEGA MLEKA ALI MEŠANIC OVČJEGA, KOZJEGA IN BIVOLJEGA MLEKA

1. NAMEN

Ugotavljanje kravjega mleka in kazeinata v sirih iz ovčjega, kozjega in bivoljega mleka ali mešanic ovčjega, kozjega in bivoljega mleka z izoelektričnim fokusiranjem γ-kazeinov po plazminolizi.

2. PODROČJE UPORABE

Ta metoda je primerna za občutljivo, specifično ugotavljanje surovega in toplotno obdelanega kravjega mleka in kazeinata v svežih in zorenih sirih iz ovčjega, kozjega in bivoljega mleka ter iz mešanic ovčjega, kozjega in bivoljega mleka. Ni pa primerna za ugotavljanje mlečnih ali sirnih ponaredkov s toplotno obdelanimi proteinskimi koncentrati govejega sirila.

3. POSTOPEK

3.1 Izolacija kazeinov iz sira in referenčni standardi

3.2 Raztopitev izoliranih kazeinov in izpostavitev v plazminsko cepitev (EC.3.4.21.7)

3.3 Izoelektrično fokusiranje plazminsko obdelanih kazeinov v prisotnosti sečnine in obarvanje proteinov

3.4 Vrednotenje obarvanih γ_3- in γ_2-kazeinskih primerkov (dokaz kravjega mleka) s primerjavo primerka, pridobljenega iz vzorca, s primerki, pridobljenimi v istem gelu iz referenčnih standardov, ki vsebujejo 0 % in 1 % kravjega mleka

4. REAGENTI

Razen če ni določeno drugače, je treba uporabiti analitsko čiste kemikalije. Voda mora biti dvakrat destilirana ali enakovredne čistosti.

Opomba: Naslednje podrobnosti veljajo za laboratorijsko pripravljene poliakrilamidne gele v velikosti 265 × 125 × 0,25 mm, ki vsebujejo sečnino. Če so uporabljene druge velikosti in vrste gelov, se lahko pogoji ločitve prilagodijo.

Izoelektrično fokusiranje

4.1 **Reagenti za izdelavo poliakrilamidnih gelov z vsebnostjo sečnine**

4.1.1 *Osnovna gelska raztopina*

V vodi raztopite:

4,85 g akrilamida,

0,15 g N, N'-metilen-bis-akrilamida (BIS),

48,05 g sečnine,

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

in dopolnite do 100 ml ter raztopino shranite v rjavi steklenici v hladilniku.

Opomba: Namesto navedenih določenih količin nevrotoksičnih akrilamidov se lahko uporabi tudi industrijska mešanica akrilamidne/BIS raztopine. Če taka raztopina vsebuje 30 % w/v akrilamida in 0,8 % w/v BIS, je treba namesto navedenih količin za pripravek vzeti 16,2 ml. Rok uporabnosti raztopine je največ 10 dni. Če je njena prevodnost več kot 5 μS, raztopino deionizirajte z mešanjem 2 g amberlita MB-3 30 minut, nato filtrirajte skozi membrano 0,45 μm.

4.1.2 *Gelska raztopina*

Gelsko raztopino pripravite z mešanjem dodatkov, amfolitov in gelske raztopine iz zaloge (glej 4.1.1).

9,0 ml osnovne gelske raztopine,
24 mg β-alanina,
500 µl amfolita pH 3,5–9,5 ([1]),
250 µl amfolita pH 5–7 ([1]),
250 µl amfolita pH 6–8 ([1]).

Zmešajte gelsko raztopino in jo dve do tri minute razplinjajte v ultrazvočni kopeli ali vakuumu.

Opomba: Gelsko raztopino pripravite, tik preden jo nalijete (glej 6.2).

4.1.3 *Katalizatorske raztopine*

4.1.3.1 N, N, N' N' – tetrametiletilendiamin (Temed)

4.1.3.2 40 % w/v amonijev persulfat (PER):

Raztopite 800 mg PER v vodi in dopolnite do 2 ml.

Opomba: Vedno uporabite sveže pripravljeno raztopino PER.

4.2 **Kontaktna tekočina**

Kerozen ali tekoči parafin.

4.3 **Anodna raztopina**

Raztopite 5,77 g fosforjeve (V) kisline (85 % w/w) v vodi in dopolnite z vodo do 100 ml.

4.4 **Katodna raztopina**

Raztopite 2,00 g natrijevega hidroksida v vodi in dopolnite z vodo do 100 ml.

Priprava vzorca

4.5 **Reagent za izolacijo proteinov**

4.5.1 *Razredčena ocetna kislina (25,0 ml ledocetne kisline dopolnite z vodo do 100 ml).*

4.5.2 *Diklorometan*

4.5.3 *Aceton*

4.6 **Pufer za raztapljanje proteinov**

V vodi raztopite

5,75 g glicerola (87 % w/w),
24,03 g sečnine,
250 mg ditiotreitola

in dopolnite do 50 ml.

Opomba: Hranite v hladilniku; najdaljši rok uporabnosti je en teden.

4.7 **Reagenti za plazminsko cepitev kazeinov**

4.7.1 *Pufer amonijevega hidrogenkarbonata*

Titrirajte 0,2 mol/l raztopine amonijevega hidrogenkarbonata (1,58 g/100 ml vode), ki vsebuje 0,05 mol/l etilendiamintetraocetne kisline (EDTA, 1,46 g/100 ml) z 0,2 mol/l raztopine amonijevega karbonata (1,92 g/100 ml vode), ki vsebuje 0,05 mol/l EDTA do pH 8.

([1]) Izdelka Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) in Resolyte® pH 5–7 in pH 6–8 (BDH, Merck) sta se pokazala kot posebno primerna za pridobitev potrebnih ločitev γ–kazeinov.

4.7.2 *Goveji plazmin (EC. 3.4.21.7) z aktivnostjo najmanj 5 U/ml.*

4.7.3 *Raztopina ε-aminokapronske kisline za inhibiranje encimov.*

Raztopite 2,624 g ε-aminokapronske kisline (6-amino-n-heksanojske kisline) v 100 ml 40 % (v/v) etanola.

4.8 **Standardi**

4.8.1 *Certificirani referenčni standardi mešanice sesirjenega posnetega ovčjega in kozjega mleka, ki vsebuje 0 % in 1 % kravjega mleka, so na voljo na Inštitutu za referenčne materiale in meritve Komisije, B-2440 Geel, Belgija.*

4.8.2 *Priprava laboratorijskih delovnih standardov sesirjenega bivoljega mleka, ki vsebuje 0 % in 1 % kravjega mleka.*

Posneto mleko se pripravi z 20-minutnim centrifugiranjem vzorca surovega bivoljega ali kravjega mleka pri 37 °C in 2 500 g. Po hitri ohladitvi epruvete in vsebine na 6 do 8 °C se popolnoma odstrani zgornja plast maščobe. Za pripravo 1 % standarda v litrski čaši k 495 ml posnetega bivoljega mleka dodajte 5 ml posnetega kravjega mleka, nastavite pH na 6,4 z dodajanjem razredčene mlečne kisline (10 % w/v). Nastavite temperaturo na 35 °C in dodajte 100 µl telečjega sirila (aktivnost sirila je 1:10 000, pribl. 3 000 U/ml), mešajte eno minuto in nato pustite eno uro čašo pokrito z aluminijasto folijo pri 35 °C, da se naredi gruda. Ko se je naredila gruda, se celotno sesirjeno mleko posuši z zmrzovanjem (freeze-dry) brez predhodne homogenizacije ali odločitve sirotke. Po tem postopku grudo fino zmeljite, da dobite homogen prah. Za pripravo 0 % standarda uporabite isti postopek z naravnim posnetim bivoljim mlekom. Standarda morate shraniti pri – 20 °C.

Opomba: Pred pripravo standardov je priporočljivo, da se preveri čistost bivoljega mleka z izoelektričnim fokusiranjem plazminsko obdelanih kazeinov.

Reagenti za obarvanje proteinov

4.9 **Fiksir**

Raztopite 150 g trikloroocetne kisline v vodi in dopolnite do 1 000 ml.

4.10 **Raztopina za razbarvanje**

500 ml metanola in 200 ml ledocetne kisline razredčite z destilirano vodo do 2 000 ml.

Opomba: Vsak dan pripravite svežo raztopino za razbarvanje. Lahko jo pripravite z mešanjem enakih prostornin osnovnih raztopin 50 % (v/v) metanola in 20 % (v/v) ocetne kisline.

4.11 **Raztopine za obarvanje**

4.11.1 *Raztopina za obarvanje (osnovna raztopina 1)*

Raztopite 3,0 g Coomassie Brillant Blue G-250 (C.I. 42655) v 1 000 ml 90 % (v/v) metanola z magnetnim mešalnikom (približno 45 minut), filtrirajte skozi dva srednje hitra nagubana filtra.

4.11.2 *Raztopina za obarvanje (osnovna raztopina 2)*

Raztopite 5,0 g bakrovega sulfata pentahidrata v 1 000 ml 20 % (v/v) ocetne kisline.

4.11.3 *Raztopina za obarvanje (delovna raztopina)*

Tik pred obarvanjem zmešajte skupaj 125 ml vsake osnovne raztopine (4.11.1, 4.11.2).

Opomba: Raztopino za obarvanje morate pripraviti na dan uporabe.

5. OPREMA

5.1 Steklene ploščice (265 × 125 × 4 mm); valjček iz gume (širine 15 cm); nivelirna miza

5.2 Nosilna folija za gel (265 × 125 mm)

5.3 Pokrivna folija (280 × 125 mm). Na vsak dolgi rob zalepite trak lepilnega traku (280 × 6 × 0,25 mm) (glej sliko 1)

5.4 Elektrofokusirna komora s hladilno ploščo (npr. 265 × 125 mm) in ustrezen vir energije (≥ 2,5 kV) ali avtomatska elektroforezna naprava

5.5 Cirkulacijski kriostat, termostatsko nadzorovan na 12 ± 0,5 °C

5.6 Centrifuga, nastavljiva do 3 000 g

5.7 Elektrodni trakovi (≥ 265 mm dolgi)

5.8 Plastične kapalke za anodne in katodne raztopine

5.9 Trakovi za nanos vzorca (10 × 5 mm, iz viskoze ali nizkoadsorpcijski filtrirni papir)

5.10 Škarje iz nerjavečega jekla, skalpeli in pincete

5.11 Posode iz nerjavečega jekla ali steklene posode za obarvanje in razbarvanje (npr. pladnji za instrumente 280 × 150 mm)

5.12 Prilagodljiv palični homogenizator (premer osi 10 mm), v razponu od 8 000 do 20 000 vrtljajev/minuto

5.13 Magnetni mešalnik.

5.14 Ultrazvočna kopel

5.15 Varilnik folije

5.16 Mikropipete s prostornino 25 µl

5.17 Vakuumski koncentrator ali – zamrzovalni sušilnik

5.18 Termostatsko nadzorovana vodna kopel, prilagodljiva na 35 in 40 ± 1 °C, z mešalnikom

5.19 Denzitometer za odčitavanje pri λ = 634 nm

6. POSTOPEK

6.1 **Priprava vzorca**

6.1.1 *Izolacija kazeinov*

Stehtajte količino, enakovredno 5 g suhe mase sira ali referenčnih standardov v 100-mililitrski epruveti za centrifugiranje, dodajte 60 ml destilirane vode in homogenizirajte s paličnim homogenizatorjem (8 000 do 10 000 vrt./min). Nastavite na pH 4,6 z razredčeno ocetno kislino (4.5.1) in centrifugirajte (5 minut, 3 000 g). Odlijte maščobo in sirotko, homogenizirajte ostanek pri 20 000 vrt./min v 40 ml destilirane vode s pH 4,5, dobljenim z razredčeno ocetno kislino (4.5.1); dodajte 20 ml diklorometana (4.5.2), znova homogenizirajte in centrifugirajte (5 minut, 3 000 g). Z lopatico odstranite kazeinsko plast, ki leži med vodno in organsko fazo (glej sliko 2), in odlijte obe fazi. Znova homogenizirajte kazein v 40 ml destilirane vode (glej zgoraj) in 20 ml diklorometana (4.5.2) in centrifugirajte. Nadaljujte postopek (dva- do trikrat), dokler obe ekstrakcijski fazi ne postaneta brezbarvni. Homogenizirajte proteinski preostanek s 50 ml acetona (4.5.3) in filtrirajte prek srednje hitrega nagubanega filtrirnega papirja. Ostanek na filtru vsakič sperite z dvema ločenima 25-mililitrskima odmerkoma acetona in pustite, da se posuši na zraku ali v toku dušika, nato ga v terilnici zdrobite v fin prah.

Opomba: Izoliran suh kazein morate hraniti pri – 20 °C.

6.1.2 *Plazminsko cepljenje β-kazeinov za okrepitev γ-kazeinov*

Disperzirajte 25 mg izoliranih kazeinov (6.1.1) v 0,5 ml pufra amonijevega karbonata (4.7.1) in 20 minut homogenizirajte, npr. z uporabo ultrazvočnega postopka. Ogrejte na 40 °C in dodajte 10 µl plazmina (4.7.2), zmešajte in eno uro inkubirajte pri 40 °C z neprestanim tresenjem. Za inhibicijo encima dodajte 20 µl raztopine ε-aminokapronske kisline (4.7.3), nato dodajte 200 mg sečnine v trdi obliki in 2 ml ditiotreitola.

Opomba: Da bi dobili več simetrije v fokusiranih kazeinskih trakovih, je priporočljivo, da raztopino sušite z zmrzovanjem, potem ko ste dodali ε-aminokapronsko kislino, in nato raztopite preostanek v 0,5 ml pufra za raztapljanje proteinov (4.6).

6.2 **Priprava sečnine, ki vsebuje poliakrilamidne gele**

Z nekaj kapljicami vode povaljajte nosilno folijo za gel (5.2) po stekleni plošči (5.1), odstranite vso odvečno vodo s papirnato brisačo ali tkanino. Na enak način povaljajte pokrivno folijo (5.3) z distančniki (0,25 mm) po drugi stekleni plošči. Položite ploščo vodoravno na nivelirno mizo.

Dodajte 10 µl Temed-a (4.1.3.1) v pripravljeno in razplinjeno gelsko raztopino (4.1.2), pomešajte in dodajte 10 µl raztopine PER (4.1.3.2), dobro premešajte in takoj enakomerno nalijte na sredino pokrivne folije. En rob nosilne plošče gela (folija naj bo obrnjena navzdol) položite na pokrivno folijo in jo počasi spuščajte, tako da se med folijami naredi film gela in se enakomerno ter brez mehurčkov razširi (slika 3). Pazljivo do konca spustite nosilno ploščo gela s tanko lopatico in nanjo položite še tri steklene plošče, ki bodo namenjene za uteži. Potem ko je polimerizacija končana (po približno 60 minutah), premestite polimerizirani gel na nosilno folijo skupaj s pokrivno folijo, tako da rahlo udarite po steklenih ploščah. Skrbno očistite hrbtno stran nosilne folije ostankov gela in sečnine. Zavarite gelov sendvič v filmski tulec in shranite v hladilnik (največ 6 tednov).

Opomba: Pokrivna folija z distančniki se lahko uporabi znova. Poliakrilamidni gel se lahko razreže v manjše kose, kar je priporočljivo zlasti, kadar je vzorcev malo ali če uporabljate avtomatsko elektroforezno napravo (dva gela, velikost 4,5 × 5 cm).

6.3 **Izoelektrično fokusiranje**

Nastavite termostat za hlajenje na 12 °C. S kerozinom zbrišite hrbtno stran nosilne folije in kapnite nekaj kapljic kerozina (4.2) na sredo hladilnega bloka. Nato po njem povaljajte gelov sendvič, z nosilno stranjo navzdol, in pazite, da ne nastanejo mehurčki. Obrišite ves odvečni kerozin in odstranite pokrivno folijo. Prepojite elektrodna trakova z elektrodnima raztopinama (4.3, 4.4), odrežite ju v dolžini gela in postavite v pripravljene položaje (razdalja elektrod 9,5 cm).

Pogoji za izoelektrično fokusiranje:

6.3.1 *Velikost gela 265 × 125 × 0,25 mm*

Korak	Čas (min)	Napetost: (V)	Tok (mA)	Moč (W)	Volt ure (Vh)
1. Predhodno fokusiranje	30	največ 2 500	največ 15	konstan. 4	pribl. 300
2. Vzorčno fokusiranje (1)	60	največ 2 500	največ 15	konstan. 4	pribl. 1 000
3. Končno fokusiranje	60	največ 2 500	največ 5	največ 20	pribl. 3 000
	40	največ 2 500	največ 6	največ 20	pribl. 3 000
	30	največ 2 500	največ 7	največ 25	pribl. 3 000

(1) Nanašanje vzorca: po predhodnem fokusiranju (korak 1) s pipeto nakapajte 18 µl vzorca in standardne raztopine na trakove za nanos vzorca (10 × 5 mm), jih položite na gel v razmiku 1 mm drug od drugega in 5 mm podolžno od anode ter rahlo pritisnite. Fokusiranje opravite pod navedenimi pogoji, po 60-minutnem fokusiranju vzorca previdno odstranite trakove za nanos vzorca.

Opomba: Če sta debelina ali širina gela spremenjeni, se morata ustrezno prilagoditi vrednosti za tok in moč (npr. podvojite vrednosti za električni tok in moč, če se uporabi gel 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2 *Primer programa napetosti za avtomatsko elektroforezno napravo (2 gela 5,0 × 4,5 cm), elektrodi brez trakov, ki se neposredno naneseta na gel*

Korak	Napetost	Tok	Moč	Začasna	Volt ure
1. Predhodno fokusiranje	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Vzorčno fokusiranje	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusiranje	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusiranje	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

V koraku 2 postavite trak za nanos vzorca na 0 Vh.

V koraku 2 odstranite trak za nanos vzorca pri 30 Vh.

6.4 **Proteinsko obarvanje**

6.4.1 *Proteinsko fiksiranje*

Po izključitvi elektrike takoj odstranite elektrodna trakova in dajte gel v posodo za obarvanje/razbarvanje, napolnjeno z 200 ml fiksirja (4.9); pustite 15 minut in neprestano stresajte.

6.4.2 *Umivanje in obarvanje gelske plošče*

Temeljito odtočite fiksir in dvakrat vsakič po 30 sekund spirajte gelsko ploščo s 100 ml raztopine za razbarvanje (4.10). Odlijte raztopino za razbarvanje in dopolnite posodo z 250 ml raztopine za obarvanje (4.11.3); počakajte 45 minut in z rahlim tresenjem omogočite, da se obarva.

6.4.3 *Razbarvanje gelske plošče*

Odlijte raztopino za obarvanje, dvakrat sperite gelsko ploščo, pri čemer vsakič uporabite 100 ml raztopine za razbarvanje (4.10), nato 15 minut tresite z 200 ml raztopine za razbarvanje in najmanj dvakrat ali trikrat ponovite korak razbarvanja, dokler ozadje ne postane čisto in brezbarvno. Nato splaknite gelsko ploščo z destilirano vodo (2 × 2 minuti) in sušite na zraku (2 do 3 ure) ali s sušilnikom za lase (10–15 minut).

Opomba 1: Fiksiranje, pomivanje, obarvanje in razbarvanje opravite pri temperaturi 20 °C. Ne uporabljajte visokih temperatur.

Opomba 2: Če raje uporabljate bolj občutljivo obarvanje s srebrom (npr. oprema za obarvanje s srebrom, protein, Pharmacia Biotech, št. kode 17–1150–01), morate plazminsko obdelane kazeinske vzorce razredčiti do 5 mg/ml.

7. OVREDNOTENJE

Ovrednotenje se izvaja s primerjavo proteinskih vzorcev neznanega vzorca z referenčnimi standardi na istem gelu. Ugotavljanje kravjega mleka v sirih iz ovčjega, kozjega in bivoljega mleka in mešanic ovčjega, kozjega in bivoljega mleka se izvaja prek γ_3- in γ_2-kazeinov, katerih izoelektrične točke so v razponu med pH 6,5 in pH 7,5 (slike 4a, 4b, in 5). Meja zaznavnosti je manj kot 0,5 %.

7.1 **Vizualna ocena**

Za vizualno ocenitev količine kravjega mleka je priporočljivo, da se koncentracije vzorcev in standardov prilagodijo za pridobitev iste stopnje intenzitete ovčjih, kozjih in/ali bivoljih γ_2- in γ_3-kazeinov (glej „γ_2, E, G, B“ in „γ_3, E, G, B“ na slikah 4a, 4b in 5). Po tem se lahko neposredno presodi količina kravjega mleka (manj kot, enako ali več kot 1 %) v neznanem vzorcu s primerjavo intenzitete kravjih γ_3- in γ_2-kazeinov (glej „γ_3 C“ in „γ_2 C“ na slikah 4a, 4b in 5) s tistimi, ki imajo od 0 % in 1 % referenčnih standardov (ovca, koza) ali laboratorijskimi vmesnimi standardi (bivol).

7.2 **Denzitometrijska ocena**

Za določitev razmerja površin pod vrhovi za kravja, ovčja, kozja in/ali bivolja kazeina γ_2 in γ_3 (glej sliko 5) uporabite denzitometrijo (5.19), če je na voljo. Primerjajte to vrednost z razmerjem površin pod vrhovi γ_2- in γ_3-kazeinov 1-odstotnega referenčnega standarda (ovca, koza) ali laboratorijskega vmesnega standarda (bivol), analiziranega na istem gelu.

