PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2018/150

od 30. siječnja 2018.

o izmjeni Provedbene uredbe (EU) 2016/1240 u pogledu metoda analize i ocjenjivanja kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda prihvatljivih za javnu intervenciju i potpore za privatno skladištenje

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EU) br. 1306/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o financiranju, upravljanju i nadzoru zajedničke poljoprivredne politike i o stavljanju izvan snage uredaba Vijeća (EEZ) br. 352/78, (EZ) br. 165/94, (EZ) br. 2799/98, (EZ) br. 814/2000, (EZ) br. 1290/2005 i (EZ) br. 485/2008 ([1]), a posebno njezin članak 62. stavak 2. točku (i),

budući da:

(1) Delegiranom uredbom Komisije (EU) 2016/1238 ([2]) i Provedbenom uredbom Komisije (EU) 2016/1240 ([3]) utvrđuju se pravila o javnoj intervenciji i potporama za privatno skladištenje. Uredbom Komisije (EZ) br. 273/2008 ([4]) utvrđuju se metode koje se primjenjuju kako bi se ocijenilo ispunjavaju li mlijeko i mliječni proizvodi uvjete prihvatljivosti utvrđene u navedenim uredbama u vezi s javnom intervencijom i privatnim skladištenjem.

(2) S obzirom na tehnički napredak u području metodologije koja se upotrebljava u analizi i ocjenjivanju kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda trebalo bi uvesti znatne promjene radi pojednostavnjenja i ažuriranja upućivanja na norme ISO. Radi osiguranja jasnoće i učinkovitosti te uzimajući u obzir opseg i tehničku prirodu izmjena odredbi Uredbe (EZ) br. 273/2008 relevantne odredbe te uredbe trebalo bi uključiti u Provedbenu uredbu (EU) 2016/1240.

(3) Kako bi se osiguralo jedinstveno poštovanje novih normi i metoda u svim državama članicama, laboratorijima bi trebalo osigurati dovoljno vremena za preispitivanje postupaka i primjenu ažuriranih metoda.

(4) Provedbenu uredbu (EU) 2016/1240 trebalo bi stoga na odgovarajući način izmijeniti.

(5) U interesu pravne sigurnosti Uredbu (EZ) br. 273/2008 trebalo bi staviti izvan snage.

(6) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Odbora za zajedničku organizaciju poljoprivrednih tržišta,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Provedbena uredba (EU) 2016/1240 mijenja se kako slijedi:

1. Članak 4. mijenja se kako slijedi:

   (a) stavak 1. mijenja se kako slijedi:

      i. točka (d) zamjenjuje se sljedećim:

         „(d) za maslac: dijelovima I. i I.a Priloga IV. ovoj Uredbi”;

      ii. točka (e) zamjenjuje se sljedećim:

         „(e) za obrano mlijeko u prahu: dijelovima I. i I.a Priloga V. ovoj Uredbi”;

([1]) SL L 347, 20.12.2013., str. 549.
([2]) Delegirana uredba Komisije (EU) 2016/1238 od 18. svibnja 2016. o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća s obzirom na javnu intervenciju i potpore za privatno skladištenje (SL L 206, 30.7.2016., str. 15.)
([3]) Provedbena uredba Komisije (EU) 2016/1240 od 18. svibnja 2016. o utvrđivanju pravila za primjenu Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća s obzirom na javnu intervenciju i potpore za privatno skladištenje (SL L 206, 30.7.2016., str. 71.)
([4]) Uredba Komisije (EZ) br. 273/2008 od 5. ožujka 2008. o utvrđivanju detaljnih pravila za primjenu Uredbe Vijeća (EZ) br. 1255/1999 o metodama analize i ocjenjivanja kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda (SL L 88, 29.3.2008., str. 1.).

(b) stavak 2. zamjenjuje se sljedećim:

„2. Metode za određivanje kvalitete žitarica, maslaca i obranog mlijeka u prahu prihvatljivih za javnu intervenciju koje su navedene u prilozima I., IV. odnosno V. jesu metode utvrđene najnovijim verzijama relevantnih europskih ili međunarodnih normi, ovisno o slučaju, koje su na snazi najmanje 6 mjeseci prije prvog dana razdoblja javne intervencije kako je utvrđeno u članku 12. Uredbe (EU) br. 1308/2013.”.

