

PRZYDATNOŚĆ WYBRANEJ MATRYCY TŁUSZCZOWEJ JAKO WEWNĘTRZNEGO MATERIAŁU ODNIESIENIA W BADANIACH ZAWARTOŚCI FAZY STAŁEJ ZA POMOCĄ NMR

Małgorzata Jerzewska, Magdalena Ropelewska, Stanisław Ptasznik

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego

Oddział Technologii Mięsa i Tłuszczu

04-190 Warszawa, ul. Jubilerska 4

Streszczenie

Zawartość SFC w próbkach tłuszczowych jest wartością dynamiczną, zmienną w czasie, zależną od temperatury pomiaru i historii próbki oraz wielu innych czynników, a w związku z tym uzyskanie certyfikowanych próbek wzorcowych, bądź trwałych materiałów odniesienia, czy też ilościowe fortyfikowanie materiału analitycznego „fabrycznymi wzorcami” uniemożliwia określenie takich parametrów walidacyjnych, jak obciążenie oraz odzysk metody. Posługując się standardem [PN-EN ISO 8292: 1999], wystarczające było potwierdzenie spełnienia warunków metody i porównanie ich z wymaganiami normy. Taka niepełna walidacja jest też zgodna z postanowieniami normy PN-EN ISO/IEC 17025 [2001] i do jej przeprowadzenia mógł posłużyć sporządzony we własnym zakresie wzorzec próbki tłuszczów.

Producent - poza wzorcami kalibracyjnymi, ani też żaden inny ośrodek, nie rozprowadza certyfikowanych materiałów wzorcowych – stąd do celów walidacji i sprawdzania poprawności wyników wytypowano własny materiał wewnętrznego odniesienia: uwodorniony olej rzepakowy o t_f 36°C, przechowywany w małych porcjach (10 ml) w zamrażarce (ok. 20 °C).

Dla potrzeb walidacji i szacowania niepewności wyników pomiarów z 6 lat (2005- 2010) posłużono się programem komputerowym ProWL-3 [PROLAB 2002].

Słowa kluczowe: faza stała, NMR, materiał odniesienia, uwodorniony olej rzepakowy, niepełna walidacja

USEFULNESS OF SELECTED FAT MATRIX AS REFERENCE SAMPLE IN EXAMINATION OF SOLID FAT CONTENT BY NMR METHOD

Summary

The SFC content in fat samples is dynamic value, changeable in the time, dependent from tempering and history of sample and many different factors, so receiving of the certified referenced samples or fortification by factory standards is impossible. Hence determining of the proper parameters of validation such as “load” and “regain” of the method is not easy. On the base of the European Standards in form of EN ISO 8292 [1999], the incomplete validation was realized by the comparison the intention of this standard.

This kind of validation is compatible with PN-EN ISO/IEC 17025 [2001] too, and allows to select own reference material; in our laboratory – the hydrogenated rapeseed oil of 36°C melting point, in the portions of 10 ml and stored in the freezer about -20°C - was taken.

The results obtained between 2005-2010 were calculated with ProWL-3 computer programme [PROLAB 2002].

Key words: solid fat content, NMR, certified referenced material, hydrogenated rapeseed oil, incomplete validation

WPROWADZENIE

Ocena zjawiska krystalizacji tłuszczów za pomocą pomiaru zawartości fazy stałej (*ang. Solid Fat Content - SFC*) jest ważnym czynnikiem analizy w laboratoriach przemysłu tłuszczowego [Chapman, Richards, Yorke 1960, Ghotra, Dyal, Narine 2002, El Khaloui, Rutledge, Ducauze 2006]. Temu celowi służy dobrze poznana metoda oznaczania SFC w olejach i tłuszczach roślinnych oraz zwierzęcych z zastosowaniem niskorozdzielczego pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang. Nuclear Magnetic Resonance - NMR*) [Van Putte, Van den Enden 1974, Czajkowski 1995, Van Putte 2003, Pawłowicz 2003a,b]. Określenie zawartości SFC w różnorodnych rodzajach tłuszczów ułatwia oszacowanie ich jakości i przydatności, między innymi do celów technologicznych [Ropelewska, Ptasznik, Jerzewska 2004].