Opomba: Metoda deluje zadovoljivo, če se pokaže jasen pozitiven znak za goveja kazeina γ_2 in γ_3 v 1-odstotnem referenčnem standardu, vendar ne v 0-odstotnem referenčnem standardu. V nasprotnem primeru optimizirajte postopek tako, da natančno sledite podrobnostim metode.

Vzorec je ocenjen pozitivno, če sta oba goveja kazeina γ_2 in γ_3 ali ustrezajoče razmerje površin pod vrhovi enako ali večje, kot je stopnja 1-odstotnega referenčnega standarda.

8. VIRI

1. *Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I, Krause I., Di Luccia A. in 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, 1990, str. 708–711.*

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

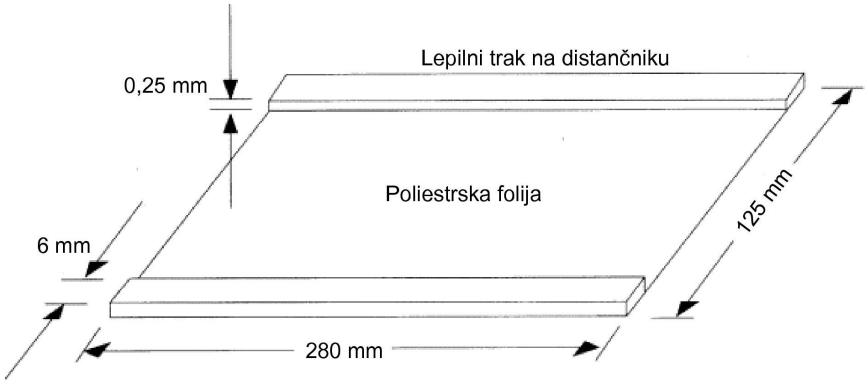
3. *Krause I., Berner I. in Klostermeyer H., „Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier", v: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ur.), Bode-Verlag,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

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

5. *Radola, B. J., „Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50–100 μm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films", Electrophoresis 1, 1980, str. 43–56.*

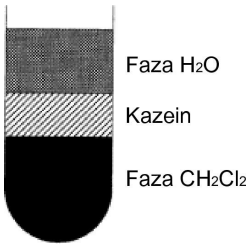
Slika 1

Shematska risba pokrivne folije



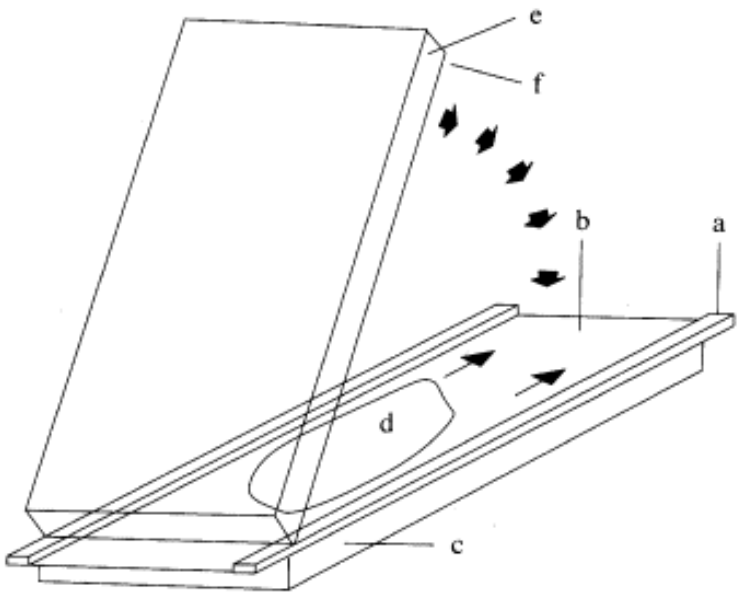
Slika 2

Kazeinska plast, ki po centrifugiranju plava med vodno in organsko fazo



Slika 3

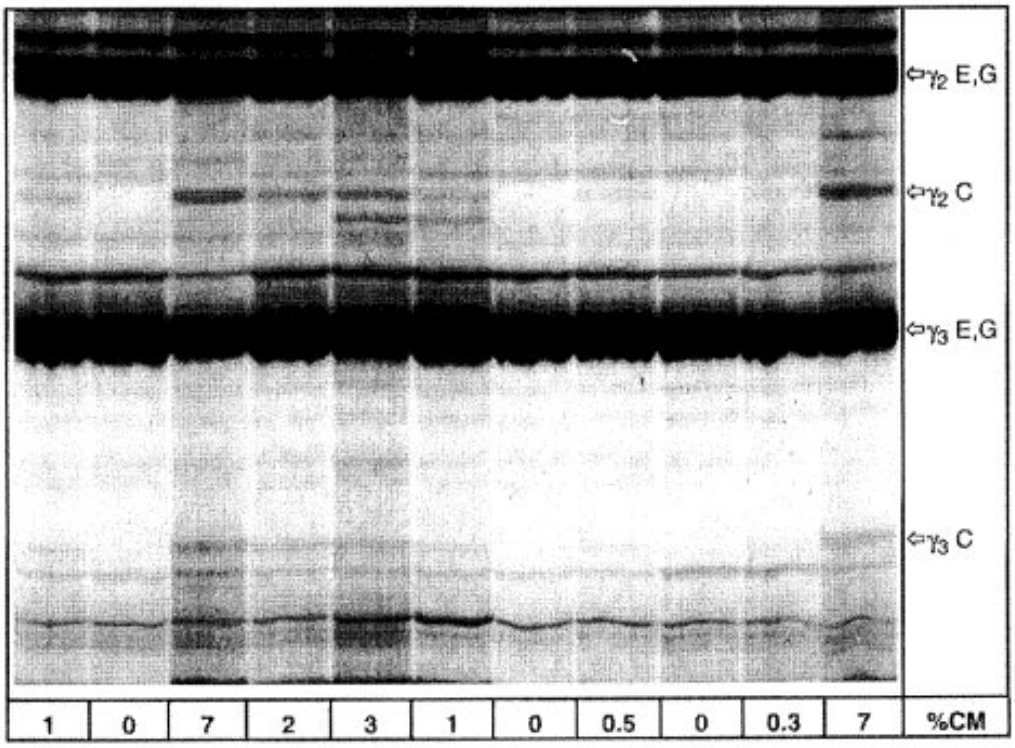
Poklopna tehnika za ulivanje zelo tankih poliakrilamidnih gelov



a = lepilni trak na distančniku (0,25 mm); b = pokrivna folija (5.3); c, e = stekleni plošči (5.1); d = gelska raztopina (4.1.2); f = nosilna folija gela

Slika 4a

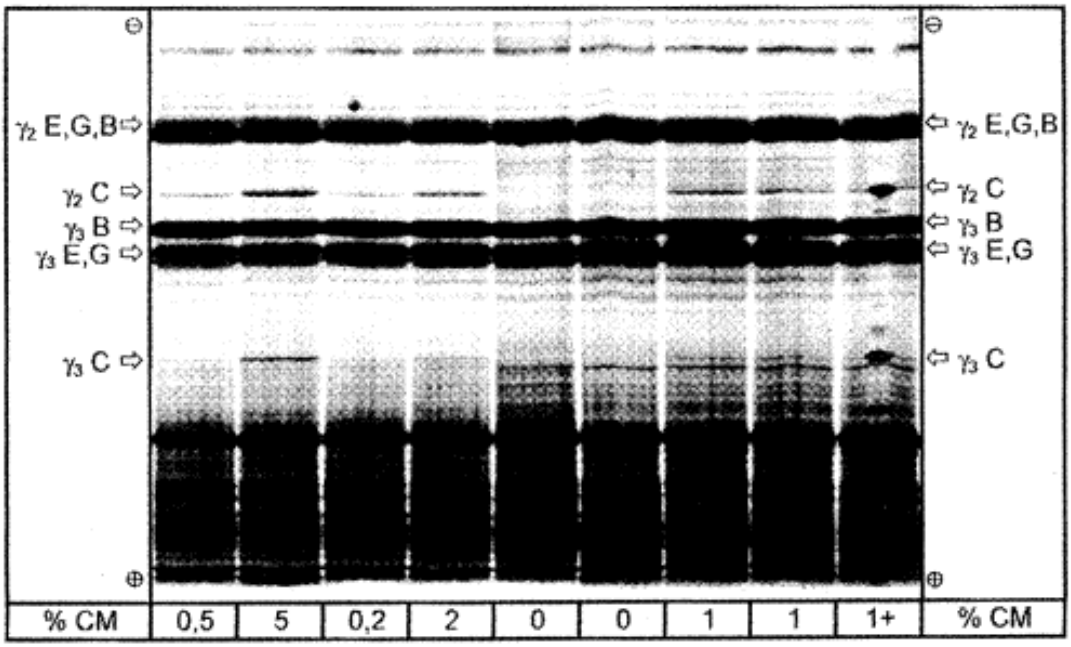
Izoelektrično fokusiranje plazminsko obdelanih kazeinov iz ovčjega in kozjega sira, ki vsebuje različne količine kravjega mleka



% CM = odstotek kravjega mleka, C = krava, E = ovca, G = koza
Prikazan je zgornji del gela izoelektričnega fokusiranja (IEF)

Slika 4b

Izoelektrično fokusiranje plazminsko obdelanih kazeinov iz sira, narejenega iz mešanic ovčjega, kozjega in bivoljega mleka z vsebnostjo različnih količin kravjega mleka

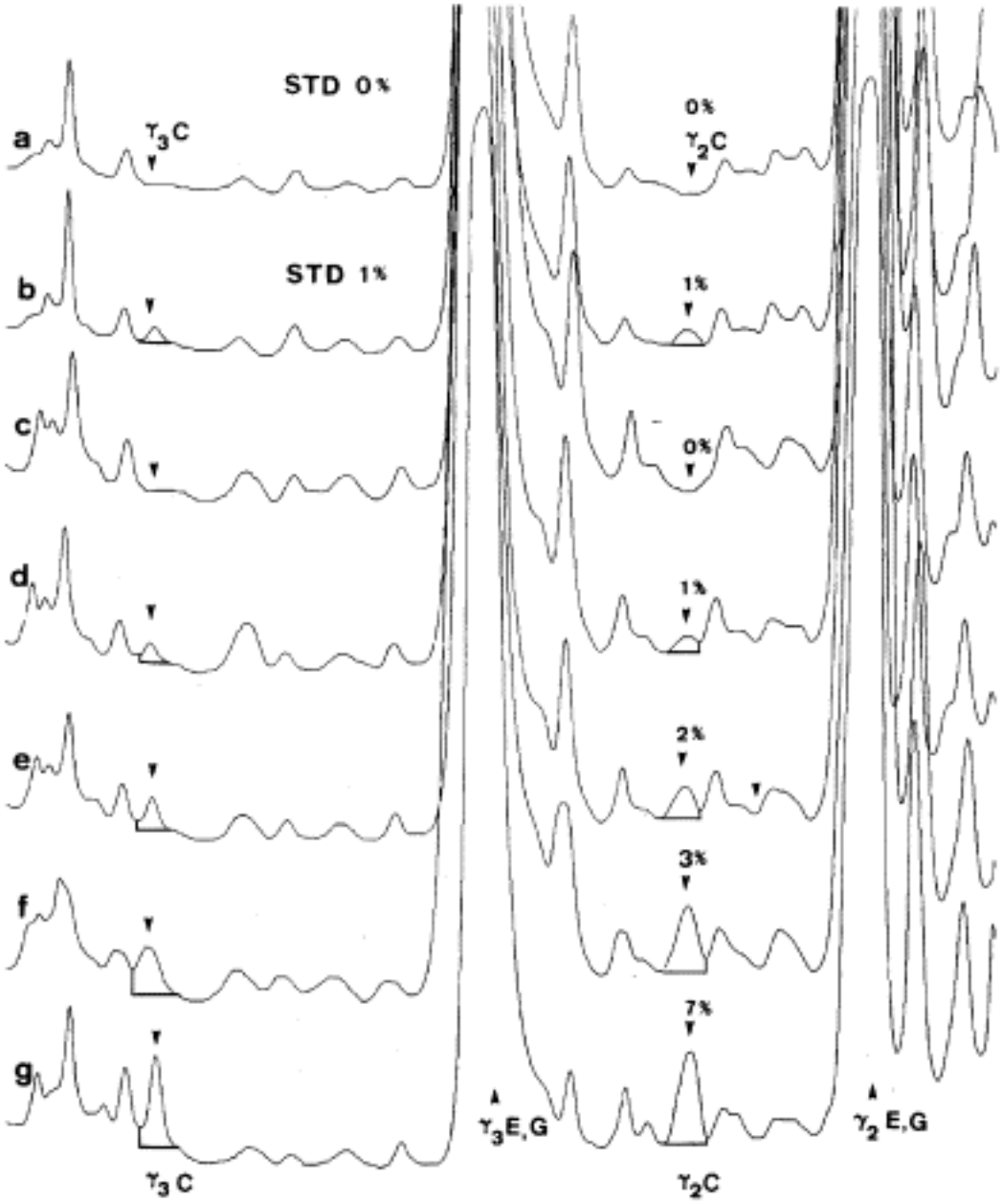


% CM = odstotek kravjega mleka; 1+ = vzorec vsebuje 1 % kravjega mleka, v sredini sledi pa ima dodano kapljico čistega govejega kazeina. C = krava, E = ovca, G = koza, B = bivol

Prikazana je skupna razdalja separacije za gel IEF.

Slika 5

Superpozicija denzitogramov standardnih vzorcev (SDT) in vzorcev sira, narejenega iz mešanice ovčjega, kozjega in bivoljega mleka po izometričnem fokusiranju



a, b = standardi, ki vsebujejo 0 % in 1 % kravjega mleka; c–g = vzorci sirov, ki vsebujejo 0, 1, 2, 3 in 7 % kravjega mleka. C = krava, E = ovca, G = koza. Zgornja polovica gela IEF je bila obdelana pri λ = 634 nm.

PRILOGA X

(Člen 7)

REFERENČNA METODA ZA UGOTAVLJANJE KOLIFORMNIH BAKTERIJ V MASLU, POSNETEM MLEKU V PRAHU, KAZEINU IN KAZEINATIH

1. PRIPRAVA VZORCEV

   Standard ISO 8261

2. POSTOPEK

   Standard ISO 4831

   Vzorci, ki ustrezajo 1 g masla ali 0,1 g posnetega mleka v prahu ali kazeina/kazeinatov, se vcepijo v gojišče.

   Vzorec se vcepi v tri epruvete.

3. REZULTATI

   Če tri epruvete pokažejo tri negativne rezultate, je rezultat „skladen“.

   Če tri epruvete pokažejo dva ali tri pozitivne rezultate, rezultat „ni skladen“.

   Če tri epruvete pokažejo dva negativna rezultata, se analiza ponovi dvakrat (z dvema epruvetama).

   — Če sta dva rezultata negativna, je rezultat „skladen“.

   — Če je najmanj en rezultat pozitiven, rezultat „ni skladen“.

PRILOGA XI

(Člen 8)

DOLOČANJE LAKTOZE V KRMNIH MEŠANICAH

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Določanje laktoze v krmnih mešanicah.

2. SKLIC

Vsebnost laktoze je opredeljena kot masni odstotek, ki se določi z opisanim postopkom.

3. OPREDELITEV

Vsebnost anhidridne laktoze se izrazi v gramih na 100 g.

4. POSTOPEK

Krmni mešanici se doda voda. V razredčen stehtan alikvot se doda „Biggsova" raztopina, da se izločijo maščoba in frakcije beljakovinskih delcev krmne mešanice. V mobilni fazi se vzorec filtrira (ali centrifugira), filtrat (ali supernatant) pa se vbrizga v kolono HPLC za izmenjavo kationov svinca, pri čemer se uporabi voda, primerna za HPLC. Eluirano laktozo zazna diferencialni refraktometer ([i]).

5. REAGENTI

5.1 **Splošno**

Če ni drugače določeno, uporabljajte le reagente priznane analitske čistosti ter vodo, primerno za HPLC, brez plinov.

5.2 **Laktoza**

D-laktoza monohidrat ($(C_{12}H_{22})O_{11}.H_2O$) lahko absorbira dodatno vlago. Pred uporabo izmerite dejansko količino vode po metodi Karl-Fisher ali odstranite dodatno vlago tako, da laktozo za 8 ur postavite v sušilnik na 105 °C (laktoza s tem postopkom ne izgubi kristalne vode).

5.3 **Koncentrirana Biggs/Szijartova raztopina** ([ii])

Raztopite 9,10 g cinkovega acetata dihidrata ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) in 5,46 g fosfovolframove kisline monohidrat ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) v približno 70 ml vode, primerne za HPLC (6.8), v 100-mililitrski merilni bučki.

Dodajte 5,81 ml ledocetne kisline (CH_3COOH). Do oznake 100 ml razredčite z vodo, primerno za HPLC (6.8), ter zmešajte. Raztopina se lahko hrani pri sobni temperaturi eno leto.

5.4 **Razredčena Biggs/Szijartova raztopina**

V merilni bučki z vodo razredčite 25 ml koncentrirane Biggs/Szijartove raztopine (5.3) na 500 ml. Raztopina se lahko hrani pri sobni temperaturi en mesec.

5.5 **Priprava vode, primerne za HPLC**

Ultra čisto vodo (6.8) filtrirajte z uporabo vakuumskega sistema (6.9). Za izboljšanje delovanja črpalke in doseganje stabilnega izhodišča vsak dan razplinite mobilno fazo s tehniko, ki je dostopna, kot je pršenje s helijem, sonikacija, sistem vakuumskega ali neposrednega razplinjevanja.

Opomba: Da je kolona uporabna dlje časa, je bistveno, da je vsebnost ogljikovega dioksida v eluentu čim nižja ter da se prepreči ponoven vnos.

6. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednja oprema:

6.1 **Kolona HPLC z ionsko izmenjevalno smolo**

Polnjenje kolone: 8 % navzkrižno vezanega polistiren-divinilbenzenskega kopolimera, na katerega so vezane skupine za izmenjavo kationov svinca.

Mere kolone: dolžina 300 mm, notranji premer pribl. 8 mm.

Mogoče je uporabiti drugačen premer, ob upoštevanju ustrezno prilagojenega razmerja pretoka.

6.2 **Varovalna kolona**

Varovalna kolona je kombinacija ločenih izmenjevalnikov kationov (H^+) in anionov (CO_3–), ki so polnjeni v koloni pribl. 30 mm x 4,6 mm (L x ID) (*tj.* mikrovarovalne kolone v mikrovarovalnem nosilcu) ter povezani v nizu ali obliki mešane naprave, sestavljene iz AG 50W–X4, – 400 mesh (H^+) in AG3-X4A, 200–400 mesh (OH–) v razmerju 35:65 (m/m), ročno polnjeni v koloni pribl. 20 x 9 mm (L x ID).

6.3 **Grelnik kolone**

Grelnik lahko ohranja temperaturo na 85 °C ± 1 °C.

6.4 **HPLC-črpalka**

Črpalka lahko ohranja stalni pretok (< 0,5 % nihanja) pri 0,2–1,0 m/min.

6.5 **HPLC-vbrizgalna naprava**

Avtomatski vzorčevalnik z zmožnostjo vbrizgavanja 25 µL s ponovljivostjo < 0,5 %.

Kot druga možnost se lahko uporablja ročna naprava (enake zahteve kot za avtomatski vzorčevalnik).

6.6 **HPLC-detektor**

Visoko občutljiv detektor za refrakcijski indeks, občutljiv do < 5.10^{-9} RI enot.

6.7 **Integrator**

Programska oprema ali integrator za pridobivanje in obdelavo podatkov ter prikazovanje površin in višin vrhov, ki se lahko pretvorijo v koncentracije laktoze.

6.8 **Enota za čiščenje vode**

Sistem, ki lahko zagotovi ultra čisto vodo (tip 1) z odpornostjo > 14 MΩ.cm.

6.9 **Enota za filtriranje topil**

Sistem, ki omogoča filtracijo vode z uporabo membranskih filtrov z velikostjo por 0,45 µm.

Opomba: Mnoge enote za čiščenje vode (6.8) imajo vgrajene filtre z velikostjo por 0,45 ali 0,2 µm. Dodatnemu filtriranju se lahko izognemo, če se voda neposredno uporabi.

6.10 **Analitska tehtnica**

Tehtnica z odčitavanjem 0,1 mg.

6.11 **Vodna kopel**

Vodna kopel, ki lahko temperaturo ohranja na 40 °C (± 0,5).

6.12 **Centrifuga**

Centrifuga lahko razvije silo najmanj 3 000 g z Eppendorfovimi stekleničkami, njihovim ekvivalentom ali večjimi stekleničkami.

6.13 **50-mililitrske merilne bučke**

Prostornina 50 ml, razred A.

Opomba: Bučke z drugačno prostornino se lahko uporabijo ob upoštevanju volumskega dejavnika.

6.14 **100-mililitrske merilne bučke**

Prostornina 100 ml, razred A.

6.15 **Graduirana pipeta**

Graduirana pipeta za 10 ml.

Opomba: Kot druga možnost se lahko uporabi ročna pipeta s prostornino 5 ml, tako da dvakrat dodamo 5 ml reagenta (5.3).

7. VZORČENJE

Laboratorij mora prejeti vzorec v skladu s standardi ISO 707/IDF 50 [iii], ki je resnično reprezentativen in ni bil poškodovan med prevozom ali skladiščenjem.

8. PRIPRAVA STANDARDNE RAZTOPINE LAKTOZE

8.1 **Standard 1**

Raztopite natančno odtehtano količino (odčitavanje pri 0,1 mg) pribl. 50 mg monohidrata laktoze (5.2) v 100-mililitrski merilni bučki (6.14) in jo dopolnite z vodo do oznake.