2. Umeće se sljedeći članak 60.a:

„*Članak 60.a*

Posebne odredbe o kontrolama koje se odnose na javnu intervenciju i potpore za privatno skladištenje za mlijeko i mliječne proizvode

1. Prihvatljivost maslaca, obranog mlijeka u prahu i sira za primanje potpore za privatno skladištenje utvrđuje se u skladu s metodama iz priloga VI., VII. odnosno VIII.

Te se metode utvrđuju uzimajući u obzir najnovije verzije relevantnih europskih ili međunarodnih normi, ovisno o slučaju, koje su na snazi najmanje 6 mjeseci prije prvog dana razdoblja javne intervencije kako je utvrđeno u članku 12. Uredbe (EU) br. 1308/2013.

2. Rezultati kontrola provedenih primjenom metoda utvrđenih u ovoj Uredbi ocjenjuju se u skladu s Prilogom IX.”.

3. Prilozi se mijenjaju u skladu s Prilogom ovoj Uredbi.

Članak 2.

Uredba (EZ) br. 273/2008 stavlja se izvan snage.

Članak 3.

Ova Uredba stupa na snagu sedmog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 30. siječnja 2018.

Za Komisiju

Predsjednik

Jean-Claude JUNCKER

PRILOG

Prilozi Provedbenoj uredbi (EU) 2016/1240 mijenjaju se se kako slijedi:

1. Prilog IV. mijenja se kako slijedi:

(a) u dijelu I. točki 2. drugi podstavak zamjenjuje se sljedećim:

„Svaki se uzorak ocjenjuje pojedinačno. Nije dopušteno ponovno uzimanje uzoraka ili ponovno ocjenjivanje."

(b) umeće se sljedeći dio I.a:

„DIO I.A

Metode analize nesoljenog maslaca za javnu intervenciju

Parametar	Metoda
Masti [1]	ISO 17189 ili ISO 3727 dio 3
Voda	ISO 3727 dio 1
Bezmasna suha tvar	ISO 3727 dio 2
Kiselost masti	ISO 1740
Peroksidni broj	ISO 3976
Nemliječna mast	ISO 17678
Senzorna svojstva	ISO 22935 dijelovi 2 i 3 i tablica bodovanja u nastavku.

[1] Metodu koja se primjenjuje odobrava agencija za plaćanja.

Tablica bodovanja

Izgled		Konzistencija		Miris i okus	
Bodovi	Napomene	Bodovi	Napomene	Bodovi	Napomene
5	*Vrlo dobar* idealni tip najviša kvaliteta (ravnomjerna suhoća)	5	*Vrlo dobra* idealni tip najviša kvaliteta (ravnomjerna mazivost)	5	*Vrlo dobri* idealni tip najviša kvaliteta (potpuno čist, blagi miris)
4	*Dobar* (bez očitih nedostataka)	4	*Dobra* (bez očitih nedostataka)	4	*Dobri* (bez očitih nedostataka)
1, 2 ili 3	Nedostatci	1, 2 ili 3	Nedostatci	1, 2 ili 3	Nedostatci"

2. U Prilogu V. umeće se sljedeći dio I.a:

„DIO I.A

Metode analize obranog mlijeka u prahu za javnu intervenciju

Parametar	Metoda
Bjelančevine	ISO 8968 dio 1
Masti	ISO 1736
Voda	ISO 5537
Kiselost	ISO 6091
Laktati	ISO 8069
Pokus na fosfatazu	ISO 11816 dio 1
Indeks netopivosti	ISO 8156
Sagorjele čestice ([1])	ADPI
Mikroorganizmi	ISO 4833-dio 1
Mlaćenica	Dodatak I.
Slatka sirutka ([2])	Dodatci II. i III.
Kisela sirutka ([3])	ISO 8069 ili kontrole na terenu
Senzorne kontrole ([4])	ISO 22935 dijelovi 2 i 3

([1]) Analize sagorjelih čestica mogu se sustavno provoditi. Međutim, takve se analize uvijek provode ako se ne provode senzorne kontrole.
([2]) Metodu koja se primjenjuje odobrava agencija za plaćanja (jednu ili obje metode).
([3]) Metodu koja se primjenjuje odobrava agencija za plaćanja.
([4]) Senzorne kontrole provode se ako se na temelju analize rizika koju odobrava agencija za plaćanja procijeni da je to potrebno.