Analitycznym narzędziem, umożliwiającym realizację mierzenia sygnału magnetycznego pochodzącego od protonów z fazy stałej i ciekłej tłuszczu z automatycznym wyliczeniem oraz wyświetleniem zawartości fazy stałej w próbce tłuszczu - są różnego typu spektrometry NMR.

Prezentowana publikacja nawiązuje do wcześniejszego artykułu [Jerzewska 2006]. W wymiarze praktycznym szukano potwierdzenia przydatności normalizowanej na przestrzeni lat metody oznaczania SFC [IUPAC Méthod 2.150:1979, AOCS Cd 16-81:1983, ISO 8992:1991, AOCS Cd 16b-93:1997, PN-EN ISO 8292:1999, ISO TC 34/SC 11 N 943:2006,], a także ostatnio znowelizowanego standardu [PN-EN ISO 8292-1:2010] – do stosowania w warunkach instytutowego laboratorium na niskorozdzielczym pulsacyjnym spektrometrze NMR „Minispec mq20” firmy Bruker.

Uważa się, iż zawartość SFC w próbkach tłuszczowych jest wartością dynamiczną, zmienną w czasie, zależną od temperatury pomiaru i historii próbki oraz wielu innych czynników, a w związku z tym uzyskanie certyfikowanych próbek wzorcowych, bądź trwałych materiałów odniesienia, czy też ilościowe fortyfikowanie materiału analitycznego „fabrycznymi wzorcami” nie jest możliwe [Herrera, de Leon Gatti, Hartel 1999, Materiały Bruker Optik GMBH 2002, Keeler 2005]. Dlatego też nie daje się jednoznacznie określić istotnych dla procesu właściwej walidacji takich parametrów, jak obciążenie oraz odzysk metody [Cozel-Kasperek 2005], a w konsekwencji laboratoria nie uczestniczą w badaniach międzylaboratoryjnych. Ponieważ jednak metoda jest od wielu lat znormalizowana – w naszym przypadku, posługując się normą PN-EN ISO 8292 [1999], wystarczające było potwierdzenie spełnienia warunków metody i porównanie ich z wymaganiami normy [Paślawski 2006]. Taka niepełna walidacja jest też zgodna z postanowieniami normy PN-EN ISO/IEC 17025 [2001] i do jej przeprowadzenia mógł posłużyć sporządzony we własnym zakresie wzorzec próbki tłuszczów.

Dla potrzeb walidacji i szacowania niepewności wyników pomiarów posłużono się programem komputerowym ProWL-3 [PROLAB 2002, 2003].

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Istotnym elementem pracy aparatu i samej analizy są certyfikowane wzorce charakteryzujące stosunek fazy ciekłej do stałej oraz zawierające ciekły olej mineralny z różnym dodatkiem fazy stałej w postaci przezroczystego polimeru polimetylmetakrylatu [Bruker Optik GMBH, 2006, minispec Calibration Samples – Certificate issued for IPMiT, Warszawa].

„Minispec mq20”, skalibrowany za pomocą certyfikowanych standardów będzie zawsze wykazywać prawidłową wartość SFC, pod warunkiem, że próbki wzorców są rekomendowane przez producenta zgodnie z oficjalną metodą oznaczania SFC. W praktyce, skalibrowanie aparatu przed przystąpieniem do pracy dokonuje się 3-ma wzorcami,

z określoną zawartością fazy stałej, nie ulegającą zmianie podczas pomiaru w całym wybranym zakresie temperatur i kształtującą się na poziomie bliskim 0%, około 30% oraz około 70%. Gwarantowana ważność wzorców fabrycznych, potwierdzających sprawność techniczną aparatu, wynosi 2 lata i po tym czasie powinny być zrekalibrowane przez dostawcę lub wymienione na nowe.