8.2 **Standard 2**

Raztopite natančno odtehtano količino (odčitavanje pri 0,1 mg) pribl. 100 mg monohidrata laktoze (5.2) v 100-mililitrski merilni bučki (6.14) in jo dopolnite z vodo do oznake.

Opomba: Standardna raztopina se lahko hrani največ en teden pri pribl. 5 °C.

9. PRIPRAVA PRESKUSNEGA VZORCA

9.1 **Rekonstitucija vzorca**

Odtehtajte pribl. 5 g prahu v 50-mililitrsko merilno bučko (6.13) in označite težo z natančnostjo 1 mg (W_1, (11)). Dodajte 50 ml vode in označite povečano težo (W_2 (11)) z 0,01–gramsko natančnostjo. Zaprto bučko postavite v vodno kopel (‎6.11) za 30 minut in jo medtem nekajkrat obrnite. Počakajte, da se ohladi na sobno temperaturo.

9.2 **Obdelava vzorca**

Vzemite pribl. 1 g raztopine in jo dajte v 50-mililitrsko merilno bučko (6.13), označite težo z natančnostjo 1 mg (W_3 (11)), dodajte 20 ml vode, nato dodajte 10 ml raztopljenega Biggs/Szijartovega reagenta (5.4) in dopolnite z vodo do oznake. V prvih 30 minutah petkrat nežno obrnite bučko.

Po eni uri vzemite alikvotni delež in ga centrifugirajte (6.12) na 3 000 g za 10 minut (ob ustreznem krajšem času se lahko uporabi več g). Uporabite alikvotni delež supernatanta za HPLC-analizo.

10. HPLC-DETEKTOR

10.1 **Predhodna priprava HPLC**

10.1.1 *Postavitev kolone in predkolone*

Predkolono (6.2) postavite zunaj grelnika kolone (6.3), medtem ko kolono (6.1) postavite v grelnik.

Opomba: Če grelnik ne vsebuje cevke za ogrevanje eluenta, mora eluent nujno teči skozi približno 15-centimetrsko cevko iz nerjavečega jekla v grelniku, preden pride v kolono (eluent mora biti nujno ogret, preden pride v kolono, v nasprotnem primeru se pojavilo širjenje vrhov).

10.1.2 *Detektor in začetni tok*

Da bi dobili stabilno izhodišče, morate detektor (6.6) vključiti najmanj 24 ur pred začetkom analize. Notranjo temperaturo detektorja nastavite na 35 °C. Pretok nastavite na 0,2 ml/min (6.4) za najmanj 20 minut, medtem ko je grelnik kolone (6.3) nastavljen na sobno temperaturo.

10.1.3 *Grelnik kolone in končni pretok*

Grelnik kolone nastavite na (6.3) 85 °C. Ko je ta temperatura dosežena, po 30 minutah postopno povečajte pretok z 0,2 ml/min na 0,6 ml/min (6.4). S tem pretokom naj sistem deluje 2 uri na 85 °C ali dokler se ne doseže stabilno izhodišče.

10.1.4 *Integracija*

Previdno izberite parametre za pridobivanje in integracijo (6.7) kot so podatkovna stopnja, občutljivost, časovna konstanta, širina vrhov in pragov.

Retenzijski čas laktoze je pribl. 11 min.

Opomba: Veliko programske opreme za pridobivanje podatkov (6.7) omogoča enostavno merjenje teoretičnega števila mikroorganizmov. Redno je treba meriti teoretično število mikroorganizmov pri standardu 1 (8.1) in zamenjati kolono (6.1), ko je število mikroorganizmov za 25 % nižje od začetne vrednosti nove kolone.

10.1.5 *Preskus varovalne kolone*

Redno je treba preveriti (vsaj enkrat na vsako zaporedje) sposobnost varovalne kolone (6.2), da odpravlja soli iz vzorca, z vbrizgavanjem 25 µl 0,05-odstotne raztopine natrijevega klorida. Ko se pojavijo vrhovi, je treba varovalno kolono zamenjati.

10.2 **Standardi delovanja**

Na začetku vsake vrste analiz je treba vbrizgati 25 µl (6.5) standarda 1 (8.1) in nato standarda 2 (8.2). Postopek je treba ponoviti na vsakih 10 do 20 vzorcev in na koncu zaporedja.

10.3 **Obravnavani vzorci**

Vbrizgajte 25 µl supernatanta (9.2) vzorca.

11. IZRAČUN IN NAVAJANJE REZULTATOV

11.1 **Kalibracija**

Običajno se višine vrhov uporabljajo za izračun rezultatov, vendar če signal vsebuje preveč motenj, uporabimo površino vrhov (na določanje količine z višinami vrhov manj vplivajo vrhovi komponent v manjših koncentracijah in tistih, ki so delno, vendar ne zadostno ločene od vrhov laktoze).

Programska oprema (6.7) mora izračunavati linearno kalibracijsko krivuljo od izhodišča. Preverite morebitno nelinearnost krivulje (nelinearnost je verjetno posledica napake pri pripravi standarda 1 (8.1) ali 2 (8.2), slabe vezave in slabo delujočega injektorja, kar je manj verjetno).

Kot dovedeno količino uporabite izračunano koncentracijo laktoze v mg/ml standardov 1 (8.1) in 2 (8.2) kot brezvodno laktozo.

Strmina (RF) kalibracijske krivulje je določena s površino/koncentracijo v mg/ml.

11.2 **Vzorci**

Rezultat analize je izražen kot g/100 g in izračunan z uporabo programske opreme (6.7) ali po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

C: koncentracija laktoze v g/100 g prahu

H: višina vrhov vzorca laktoze

RF: faktor odziva (ali nagib) kalibracijskega grafa v mV/mg/ml

W_1: vzorčna masa vzorca prahu v g (9.1)

W_2: masa dodane vode vzorcu prahu v g (9.1)

W_3: vzorčna masa rekonstituirane raztopine prahu v g (9.2)

50: prostornina merilne bučke, uporabljene v (9.2)

0,1: preračunavanje rezultata v g/100 g

12. NATANČNOST

Vrednosti, ki izhajajo iz tega medlaboratorijskega preskusa, mogoče ne bodo ustrezale razponom koncentracij in matricam, ki se od danih razlikujejo. Vrednosti za ponovljivost in obnovljivost bodo izhajale iz rezultata medlaboratorijskega preskusa v skladu z ISO 5725 [iv].

12.1 **Ponovljivost**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po isti metodi na enakem preskusnem materialu v istem laboratoriju pri istem izvajalcu, ki je uporabljal enako opremo, v kratkem časovnem obdobju, bo le v največ 5 % primerov večja od xxx (vrednost bo določena z medlaboratorijskim preskušanjem) [v].

12.2 **Obnovljivost**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v različnih laboratorijih pri različnih izvajalcih, ki so uporabljali različno opremo, bo le v največ 5 % primerov večja od 0,5 g/100 g (vrednost bo določena z medlaboratorijskim preskušanjem).

13. VIRI

[i] J. Koops in C. Olieman, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 39, 1985, 89–106.

[ii] D.A. Biggs in L. Szijarto, *Journal of Dairy Science*, 46, 1963, 1196.

[iii] ISO 707 (IDF 50), Mleko in mlečni proizvodi – metode vzorčenja.

[iv] ISO 5725–1, Točnost (pravilnost in natančnost) merilnih metod in rezultatov. Del 1: Splošna načela in definicije.

[v] ISO 5725–2, Točnost (pravilnost in natančnost) merilnih metod in rezultatov. Del 2: Osnovna metoda za določitev ponovljivosti in obnovljivosti standardne merilne metode.

PRILOGA XII

(Člen 9)

UGOTAVLJANJE SIRIŠČNE SIROTKE V POSNETEM MLEKU V PRAHU ZA JAVNO SKLADIŠČENJE Z DOLOČITVIJO MAKROPEPTIDOV KAZEINA S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE ZMOGLJIVOSTI (HPLC)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda omogoča zaznavanje siriščne sirotke v posnetem mleku v prahu, ki je namenjeno javnemu skladiščenju z ugotavljanjem makropeptidov kazeina.

2. SKLIC

Mednarodni standard ISO 707 – mleko in mlečni proizvodi – metode vzorčenja, v skladu z navodili iz zadnjega odstavka Priloge I(2)(c).

3. OPREDELITEV

Vsebnost trdnih snovi siriščne sirotke je opredeljena kot masni odstotek, ki se določi z vsebnostjo makropeptidov kazeina v skladu z opisanim postopkom.

4. POSTOPEK

— Rekonstitucija posnetega mleka v prahu, odstranitev maščob in beljakovin s trikloroocetno kislino, ki ji sledi centrifugacija ali filtracija.

— Določitev količine makropeptidov kazeina (CMP) v supernatantu se izvede s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

— Ovrednotenje rezultatov, dobljenih za vzorce, glede na standardne vzorce posnetega mleka v prahu z dodatkom znanega odstotka sirotke v prahu ali brez njega.

5. REAGENTI

Uporabljeni reagenti morajo biti priznane analitske kakovosti. Uporabljena voda mora biti destilirana voda ali voda vsaj enakovredne čistosti.

5.1 **Raztopina trikloroocetne kisline**

Raztopite 240 g trikloroocetne kisline (CCl_3COOH) v vodi in dopolnite do prostornine 1 000 ml. Raztopina mora biti bistra in brezbarvna.

5.2 **Raztopina eluenta, pH 6,0**

Raztopite 1,74 g dikalijevega hidrogenfosfata (K_2HPO_4), 12,37 g monokalijevega fosfata (KH_2PO_4) in 21,41 g natrijevega sulfata (Na_2SO_4) v približno 700 ml vode. Če je potrebno, uravnajte pH na vrednost 6,0 z uporabo raztopin fosforjeve kisline ali kalijevega hidroksida.

Dopolnite z vodo do 1 000 ml in homogenizirajte.

Opomba: Sestava eluenta se lahko posodobi tako, da ustreza spričevalu v skladu s standardi ali priporočili proizvajalca materiala za polnitev kolone.

Raztopino topila pred uporabo filtrirajte skozi membranski filter, ki ima premer por 0,45 μm.

5.3 **Raztopina za izpiranje**

Zmešajte eno volumsko enoto acetonitrila (CH_3CN) z devetimi volumskimi enotami vode. Pred uporabo filtrirajte zmes z membranskimi filtrom s premerom por 0,45 μm.

Opomba: Uporabi se lahko katera koli druga raztopina za izpiranje z baktericidnim učinkom, ki ne poslabša ločljivosti kolone.

5.4 **Standardni vzorci**

5.4.1 *Posneto mleko v prahu, ki ustreza zahtevam te resolucije (npr. [0])*

5.4.2 *Enako posneto mleko v prahu z dodanimi 5 % (m/m) prahu siriščne sirotke v prahu standardne sestave (npr. [5])*

6. OPREMA

6.1 Analitska tehtnica

6.2 Neobvezna centrifuga, ki lahko razvije centrifugalno silo 2 200 g, s centrifugalnimi epruvetami z zamaški ali pokrovčki s prostornino 50 ml

6.3 Mehanski stresalnik

6.4 Magnetni mešalnik

6.5 Stekleni lijaki s premerom približno 7 cm

6.6 Filtrirni papir, srednje porozen, s premerom približno 12,5 cm

6.7 Oprema za filtriranje iz stekla s premerom por membranskega filtra 0,45 μm

6.8 Graduirana pipeta, ki prepušča 10 ml (ISO 648, razred A, ali ISO/R 835) ali razdelilni sistem, ki lahko prepušča 10,0 ml v dveh minutah

6.9 Razdelilni sistem, ki lahko prepušča 20,0 ml vode pri pribl. 50 °C

6.10 Termostatska vodna kopel, nastavljena na 25 ± 0,5 °C

6.11 HPLC-oprema, ki jo sestavljajo:

6.11.1 Črpalka

6.11.2 Injektor, ročni ali avtomatski, s prostornino 15 do 30 μl

6.11.3 Dve serijski koloni TSK 2 000-SW (dolžina 30 cm, notranji premer 0,75 cm) ali istovrstni koloni (tj. enojna TSK 2 000-SWxl, enojna Agilent Technologies Zorbax GF 250) in predkolona (3 cm × 0,3 cm), polnjena z I 125 ali enako učinkovitim materialom

6.11.4 Termostatski grelnik kolone, nastavljen na 35 ± 1 °C

6.11.5 UV-detektor z nastavljivo valovno dolžino, ki omogoča meritve pri 205 nm z občutljivostjo 0,008 A

6.11.6 Integrator, ki lahko poveže doline

Opomba: Mogoče je delo s kolonami pri sobni temperaturi, vendar je njihova moč resolucije nekoliko manjša. V tem primeru mora biti obseg temperature manjši od ± 5 °C v kateri koli stopnji analize.

7. VZORČENJE

7.1 Vzorci morajo biti vzeti v skladu z mednarodnim standardom ISO 707. Vendar lahko države članice uporabijo drugo metodo vzorčenja, če je skladna z navedenim standardom.

7.2 Vzorec hranite pri pogojih, ki izključujejo kakršno koli kvarjenje ali spremembo sestave.

8. POSTOPEK

8.1 **Priprava preskusnega vzorca**

Prenesite mlečni prah v posodo s približno dvakrat večjo prostornino, kakor je prostornina prahu, ki ima nepredušen pokrov. Posodo takoj zaprite. Zmešajte mlečni prah s ponavljajočim obračanjem posode.

8.2 **Preizkusni delež**

Odtehtajte 2,000 ± 0,001 g preskusnega vzorca v epruveto za centrifugiranje (6.2) ali ustrezno zaprto bučko (50 ml).

8.3 **Odstranitev maščobe in beljakovin**

8.3.1 Odtehtanemu vzorcu dodajte 20,0 ml tople vode (50 °C). Raztopite prah s petminutnim stresanjem na mehanskem stresalniku (6.3). Postavite epruveto v vodno kopel (6.10) in pustite, da se temperatura uravna na 25 °C.

8.3.2 V dveh minutah dodajte 10,0 ml raztopine trikloroocetne kisline (5.1) s temperaturo približno 25 °C in pri tem intenzivno mešajte z magnetnim mešalnikom (6.4). Postavite epruveto v vodno kopel (6.10) in pustite 60 minut.

8.3.3 Centrifugirajte (6.2) 10 minut pri 2 200 g, ali filtrirajte skozi filter (6.6) in zavrzite prvih 5 ml filtrata.

8.4 **Kromatografsko določanje**

8.4.1 Vbrizgajte 15 do 30 µl natančno odmerjenega supernatanta ali filtrata (8.3.3) v HPLC-opremo (6.11), ki deluje s pretokom 1,0 ml raztopine eluenta (5.2) na minuto.

Opomba 1: Uporabiti je mogoče tudi drugačen pretok, odvisno od notranjega premera kolon, ki so uporabljene, ali navodil proizvajalca kolon.

Opomba 2: Raztopina eluenta (5.2) naj ima med kromatografsko analizo 85 °C, kar omogoča vzdrževanje razplinjenja eluenta in preprečuje rast bakterij. Uporabi se lahko katerikoli ukrep z istim učinkom.

Opomba 3: Med vsako prekinitvijo sperite kolone z vodo. Nikoli ne pustite v njih raztopine eluenta (5.2).

Pred kakršno koli prekinitvijo, ki traja več kot 24 ur, spirajte kolone z vodo in nato z raztopino (5.3) pri pretoku 0,2 ml na minuto najmanj tri ure.

8.4.2 Rezultati kromatografske analize preskusnega vzorca [E] so dobljeni v obliki kromatogramov, pri katerih je vsak vrh opredeljen z retenzijskim časom RT, kakor sledi:

Vrh II:	Drugi vrh kromatograma z retenzijskim časom približno 12,5 minute.
Vrh III:	Tretji vrh kromatograma, ki ustreza CMP z retenzijskim časom približno 15,5 minute.

Izbira kolone ali kolon lahko bistveno vpliva na retenzijski čas posameznih vrhov.

Integrator (6.11.6) samodejno izračuna površino A vsakega vrha:

A_{II}:	površina vrha II,
A_{III}:	površina vrha III,

Pred kvantitativno interpretacijo je treba pregledati videz vsakega kromatograma, da bi tako lahko izsledili kakršne koli nepravilnosti kot posledice slabega delovanja bodisi kromatografa ali kolon ali pa kot posledico izvora in narave analiziranega vzorca.

V primeru dvoma analizo ponovite.

8.5 **Kalibracija**

8.5.1 Za standardne vzorce (5.4) uporabite postopek, opisan od točke 8.2 do točke 8.4.2.

Uporabite sveže pripravljene raztopine, ker se CMP razgradi v 8-odstotnem trikloroocetnem okolju. Izguba je ocenjena na 0,2 % na uro pri 30 °C.

8.5.2 Pred kromatografskim določanjem vzorcev pripravite kolone s ponavljajočim vbrizgavanjem standardnega vzorca (5.4.2) v raztopino (8.5.1), dokler nista površina in retenzijski čas vrha, ki ustreza CMP, stalna.

8.5.3 Z vbrizganjem enake prostornine filtrata (8.5.1), kakor je uporabljen pri vzorcih, določite odzivni faktor R.

9. IZRAŽANJE REZULTATOV

9.1 **Metoda za izračun in enačbe**

9.1.1 *Izračun odzivnih faktorjev R:*

Vrh II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

kjer je:

R_{II} = odzivni faktorji vrhov II,

A_{II} [0] = površine vrhov II standardnega vzorca [0], pridobljene v 8.5.3.

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

kjer je:

R_{III} = odzivni faktor vrha III,

A_{III} [0] in A_{III} [5] = površine vrha III standardnega vzorca [0] in [5], pridobljene v 8.5.3,

W = količina sirotke v standardnem vzorcu [5], tj. 5.

9.1.2 *Izračun relativnih površin vrhov vzorca [E]*

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

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

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

kjer je:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = relativne površine vrhov II, III in IV v vzorcu [E],

A_{II} [E], A_{III} [E] = relativne površine vrhov II in III v vzorcu [E], pridobljene v 8.4.2,

R_{II}, R_{III} = odzivni faktorji, izračunani v 9.1.1.

9.1.3 *Izračun relativnega retenzijskega časa vrha III v vzorcu [E]:* $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$

kjer je:

RRT_{III} [E] = relativni retenzijski čas vrha III v vzorcu [E],

RT_{III} [E] = retenzijski čas vrha III v vzorcu [E], pridobljen v 8.4.2,

RT_{III} [5] = retenzijski čas vrha III v kontrolnem vzorcu [5], pridobljen v 8.5.3,

9.1.4 Preskusi so pokazali, da obstaja linearna povezava med relativnim retenzijskim časom vrha III, npr. RRT_{III} [E] in odstotkom dodane sirotke v prahu do 10 %

— RRT_{III} [E] je < 1,000, ko je vsebnost sirotke > 5 %,

— RRT_{III} [E] je ≥ 1,000, ko je vsebnost sirotke ≤ 5 %.

Dovoljena negotovost za vrednosti RRT_{III} je ± 0,002.

Običajno se vrednost RRT_{III} [0] giblje malo okoli 1,034. Odvisno od stanja kolon se vrednost lahko približa 1,000, ampak mora biti vedno večja od 1,000.

9.2 Izračun vsebnosti siriščne sirotke v prahu v vzorcu:

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

kjer je:

W	=	odstotek m/m siriščne sirotke v vzorcu [E];
S_{III} [E]	=	relativna površina vrha III preskusnega vzorca [E] pridobljena v 9.1.2;
1,3	=	predstavlja relativno povprečno površino vrha III, izraženo v gramih siriščne sirotke na 100 g določene v posnetem mleku v prahu brez primesi različnega izvora. Ta podatek je bil pridobljen eksperimentalno;
S_{III} [0]	=	predstavlja relativno površino vrha III, ki je enaka $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Te vrednosti so pridobljene v 9.1.1 in 8.5.3;
(S_{III} [0] – 0,9)	=	predstavlja popravek za relativno povprečno površino 1,3, ko S_{III} [0] ni enako 0,9. Eksperimentalno je relativna povprečna površina vrha III kontrolnega vzorca [0] 0,9.

9.3 **Zanesljivost postopka**

9.3.1 *Ponovljivost*

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju izvede simultano ali po kratkem času isti analitik z isto opremo in na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 0,2 % m/m.

9.3.2 *Obnovljivost*

Razlika med dvema posamičnima in neodvisnima rezultatoma, dobljenima v dveh različnih laboratorijih na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 0,4 % m/m.

9.4 **Interpretacija**

9.4.1 Če je relativna površina vrha III, S_{III} [E], izražena v gramih siriščne sirotke na 100 g proizvoda ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), je treba zanikati obstoj sirotke, kjer je

2,0	=	največja dovoljena vrednost relativne površine vrha III ob upoštevanju relativne površine vrha III, npr. 1,3, negotovost zaradi sprememb v sestavi posnetega mleka v prahu in obnovljivost metode (9.3.2),
(S_{III} [0] – 0,9)	=	popravek, ki ga je treba upoštevati, ko se površina S_{III} [0] razlikuje od 0,9 (glej točko 9.2)

9.4.2 Če je relativna površina vrha III, S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) in relativna površina vrha II, S_{II} [E] ≤ 160, določite vsebnost siriščne sirotke, kot je navedeno v točki 9.2.

9.4.3 Če je relativna površina vrha III, S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) in relativna površina vrha II, S_{II} [E] ≤ 160, določite vsebnost skupnih beljakovin (P %); nato preučite diagrama 1 in 2.