Dodatak I.

OBRANO MLIJEKO U PRAHU: KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE FOSFATIDILSERINA I FOSFATIDILETANOLAMINA

Metoda: reverzno-fazna HPLC metoda

1. SVRHA I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak količinskog određivanja fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE) u obranom mlijeku u prahu (OMP) te je prikladna za detekciju suhe tvari mlaćenice u OMP-u.

2. DEFINICIJA

Sadržaj fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE): masena frakcija određene tvari koja se utvrđuje ovdje opisanim postupkom. Rezultat se izražava u fosfatidiletanolamin dipalmitoilu (PEDP) na 100 g praha.

3. NAČELO METODE

Ekstrakcija aminofosfolipida iz rekonstituiranog mlijeka u prahu pomoću metanola. Određivanje fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE) kao derivata o-ftaldialdehida (OPA) reverzno-faznom (RP) HPLC analizom i detekcijom fluorescencije. Kvantifikacija sadržaja fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE) u ispitnom uzorku na temelju standardnog uzorka koji sadržava poznatu količinu fosfatidiletanolamin dipalmitoila (PEDP).

4. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti priznate analitičke čistoće. Mora se koristiti destilirana voda ili voda barem jednake čistoće, osim ako je navedeno drukčije.

4.1. **Standardni materijal: fosfatidiletanolamin dipalmitoil (PEDP), čistoće najmanje 99 %**

Napomena: Standardni materijal čuva se na temperaturi od – 18 °C.

4.2. **Reagensi za pripremu standardnog i ispitnog uzorka**

4.2.1. *Metanol, HPLC čistoće*

4.2.2. *Kloroform, HPLC čistoće*

4.2.3. *Triptamin-monohidroklorid*

4.3. **Reagensi za derivatizaciju o-ftaldialdehida**

4.3.1. *Natrijev hidroksid, vodena otopina 12 M*

4.3.2. *Borna kiselina, vodena otopina 0,4 M, pH vrijednost podešena na 10,0 pomoću natrijeva hidroksida (4.3.1.)*

4.3.3. *2-merkaptoetanol*

4.3.4. *O-ftaldialdehid (OPA)*

4.4. **Otapala za HPLC eluaciju**

4.4.1. *Za pripremu otapala za eluaciju koriste se reagensi HPLC čistoće*

4.4.2. *Voda HPLC čistoće*

4.4.3. *Metanol provjerene fluorimetrijske čistoće*

4.4.4. *Tetrahidrofuran*

4.4.5. *Natrijev dihidrogen fosfat*

4.4.6. *Natrijev acetat*

4.4.7. *Octena kiselina.*

5. OPREMA

5.1. **Analitička vaga koja može vagati s točnošću od 1 mg, uz mogućnost očitanja 0,1 mg.**

5.2. **Laboratorijske čaše zapremine 25 i 100 ml**

5.3. **Pipete za prijenos količina od 1 i 10 ml**

5.4. **Magnetska miješalica**

5.5. **Graduirane pipete za prijenos količina od 0,2, 0,5 i 5 ml**

5.6. **Odmjerne tikvice zapremine 10, 50 i 100 ml**

5.7. **Šprice zapremine 20 i 100 µl**

5.8. **Ultrazvučna kupelj**

5.9. **Centrifuga koja može raditi na 27 000 × g**

5.10. **Staklene bočice zapremine oko 5 ml**

5.11. **Menzura zapremine 25 ml**

5.12. **pH-metar s točnošću od 0,1 pH jedinica**

5.13. **Oprema za HPLC**

5.13.1. *Gradijentni pumpni sustav s mogućnošću rada pri brzini protoka od 1,0 ml/min i tlaku od 200 bara*