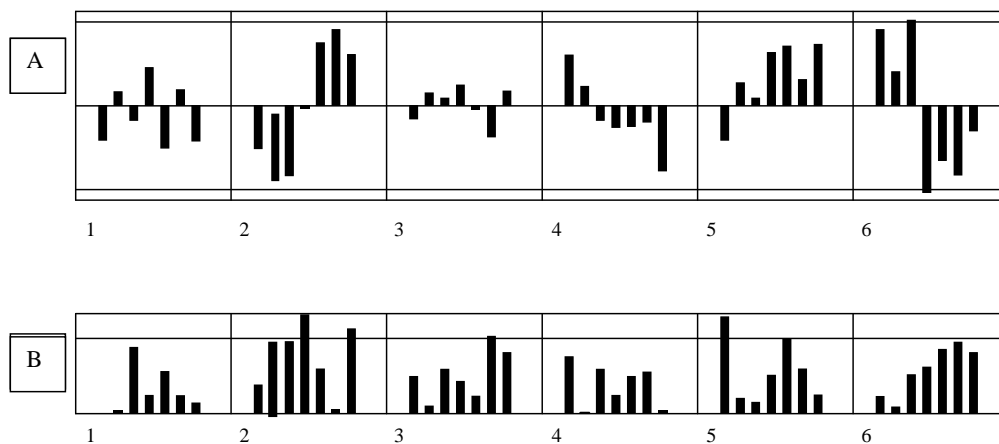
Ponieważ producent poza wzorcami kalibracyjnymi, ani też żaden inny ośrodek, nie rozprowadza certyfikowanych materiałów wzorcowych – do celów walidacji i sprawdzania poprawności wyników w roku 2005, spośród wcześniej badanych matryc [Jerzewska 2006] wytypowano własny materiał wewnętrznego odniesienia - uwodorniony olej rzepakowy o temperaturze topnienia (t_t) 36°C, przechowywany w małych porcjach (10 ml) w zamrażarce (ok. 20 °C). Procedurę analityczną prowadzono wg PN-EN ISO 8292 [1999]. Sprawdzanie zawartości SFC w powyższych próbkach odbywało się co najmniej raz na pół roku i przed badaniem prób nadesłanych przez zleceniodawców zewnętrznych.

WYNIKI

Jednym z podstawowych warunków uzyskania certyfikatu na daną metodę jest uczestnictwo w badaniach walidacyjnych na materiałach certyfikowanych, bądź w przypadku ich braku - odpowiednich materiałach odniesienia. Sprawdzeniu tej możliwości posłużyły zaprezentowane badania, w których starano się określić przydatność i trwałość wytypowanego wzorca.

Obiektywnym potwierdzeniem spełnienia wymogów metody analitycznej w rozumieniu pojęcia walidacji jest dokładność pomiaru, czyli precyzja wyrażana przez powtarzalność i odtwarzalność metody (precyzja pośrednia). Obie te wartości wpływają na wielkość niepewności pomiaru, którą można zdefiniować jako cechę charakteryzującą rozrzut wartości. W przypadku przeprowadzanej przez nas niepełnej walidacji, bez możliwości sprawdzenia obciążenia oraz odzysku metody – uzyskujemy tzw. niepewność rozszerzoną (U) [Cozel-Kasperek 2005, Paślowski 2006].

Wyniki walidacyjne osiągnięte w roku 2005, [Jerzewska 2006], zgodne z powyższym stwierdzeniem – dla przypomnienia przedstawia Rysunek 1 i Tabela 1.



Rysunek. 1. Histogramy statystyki Mandel'a uzyskane w badaniach walidacyjnych IPMiT (2005) w cyklu - 6 dni/7 poziomów temperatur - dla próbki uwodornionego rzepaku 36°C: A - statystyka h (dla średnich) i B - statystyka k (dla odchylenia standardowego) [PROLAB 2002, 2003].