9.4.3.1 Podatki, dobljeni po analizi nepotvorjenih vzorcev posnetega mleka v prahu z visoko vsebnostjo skupnih beljakovin, so zbrani v grafih 1 in 2.

Neprekinjena črta predstavlja linearno regresijo, katere koeficienti so izračunani z metodo najmanjših kvadratov.

Prekinjena ravna črta označuje zgornjo mejo relativne površine vrha III z verjetnostjo, da v 90 % primerov ni presežena.

Enačbi prekinjenih ravnih črt v grafih 1 in 2 sta:

$S_{III} = 0{,}376\ P\ \% - 10{,}7$	(graf 1),
$S_{III} = 0{,}0123\ S_{II}$ [E] + 0,93	(graf 2),

kjer je:

S_{III} = relativna površina vrha III izračunana bodisi v skladu z vsebnostjo skupnih beljakovin bodisi v skladu z relativno površino vrha S_{II} [E],

P % = vsebnost skupnih beljakovin, izražena v masnih odstotkih,

(S_{II} [E] = relativna površina vzorca, izračunana v točki 9.1.2.

Te enačbe so enakovredne vrednosti 1,3, navedeni v točki 9.2.

Odstopanje (T_1 in T_2) med relativno površino S_{III} [E] in relativno površino S_{III} je prikazano z naslednjimi vrednostmi: $T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)] T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$

9.4.3.2.

Če je T_1 in/ali T_2 nič ali manj, prisotnosti siriščne sirotke ni mogoče določiti.

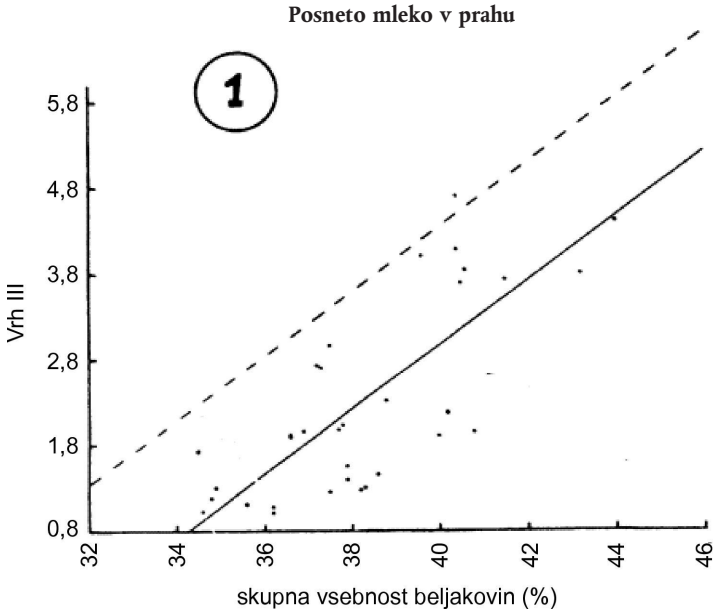
Če sta T_1 in T_2 večji kot nič, je siriščna sirotka prisotna.

Vsebnost siriščne sirotke se izračuna v skladu z naslednjo enačbo: $W = T_2 + 0{,}91$

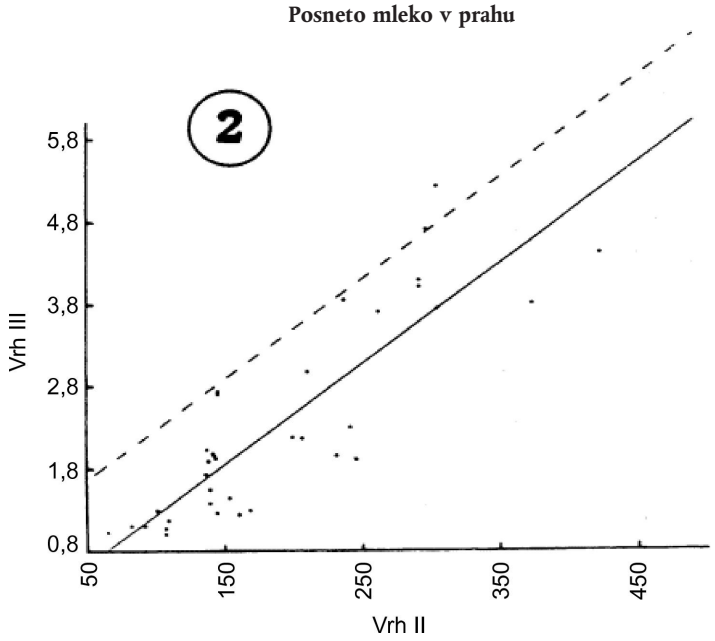
kjer je:

0,91 razdalja navpičnih osi med neprekinjenimi in pikčastimi ravnimi črtami.

Posneto mleko v prahu



Posneto mleko v prahu



PRILOGA XIII

(Člen 9)

DOLOČANJE SUHIH SNOVI SIRIŠČNE SIROTKE V POSNETEM MLEKU V PRAHU IN MEŠANIC IZ UREDBE (ES) ŠT. 2799/1999

1. NAMEN: UGOTAVLJANJE DODATKA SUHE SNOVI SIRIŠČNE SIROTKE K:

(a) posnetemu mleku v prahu, kakor je opredeljeno v členu 2 Uredbe (ES) št. 2799/1999, in

(b) mešanicam iz člena 4 Uredbe (ES) št. 2799/1999.

2. SKLICI: MEDNARODNI STANDARD ISO 707

3. OPREDELITEV

Vsebnost trdnih snovi siriščne sirotke je opredeljena kot masni odstotek, ki se določi z vsebnostjo makropeptidov kazeina v skladu z opisanim postopkom.

4. POSTOPEK

Vsebnost makropeptidov kazeina se določi skladno s Prilogo XII. Pri vzorcih, ki dajejo pozitivne rezultate, se analizira vsebnost makropeptida kazeina A s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti na reverzni fazi (HPLC-postopek). Druga možnost je, da se vzorci neposredno analizirajo z reverzno fazo HPLC-postopka. Rezultati se vrednotijo glede na standardne vzorce posnetega mleka v prahu z znanim dodatkom in brez znanega dodatka sirotke v prahu. Rezultati, ki presegajo 1 % masnega deleža, kažejo na prisotnost trdnih snovi siriščne sirotke.

5. REAGENTI

Uporabljeni reagenti morajo biti priznane analitske kakovosti. Uporabljena voda mora biti destilirana voda ali voda vsaj enakovredne čistosti. Kakovost acetonitrila mora biti primerna za spektroskop ali HPLC.

Reagenti, ki so potrebni za postopek, so opisani v Prilogi XII k tej uredbi.

Reagenti za HPLC na reverzni fazi.

5.1 **Raztopina trikloroocetne kisline**

Raztopite 240 g trikloroocetne kisline (CCl_3CCOOH) v vodi in dopolnite do prostornine 1 000 ml. Raztopina mora biti bistra in brezbarvna.

5.2 **Eluenta A in B**

Eluent A: V 1 000-mililitrsko merilno bučko dodajte 150 ml acetonitrila (CH_3CN), 20 ml izopropanola ($CH_3CHOHCH_3$) in 1,00 ml trifluoroocetne kisline (TFA, CF_3COOH). Dopolnite z vodo do 1 000 ml.

Eluent B: V 1 000-mililitrsko merilno bučko dodajte 550 ml acetonitrila (CH_3CN), 20 ml izopropanola ($CH_3CHOHCH_3$) in 1,00 ml trifluoroocetne kisline (TFA, CF_3COOH). Dopolnite z vodo do 1 000 ml. Raztopino topila pred uporabo filtrirajte skozi membranski filter, ki ima premer por 0,45 μm.

5.3 **Shranitev kolone**

Po analizi kolono sperete z eluentom B (gradientno) in potem še z acetonitrilom (gradientno v 30 minutah.). Kolona se shrani v acetonitrilu.

5.4 **Standardni vzorci**

5.4.1 Posneto mleko v prahu, ki ustreza zahtevam za javno skladiščenje (npr. [0])

5.4.2 Enako posneto mleko v prahu z dodatkom 5 % (m/m) siriščne sirotke v prahu s standardno sestavo (tj. [5]).

5.4.3 Enako posneto mleko v prahu z dodatkom 50 % (m/m) siriščne sirotke v prahu s standardno sestavo (tj. [50]) [1].

6. OPREMA

Oprema, ki je potrebna za omenjeni postopek, je opisana v Prilogi XII k tej uredbi.

6.1 Analitska tehtnica

6.2 Neobvezna centrifuga, ki lahko razvije centrifugalno silo 2 200 g, z epruvetami za centrifugiranje z zamaški ali pokrovčki s prostornino približno 50 ml

6.3 Mehanski stresalnik

6.4 Magnetni mešalnik

6.5 Stekleni lijaki s premerom približno 7 cm

6.6 Filtrirni papir, srednje porozen, s premerom približno 12,5 cm

6.7 Oprema za filtriranje iz stekla s premerom por membranskega filtra 0,45 μm

6.8 Graduirana pipeta, ki prepušča 10 ml (ISO 648, razred A, ali ISO/R 835), ali razdelilni sistem, ki lahko prepušča 10,0 ml v dveh minutah

6.9 Razdelilni sistem, ki lahko prepušča 20,0 ml vode pri pribl. 50 °C

6.10 Termostatska vodna kopel, nastavljena na 25 ± 0,5 °C

6.11 HPLC-oprema, ki jo sestavljajo:

6.11.1 Binarni gradientni sistem črpalk

6.11.2 Injektor, ročni ali avtomatski, s prostornino 100 μl

6.11.3 Kolona Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (dolžina 25 cm, notranji premer 0,46 cm) ali enakovredna silicijeva kolona s širokimi porami za reverzno kromatografijo

6.11.4 Termostatiran grelnik kolone, nastavljen na 35 ± 1 °C

6.11.5 UV-detektor z nastavljivo valovno dolžino in z možnostjo merjenja pri 210 nm (če je potrebno, se lahko uporabi višja valovna dolžina do 220 nm) z občutljivostjo 0,02 Å.

6.11.6 Integrator, ki lahko določi integracijo na splošni bazni liniji ali dolina–dolina

Opomba: Delo s kolonami je mogoče tudi pri sobni temperaturi, če temperatura niha manj kot ± 1 °C, sicer nastane preveliko nihanje retenzijskega časa CMP_A.

7. VZORČENJE

7.1 Vzorci morajo biti vzeti v skladu z mednarodnim standardom ISO 707. Vendar lahko države članice uporabijo drugo metodo vzorčenja, če je skladna z navedenim standardom.

7.2 Vzorec hranite pri pogojih, ki izključujejo kakršno koli kvarjenje ali spremembo sestave.

[1] Prah siriščne sirotke standardne sestave in potvorjeno posneto mleko v prahu sta razpoložljiva pri NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL-6710 BA Ede. Vendar se lahko uporabi tudi drug prah, ki daje enake rezultate kot prah NIZO.

8. POSTOPEK

8.1 **Priprava preskusnega vzorca**

Prenesite mlečni prah v posodo s približno dvakrat večjo prostornino, kakor je prostornina prahu, ki ima nepredušen pokrov. Posodo takoj zaprite. Zmešajte mlečni prah s ponavljajočim obračanjem posode.

8.2 **Preskusni delež**

Odtehtajte 2,00 ± 0,001 g preskusnega vzorca v epruveto za centrifugiranje (6.2) ali ustrezno zaprto bučko (50 ml).

Opomba: V primeru mešanic odtehtajte takšno količino preskusnega vzorca, da razmaščeni vzorec deleža ustreza 2,00 g.

8.3 **Odstranitev maščob in beljakovin**

8.3.1 Odtehtanemu vzorcu dodajte 20,0 ml tople vode (50 °C). Raztopite prah s petminutnim stresanjem na mehanskem stresalniku ali tridesetminutnim stresanjem v primeru kislega pinjenca (6.3). Postavite epruveto v vodno kopel (6.10) in pustite, da se temperatura uravna na 25 °C.

8.3.2 V dveh minutah dodajte 10,0 ml raztopine triklorocetne kisline s temperaturo približno 25 °C (5.1) in pri tem intenzivno mešajte z magnetnim mešalnikom (6.4). Postavite epruveto v vodno kopel (6.10) in pustite 60 minut.

8.3.3 Centrifugirajte (6.2) 10 minut pri 2 200 g ali filtrirajte skozi filter in zavrzite prvih 5 ml filtrata.

8.4 **Kromatografsko določanje**

8.4.1 Izvedite HPLC-analizo, kakor je opisano v Prilogi XII. Če je dobljeni rezultat negativen, analizirani vzorec ne vsebuje suhe snovi siriščne sirotke v zaznavnih količinah. Če je rezultat pozitiven, je treba uporabiti HPLC-kromatografijo na reverzni fazi. V nasprotnem primeru se lahko neposredno uporabi metoda HPLC na reverzni fazi. Prisotnost kislega pinjenca lahko privede do lažno pozitivnih rezultatov z uporabo metode iz Priloge XII. Metoda HPLC na reverzni fazi to možnost izključuje.

8.4.2 Pred izvedbo HPLC-analize na reverzni fazi je treba optimizirati gradientne pogoje. Retenzijski čas CMP_A 26 ± 2 minuti je optimalen za gradientne sisteme z mrtvo prostornino približno 6 ml (prostornina od točke, na kateri pridejo skupaj topila, do vključno s prostornino injekcijske zanke). Gradientni sistemi z manjšo mrtvo prostornino (npr. 2 ml) naj uporabijo 22 minut kot optimalen retenzijski čas.

Odvzem raztopine standardnih vzorcev (5.4) brez siriščne sirotke in s 50 % siriščne sirotke.

Vbrizgajte 100 µl supernatanta ali filtrata (8.3.3) v instrument HPLC, ki deluje pri predlaganih gradientnih pogojih, danih v tabeli 1.

Tabela 1

Predlagani gradientni pogoji za optimizacijo kromatografije

Čas (minute)	Pretok (ml/min)	% A	% B	Krivulja
Začetek	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	linearna
32	1,0	10	90	linearna
37	1,0	10	90	linearna
42	1,0	90	10	linearna

Iz primerjave dveh kromatogramov se razbere lokacija vrha CMP_A.

Po navedeni enačbi se lahko izračuna sestava začetnega topila, ki se uporabi za normalni gradient (glej 8.4.3): $\% B = 10 - 2{,}5 + (13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26)/6) \times 30/27$ $\% B = 7{,}5 + (13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26)/6) \times 1{,}11$

kjer je:

RT_{cmpA}: retenzijski čas CMP_A v predlaganem gradientu

10: začetni % B v predlaganem gradientu

2,5: % B na sredini minus % B na začetku normalnega gradienta

13,5: srednji čas predlaganega gradienta

26: zahtevani retenzijski čas CMP_A

6: razmerje naklonov predlaganega in normalnega gradienta

30: % B na začetku minus % B pri 27 minutah predlaganega gradienta

27: celotni čas predlaganega gradienta.

8.4.3 Odvzem raztopin preskusnih vzorcev

Vbrizgajte 100 µl natančno odmerjenega supernatanta ali filtrata (8.3.3) v instrument HPLC, ki deluje pri pretoku 1,0 ml raztopine eluenta (5.2) na minuto.

Sestavo eluenta na začetku analize dobite iz 8.4.2. Ponavadi je blizu A:B = 76:24 (5.2). Takoj po vbrizgavanju se vklopi linearni gradient, ki ima po 27 minutah za 5 % višji delež B. Nato se vklopi linearni gradient, ki v petih minutah spremeni sestavo eluenta na 90 % B. Ta sestava se ohrani pet minut, potem pa se prek linearnega gradienta v petih minutah spremeni v začetno sestavo. Odvisno od notranje prostornine sistema črpalk lahko naslednje vbrizgavanje sledi 15 minut zatem, ko dosežete začetno sestavo.

Opomba 1: Retenzijski čas CMP_A naj bi bil 26 ± 2 minuti. To je mogoče doseči s spreminjanjem začetnih in končnih pogojev prvega gradienta. Vendar mora razlika % B pri začetnih in končnih pogojih prvega gradienta ostati 5 % B.

Opomba 2: Eluente je treba primerno razpliniti in morajo ostati razplinjeni. To je nujno za pravilno delovanje gradientnega sistema črpalk. Standardni odmik retenzijskega časa CMP_A vrha naj bo manjši od 0,1 minute (n = 10).

Opomba 3: Vsakih pet vzorcev je treba vbrizgati referenčni vzorec (5) in ga uporabiti za izračun novega odzivnega faktorja R (9.1.1).

8.4.4 Rezultati kromatografske analize preskusnega vzorca (E) so dobljeni v obliki kromatograma, v katerem je vrh CMP_A prepoznan z retenzijskim časom približno 26 minut.

Integrator (6.11.6) samodejno izračuna višino vrha H vrha CMP_A. Na vsakem kromatogramu je treba preveriti položaj bazne linije. Analizo ali integracijo je treba ponoviti, če je bazna linija nepravilno določena.

Opomba: Če je vrh CMP_A dovolj ločen od drugih vrhov, je treba uporabiti bazno linijo dolina–dolina, v nasprotnem primeru uporabite padajoče navpičnice za splošno bazno linijo, ki mora imeti izhodišče blizu vrha CMP_A (torej ne pri t = 0 min). Za standard in vzorec uporabite enako vrsto integracije in v primeru splošne bazne linije preverite skladnost vrste za vzorce in standard.

Pred kvantitativno interpretacijo je treba pregledati videz vsakega kromatograma, da bi tako lahko izsledili kakršne koli nepravilnosti kot posledice slabega delovanja bodisi kromatografa ali kolone ali pa kot posledice izvora in narave analiziranega vzorca. V primeru dvoma analizo ponovite.

8.5 **Kalibracija**

8.5.1 Za standardne vzorce uporabite postopek, opisan od točke 8.2 do točke 8.4.4 (od 5.4.1 do 5.4.2). Uporabite sveže pripravljene raztopine, ker se CMP razgradi v 8-odstotni triklorocetni kislini pri sobni temperaturi. Pri 4 °C ostane raztopina stabilna 24 ur. Pri veliki seriji analiz je zaželena uporaba hlajenega pladnja za vzorce v avtomatskem injektorju.

Opomba: Točko 8.4.2 je mogoče izpustiti, če je % B pri začetnih pogojih znan iz prejšnjih analiz.

Kromatogram referenčnega vzorca [5] mora biti analogen sliki 1. Na tej sliki sta pred vrhom CMP_A dva majhna vrhova. Nujno je, da dobite podobno ločevanje.

8.5.2 Pred kromatografskim določanjem vzorcev vbrizgajte 100 µl standardnega vzorca brez siriščne sirotke [0] (5.4.1).

Kromatogram ne sme imeti vrha pri retenzijskem času vrha CMP_A.

8.5.3 Z vbrizganjem enake prostornine filtrata (8.5.1), kakor je uporabljena pri vzorcih, določite odzivni faktor R.

9. IZRAŽANJE REZULTATOV

9.1 **Metoda za izračun in enačbe**

9.1.1 *Izračun odzivnega faktorja R:*

vrh CMP_A: $R = W/H$

kjer je:

R = odzivni faktor vrha CMP_A

H = višina vrha CMP_A

W = količina sirotke v standardnem vzorcu [5].

9.2 **Izračun deleža siriščne sirotke v prahu v vzorcu**

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

kjer je:

W(E) = masni delež (m/m) siriščne sirotke v vzorcu [E].

R = odzivni faktor vrha CMP_A (9.1.1)

H(E) = višina vrha CMP_A iz vzorca (E)

Če je W(E) večji od 1 % in razlika med retenzijskim časom pri vzorcu in standardnem vzorcu manjša od 0,2 minute, potem je suha snov siriščne sirotke prisotna.

9.3 **Zanesljivost postopka**

9.3.1 *Ponovljivost*

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju izvede simultano ali po kratkem času isti analitik z isto opremo in na enakem preskusnem materialu, ne sme presegati 0,2 % m/m.

9.3.2 *Obnovljivost*

Ni določena.

9.3.3 *Linearnost*

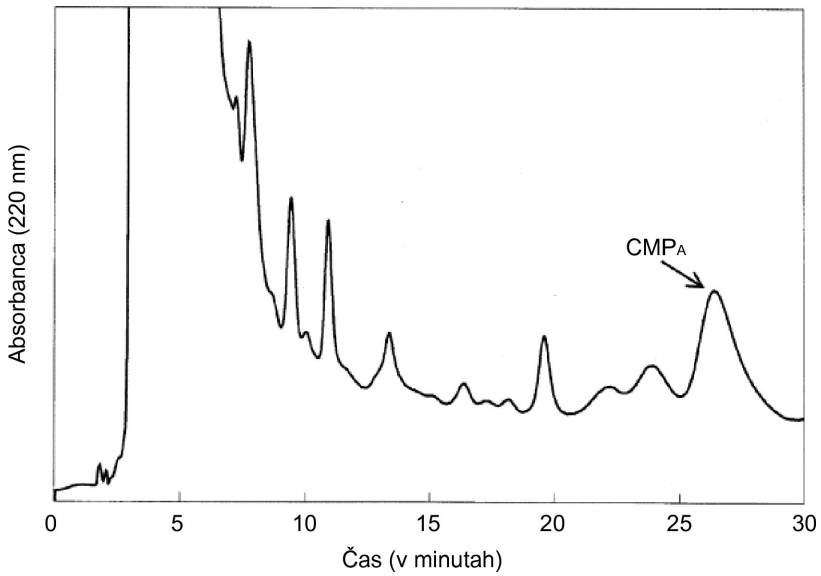
Linearno zvezo s korelacijskim koeficientom > 0,99 je treba dobiti v območju od 0 do 16 % siriščne sirotke.