5.13.2. *Automatski uređaj za uzorkovanje s mogućnošću derivatizacije*

5.13.3. *Grijač kolona koji kolonu može održavati na temperaturi 30 °C ± 1 °C*

5.13.4. *Detektor fluorescencije s mogućnošću rada na 330 nm valne duljine ekscitacije i 440 nm valne duljine emisije*

5.13.5. *Integrator ili softver za obradu podataka koji može izmjeriti površinu pika*

5.13.6. *Kolona LiChrospher® – 100 (250 × 4,6 mm) ili ekvivalentna kolona ispunjena oktadecilsilanom (C 18), veličine čestica 5 µm*

6. UZORKOVANJE

Uzorkovanje se provodi u skladu s normom ISO 707.

7. POSTUPAK

7.1. **Priprema interne standardne otopine**

7.1.1. *Odvagnite 30,0 ± 0,1 mg triptamin-monohidroklorida (4.2.3.) u odmjernu tikvicu od 100 ml (5.6.) i dopunite do oznake metanolom (4.2.1.).*

7.1.2. *Otpipetirajte 1 ml (5.3.) ove otopine u odmjernu tikvicu od 10 ml (5.6.) i dopunite do oznake metanolom (4.2.1.) da biste dobili koncentraciju triptamina od 0,15 mM.*

7.2. **Priprema otopine ispitnog uzorka**

7.2.1. *Odvagnite 1,000 ± 0,001 g uzorka OMP-a u laboratorijsku čašu od 25 ml (5.2.). Pipetom (5.3.) dodajte 10 ml destilirane vode temperature 40 ± 1 °C i miješajte 30 minuta magnetskom miješalicom (5.4.) da bi se rastopile eventualne grudice.*

7.2.2. *Otpipetirajte 0,2 ml (5.5.) rekonstituiranog mlijeka u odmjernu tikvicu od 10 ml (5.6.), špricom (5.7.) dodajte 100 µl otopine triptamina koncentracije 0,15 mM (7.1.) i dopunite do oznake metanolom (4.2.1.). Pažljivo izmiješajte preokretanjem bočice i stavite na 15 minuta u ultrazvučnu kupelj (5.8.).*

7.2.3. *Centrifugirajte (5.9.) na 27 000 × g 10 minuta i skupite supernatant u staklenu bočicu (5.10.).*

Napomena: Otopinu ispitnog uzorka čuvajte na temperaturi od 4 °C do izvođenja HPLC analize.

7.3. **Priprema vanjske standardne otopine**

7.3.1. *Odvagnite 55,4 mg fosfatidiletanolamin dipalmitoila (PEDP) (4.1.) u odmjernu tikvicu od 50 ml (5.6.) i dodajte oko 25 ml kloroforma (4.2.2.) pomoću menzure (5.11.). Zagrijte začepljenu tikvicu na 50 °C ± 1 °C i pažljivo miješajte da se PEDP rastopi. Ohladite tikvicu na 20 °C, dopunite do oznake metanolom (4.2.1.) i izmiješajte preokretanjem tikvice.*

7.3.2. *Otpipetirajte 1 ml (5.3.) ove otopine u odmjernu tikvicu od 100 ml (5.6.) i dopunite do oznake metanolom (4.2.1.). Otpipetirajte 1 ml (5.3.) tako dobivene otopine u odmjernu tikvicu od 10 ml (5.6.), dodajte 100 µl (5.7.) otopine triptamina koncentracije 0,15 mM (7.1.) i dopunite do oznake metanolom (4.2.1.). Promiješajte preokretanjem tikvice.*

Napomena: Otopinu referentnog uzorka do HPLC analize treba čuvati na temperaturi od 4 °C.

7.4. **Priprema reagensa za derivatizaciju**

Odvagnite 25,0 ± 0,1 mg o-ftaldialdehida (OPA) (4.3.4.) u odmjernu tikvicu zapremine 10 ml (5.6.), dodajte 0,5 ml (5.5.) metanola (4.2.1.) i pažljivo promiješajte da se OPA rastopi. Dopunite do oznake otopinom borne kiseline (4.3.2.) i špricom (5.7.) dodajte 20 µl 2-merkaptoetanola (4.3.3.).