Mandel's histogrammes of validation obtained in IPMiT (2005) in cycle - 6 days/7 levels of temperatures – for hardened rapeseed oil of 36°C: A - h statistics (for means) and B - k statistics (for standard deviation) [PROLAB 2002, 2003].

Przedstawione histogramy ilustrują wybrane parametry precyzji metody (wartości średniej zawartości SFC „A” i odchylenie standardowe „B”) dla wytypowanej matrycy tłuszczowej, które w 6-cio dniowym cyklu pomiarowym nie wykazały istotnych różnic w średniej zawartości SFC. Wahania zawartości SFC w poszczególnych temperaturach (w postaci „słupków”) widoczne na histogramie A i B nie powodowały przekroczeń przedziałów ufności (linie zewnętrzne histogramów).

Tabela 1. Zbiorcze wyniki oceny statystycznej zawartości SFC w przeprowadzonych badaniach walidacyjnych w IPMiT w roku 2005 (metoda bezpośrednia, typ temperowania szeregowy, w różnych temperaturach [°C]) dla rzepaku utwardzonego 36°C (zwykła procedura wstępnej obróbki cieplnej jak dla większości olejów i tłuszczów roślinnych i zwierzęcych).

Comprehensive results of statistical estimation of SFC of validation obtained in IPMiT in 2005y. (direct method, series type of tempering, in different temperatures [°C]) for hardened rapeseed oil of 36°C (common procedure of initial treatment for animal and vegetable fats).

Składowe precyzji metody <i>Component of precision method</i>	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°
Liczba przeprowadzonych oznaczeń <i>Number of estimations</i>	12	12	12	12	12	12	12
Srednia ogólna, m, % <i>Mean, m, %</i>	81,27	71,88	55,20	35,63	14,33	3,55	0,17
Odchylenie standardowe powtarzalności, sr <i>Standard deviation of repeatability, sr</i>	0,125	0,053	0,064	0,176	0,143	0,129	0,134
Granice powtarzalności, r <i>Limits of repeatability, r</i>	0,349	0,150	0,180	0,492	0,401	0,334	0,375
Współczynnik zmienności powtarzalności, % sr <i>Coefficient of repeatability variation, % sr</i>	0,153	0,075	0,116	0,493	0,999	3,37	17,2
Odchylenie standardowe odtwarzalności, sR <i>Standard deviation of reproduceability, sR</i>	0,125	0,054	0,064	0,176	0,174	0,192	0,134
Granice odtwarzalności, R <i>Limits of reproduceability, R</i>	0,349	0,151	0,180	0,492	0,487	0,537	0,375
Współczynnik zmienności odtwarzalności, % sR <i>Coefficient of reproduceability variation, % R</i>	0,153	0,075	0,116	0,493	1,21	5,40	17,2
Niepewność rozszerzona U,% <i>Uncertainty spreaded U, %</i>	0,25	0,11	0,13	0,36	0,35	0,39	0,27

Wyniki zbiorcze statystycznej analizy badanego materiału (Tabela 1) odniesione do rozrzutu wartości dla całego zakresu SFC, mierzonego rozszerzoną niepewnością U – nie przekroczyły danych zamieszczonych w normie PN-EN ISO 8292 [1999], dając podstawy do uznania prawidłowości przebiegu walidacji w roku 2005. Spełniają one tym samym zalecenia z Tabeli 2, gdzie zacytowano parametry oceny statystycznej z badań międzylaboratoryjnych, podanych w powyższej normie oryginalnej.

Tabela 2. Ocena statystyczna wyników badań międzylaboratoryjnych (dane z oryginalnej normy PN-EN ISO 8292: wrzesień 1999, rozdz. 11.2).

Statistical estimation of interlaboratorial tests (data from original standard PN-EN ISO 8292: September 1999, ch. 11.2).