9.4 **Interpretacija**

Meja 1 % je postavljena v skladu z zahtevami točk 9.2 in 9.4.1 Priloge XIX k Uredbi (EGS) št. 214/2001, ki vključuje negotovost zaradi obnovljivosti.

Tabela 1

Ni – standard 4.6



PRILOGA XIV

(Člen 10)

POSNETO MLEKO V PRAHU: KOLIČINSKO DOLOČANJE FOSFATIDILSERINA IN FOSFATIDILETANOLAMINA

Metoda: HPLC na reverzni fazi

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Metoda navaja postopek za količinsko določanje fosfatidilserina (PS) in fosfatidiletanolamina (PE) v posnetem mleku v prahu (SMP) in je primerna za ugotavljanje trdnega pinjenca v SMP.

2. OPREDELITEV POJMA

Vsebnost PS + PE: masni delež snovi, določen s tukaj opisanim postopkom. Rezultat se izrazi v miligramih fosfatidiletanolamina dipalmitola (PEDP) na 100 g prahu.

3. PRINCIP METODE

Ekstrakcija aminofosfolipidov iz rekonstruiranega mleka v prahu. Določitev PS in PE kot derivatov o-ftaldialdehida (OPA) s HPLC na reverzni fazi (RP) in fluorescenčno detekcijo. Količinska opredelitev vsebnosti PS in PE v preskusnem vzorcu glede na standardni vzorec, ki vsebuje znano količino PEDP.

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti. Uporabljena voda mora biti destilirana ali vsaj primerljive čistosti, če ni navedeno drugače.

4.1 **Standardni material: PEDP s čistostjo najmanj 99 %**

Opomba: Standardni material je treba hraniti pri – 18 °C.

4.2 **Reagenti za pripravo standardnega in preskusnega vzorca**

4.2.1 Metanol, HPLC-čistost

4.2.2 Kloroform, HPLC-čistost

4.2.3 Triptamin-monohidroklorid

4.3 **Reagenti za o-ftalaldehidno derivatizacijo**

4.3.1 Natrijev hidroksid, 12 M vodna raztopina

4.3.2 Borna kislina, 0,4 M vodna raztopina, uravnana na pH 10,0 z natrijevim hidroksidom (4.3.1)

4.3.3 2-merkaptoetanol

4.3.4 o-ftalaldehid (OPA)

4.4 **Reagenti za HPLC (eluenti)**

4.4.1 Eluente je treba pripraviti z uporabo reagentov HPLC-čistost.

4.4.2 Voda, HPLC-čistost

4.4.3 Metanol, čistost za fluorimetrijo

4.4.4 Tetrahidrofuran

4.4.5 Natrijev dihidrogen fosfat

4.4.6 Natrijev acetat

4.4.7 Ocetna kislina

5. OPREMA

5.1 Analitska tehtnica, ki lahko tehta na 1 mg natančno, s čitljivostjo 0,1 mg

5.2 Čaše s prostornino 25 in 100 ml

5.3 Pipete, ki lahko prepuščajo 1 ml in 10 ml

5.4 Magnetni mešalnik

5.5 Polnilne pipete, ki lahko prepuščajo 0,2, 0,5 in 5 ml

5.6 Merilne bučke s prostornino 10, 50 in 100 ml

5.7 Brizgalke s prostornino 20 in 100 µl

5.8 Ultrazvočna kopel

5.9 Centrifuga, delujoča pri 27 000 × g

5.10 Reakcijske stekleničke s prostornino približno 5 ml

5.11 Merilni valj s prostornino 25 ml

5.12 pH-meter z natančnostjo do 0,1 pH-enot

5.13 HPLC-oprema

5.13.1 Gradientni sistem črpalk z možnostjo delovanja pri pretoku 1,0 ml/min pri 200 barih

5.13.2 Avtomatski vzorčevalnik z možnostjo izvajanja derivatizacije

5.13.3 Grelnik kolone, ki lahko temperaturo ohranja na 30 °C ± 1 °C

5.13.4 Fluorescenčni detektor z valovno dolžino vzbujanja 330 nm in valovno dolžino emisije 440 nm

5.13.5 Integrator ali programska oprema za obdelavo podatkov, ki lahko meri površino vrha

5.13.6 Kolona Lichrosphere – 100 (250 × 4,6 mm) ali enakovredna kolona, polnjena z oktadecilsilanom (C 18), velikost delcev 5 µm

6. VZORČENJE

Vzorčenje mora biti izvedeno v skladu s standardom ISO 707.

7. POSTOPEK

7.1 **Priprava raztopine internega standarda**

7.1.1 Natehtajte 30,0 ± 0,1 mg triptamin-monohidroklorida (4.2.3) v 100-mililitrsko merilno bučko (5.6) in dopolnite do oznake z metanolom (4.2.1).

7.1.2 Odpipetirajte 1 ml (5.3) te raztopine v 10-mililitrsko merilno bučko (5.6) in dopolnite do oznake z metanolom (4.2.1), da dobite raztopino s koncentracijo 0,15 mM triptamina.

7.2 **Priprava raztopine preskusnega vzorca**

7.2.1 Odtehtajte 1,000 ± 0,001 g vzorca SMP v 25-mililitrsko čašo (5.2). S pipeto (5.3) dodajte 10 ml destilirane vode pri 40 °C ± 1 °C in mešajte 30 minut z magnetnim mešalnikom (5.4), da raztopite morebitne grudice.

7.2.2 Odpipetirajte 0,2 ml (5.5) rekonstruiranega vzorca mleka v 10-mililitrsko merilno bučko (5.6), dodajte 100 µl 0,15 mM raztopine triptamina (7.1) z brizgalko (5.7) in dopolnite do oznake z metanolom (4.2.1). Previdno zmešajte z obračanjem bučke in postavite v ultrazvočno kopel (5.8) za 15 min.

7.2.3 Centrifugirajte (5.9) 10 minut pri 27 000 g in zberite bistro tekočino v stekleno vialo (5.10).

Opomba: Raztopino preskusnega vzorca je treba do HPLC-analize hraniti pri 4 °C.

7.3 **Priprava raztopine eksternega standarda**

7.3.1 Odtehtajte 55,4 mg PEDP (4.1) v 50-mililitrsko merilno bučko (5.6) in dodajte z merilnim valjem (5.11) približno 25 ml kloroforma (4.2.2). Zaprto bučko segrejte do 50 °C ± 1 °C in previdno premešajte, da se PEDP raztopi. Ohladite bučko na 20 °C in dopolnite do oznake z metanolom (4.2.1) ter zmešajte z obračanjem.

7.3.2 Odpipetirajte 1 ml (5.3) te raztopine v 100-mililitrsko merilno bučko (5.6) in dopolnite do oznake z metanolom (4.2.1). Odpipetirajte 1 ml (5.3) te raztopine v 10-mililitrsko merilno bučko (5.6), dodajte 100 µl (5.7) 0,15 mM raztopine triptamina (7.1) in dopolnite do oznake z metanolom (4.2.1). Zmešajte z obračanjem bučke.

Opomba: Raztopino referenčnega vzorca je treba do HPLC-analize hraniti pri 4 °C.

7.4 **Priprava reagenta za derivatizacijo**

Odtehtajte 25,0 ± 0,1 mg OPA (4.3.4) v 10-mililitrsko merilno bučko (5.6), dodajte 0,5 ml (5.5) metanola (4.2.1) in previdno premešajte, da se OPA raztopi. Dopolnite do oznake z raztopino borne kisline (4.3.2) in dodajte z brizgalko (5.7) 20 µl 2-merkaptoetanola (4.3.3).

Opomba: Reagent za derivatizacijo je treba hraniti v temni viali pri 4 °C in je stabilen en teden.

7.5 **HPLC-določitev**

7.5.1 *Topila (eluenti) (4.4)*

Topilo A: 0,3 mM raztopina natrijevega dihidrogen fosfata in 3 mM natrijevega acetata (pH uravnan na 6,5 ± 0,1 z ocetno kislino):metanol:tetrahidrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Topilo B: metanol.

7.5.2 *Predlagani elucijski gradient*

Čas (min)	Topilo A (%)	Topilo B (%)	Pretok (ml/min)
začetek	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

Opomba: Elucijski gradient je morda treba rahlo spremeniti, da bi dobili ločitev, kakor je prikazana na sliki 1.

Temperatura kolone: 30 °C.

7.5.3 *Prostornina vbrizganja: 50 µl reagenta za derivatizacijo in 50 µl raztopine vzorca*

7.5.4 *Vzpostavitev ravnotežja v koloni*

Če se sistem začne dnevno, se kolona spira 15 minut s 100-odstotnim topilom B, potem nastavi A:B = 40:60 in 15 minut vzpostavlja ravnotežje pri pretoku 1 ml/min. Slepa določitev se izvede z vbrizganjem metanola (4.2.1).

Opomba: Pred daljšim hranjenjem je treba kolono spirati 30 minut z mešanico metanol:kloroform = 80:20 (v/v).

7.5.5 *Določitev vsebnosti PS + PE v preskusnem vzorcu*

7.5.6 *Izvedite zaporedje kromatografskih analiz s konstantnim časom med dvema analizama, da s tem zagotovite konstanten retenzijski čas. Vsakih 5–10 preskusnih vzorcev vbrizgajte raztopino eksternega standarda (7.3) za ovrednotenje odzivnega faktorja0*

Opomba: Na vsakih 20–25 analiz je nujno kolono najmanj 30 minut spirati s 100-odstotnim topilom B.

7.6 **Način integracije**

7.6.1 *Vrh PEDP*

Vrh PEDP se pojavi samostojno. Njegova površina se določi z integracijo dolina-dolina.

7.6.2 *Vrh triptamina*

Vrh triptamina se pojavi samostojno (slika 1). Njegova površina se določi z integracijo dolina-dolina.

7.6.3 *Skupine vrhov PS in PE*

Pri opisanih pogojih (slika 1) se PS eluira v obliki dveh delno neločenih vrhov, pred katerima je še en manjši vrh. PE se eluira v obliki treh glavnih delno neločenih vrhov. Površina vsake skupine vrhov se določi z nastavitvijo bazne linije, kakor je prikazano na sliki 1.

8. IZRAČUN IN IZRAŽANJE REZULTATOV

Vsebnost PS in PE v preskusnem vzorcu se izračuna, kakor sledi: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

kjer je:

C = vsebnost PS ali PE (v mg/100 g prahu) v preskusnem vzorcu

A_1 = površina vrha PEDP raztopine standardnega vzorca (7.3)

A_2 = površina vrha PS ali PE raztopine preskusnega vzorca (7.2)

T_1 = površina vrha triptamina v raztopini standardnega vzorca (7.3)

T_2 = površina vrha triptamina v raztopini preskusnega vzorca (7.2)

9. TOČNOST METODE

Opomba: Vrednosti za ponovljivost so bile izračunane v skladu z mednarodnim standardom IDF [1]. Predpisana meja za obnovljivost je bila izračunana v skladu s postopkom iz Priloge III(b).

9.1 **Ponovljivost**

Relativni standardni odmik ponovljivosti, izražajoč variabilnost neodvisnih analitskih rezultatov, ki jih dobi isti analitik z isto opremo pri enakih pogojih na istem preskusnem vzorcu v kratkem časovnem intervalu, ne sme presegati vrednosti 2 % relativno. Če sta dve določitvi izvedeni pri teh pogojih, relativna razlika med dvema rezultatoma ne sme biti večja od 6 % aritmetične sredine teh rezultatov.

[1] Mednarodni standard IDF 135B/1991. Mleko in mlečni proizvodi. Značilnosti natančnosti analitskih metod. Prikaz postopka medlaboratorijske študije.

9.2 **Obnovljivost**

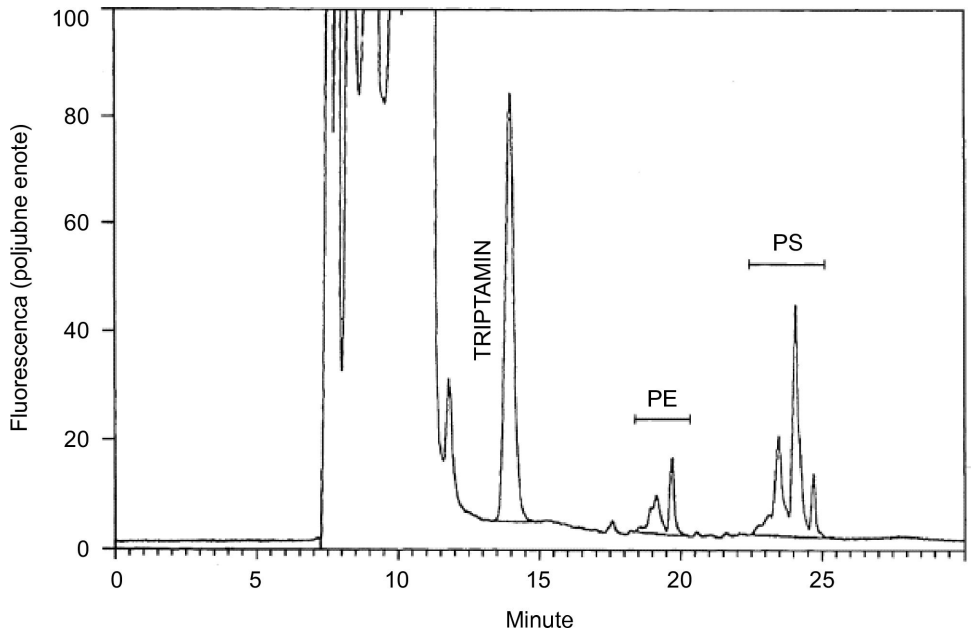
Če sta dve določitvi izvedeni v različnih laboratorijih z različno opremo pri različnih pogojih analize na enakem preskusnem vzorcu, relativna razlika med dvema rezultatoma ne sme biti večja od 11 % aritmetične sredine teh rezultatov.

10. VIRI

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.*

Slika 1

HPLC vzorec derivatov o-ftaldialdehida (OPA), fosfatidilserina (PS) in fosfatidiletanolamina (PE) v ekstraktu metanola rekonstruiranega posnetega mleka v prahu. Prikazan je način integracije vrhov PS, PE in triptamina (interni standard)



PRILOGA XV

(Člen 11)

UGOTAVLJANJE ANTIMIKROBNIH OSTANKOV V POSNETEM MLEKU V PRAHU

Uporablja se mikrobni inhibitorski izločilni preskus z *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (enak kot C953) kot preskusnim mikroorganizmom, ker je dovolj občutljiv, da zazna 4 μg benzilpenicilina v kilogramu mleka in 100 μg sulfadimina v kilogramu mleka. Na voljo so komercialni kompleti za preskušanje in se lahko uporabijo, če imajo zahtevano občutljivost za benzilpenicilin in sulfadimin.

Za preskus se uporabi rekonstituirano posneto mleko v prahu (1 g prahu + 9 ml destilirane vode). Preskus se izvede, kakor je opisano v standardu ISO/TS 26844:2006, mleko in mlečni proizvodi – ugotavljanje antimikrobnih ostankov – difuzijski test epruvete IDF, Bilten št. 258/1991, oddelek 1, poglavje 2, ali v skladu z navodili proizvajalca preskusnega kompleta ([1]).

Pozitivni rezultati naj se interpretirajo tako:

1. Prisotnost β-laktamov lahko potrdite s ponovitvijo preskusa z dodatkom penicilinaze preskusnemu sistemu ([2]):

   Negativni rezultat: Inhibitorska substanca je β-laktamski antibiotik.

   Pozitivni rezultat ostaja: Inhibitorske substance s tem postopkom ni mogoče razpoznati, nadaljujte s točko 2.

2. Prisotnost sulfonamidov lahko potrdite s ponovitvijo preskusa z dodatkom p-amino benzojske kisline preskusnemu sistemu:

   Negativni rezultat: Inhibitorska substanca je sulfonamid.

   Pozitivni rezultat ostaja: Inhibitorske substance s tem postopkom ni mogoče razpoznati, nadaljujte s točko 3.

3. Prisotnost kombinacije β-laktama in sulfonamida lahko potrdite s ponovitvijo preskusa z dodatkom penicilinaze + p-amino benzojske kisline preskusnemu sistemu:

   Negativni rezultat: Inhibitorska substanca je β-laktamski antibiotik in sulfonamid.

   Pozitivni rezultat: Inhibitorske substance s tem postopkom ni mogoče razpoznati.

([1]) Pomembna opomba: Pri analizi posnetega mleka v prahu so rezultati lahko lažno pozitivni. Zato je zelo pomembno preveriti, da uporabljeni preskusni sistem ne daje lažno pozitivnih rezultatov.

([2]) Nekateri β-laktami so manj občutljivi na β-laktamazo. V takšnih primerih se priporoča dodatna predhodna obdelava vzorca (1 ml preskusnega vzorca z 0,3 ml koncentrata beta-laktamov pri 37 °C za 2 uri).

PRILOGA XVI

(Člen 12)

KOLIČINSKO DOLOČANJE POSNETEGA MLEKA V PRAHU V KRMNIH MEŠANICAH Z ENCIMATSKO KOAGULACIJO PARAKAZEINA

1. NAMEN

Količinsko določanje posnetega mleka v prahu v krmnih mešanicah z encimsko koagulacijo parakazeina.

2. PODROČJE UPORABE

Ta metoda se uporablja za krmne mešanice, ki vsebujejo najmanj 10 % posnetega mleka v prahu; velike količine pinjenca in/ali določene nemlečne beljakovine so lahko moteče.

3. PRINCIP METODE

3.1 Raztapljanje kazeina, ki je v krmni mešanici, z ekstrakcijo z raztopino natrijevega citrata

3.2 Uravnanje koncentracije kalcijevih ionov na zahtevano raven za obarjanje parakazeina z dodatkom sirišča

3.3 Vsebnost dušika v oborini parakazeina se določi s Kjeldahlovo metodo, kakor je opisana v standardu ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001; količina posnetega mleka v prahu se izračuna na podlagi najmanjše vsebnosti kazeina 27,5 % (glej 8.1)

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti. Uporabljena voda mora biti destilirana ali vsaj primerljive čistosti. Razen sirišča (4.5) morajo biti vsi reagenti in raztopine brez dušikovih spojin.

4.1 Trinatrijev citrat, dihidrat (1 % m/v raztopina)

4.2 Kalcijev klorid (5 M raztopina)

V 100 ml destilirane vode s stresanjem raztopite 75 g $CaCl_2.2H_2O$ (bodite pozorni na eksotermno reakcijo). Pustite čez noč in nato filtrirajte raztopino. Raztopino shranite v hladilniku.

4.3 0,1 N raztopina natrijevega hidroksida

4.4 0,1 N solna kislina

4.5 Tekoče goveje sirišče (moč sirjenja približno 100 IMCU/ml v skladu s standardom ISO 11815/IDF 157). Hranite v hladilniku pri 4 do 6 °C.

4.6 Reagenti za količinsko določanje dušika v skladu s Kjeldahlovo metodo, kakor je opisana v standardu ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001.

5. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema, med drugim:

5.1 Terilnica ali homogenizator

5.2 Analitska tehtnica, ki lahko tehta na 1 mg natančno, s čitljivostjo 0,1 mg

5.3 Namizna centrifuga (500 g ali 2 000 do 3 000 obratov na minuto) s 50-mililitrskimi epruvetami in 2 000 g

5.4 Magnetni mešalnik z (10 do 15 mm) magnetki

5.5 150- do 200-mililitrske čaše

5.6 250- in 500-mililitrske bučke

5.7 Stekleni lijaki s premerom od 60 do 80 mm

5.8 Filtri za hitro filtriranje s premerom 150 mm brez pepela (Whatman št. 41 ali enakovreden)

5.9 Pipete z različnimi nazivnimi prostorninami

5.10 Termostatsko nadzorovana vodna kopel pri 37 °C ± 1 °C

5.11 pH-meter z natančnostjo do 0,1 enote

5.12 Termometri z natančnostjo do 1 °C

6. POSTOPEK

6.1 **Priprava vzorca**

V terilnici strite ali homogenizirajte v mlinu od 10 do 20 g vzorca, da dobite homogeno zmes.

6.2 **Raztapljanje mlečnega prahu in odstranitev netopnega ostanka**

6.2.1 Odtehtajte 1,000 ± 0,002 g dobro homogenizirane krmne mešanice (6.1) neposredno v 50-mililitrsko epruveto za centrifugiranje. Dodajte 30 ml raztopine trinatrijevega citrata (4.1), predhodno segrete na 45 °C ± 2 °C, in mešajte z magnetnim mešalnikom najmanj pet minut ali močno stresajte.

6.2.2 Centrifugirajte pri 500 g (2 000 do 3 000 vrtljajev na minuto) 10 minut in dekantirajte čisti vodni supernatant v 150- do 200-mililitrsko čašo, pri čemer pazite, da ne prelijete rahle usedline.

6.2.3 Po istem postopku izvedite še dve nadaljnji ekstrakciji ostanka in združite ekstrakta s prvim.

6.2.4 Če na površini nastane plast maščobe, jo ohladite v hladilniku, da se strdi, in odstranite trdno plast z lopatico.

6.3 **Koagulacija kazeina s siriščnimi encimi**

6.3.1 Med stalnim mešanjem dodajte skupnemu vodnemu ekstraktu (približno 100 ml) po kapljicah 2 ml raztopine kalcijevega klorida (4.2). Uravnajte pH na 6,4–6,5 z raztopinama NaOH (4.3) ali HCl (4.4). Postavite v termostatirano vodno kopel pri 37 °C ± 1 °C za od 15 do 20 minut, da vzpostavite ravnotežje soli. Z nastankom rahle motnosti postane to še bolj očitno.