Zawartość fazy stałej % (m/m) <i>Solid Fat Content</i>	Powtarzalność/ <i>Repeatability</i>		Odtwarzalność/ <i>Reproduceability</i>	
	Bezwzględna %	Względna %	Bezwzględna %	Względna %
	<i>Absolute</i>	<i>Relative</i>	<i>Absolute</i>	<i>Relative</i>
10	1,0	10	1,8	18
30	1,3	4,3	2,8	9,3
50	1,6	3,2	3,8	7,6
60	1,8	2,7	4,8	6,9

Uwaga – tłuszczami użytymi w badaniach międzylaboratoryjnych były: olej rybi, olej palmowy, smalec i margaryna. Żaden z tych tłuszczów nie wykazywał polimorfizmu.
Attention – the used fats in interlaboratory tests were: fish oil, palm oil, lard and margarine. None of these fats did not show the polymorphism.

Przyjmując, iż powtarzalność względna (błąd względny), czyli odchylenie standardowe powtarzalności s_r oraz odtwarzalność (czyli odchylenie standardowe odtwarzalności s_R), która odpowiada wartości niepewności rozszerzonej (czyli podwójnemu błędowi bezwzględnyemu) - można stwierdzić, iż powtarzalność oraz odtwarzalność (precyzja pośrednia) uzyskane w badaniach walidacyjnych są zgodne z omawianą normą [Paślawski 2006].

Podobnie, stosując powyższe kryteria z Tabeli 2 (dane z normy PN-EN ISO 8292:1999) można zinterpretować wyniki analiz SFC na wybranej matrycy dokonanych w kolejnych latach.

Tabela 3. Szacowanie niepewności dla materiału wewnętrznego wg normy PN EN-ISO 8292 na podstawie 2-ch okresów badań SFC: 6.02.2008 i 27.06.2008 dla zakresu > 50% i > 60%.

Estimation of uncertainty for internal material according to PN EN-ISO 8292 standard on the base of two seasons of SFC analysis: 6.02.2008 and 27.06.2008 for range > 50% and > 60%.

Zawartość fazy stałej (SFC) w wytypowanym uwodornionym oleju rzepakowym (tt 36°C). <i>SFC content in selected hardened rapeseed oil (36°C).</i>		
Nr oznaczenia <i>No estimation</i>	> 50% SFC	> 60% SFC
1.	55,3	77,9
2.	55,2	77,8
3.	50,8	78,1
4.	51,8	78,3
Suma <i>Total</i>	213,1	312,0
Średnia <i>Mean</i>	53,285	78,1
Błąd bezwzględny <i>Absolute error</i>	2,8	0,4
Niepewność <i>U</i> <i>Uncertainty U</i>	5,6	0,7
Zgodność z normą <i>Conformity</i>	zgodne (<i>U=7,6%</i>) <i>conform</i>	zgodne (<i>U=6,9%</i>) <i>conform</i>

Wyniki niepewności *U* prezentowane w Tabeli 3, uzyskane z dwóch niezależnych badań własnego materiału odniesienia dla zawartości 50% i 60% SFC na przestrzeni roku 2008 są tego potwierdzeniem (ostatnia kolumna Tabeli 2). Wynoszą one odpowiednio 5,6% dla zawartości około 50% SFC (w normie nie powinny przekraczać 7,6%) oraz 0,7% w przypadku zawartości SFC wyższej od 60% – co przy wartości z cytowanej normy, równej 6,9% jest bardzo dobrym wynikiem.

W związku z powyższym przygotowany materiał odniesienia w postaci próbek uwodornionego oleju rzepakowego o *tt* równej 36°C okazał się na tyle wartościowym wzorcem wewnętrznym, iż jego dalsze testowanie w badaniach laboratoryjnych na aparacie NMR było jak najbardziej celowe.

Dowodem tego są zbiorcze dane zamieszczone w Tabeli 4, dotyczące wyników z lat 2006-2010. Wartość średniej ogólnej zawartości SFC liczona dla tak długiego okresu badań tego materiału ciągle spełniała zalecenia przewidziane normą PN-EN ISO 8292 [1999] pod postacią niepewności U . Przy czym – im niższa jest zawartość fazy stałej wywołana podwyższaniem temperatury, czyli zjawiskiem topienia się tłuszczu, tym wartość niepewności staje się niższa i kryteria przewidziane normą są lepiej spełnione (ostatnia kolumna Tabeli 2). Świadczy to o dużej stabilności budowy krystalicznej użytego tłuszczu, który przechowywany w odpowiednio niskich warunkach temperaturowych dobrze spełnia rolę wewnętrznego materiału odniesienia w badaniach zmian zawartości SFC.

Tabela 4. Wyniki porównawcze materiału wewnętrznego odniesienia z lat 2006-2010. Odtwarzalność (dane z 7-miu analiz z różnych dni na przestrzeni 5ciu lat w 2-ch powtórzeniach dla 8-miu poziomów temperatury).
Comparative results of internal material from 2006-2010 vs. Reproduceability (data from 7 analysis' from different days by 5 years in two repetitions for 8 levels of temperature).

Temp. pomiaru, °C <i>Temp.of meas. °C</i>	Wartości średniej ogólnej <i>Value of total mean</i>	
	Zawart. fazy stałej, (%) <i>SFC content</i>	Niepewność wyniku U <i>Uncertainty U</i>
	n=8	
10	77,60	5,2
15	67,50	8,5
20	51,67	7,8
25	32,18	8,0
30	14,72	0,94
35	4,07	1,7
40	1,02	0,97
45	0,30	0,62

W powiązaniu z Tabelą 4 zamieszczono wycinkowe dane z programu liczącego ProWL-3 [Prolab 2002] w postaci składowych precyzji metody dla badanego materiału odniesienia – rubryki Tabeli 5. Wykorzystano tu wybrane elementy z eksperymentu walidacyjnego, jaki na podstawie własnych wprowadzonych danych drukuje ten program.

Tabela 5. Wybrane elementy sprawozdania z eksperymentu walidacyjnego (ProWL-3) zawartości fazy stałej metodą NMR dla porównania wewnętrznego materiału odniesienia z 5ciu lat (2006-2010).

Selected elements of validation experiment (ProWL-3) of SFC content by NMR method for interial material by 5 years of estimation (2006-2010).

	Lista serii (kolejne dni) <i>List of days</i>	Liczba poziomów 8 - temperatura [°C] <i>Number of levels 8-</i> temperatura [°C]			Liczba powtórzeń <i>Number of</i> <i>repetitions</i>	
	1 dzień/day 14.09.06	10,15,20,25,30,35, 40,45			2	
	2 dzień/ day 19.12.06					
	3 dzień/ day 6.02. 08					
	4 dzień/ day 27.06.08					
	5 dzień/ day 24.04.09					
	6 dzień/ day 9.02.10a					
	7 dzień/ day 9.02.10b					
	Poziom (temp.°C) <i>Level (temp.)</i>	10.	15.	20	25.	30.
	Poziom (temp.°C) <i>Level (temp.)</i>	35.	40.	45.		
	Średnia ogólna (m) <i>Total mean (m)</i>	77.603	67.502	51.671	32.187	14.722
	Średnia ogólna (m) <i>Total mean (m)</i>	4.069	1.015	0.301		
Precyzja/Precision						
Odchylenia standardowe powtarzalności (sr), granica powtarzalności (r) i współczynnik zmienności (%sr): <i>Standard deviation of repeatability (sr), limit of repeatability (r) and coefficient of repeatab. variation(%s</i>						
	sr	0.796	2.337	0.797	0.657	0.348
	sr	0.196	0.396	0.212		
	r	2.230	6.544	2.231	1.838	0.975
	r	0.549	1.110	0.592		
	%sr	1.03	3.46	1.54	2.04	2.37
	%sr	4.82	39.1	70.2		
Odchylenie standardowe odtwarzalność (sI), granica precyzji pośredniej (I) i współczynnik zmienności (%s <i>Standard deviation of reproduceability (sI), limit of indirect reproduceab. (I) and coeff. of reproduc. var.(%</i>						
	sI	2.592	4.250	3.885	3.982	0.469
	sI	0.831	0.484	0.310		
	I	7.258	11.899	10.877	11.149	1.314
	I	2.326	1.355	0.867		
	%sI	3.34	6.30	7.52	12.4	3.19
	%sI	20.4	47.7	103		
Niepewność pomiaru/ Uncertainty of measurement						
Rozszerzona (U) niepewność pomiaru/ <i>Uncertainty spreaded (U)</i> (dla współczynnika rozszerzenia k=2 i liczby uśrednianych powtórzeń równej 1)						
	U	5.2	8.5	7.8	8.0	0.94
	U	1.7	0.97	0.62		