6.3.2 Prenesite tekočino v eno (ali dve) epruveti za centrifugiranje in centrifugirajte pri 2 000 g 10 minut, da odstranite oborino. Prenesite supernatant brez izpiranja sedimenta v eno (ali dve) epruveti za centrifugiranje.

6.3.3 Ponovno temperirajte supernatant na 37 °C ± 1 °C. Med mešanjem ekstrakta dodajte po kapljicah 0,5 ml tekočega sirišča (4.5). Koagulacija poteče v eni do dveh minutah.

6.3.4 Ponovno vrnite vzorec v vodno kopel in ga pustite 15 minut pri temperaturi 37 °C ± 1 °C. Vzemite vzorec iz kopeli in z mešanjem razdrobite koagulat. Centrifugirajte pri 2 000 g 10 minut. Filtrirajte supernatant skozi primeren filtrirni papir (5.8) in filtrirni papir zadržite. Usedlino v epruveti za centrifugiranje med mešanjem izperite s 50 ml vode, ki ima približno 35 °C.

Ponovno centrifugirajte pri 2 000 g 10 minut. Filtrirajte supernatant skozi predhodno shranjen filtrirni papir.

6.4 **Določitev kazeinskega dušika**

6.4.1 Po izpiranju usedlino količinsko prenesite z uporabo destilirane vode na shranjeni filtrirni papir (6.3.4). Osušen filtrirni papir prenesite v Kjeldahlovo epruveto. Določite dušik po Kjeldahlovi metodi, kakor je opisano v standardu ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001.

7. SLEPI PRESKUS

7.1 Slepi preskus je treba redno izvajati z mineralizacijo po Kjeldahlovi metodi, kakor je opisano v standardu ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001. Pri preskusu se uporabi filtrirni papir brez pepela (5.8) z zmesjo 90 ml (4.1) raztopine natrijevega citrata, 2 ml nasičene raztopine kalcijevega klorida (4.2), 0,5 ml tekočega sirišča (4.5), ki se spere s 3 × 15 ml destilirane vode.

7.2 Prostornino kisline, porabljeno za slepi preskus, je treba odšteti od prostornine kisline (4.4), porabljene za titracijo vzorca.

8. IZRAŽANJE REZULTATOV

8.1 Odstotek posnetega mleka v prahu v krmni mešanici se izračuna po naslednji enačbi:

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

kjer je:

N odstotek dušika v parakazeinu;

27,5 = je koeficient za pretvarjanje dobljenega kazeina v odstotek posnetega mleka v prahu;

2,81 = in 0,908 sta korekcijska faktorja, dobljena iz regresijske analize.

9. TOČNOST METODE

9.1 **Ponovljivost**

V najmanj 95 % obdelanih primerov razlika dveh vzporednih analiz, ki ju opravi isti analitik v istem laboratoriju z istim vzorcem, ne sme biti večja od 2,3 g posnetega mleka v prahu v 100 g krmne mešanice.

9.2 **Obnovljivost**

V najmanj 95 % obdelanih primerov razlika dveh vzporednih analiz istega vzorca v dveh laboratorijih ne sme biti večja od 6,5 g posnetega mleka v prahu v 100 g krmne mešanice.

10. UGOTOVITVE

10.1 Če je dodan visok odstotek nekaterih nemlečnih, zlasti sojinih beljakovin, lahko to pri segrevanju skupaj s posnetim mlekom v prahu povzroči previsoke rezultate zaradi skupnega usedanja s parakazeinom mleka.

10.2 Dodatek pinjenca lahko povzroči nekoliko nizke rezultate, ker se določajo samo nemlečni proteini. Dodatek nekega kislega pinjenca lahko povzroči izrazito nizke vrednosti zaradi nepopolnega raztapljanja v raztopini citrata.

10.3 Dodatek 0,5 % ali več lecitina lahko prav tako povzroči nizke vrednosti rezultatov.

10.4 Vključevanje močno segretega posnetega mleka v prahu lahko privede do previsokih vrednosti zaradi skupnega usedanja nekaterih sirotkinih beljakovin s parakazeinom mleka.

PRILOGA XVII

(Člen 13)

DOLOČITEV ŠKROBA V POSNETEM MLEKU V PRAHU, DENATURIRANEM MLEČNEM PRAHU IN KRMNIH MEŠANICAH

1. PODROČJE UPORABE

S to metodo se ugotavlja škrob, ki je pokazatelj za denaturirani mlečni prah.

Meja ugotavljanja pri tej metodi je približno 0,05 g škroba na 100 g vzorca.

2. PRINCIP METODE

Reakcija temelji na tisti, ki se uporablja v jodometriji:

— fiksacija s koloidi prostega joda v vodni raztopini,

— absorpcija s škrobnimi micelami in tvorbo barve.

3. REAGENTI

3.1 Raztopina joda

— Jod: 1,0 g,

— Kalijev jodid: 2,0 g,

— Destilirana voda: 100 ml,

— V 100-mililitrski merilni bučki z eno oznako v vodi raztopite 1,0 g joda in 2,0 g kalijevega jodida. Do oznake 100 ml razredčite z vodo in premešajte.

4. OPREMA

4.1 Analitska tehtnica

4.2 Vrela vodna kopel

4.3 Preskusne epruvete, 25 mm × 200 mm

5. POSTOPEK

Odtehtajte 1,0 g vzorca s točnostjo 0,1 g in ga prenesite v preskusno epruveto (4.3).

Dodajte 20 ml destilirane vode in pretresite, da se vzorec porazdeli.

Postavite epruveto v vrelo vodno kopel (4.2), v kateri naj ostane 5 minut.

Vzemite epruveto iz kopeli in jo ohladite na sobno temperaturo.

Dodajte 0,5 ml raztopine joda (3.1), stresite in opazujte nastalo barvo.

6. IZRAŽANJE REZULTATOV

Modra obarvanost kaže na navzočnost nemodificiranega škroba v vzorcu.

Če vzorec vsebuje modificirani škrob, se ta morda ne obarva modro.

7. OPOMBE

Barva, jakost barve in mikroskopski videz škroba se spreminjajo glede na izvor nemodificiranega škroba (npr. koruzni ali krompirjev) in na vrsto modificiranega škroba, ki je v vzorcu.

V prisotnosti modificiranega škroba se nastala barva spremeni v vijolično, rdečo ali rjavo v skladu s stopnjo modificiranosti kristalne strukture nemodificiranega škroba.

PRILOGA XVIII

(Člen 14)

DOLOČITEV VSEBNOSTI VLAGE V SMETANI V PRAHU

1. PODROČJE UPORABE

Ta priloga določa metodo za določanje vsebnosti vlage v smetani v prahu.

2. IZRAZI IN OPREDELITVE POJMOV

V tej prilogi veljajo naslednje opredelitve:

Vsebnost vlage: Izguba mase, ki se določi s postopkom iz tega mednarodnega standarda.

Izražena je kot masni delež.

3. PRINCIP METODE

Sušite preskusni delež pri 102 ± 2 °C na stalno maso in tehtajte, da se določi izguba mase.

4. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednja oprema:

4.1 Analitska tehtnica, ki lahko tehta na 1 mg natančno, s čitljivostjo 0,1 mg

4.2 Sušilnik, dobro prezračevan, ki lahko temperaturo ohranja pri 102 ± 2 °C v celotnem delovnem prostoru

4.3 Eksikator s sveže posušenim silikagelom s higrometričnim indikatorjem ali drugim učinkovitim sušilnim sredstvom

4.4 Posode z ravnim dnom, globino približno 25 mm, premerom okrog 50 mm in iz primernih materialov (na primer iz stekla, nerjavečega jekla, niklja ali aluminija), z dobro prilegajočimi se in enostavno odstranljivimi pokrovi

4.5 Stekleničke s tesno prilegajočimi se zamaški za mešanje laboratorijskih vzorcev

5. VZORČENJE

Laboratorij mora prejeti preskusni vzorec, ki je resnično reprezentativen in med prevozom ali skladiščenjem ni bil poškodovan ali spremenjen.

Vzorčenje ni del metode, ki je opredeljena v tem mednarodnem standardu. Priporočena metoda vzorčenja je navedena v standardu ISO 707|IDF 50.

Vzorec shranite tako, da preprečite kvarjenje in spremembe sestave.

6. PRIPRAVA PRESKUSNEGA VZORCA

Temeljito zmešajte preskusni vzorec s stresanjem in obračanjem posode (če je treba, potem ko ste vse preskusne vzorce prenesli v nepredušno posodo zadostne prostornine, ki omogoča tak postopek).

Če s tem postopkom ne dosežete popolne homogenosti, vzemite preskusne deleže (za dve posamezni določitvi) iz pripravljenega preskusnega vzorca na dveh čim bolj oddaljenih mestih.

7. POSTOPEK

7.1 **Priprava posodice**

7.1.1 V sušilniku (4.2) segrevajte nepokrito posodico in njen pokrov (4.4) pri 102 ± 2 °C vsaj eno uro.

7.1.2 Pokrijte posodico s pokrovom in jo prenesite v eksikator (4.3), v njem naj se ohladi na sobno temperaturo, in odtehtajte na 1 mg natančno ter zabeležite na 0,1 mg natančno.

7.2 **Preskusni delež**

Prenesite približno 1 do 3 g pripravljenega preskusnega vzorca (6) v posodico, pokrijte s pokrovom in stehtajte na 1 mg natančno ter zabeležite na 0,1 mg natančno.

7.3 **Določitev**

7.3.1 Odkrijte posodico in jo skupaj s pokrovom postavite v sušilnik (4.2) pri 102 ± 2 °C za dve uri.

7.3.2 Ponovno pokrijte posodico s pokrovom in jo prenesite v eksikator, v katerem naj se ohladi na sobno temperaturo, in odtehtajte na 1 mg natančno ter zabeležite na 0,1 mg natančno.

7.3.3 Odkrijte posodico in jo ponovno vsaj eno uro segrevajte v sušilniku skupaj s pokrovom. Ponovite postopek iz točke 7.3.2.

7.3.4 Ponovite postopek segrevanja in tehtanja, dokler se masa med dvema zaporednima tehtanjema ne zmanjša za 1 mg ali manj ali se poveča.

Za izračun uporabite najnižjo zabeleženo maso.

8. IZRAČUN IN IZRAŽANJE REZULTATOV

8.1 **Izračun**

Vsebnost vlage, izražena v g/100 g, je enaka:

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

kjer je:

m_0 = je masa posodice in pokrova v gramih (7.1.2);

m_1 = je masa posodice, pokrova in preskusnega deleža pred sušenjem v gramih (7.2);

m_2 = je masa posodice, pokrova in preskusnega deleža po sušenju v gramih (7.3.4).

Rezultat izrazite na dve decimalni mesti natančno.

9. NATANČNOST

Opomba: Vrednosti za ponovljivost in obnovljivost izhajajo iz rezultatov medlaboratorijskega preskusa (glej Steiger, G.: Bulletin of IDF, št. 285/1993, str. 21–28), ki se izvede v skladu s standardom IDF 135B:1991. Mleko in mlečni proizvodi – značilnosti natančnosti analitičnih metod – prikaz postopka medlaboratorijske študije.

9.1 **Ponovljivost**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh neodvisnih posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v istem laboratoriju pri istem izvajalcu, ki je uporabljal enako opremo, v kratkem časovnem obdobju, bo le v največ 5 % primerov večja od 0,20 g vlage na 100 g proizvoda.

9.2 **Obnovljivost**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh neodvisnih posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v različnih laboratorijih pri različnih izvajalcih, ki so uporabili različno opremo, bo le v največ 5 % primerov večja od 0,40 g vlage na 100 g proizvoda.

10. POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu vključuje:

— vse podatke, potrebne za popolno prepoznavnost vzorca,

— uporabljeno metodo vzorčenja, če je znana,

— preskusno metodo, uporabljeno v skladu s tem mednarodnim standardom,

— vse podrobnosti v zvezi z izvajanjem, ki niso opisane v tem mednarodnem standardu ali ne veljajo za obvezne, skupaj s podrobnostmi o vseh dogodkih, ki so morda vplivali na rezultat(-e) preskusa,

pridobljen(-e) rezultat(-e) preskusa ter končni rezultat, če se je preverjala ponovljivost.

PRILOGA XIX

(Člen 15)

UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI VLAGE V KISLEM PINJENCU V PRAHU

1. PODROČJE UPORABE

Za določitev vsebnosti vlage v kislem pinjencu v prahu, prvotno namenjenem za krmo živali.

2. PRINCIP

Vzorec se vakuumsko osuši. Izguba mase se določi s tehtanjem.

3. OPREMA

3.1 Analitska tehtnica, ki lahko tehta na 1 mg natančno, s čitljivostjo 0,1 mg.

3.2 Posode iz nerjaveče kovine ali stekla s pokrovi, ki omogočajo neprepustno zapiranje; delovna površina, ki omogoča, da se preskusni vzorec razprostre na približno 0,3 g/cm^2.

3.3 Nastavljiv električni vakuumski sušilnik, opremljen z oljno črpalko in mehanizmom za dovajanje suhega vročega zraka prek stolpa, ki vsebuje na primer kalcijev oksid ali kalcijev sulfat (ter ima indikator vlage).

3.4 Eksikator z učinkovitim sušilnim sredstvom.

3.5 Ventilatorski sušilnik, termostatsko nadzorovan, pri 102 ± 2 °C.

4. POSTOPEK

Segrevajte posodo (3.2) s pokrovom v sušilniku (3.5) najmanj eno uro. Posodo pokrijte s pokrovom in jo takoj prenesite v eksikator (3.4), v katerem naj se shladi na sobno temperaturo, ter odtehtajte na 1 mg natančno, maso pa zabeležite na 0,1 mg natančno.

S posode odstranite pokrov in prenesite približno 5 g vzorca v posodo ter ga odtehtajte na 1 mg natančno, maso pa zabeležite na 0,1 mg natančno. Posodo s pokrovom postavite v vakuumski sušilnik (3.3), predhodno segret na 83 °C. Da se prepreči prevelik padec temperature v sušilniku, posodo vanj postavite čim hitreje.

Uravnajte tlak na 100 torrov (13,3 kPa) in pri tem tlaku v toku suhega vročega zraka sušite (približno 4 ure) do konstantne mase.

Čas sušenja upoštevajte od trenutka, ko temperatura v sušilniku ponovno doseže 83 °C. Tlak v sušilniku previdno izenačite z atmosferskim. Odprite sušilnik, posodo takoj pokrijte s pokrovom, jo odstranite iz sušilnika in pustite, da se 30 do 45 minut ohlaja v eksikatorju (3.4), ter odtehtajte na 1 mg natančno, maso pa zabeležite na 0,1 mg natančno. Sušite še nadaljnjih 30 minut v vakuumskem sušilniku (3.3) pri 83 °C in ponovno stehtajte. Ponovite postopek segrevanja in tehtanja, dokler se masa posode s pokrovom med dvema zaporednima tehtanjema ne zmanjša za 1 mg ali manj ali pa se poveča. Za izračun uporabite najnižjo zabeleženo maso.

5. IZRAČUN

% vlage = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %

kjer je:

m_0 masa posode in pokrova;

m_1 je masa posode, pokrova in preskusnega deleža pred sušenjem;

m_2 je masa posode, pokrova in preskusnega deleža po sušenju.

Zabeležite rezultat pri tehtanju na 0,1 g/100 g natančno.

6. NATANČNOST

6.1 **Meja ponovljivosti**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh neodvisnih posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v istem laboratoriju pri istem izvajalcu, ki je uporabljal enako opremo, v kratkem časovnem obdobju, bo le v največ 5 % primerov večja od 0,4 g vode na 100 g pinjenca v prahu.

6.2 **Meja obnovljivosti**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh neodvisnih posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v različnih laboratorijih pri različnih izvajalcih, ki so uporabljali različno opremo, bo le v največ 5 % primerov večja od 0,6 g vode na 100 g pinjenca v prahu.

6.3 **Vir natančnih podatkov**

Podatki za natančnost so bili določeni s preskusom leta 1995, pri katerem je sodelovalo osem laboratorijev in 12 vzorcev (šest slepih dvojnih vzorcev).

PRILOGA XX

(Člen 16)

REFERENČNA METODA ZA DOLOČITEV ČISTOSTI MLEČNE MAŠČOBE S PLINSKO KROMATOGRAFSKO ANALIZO TRIGLICERIDOV – PREGLED 2

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta standard določa referenčno metodo za določitev čistosti mlečne maščobe s plinsko kromatografsko analizo trigliceridov. Ugotoviti je mogoče rastlinske in živalske maščobe, kot sta goveji loj in svinjska mast.

Z uporabo opredeljenih trigliceridnih enačb se ugotovi integriteta mlečne maščobe. Metoda se običajno uporablja za surovo kravje mleko ali proizvode iz takšnega mleka ne glede na prehrano, pasmo ali izločanje mleka. Le izjemno visok delež čistih rastlinskih olj, kot je repično olje, v prehrani lahko povzroči lažno pozitiven rezultat. Lažno pozitiven rezultat lahko povzročijo tudi mlečni proizvodi, pridobljeni od posameznih krav.

Metoda se uporablja zlasti za maščobo, ekstrahirano iz mlečnih proizvodov, ki naj bi vsebovali čisto mlečno maščobo z nespremenjeno sestavo, kot so maslo, smetana, mleko in mleko v prahu. Tehnološka obdelava mlečne maščobe, kot je odstranitev holesterola ali frakcioniranje, lahko povzroči lažno pozitiven rezultat. To velja tudi za mlečno maščobo, pridobljeno iz posnetega mleka ali kislega pinjenca. Metoda se ne uporablja vedno za maščobo, ekstrahirano iz sira, ker lahko proces zorenja tako odločilno vpliva na sestavo maščobe, da povzroči lažno pozitiven rezultat.

Opomba 1: Maslena (n-butanojska) kislina (C_4) se pojavlja izključno v mlečni maščobi ter omogoča količinsko oceno nizkih do srednjih količin mlečne maščobe v rastlinskih in živalskih maščobah. Vendar je zaradi velikih variacij C_4 glede povprečnega odstotka masnih deležev, ki so med 3,1 % in 3,8 %, težko pridobiti kakovostne in količinske podatke pri dodajanju do najmanj 20 % tuje maščobe čisti mlečni maščobi [1].

Opomba 2: V praksi količinskih rezultatov ni mogoče pridobiti na podlagi vsebnosti sterola v rastlinskih maščobah, ker so odvisni od pogojev pridobivanja in obdelave. Razen tega je kakovostna določitev tuje maščobe na podlagi sterolov nejasna.

2. OPREDELITEV

Čistost mlečne maščobe: odsotnost rastlinskih in živalskih maščob, ki jih določa postopek iz tega standarda.

Opomba: Čistost se določi z vrednostmi *S*, ki se izračunajo na podlagi sestave trigliceridov. Masni deleži trigliceridov so izraženi v odstotkih.

3. PRINCIP METODE

Maščoba, ekstrahirana iz mleka ali mlečnih proizvodov, se analizira s plinsko kromatografijo s polnjeno ali kratko kapilarno kolono za ugotovitev trigliceridov, ločenih glede na skupno število ogljikovih atomov. Z vstavitvijo masnih deležev maščobnih molekul različnih velikosti (C_{24}–C_{54}, samo s sodim številom C-atomov), izraženih v odstotkih, v ustrezno trigliceridno enačbo se izračunajo vrednosti *S*. Če vrednosti *S* presežejo meje, določene za čisto mlečno maščobo, se ugotovi prisotnost tuje maščobe.

Opomba 1: Primernost in enakovrednost polnjenih in kapilarnih kolon sta že bili dokazani [2–4].

Opomba 2: Vrednost *S* je vsota masnih deležev trigliceridov, pomnoženih z opredeljenimi faktorji.

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo imeti priznano analitsko čistost.

4.1 Nosilni plin: dušik ali po potrebi helij ali vodik s stopnjo čistosti 99,995 %

4.2 Standardne maščobe za standardiziranje standardne mlečne maščobe v skladu s točko 7.3.3

4.2.1 Standardni trigliceridi, nasičeni, ustrezni proizvodi so na voljo na tržišču.

4.2.2 Standardni holesterol

4.3 Metanol (CH_3OH), brezvoden

4.4 N-heksan ($CH_3(CH_2)4CH_3$)

4.5 N-heptan ($CH_3(CH_2)5CH_3$)

4.6 Ostali plini: vodik, čistost vsaj 99,995 %, brez organskih nečistoč (C_nH_m < 1 µl/l); sintetični zrak, brez organskih nečistoč (C_nH_m < 1 µl/l)

4.7 Brezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4)

5. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

5.1 **Visokotemperaturni plinski kromatograf**

Visokotemperaturni plinski kromatograf je primeren za temperature vsaj 400 °C in je opremljen s plamenskim ionizacijskim detektorjem. Septe, ki se uporabljajo v injektorju, morajo biti odporne proti visokim temperaturam in imeti zelo nizko stopnjo „puščanja“. Za kapilarni plinski kromatograf uporabite injektor za vbrizgavanje v kolono. Vedno uporabljajte grafitna tesnila za povezovanje kolone ter vstavke za injektor in/ali detektor (če je to potrebno).