W sytuacji, gdy żaden z europejskich ośrodków rozprawdzających certyfikowane materiały nie oferuje wzorców dla oznaczeń SFC - dysponowanie własną matrycą spełniającą takie zadanie, pozwala udokumentować możliwości aparaturowe i kompetencje techniczne laboratorium. Przeprowadzone badania w pełni potwierdziły użyteczność wytypowanego materiału wewnętrznego odniesienia w postaci uwodornionego oleju rzepakowego o temperaturze topnienia 36°C do wykonywania akredytowanych analiz w zakresie oznaczeń zawartości fazy stałej w olejach i tłuszczach metodą NMR.

WNIOSKI

- Sposób przygotowania materiału odniesienia i wybrane parametry przeprowadzenia eksperymentu niepełnej walidacji metody spełniają wymagania normy PN-EN ISO 8292:1999 oraz PN-EN ISO/IEC 17025:2001.
- Określoną w pracy precyzję i niepewność wyników należy uznać za zadawalającą i spełniającą wymagania normy PN-EN ISO 8292, a sama metoda jest bardzo dobrym narzędziem pracy przy oznaczaniu SFC.
- Zastosowanie programu komputerowego ProWL-3 do przeprowadzenia testów statystycznych ułatwiło ocenę wyników procesu walidacyjnego metody.
- Wybrany do badań uwodorniony olej rzepakowy o t_f 36°C dobrze spełnia zadanie jako wewnętrzny materiał odniesienia. Przechowywany w małych porcjach (10 ml) w zamrażarce (ok. 20°C) już od 6 lat zapewnia poprawne wyniki walidacji metody oznaczania zawartości fazy stałej według europejskiego standardu.
- Całościowe wyniki przeprowadzenia eksperymentu walidacyjnego oznaczania zawartości fazy stałej metodą NMR były podstawą do uzyskania statusu metody akredytowanej przez PCA (AB 553) i jej kolejnych weryfikacji przy stosowaniu w Laboratorium Żywności i Środowiska OTMiT IBPRS.

PIŚMIENNICTWO

1. AOCS Official Methods Cd 16-81, 1983, revised in 1998, Solid fat Content (SFC) by NMR, Indirect Method.
2. AOCS Official Methods Cd 16b-93, 1997, revised in 1999, Solid fat Content (SFC) by Low-Resolution NMR, Direct Method.
3. Bruker Optik GMBH, 2006, minispec Calibration Samples – Certificate issued for IPMiT, Warszawa.