5.2 **Kromatografska kolona**

5.2.1 *Polnjena kolona*

Uporabite stekleno kolono z notranjim premerom 2 mm in dolžino 500 mm, ki je napolnjena s stacionarno fazo 3 % OV-1 na 125 µm do 150 µm (100 do 120 mesh) Gas ChromQ ([1])). Priprava, silaniziranje, pakiranje in kondicioniranje polnjene kolone so opisani v Prilogi A.

V nasprotnem primeru se lahko uporabi tudi kapilarna kolona (5.2.2).

5.2.2 *Kapilarna kolona*

Uporabite kratko kapilarno kolono, npr. dolžine 5 m z nepolarno stacionarno fazo, ki je odporna proti temperaturam do 400 °C in višjim ([2])). Kolono kondicionirajte z izvedbo 20 analiz raztopine mlečne maščobe (7.2) v dveh do treh dneh na podlagi nastavitev iz 7.3.4.2. Po tem bodo odzivni faktorji (7.3.3) blizu 1 in nižji od 1,20.

Opomba: Uporabijo se lahko kolone različnih mer in drugačna nepolarna faza, odporna proti visokim temperaturam, če je njihova uspešnost v skladu s tem standardom. Glej tudi 7.3.4.2.

5.3 Kolona Extrelut column s prostornino 1–3 ml, napolnjena s silikagelom, ki se uporablja le za ekstrakcijo mlečne maščobe v skladu s 7.1.3

5.4 Grafitna tesnila, ki so odporna proti visokim temperaturam do vsaj 400 °C; uporabljajo se za povezovanje kolone plinskega kromatografa ter za vstavke za injektor in/ali detektor

5.5 Vodna kopel, ki lahko ohranja temperaturo 50 °C ± 2 °C

5.6 Sušilnik, ki lahko deluje pri 50 °C ± 2 °C in 100 °C ± 2 °C

5.7 Mikrolitrska pipeta

([1]) Primer ustreznega izdelka, ki je na voljo na tržišču. Ta informacija je navedena v korist uporabnikom tega mednarodnega standarda in ne pomeni potrditve tega izdelka.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) je primer ustreznega izdelka, ki je na voljo na tržišču. Ta informacija je navedena v korist uporabnikom tega mednarodnega standarda in ne pomeni potrditve tega izdelka.

5.8 Polnilna pipeta s prostornino 5 ml

5.9 Bučka z okroglim dnom s prostornino 50 ml

5.10 Erlenmajerica z nazivno prostornino 250 ml

5.11 Lijak

5.12 Filtrirni papir z drobnimi porami

5.13 Rotacijski izparilnik

5.14 Ampule z nazivno prostornino 1 ml, opremljene z aluminijastimi čepi ali zamaški na navoj z obrobo iz politetrafluoroetilena

5.15 Brizga, katere bat ne sme segati v konico igle (polnjena kolona plinskega kromatografa)

Opomba: Take brizge omogočajo boljšo ponovljivost rezultatov.

5.16 Analitska tehtnica, ki lahko tehta na 1 mg natančno, s čitljivostjo 0,1 mg

6. VZORČENJE

Reprezentativen vzorec je treba poslati v laboratorij. Med prevozom in skladiščenjem se ne sme poškodovati ali spremeniti.

Vzorčenje ni del metode, ki je opredeljena v tem mednarodnem standardu. Priporočena metoda vzorčenja je navedena v standardu ISO 707IDF 50[5].

7. POSTOPEK

7.1 **Priprava preskusnih vzorcev**

Za pripravo preskusnega vzorca uporabite eno od treh navedenih metod za ekstrakcijo mlečne maščobe.

7.1.1 *Izolacija iz masla ali maslenega olja*

Raztopite 50–100 g preskusnega vzorca pri 50 °C v vodni kopeli (5.5) ali sušilniku (5.6). V prepognjen filtrirni papir (5.12) položite 0,5–1,0 g natrijevega sulfata (4.7). Predhodno segrejte 250-mililitrsko erlenmajerico (5.10) in lijak (5.11) z vstavljenim filtrirnim papirjem v sušilniku (5.6), nastavljenem na 50 °C. Ko so predhodno segreta erlenmajerica, lijak in vstavljeni filter v sušilniku, filtrirajte maščobni sloj stopljenega masla. Zagotovite, da se ne prenese noben del seruma.

Manjši preskusni vzorec se lahko uporabi le, kadar je na voljo le omejena količina preskusnega materiala, čemur je treba prilagoditi tudi postopek. Vendar obdelava manjšega preskusnega deleža pomeni večje tveganje za nastanek nereprezentativnega vzorca.

Opomba 1: Maslo je mogoče pridobiti iz smetane z metenjem in temeljitim pranjem nastalih maslenih zrn.

Opomba 2: Mlečna maščoba, pridobljena v postopku iz točke 7.1.1, bo skoraj brez fosfolipidov.

7.1.2 *Ekstrakcija v skladu z gravimetrično Röse–Gottliebovo metodo*

Z gravimetrično metodo, opisano v standardu ISO 1211IDF 001D, ISO 2450IDF 016C ali ISO 7328IDF 116A, ekstrahirajte maščobno frakcijo iz preskusnega vzorca.

Opomba: Če so v pridobljeni mlečni maščobi prisotni fosfolipidi, se doseže holesterolni vrh, ki je povečan za približno 0,1 %. Vpliv na trigliceridno sestav, standardizirano na 100 % s holesterolom, je tako le zanemarljiv.

7.1.3 *Ekstrakcija iz mleka s silikagel kolonami*

Z mikrolitrsko pipeto (5.7) nanesite 0,7 ml preskusnega vzorca, temperiranega na 20 °C, na 1 do 3 ml kolone Extrelut (5.3). Počakajte približno 5 minut, da se vzorec enakomerno porazdeli po silikagelu.

Za denaturiranje proteinsko-lipidnih kompleksov s polnilno pipeto (5.8) v kolono Extrelut dodajte 1,5 ml metanola (4.3). Nato z 20 ml *n*-heksana (4.4) ekstrahirajte maščobno frakcijo iz preskusnega vzorca. N-heksan dodajajte počasi v majhnih količinah. Odtekajoče topilo zberite v 50-mililitrski bučki z okroglim dnom (5.9), ki ste jo pred tem osušili na konstantno, znano maso, odtehtano na 1 mg natančno in zabeleženo na 0,1 mg natančno.

Po ekstrakciji pustite, da se kolona izprazni. Topila iz eluata destilirajte v rotacijskem izparilniku (5.13) pri temperaturi vodne kopeli med 40 °C in 50 °C. Po destilaciji topil posušite in nato stehtajte bučko in njeno vsebino na 1 mg natančno, maso pa zabeležite na 0,1 mg natančno. Določite maso ostanka maščobe tako, da od ugotovljene mase odštejete maso posušene bučke.

Opomba: Ekstrakcije maščobe po Gerberju, Weibull–Berntropu ali Schmid–Bondzynski–Ratzlaffu ali izolacija mlečne maščobe z uporabo detergentov (metoda BDI) niso primerne za analizo trigliceridov, ker lahko pri teh metodah večje količine delnih gliceridov ali fosfolipidov prehajajo v maščobno fazo. Zato je uporaba tega mednarodnega standarda v zvezi z nekaterimi proizvodi omejena.

7.2 **Priprava raztopine vzorca**

Za plinsko kromatografijo s polnjeno kolono pripravite petodstotno (volumski delež) raztopino maščobe (pridobljeno v skladu s točko 7.1) v *n*-heksanu (4.4) ali *n*-heptanu (4.5). Odvisno od mer kolone uporabite koncentracijo 1 % (širši notranji premer 0,53 mm) ali manj za vbrizgavanje v kolono s kapilarno kolono.

Ob upoštevanju uporabljene kolone in mase maščobe iz 7.1.3 določite količino topila (4.4 ali 4.5), ki se doda preskusnemu materialu v bučki na podlagi tehtanja na 1 mg natančno in zapisa mase na 0,1 mg natančno. Preostanek v celoti raztopite.

Približno 1 ml raztopine vzorca prenesite v ampulo (5.14).

7.3 **Kromatografsko določanje trigliceridov**

7.3.1 *Premik bazne linije*

Za čim večjo omejitev višanja bazne linije je treba kolono kondicionirati, kot je opisano v točki 5.2.2 (kapilarna kolona) ali v Prilogi A.4 (polnjena kolona).

Opomba: Zaradi visoke temperature kolone je pri analizi trigliceridov ta zlasti občutljiva na dvig bazne linije pri velikem številu ogljikovih atomov.

7.3.2 *Tehnika vbrizgavanja*

7.3.2.1 Polnjena kolona

Da bi se izognili vplivom različnih pogojev in dosegli boljše količinske opredelitve pri trigliceridnih komponentah z visokim vreliščem, uporabite „vročo vbrizgalno tehniko“. Iglo napolnite z zrakom, tako da brizgo napolnite z raztopino maščobe. Iglo vstavite v injektor. Iglo pred vbrizganjem segrevajte približno 3 sekunde. Nato vsebino brizge hitro vbrizgajte.

7.3.2.2 Kapilarna kolona

Pri hladnem vbrizgavanju v kolono (7.3.4.2) iglo vstavite v brizgalko in takoj vbrizgajte. Čas mirovanja igre v injektorju mora biti dovolj dolg, da se prepreči širši rep vrha topila.

Opomba: Optimalni čas mirovanja je običajno približno 3 sekunde.

7.3.3 *Kalibracija*

7.3.3.1 Splošno

Za kalibracijo preskusnih vzorcev na začetku vsakega dne opravite dve ali tri analize standardizirane mlečne maščobe. Uporabite zadnjo analizo standardizirane mlečne maščobe za določitev odzivnih faktorjev, RF_{si} (masni delež/delež površine) trigliceridov in holesterola ter jih uporabite pri naslednjih preskusnih vzorcih (glej 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

kjer je:

w_{si} masni delež vsakega triglicerida ali holesterola v standardizirani mlečni maščobi, izražen v odstotkih;

A_{si} numerična vrednost površine vrha vsakega triglicerida ali holesterola v standardizirani mlečni maščobi.

Za pridobitev standardizirane mlečne maščobe z znano trigliceridno sestavo uporabite točko 7.3.3.2 ali 7.3.3.3.

7.3.3.2 Tržna standardna mlečna maščoba

Najboljši način za določitev odzivnega faktorja vsake sestavine preskusnega vzorca je uporaba standardizirane mlečne maščobe s potrjeno trigliceridno sestavo.

Opomba: Ustrezen standard je CRM 519 (brezvodna mlečna maščoba), ki ga je mogoče dobiti na Inštitutu za referenčne materiale in meritve (IRMM) iz Geela v Belgiji [1].

7.3.3.3 Laboratorijska standardna mlečna maščoba

Pripravite približno 1 g mešanice standardne maščobe (glej 4.2, ki vsebuje vsaj nasičene trigliceride, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} in C_{54} ter holesterol, poleg tega po možnosti še C_{50} in C_{52}) s tehtanjem na 1 mg natančno in zapisom mase na 0,1 mg natančno, da dobite ustrezno trigliceridno sestavo, podobno mlečni maščobi.

Raztopino mešanice standardne maščobe večkrat analizirajte v *n*-heksanu (4.4) ali *n*-heptanu (4.5) v skladu s točko 7.3.4. V enakem zaporedju večkrat analizirajte mlečno maščobo s povprečno sestavo.

Določite odzivne faktorje trigliceridov glede na mešanico standardne maščobe. Takojšnje odzivne faktorje trigliceridov, ki jih v mešanici ni, je mogoče izračunati z matematično interpolacijo. Odzivne faktorje za mlečno maščobo uporabite za ugotovitev standardizirane sestave. Tako pridobljena standardizirana mlečna maščoba je pri skladiščenju v dušiku pri najvišji temperaturi -18 °C obstojna nekaj let.

7.3.4 *Pogoji za kromatografijo*

Opomba: Uporaba polnjenih ali kapilarnih kolon običajno povzroči ločbo, podobno kot na sliki 1. Cepitev trigliceridov s sodim številom se običajno ne ugotavlja in se ji je treba izogibati.

7.3.4.1 Polnjena kolona

(a) Nastavitev temperature: Začetno temperaturo sušilnika nastavite na 210 °C in jo ohranite za 1 minuto. Nato temperaturo povečujte po stopnji 6 °C/minuto do 350 °C. To (končno) temperaturo ohranite 5 minut.

(b) Temperatura detektorja in injektorja: 370 °C.

(c) Nosilni plin: Uporabite dušik s stopnjo stalnega pretoka približno 40 ml/min. Pretok nosilnega plina nastavite tako, da se C_{54} eluira pri 341 °C.

(d) Trajanje analize: 29,3 minute.

(e) Vbrizgana količina: Vbrizgajte 0,5 µl petodstotne (volumski delež) raztopine vzorca.

[1] Primer ustreznega izdelka, ki je na voljo na tržišču. Ta informacija je navedena v korist uporabnikom tega mednarodnega standarda in ne pomeni potrditve tega izdelka.

Če se analize trigliceridov ne izvajajo, začetno temperaturo sušilnika ohranite, kot je navedeno v točki a, temperaturo detektorja in injektorja, kot je navedeno v točki b, ter stopnjo pretoka nosilnega plina na konstantni ravni, kot je navedeno v točki c, tudi čez noč, ob koncih tedna in praznikih. To zagotavlja največjo učinkovitost kolone.

7.3.4.2 Kapilarna kolona

(a) Nastavitev temperature: Začetno temperaturo sušilnika nastavite na 80 °C in jo ohranite za 0,5 minute. Nato temperaturo povečujte po stopnji 50 °C/min do 190 °C ter po tem po stopnji 6 °C/min do 350 °C. To (končno) temperaturo ohranite 5 minut.

(b) Temperatura detektorja: nastavljena pri 370 °C.

(c) Nosilni plin: uporabite dušik pri stopnji stalnega pretoka približno 3 ml/min.

(d) Trajanje analize: 34,4 min.

(e) Vbrizgana količina: Vbrizgajte 0,5 µl enoodstotne (volumski delež) raztopine vzorca.

Za čim večjo učinkovitost te nastavitve ohranite v stanju pripravljenosti (glej 7.3.4.1).

Nastavitve za analizo iz točke 7.3.4.2 so ustrezne za uporabo kolone s širšim notranjim premerom (0,53 mm), kot je določeno v točki 5.2.2. Če se uporablja kolona drugačnih mer ali drugačna faza, lahko veljajo različni pogoji.

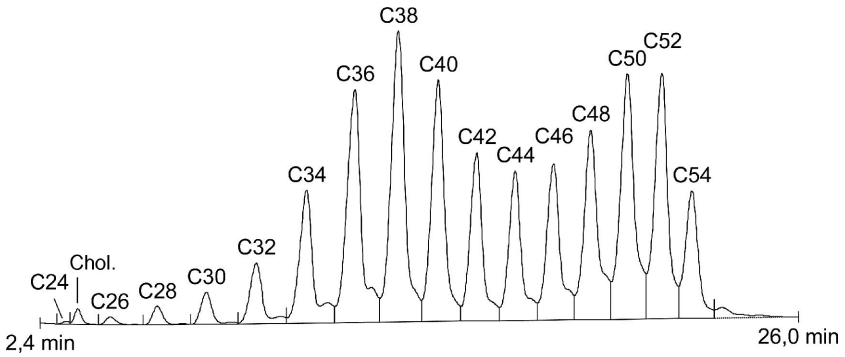
8. INTEGRACIJA, OCENA IN NADZOR UČINKOVITOSTI ANALIZ

Ocenite vrhove kromatograma s sistemom za integracijo z možnostjo risanja bazne linije in reintegracije. Slika 1 prikazuje pravilno integriran kromatogram, slika 2 pa prikazuje sporadično napako v bazni liniji, ki se konča za C_{54}, ki vpliva na odstotke vseh trigliceridov. Vseeno iz ocene izključite vrhove, ki eluirajo po C_{54}.

Trigliceride z lihim acil-c številom ($2n + 1$) združite s predhodnimi trigliceridi s sodim številom ($2n$). Ne upoštevajte nizke vsebnosti C_{56}. Odstotne deleže površine preostalih trigliceridov, vključno s holesterolom, pomnožite z ustreznimi odzivnimi faktorji standardizirane mlečne maščobe (zadnja kalibracija) ter vse skupaj normalizirajte na 100 % v skladu s točko 9.1.

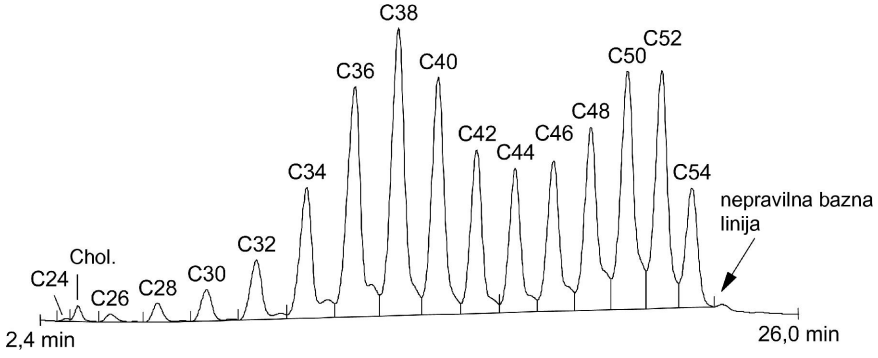
Slika 1

Primer kromatograma trigliceridov mlečne maščobe s pravilno določeno bazno linijo



Slika 2

Primer kromatograma trigliceridov mlečne maščobe z nepravilno določeno bazno linijo



Za nadzor nad pogoji merjenja primerjajte s koeficienti variacije različnih trigliceridov, izraženimi v odstotkih v tabeli 1, ki temeljijo na 19 zaporednih analizah istega vzorca mlečne maščobe.

Če so koeficienti variacije znatno višji od vrednosti iz tabele 1, kromatografski pogoji niso ustrezni.

Opomba: Vrednosti iz tabele 1 niso obvezne, ampak so samo v oporo za nadzor kakovosti.

Če se dopustijo večje vrednosti koeficientov variacije, se mejne vrednosti ponovljivosti in obnovljivosti iz klavzule 10 kljub temu upoštevajo.

Tabela 1

Koeficienti variacije vsebnosti trigliceridov (19 zaporednih analiz)

Triglicerid	Koeficient variacije %
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. IZRAČUN IN IZRAŽANJE REZULTATOV

9.1 **Sestava trigliceridov**

9.1.1 *Izračun*

Izračunajte masni delež za vsak triglicerid (za $i = C_{24}$, 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} in C_{54}) plus holesterol, w_i, izraženo v odstotkih, celotne vsebnosti trigliceridov v preskusnem vzorcu z naslednjo enačbo:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum (A_1 \times RF_{si})} \times 100 \qquad (2)$$

pri čemer je:

A_i numerična vrednost površine vrha vsakega TG v preskusnem vzorcu;

RF_{si} odzivni faktor vsakega TG, določen s kalibracijo (7.3.3).

9.1.2 *Izražanje preskusnih rezultatov*

Rezultate izrazite na dve decimalni mesti natančno.

9.2 **S-vrednosti**

9.2.1 *Izračun*

9.2.1.1 Izračunajte *S*-vrednosti, izražene v odstotkih, tako da izračunano vrednost w_i (9.1.1) ustreznih odstotkov TG vstavite v enačbe (3) do (7). Uporabite vse enačbe ne glede na vrsto predvidene tuje maščobe.

9.2.1.2 Sojino olje, sončnično olje, oljčno olje, repično olje, laneno olje, olje iz pšeničnih kalčkov, olje iz koruznih kalčkov, olje iz bombaža in ribje olje

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C5}0 \quad (3)$$

9.2.1.3 Maščobe kokosovih orehov in palmovih jedrc

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4 Palmovo olje in goveji loj

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5 Svinjska mast

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6 Skupaj

$$S = -\ 2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2 *Izražanje preskusnih rezultatov*

Rezultate izrazite na dve decimalni mesti natančno.

9.3 **Ugotavljanje tujih maščob**

Primerjajte pet *S*-vrednosti, dobljenih pri 9.2.1, z ustreznimi *S*-mejami iz tabele 2.

Preskusni vzorec šteje za čisto mlečno maščobo, če je vseh pet *S*-vrednosti v mejah iz tabele 2. Če je katera koli *S*-vrednost zunaj ustreznih mejnih vrednosti, se za vzorec šteje, da vsebuje tuje maščobe.

Čeprav so posamezne enačbe (3) do (6) občutljivejše za nekatere tuje maščobe kot skupna enačba (7) (glej tabelo B.1), po pozitivnem rezultatu iz le ene od enačb (3) do (6) ne moremo sklepati o vrsti tujih maščob.

Priloga B opisuje postopek za izračun vsebnosti rastlinskih ali živalskih maščob v potvorjeni mlečni maščobi. Ta postopek ni validiran in je le informativen.

Tabela 2

S-meje za čiste mlečne maščobe

Tuje maščobe	Enačba	*S*-meje [a]
Sojino olje, sončnično olje, oljčno olje, repično olje, laneno olje, olje iz pšeničnih kalčkov, olje iz koruznih kalčkov, olje iz bombaža, ribje olje	(3)	98,05 do 101,95
Maščobe kokosovih orehov in palmovih jedrc	(4)	99,42 do 100,58
Palmovo olje in goveji loj	(5)	95,90 do 104,10
Svinjska mast	(6)	97,96 do 102,04
Skupaj	(7)	95,68 do 104,32

[a] Izračunano z 99-odstotno zanesljivostjo, tako da se tuja maščoba navede le, če so presežene meje zaznavnosti posamezne enačbe (glej tabelo B.1).