4. Chapman D., Richards R.E., Yorke R.W., (1960) NMR method seems to be an adequate method for product control, *J. Am. Oil Chem.Soc.*, 37, 243-246.
5. Cozel-Kasperek A., (2005) Walidacja i niepewność wyników oznaczania pozostałości pestycydów chloroorganicznych w matrycy tłuszczowej metodą chromatografii gazowej na przykładzie heksachlorobenzenu (HCB). *Rocz. Inst. Przem. Mięsn. Tłuszcz.*, XLII/XLIII, 273-284.
6. Czajkowski C., (1995) Progress in determining SFC by NMR, *INFORM*, 6, 1374.
7. El Khaloui M., Rutledge D.N., Ducauze Ch. J., (2006) Monitoring hydrogenation in the margarine industry by low resolution pulsed NMR. *J. Sci. Food Agricult.* t. 53, nr 3, s. 389–393.
8. Ghotra B. S., Dyal S. D., Narine S. S., (2002) Lipid shortenings: a review. *Food Res.h Intern.* 35, 1018-1023.
9. Herrera M. L., de Leon Gatti M., Hartel R. W., (1999) A kinetic analysis of crystallization of a milk fat model system, *Food Res.Intern.* 32, 289-298.
10. ISO 8992, (1991) Animal and vegetable fats and oils – Determination of Solid Fat Content – Pulsed nuclear magnetic resonance method.
11. ISO TC 34/SC 11 N 943, 2006-08-21, Animal and vegetable fats and oils – Determination of Solid Fat Content by pulsed NMR – Part 1: Direct Method.
12. IUPAC Méthod 2.150, (1979) Section II: MATIERES GRASSES, Détermination de la teneur en corps gras solides par résonance magnétique nucléaire.
13. Jerzewska M., (2006) Oznaczanie zawartości fazy stałej metodą pulsacyjnego NMR jako rutynowa metoda w świetle krajowych badań międzylaboratoryjnych służących walidacji. *Tłuszcze Jadalne*, t. 41, nr 3 – 4, 205-220.
14. Keeler J., (2005) *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, New York, 201-204.
15. Materiały producenta Bruker Optik GMBH, (2002) The minispec Solid Fat Content Analyzer, 1-888-4Bruker, www.theminispec.com.
16. Paślawski P., (2006) Zapewnienie jakości w analizach rutynowych, Materiały z warsztatów szkoleniowych: Walidacja i niepewność metod badawczych, PCBiC, DA/PC/E03-2/2006, Warszawa, 1-7.
17. Pawłowicz R., (2003a) Porównanie dwóch metod termostatowania stosowanych przy oznaczaniu zawartości fazy stałej w oleju palmowym, *Tł. Jad.* 38, 1/2, 8–18.
18. Pawłowicz R., (2003b) Właściwości fizyczne mieszanek tłuszczowych zawierających olej palmowy, *Tł. Jad.* 38, 3/4, 128–138.

19. PN-EN ISO 8292, 1999, Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości fazy stałej. Metoda pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego.
20. PN-EN ISO 8292-1: 2010, Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce - Oznaczanie zawartości fazy stałej metodą pulsacyjnego NMR – Część 1: Metoda bezpośrednia.
21. PN-EN ISO/IEC 17025, 2001, Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
22. PROLAB 07-09, 2003, Szacowanie niepewności pomiarów w laboratorium. Materiały szkoleniowe.
23. PROLAB (2002) ProW1 Walidacja metod pomiarowych. Dokumentacja programu.
24. Ropelewska M., Ptasznik S., Jerzewska M., 2004, Wpływ sposobu temperowania na zawartość fazy stałej wybranych prób masła kakaowego, XII Międzynarodowa Konferencja Naukowa – Postępy w technologii tłuszczów roślinnych, Materiały Konferencyjne, Pieszczany-Słowacja, 31 V-02 VI, 206–213.
25. Van Putte K., (2003) Pulsed NMR as a routine method in the fat and margarine industry. Bruker Spin Report, 152/153, 68-70.
26. Van Putte K., Van den Enden J., (1974) Fully automated determination of solid fat content by pulsed NMR. J. Am. Oil Chem. Soc., 51, nr 7, 316-320.