10. NATANČNOST

10.1 **Medlaboratorijski preskus**

Vrednosti ponovljivosti in obnovljivosti so bile določene na podlagi enačb 3 do 7 s čisto mlečno maščobo in se lahko uporabljajo le za navedene matrice.

10.2 **Ponovljivost**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v istem laboratoriju pri istem izvajalcu, ki je uporabljal enako opremo, v kratkem časovnem obdobju, bo le v največ 5 % primerov presegla mejne vrednosti iz tabele 3.

Tabela 3

Meje ponovljivosti, r, za enačbe (3) do (7)

Tuje maščobe	Enačba	r %
Sojino olje, sončnično olje, oljčno olje, repično olje, laneno olje, olje iz pšeničnih kalčkov, olje iz koruznih kalčkov, olje iz bombaža, ribje olje	(3)	0,67
Maščobe kokosovih orehov in palmovih jedrc	(4)	0,12
Palmovo olje in goveji loj	(5)	1,20
Svinjska mast	(6)	0,58
Skupaj	(7)	1,49

10.3 **Obnovljivost**

Absolutna razlika med rezultatoma dveh posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v različnih laboratorijih pri različnih izvajalcih, ki so uporabljali različno opremo, bo le v največ 5 % primerov presegla mejne vrednosti iz tabele 4.

Tabela 4

Meje obnovljivosti, R, za enačbe (3) do (7)

Tuje maščobe	Enačba	R %
Sojino olje, sončnično olje, oljčno olje, repično olje, laneno olje, olje iz pšeničnih kalčkov, olje iz koruznih kalčkov, olje iz bombaža, ribje olje	(3)	1,08
Maščobe kokosovih orehov in palmovih jedrc	(4)	0,40
Palmovo olje in goveji loj	(5)	1,81
Svinjska mast	(6)	0,60
Skupaj	(7)	2,07

11. MERILNA NEGOTOVOST

S ponovljivostjo *r* in obnovljivostjo *R* je mogoče izračunati razširjeno negotovost za *S*-vrednost.

Z vključitvijo razširjene negotovosti (na podlagi dvojnih analiz) v *S*-meje iz tabele 2 dobimo razširjene *S*-meje, ki so navedene v tabeli 5.

Tabela 5

Razširjene *S*-meje za čiste mlečne maščobe, ki vključujejo razširjeno negotovost

Tuje maščobe	Enačba	Razširjene *S*-meje
Sojino olje, sončnično olje, oljčno olje, repično olje, laneno olje, olje iz pšeničnih kalčkov, olje iz koruznih kalčkov, olje iz bombaža, ribje olje	(3)	97,36 do 102,64
Maščobe kokosovih orehov in palmovih jedrc	(4)	99,14 do 100,86
Palmovo olje in goveji loj	(5)	94,77 do 105,23
Svinjska mast	(6)	97,65 do 102,35
Skupaj	(7)	94,42 do 105,58

12. POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu določa:

— vse podatke, potrebne za popolno prepoznavnost vzorca,

— uporabljeno metodo vzorčenja, če je znana,

— preskusno metodo v skladu s tem mednarodnim standardom,

— vse podrobnosti v zvezi z izvajanjem, ki niso opisane v tem mednarodnem standardu ali ne veljajo za obvezne, skupaj s podrobnostmi o vseh dogodkih, ki so morda vplivali na rezultat(-e) preskusa,

— pridobljen(-e) rezultat(-e) preskusa ter končni rezultat, če se je preverjala ponovljivost.

PRILOGA A

(normativna)

PRIPRAVA POLNJENIH KOLON

A.1 REAGENTI IN OPREMA

A.1.1 **Toluen** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2 **Dimetildiklorosilanova** raztopina [$Si(CH_3)_2Cl_2$].

50 ml dimetildiklorosilana raztopite v 283 ml toluena (A.1.1).

A.1.3 Raztopina **kakavovega masla**, z masnim deležem 5 % kakavovega masla v *n*-heksanu (4.4) ali *n*-heptanu (4.5).

A.1.4 **Stacionarna faza**, 3 % OV-1 na 125 µm do 150 µm (100 do 120 mesh) Gas ChromQ ([1])).

Opomba: Oznaka za zrno je bila spremenjena v mikrometre v skladu z BS 410 (vsi deli)[6].

A.1.5 **Steklena kolona** z notranjim premerom 2 mm in dolžino 500 mm, v obliki črke U.

A.1.6 **Naprave** za polnjenje kolon.

A.1.6.1 *Polnilna kolona* z navitimi končnimi pokrovčki in oznako, do katere se lahko kolona napolni s potrebno količino stacionarne faze.

A.1.6.2 *Drobno sito* z gostoto sita približno 100 µm, s pokrovčkom, primernim za zaprtje steklene kolone v skladu s sliko A.3.

A.1.6.3 *Silanizirana steklena volna*, deaktivirana.

A.1.6.4 *Vibrator* za enakomerno porazdelitev stacionarne faze med polnjenjem.

A.1.6.5 *Naprave za silaniziranje* steklene površine kolone.

A.1.6.6 *Woulffova steklenica*.

A.1.6.7 *Vodna črpalka*.

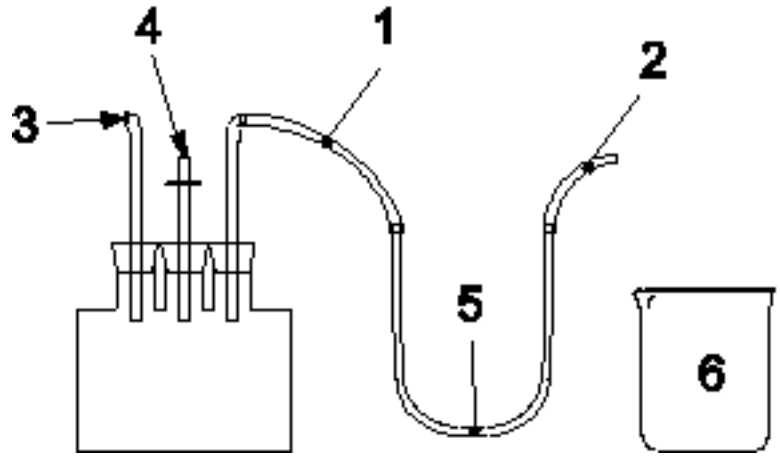
A.2 SILANIZIRANJE (DEAKTIVACIJA STEKLENE POVRŠINE)

Po priključitvi Woulffove steklenice (A.1.6.6) na vodno črpalko (A.1.6.7) cev 2 (glej sliko A.1) potopite v dimetildiklorosilanovo raztopino (A.1.2). Napolnite kolono (A.1.5) s to raztopino, tako da zaprete zaporni ventil. Ponovno odprite zaporni ventil in nato odstranite obe cevi. Kolono pritrdite na stojalo. S pipeto jo napolnite z dimetildiklorosilanovo raztopino (A.1.2).

([1]) Primer ustreznega izdelka, ki je na voljo na tržišču. Ta informacija je navedena v korist uporabnikom tega mednarodnega standarda in ne pomeni, da je ta izdelek potrdil ISO ali IDF.

Slika A.1

Priprava za silaniziranje



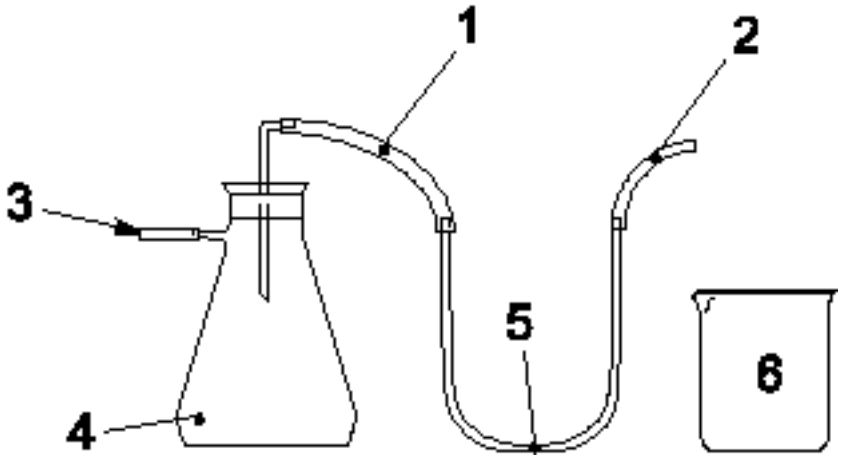
Legenda:

1 cev 1
2 cev 2
3 vodna črpalka
4 zaporni ventil
5 steklena kolona
6 dimetildiklorosilan in toluen

Kolono pustite stati 20 do 30 minut. Potem Woulffovo steklenico zamenjajte s stekleničko za filtriranje. Kolono izpraznite, tako da jo povežete z vodno črpalko (A.1.6.7) (glej sliko A.2). Sperite izpraznjeno kolono najprej s 75 ml toluena (A.1.1) in nato s 50 ml metanola (4.3), tako da cev 2 potopite v raztopino. Sprano kolono sušite v sušilniku (5.6) pri 100 °C približno 30 minut.

Slika A.1

Priprava za spiranje



Legenda:

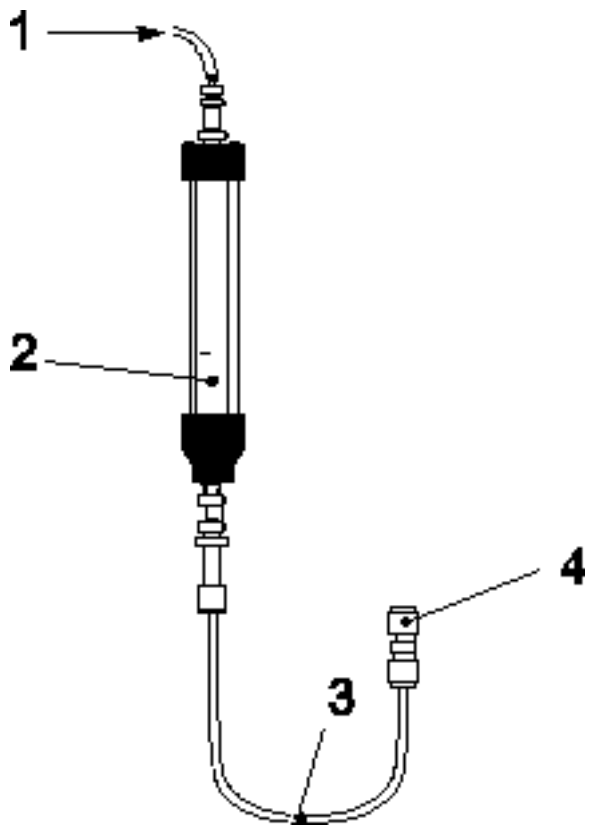
1 cev 1
2 cev 2
3 vodna črpalka
4 stekleničkа za filtriranje
5 steklena kolona
6 sredstvo za izpiranje

A.3 POLNJENJE

Kolono napolnite s pripravo, prikazano na sliki A.3. Polnilno kolono (A.1.6.1) napolnite s stacionarno fazo (A.1.4) do oznake. Spodnji del steklene kolone, ki jo boste napolnili, zaprite s približno 1 cm dolgim čepom iz silanizirane stisnjene steklene volne (A.1.6.3). Konec kolone zaprite z drobnim sitom (A.1.6.2).

Slika A.2

Polnjenje steklene kolone



Legenda:

1 dovod dušika

2 polnilna kolona, ki se z OV-1 napolni do oznake

3 steklena kolona, ki jo je treba napolniti

4 pokrovček s filtrom, ob katerega so pritisnjena steklena vlakna in stacionarna faza

Kolono pod tlakom napolnite s stacionarno fazo (300 kPa in tok dušika). Da se steklena kolona homogeno, enakomerno in trdno napolni, se po njej med polnjenjem vzdolžno premika vibrator. Po polnjenju v drugi konec polnjene kolone potisnite trden čep iz silanizirane steklene volne (A.1.6.3). Odrežite štrleče dele. Čep z lopatico potisnite nekaj milimetrov v kolono.

A.4 KONDICIONIRANJE

Med koraki (a) do (c) naj zadnji del kolone ne bo povezan z detektorjem, da se prepreči kontaminacija. Kondicionirajte polnjeno kolono (A.3) na naslednji način:

(a) kolono 15 minut izpirajte z dušikom, pri čemer je hitrost pretoka 40 ml/min in sušilnik GC nastavljen na 50 °C;

(b) segrejte kolono na stopnji 1 °C/min do 355 °C pri stopnji pretoka dušika 10 ml/min;

(c) kolono hranite pri 355 °C od 12 h do 15 h;

(d) vbrizgajte dvakrat po 1 µl raztopine kakavovega masla (A.1.3), pri čemer uporabite enake temperature kot pri polnjeni koloni, navedene pod 7.3.4.1;

Opomba: Kakavovo maslo je skoraj izključno sestavljeno iz trigliceridov C_{50} do C_{54} z visokim vreliščem, zato je kondicioniranje kolone v zvezi z ustreznimi odzivnimi faktorji enostavnejše.

(e) 20-krat vbrizgajte po 0,5 µl raztopine mlečne maščobe v skladu s točko 7.2 v dveh do treh dneh na podlagi določil za polnjeno kolono iz 7.3.4.1.

— Za analizo preskusnih vzorcev porabite le kolone z odzivnimi faktorji blizu 1. Odzivni faktorji ne smejo biti višji od 1,20.

PRILOGA B

(informativna)

KOLIČINSKA OPREDELITEV VSEBNOSTI TUJE MAŠČOBE

B.1 SPLOŠNO

Tabela B.1 prikazuje meje zaznavnosti za različne tuje maščobe, izračunane z 99-odstotno stopnjo zanesljivosti. Srednji stolpec prikazuje meje zaznavnosti posameznih enačb (3) do (6) z najboljšimi rezultati.

Meje zaznavnosti skupne enačbe (7), prikazane v skrajnem desnem stolpcu, so nekoliko višje. Enačba (7) se na splošno potrebuje le za količinsko opredelitev tujih maščob.

Z vsemi enačbami se lahko ugotavljajo tudi kombinacije različnih tujih maščob. Variacije trigliceridne sestave posameznih vzorcev iste vrste tuje maščobe ne vplivajo pomembno na meje zaznavnosti.

Če uporabimo posamezne enačbe in skupno enačbo, se uporabljajo meje zaznavnosti posameznih enačb. Vendar je za količinsko opredelitev v nekaterih primerih potrebna *S*-vrednost skupne enačbe (B.2).

Tabela B.1

99-odstotne meje zaznavnosti tujih maščob, dodanih mlečni maščobi, v odstotkih

Tuje maščobe	Posamezna enačba %	Skupna enačba %
Sojino olje	2,1	4,4
Sončnično olje	2,3	4,8
Oljčno olje	2,4	4,7
Kokosovo olje	3,5	4,3
Palmovo olje	4,4	4,7
Maščobe palmovih jedrc	4,6	5,9
Repično olje	2,0	4,4
Laneno olje	2,0	4,0
Olje iz pšeničnih kalčkov	2,7	6,4
Olje iz koruznih kalčkov	2,2	4,5
Olje iz bombaža	3,3	4,4
Svinjska mast	2,7	4,7
Goveji loj	5,2	5,4
Hidrogenirano ribje olje	5,4	6,1

B.2 IZRAČUN

Vsebnost tujih maščob opredelite le, če je presežena najmanj ena od *S*-mej (tabela 2 ali tabela 5). Za pridobitev količinskih podatkov izračunajte masni delež tujih maščob ali masni delež mešanice tujih maščob w_f, izražen v odstotkih, v preskusnem vzorcu z naslednjo enačbo:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (B.1)$$

pri čemer je:

S je rezultat, ki ga dobimo, če podatke o trigliceridih iz mlečne maščobe, ki ji je bila dodana tuja maščoba ali mešanica tujih maščob, vstavimo v eno od enačb (3) do (7);

S_f je konstanta, odvisna od vrste dodane tuje maščobe.

Če vrsta tuje maščobe, dodane mlečni maščobi, ni znana, uporabite splošno S_f-vrednost 7,46 (tabela B.2). Vedno uporabite *S*-vrednost, dobljeno iz enačbe (7), tudi če njene *S*-meje niso presežene, vendar so presežene meje iz druge enačbe.

Pri znanih tujih maščobah v enačbo (B.1) vstavite njihove posamezne S_f-vrednosti (tabela B.2). Da izračunate *S*, iz enačb (3) do (6) izberite ustrezno enačbo za tuje maščobe.

Tabela B.2

S_f-vrednosti različnih tujih maščob

Tuje maščobe	S_f
Ni znana	7,46
Sojino olje	8,18
Sončnično olje	9,43
Oljčno olje	12,75
Kokosovo olje	118,13
Palmovo olje	7,55
Maščobe palmovih jedrc	112,32
Repično olje	3,30
Laneno olje	4,44
Olje iz pšeničnih kalčkov	27,45
Olje iz koruznih kalčkov	9,29
Olje iz bombaža	41,18
Svinjska mast	177,55
Goveji loj	17,56
Ribje olje	64,12

B.3 IZRAŽANJE PRESKUSNIH REZULTATOV

Preskusne rezultate izrazite na dve decimalni mesti natančno.

Literatura

1. Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, str. 82–85.
2. Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, str. 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, str. 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, str. 791–797.
5. ISO 707IDF 50, Mleko in mlečni proizvodi – navodila za vzorčenje.
6. BS 410:1988, Preskusna sita – Tehnične zahteve in preskušanje.
7. Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber., 43, 1991, str. 219–242.
8. Precht, D., „Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses“, Fat Sci. Technol., 93, 1991, str. 538–544.
9. DIN 10336:1994, Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse [Ugotavljanje in določitev tujih maščob v mlečni maščobi s plinsko kromatografsko analizo trigliceridov].
10. Komisija Evropskih skupnosti: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Dokumenti št. 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, str. 505–510.

PRILOGA XXI

(Člen 18)

POSTOPEK PRI SPORNIH REZULTATIH ANALIZ (KEMIČNA ANALIZA)

1. Na zahtevo proizvajalca se v drugem laboratoriju, ki ga odobri pristojni organ, izvede dodatna analiza z ustrezno metodo, če so na voljo zapečatene kopije vzorcev proizvoda, ki jih ustrezno hranijo pristojni organi. Zahteva se izrazi v sedmih delovnih dneh po objavi rezultatov prve analize. Analiza se izvede v 21 delovnih dneh po prejemu zahtevka. Pristojni organ pošlje te vzorce drugemu laboratoriju na zahtevo in stroške proizvajalca. Laboratorij mora biti pooblaščen za izvajanje uradnih analiz in mora biti preverjeno usposobljen za zadevne analize.

2. Razširjene negotovosti ($k = 2$) povprečja $\bar{y}_1$ ponovljenih meritev n_1 v laboratoriju 1 in povprečja $\bar{y}_2$ ponovljenih meritev n_2 v laboratoriju 2 so

3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ in $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$, če je σ_r standardni odmik ponovljivosti in σ_R standardni odmik obnovljivosti ustrezne metode. Če se končni rezultat *y* merjenja v laboratorijih izračuna s formulo v obliki $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ ali $y = x_1/x_2$, je treba uporabiti običajne postopke za združevanje standardnih odmikov v takšnih primerih, da se dobi negotovost.

4. Da se preveri, ali so rezultati dveh laboratorijev skladni s standardnim odmikom obnovljivosti σ_R metode, se razširjena negotovost razlike $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$ izračuna:

5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Če absolutna vrednost razlike laboratorijskih povprečij $\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right|$ ni večja kot njena negotovost $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

   $$\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

   sta rezultata dveh laboratorijev skladna s standardnim odmikom obnovljivosti σ_r, aritmetična sredina povprečij dveh laboratorijev

   $$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2}$$

   pa se objavi kot končni rezultat. Razširjena negotovost je

   $$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

   Pošiljka se zavrne kot neskladna z zgornjo pravno omejitvijo *UL*, če je

   $$\bar{y} - U_{\bar{y}} > \mathrm{UL};$$

   sicer se sprejme kot skladna z *UL*.

   Pošiljka se zavrne kot neskladna s spodnjo pravno omejitvijo *LL*, če je

   $$\bar{y} - U_{\bar{y}} < \mathrm{LL};$$

   sicer se sprejme kot skladna z *LL*.

   Če je absolutna vrednost razlike laboratorijskih povprečij $\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right|$ večja kot njena negotovost $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

   $$\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

rezultata dveh laboratorijev nista skladna s standardnim odmikom obnovljivosti.

V tem primeru se pošiljka zavrne kot neskladna, če druga analiza potrdi prvo. V nasprotnem primeru se pošiljka sprejme kot skladna.

Končni rezultat mora pristojni organ čim prej sporočiti proizvajalcu. Če se pošiljka zavrne, mora stroške druge analize kriti proizvajalec.

PRILOGA XXII

KORELACIJSKA TABELA

Uredba (ES) št. 213/2001	Ta uredba
Člen 1	Člen 1
Člen 2	Člen 1
Člen 3	Člen 2
—	Člen 3
Člen 4	—
Člen 5	—
Člen 6	Člen 4
Člen 7	Člen 18
Člen 8	—
Člen 9	Člen 5
Člen 10	Člen 6
Člen 11	Člen 7
Člen 12	Člen 8
Člen 13	Člen 9
Člen 14	Člen 10
Člen 15	Člen 11
Člen 16	Člen 12
Člen 17	Člen 13
—	Člen 14
Člen 18	Člen 15
Člen 19	Člen 16
	Člen 17
	Člen 19
Člen 20	—
Člen 21	—
Člen 22	Člen 20
Člen 23	Člen 21