Napomena: Reagens za derivatizaciju treba čuvati na 4 °C u tamnoj staklenoj bočici da bi ostao stabilan tjedan dana.

7.5. **Određivanje putem HPLC-a**

7.5.1. *Otapala za eluaciju (4.4.)*

Otapalo A: Otopina 0,3 mM natrijeva dihidrogen fosfata i 3 mM otopine natrijeva acetata (pH vrijednosti podešene octenom kiselinom na 6,5 ± 0,1): metanol: tetrahidrofuran = 558:440:2 (v/v/v).

Otapalo B: metanol

7.5.2. *Preporučeni gradijent eluacije:*

Vrijeme (min)	Otapalo A (%):	Otapalo B (%):	Brzina protoka (ml/min)
Početak	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

Napomena: Da bi se postigla rezolucija prikazana na slici 1., gradijent eluacije možda treba malo modificirati.

Temperatura kolone: 30 °C.

7.5.3. *Volumen injektiranja: 50 µl reagensa za derivatizaciju i 50 µl otopine uzorka.*

7.5.4. *Uspostavljanje ravnoteže u koloni*

Svakog dana pri pokretanju sustava kolonu treba ispirati 15 minuta 100 %-tnim otapalom B, a potom podesiti na A:B = 40:60 da bi se tijekom 15 minuta uspostavila ravnoteža uz brzinu protoka od 1 ml/min. Napravite slijepu probu ubrizgavanjem metanola (4.2.1.).

Napomena: Prije nego kolonu pohranite na duže vrijeme, ispirite je 30 minuta mješavinom metanol: kloroform = 80:20 (v/v).

7.5.5. *Odredite sadržaj fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE) u ispitnom uzorku.*

7.5.6. *Izvedite niz kromatografskih analiza pazeći da vrijeme između ciklusa bude konstantno radi postizanja konstantnih vremena zadržavanja. Nakon svakih 5-10 otopina ispitnog uzorka ubrizgajte vanjsku standardnu otopinu (7.3.) radi izračuna faktora odziva.*

Napomena: Nakon svakih 20-25 analiza kolona se mora ispirati 100 %-tnim otapalom B (7.5.1.) najmanje 30 minuta.

7.6. **Integracija**

7.6.1. *Pik fosfatidiletanolamin dipalmitoila (PEDP)*

PEDP se pojavljuje kao jedan pik. Odredite površinu pika integracijom dolina-dolina.

7.6.2. *Pik triptamina*

Triptamin se pojavljuje kao jedan pik (slika 1.). Odredite površinu pika integracijom dolina-dolina.

7.6.3. *Grupe pikova fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE)*

U opisanim se uvjetima (slika 1.) PS pojavljuje kao dva glavna djelomično nerazdvojena pika, kojima prethodi jedan manji pik. PE sa javlja kao tri glavna djelomično nerazdvojena pika. Odredite ukupnu površinu svake grupe pikova postavljajući baznu liniju kako je prikazano na slici 1.

8. IZRAČUN I PRIKAZ REZULTATA

Sadržaj fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE) u ispitnom uzorku izračunava se s pomoću sljedeće formule:

$$C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$$

gdje je:

C = sadržaj fosfatidilserina (PS) ili fosfatidiletanolamina (PE) (mg/100 g praha) u ispitnom uzorku;

A_1 = površina pika fosfatidiletanolamin dipalmitoila (PEDP) u standardnoj otopini uzorka (7.3.);

A_2 = površina pika fosfatidilserina (PS) ili fosfatidiletanolamina (PE) u ispitnoj otopini uzorka (7.2.);

T_1 = površina pika triptamina u standardnoj otopini uzorka (7.3.);

T_2 = površina pika triptamina u ispitnoj otopini uzorka (7.2.).

9. PRECIZNOST METODE

Napomena: Vrijednosti ponovljivosti računaju se u skladu s međunarodnom normom IDF (*).

9.1. **Ponovljivost**

Relativna standardna devijacija ponovljivosti, koja prikazuje varijabilnost nezavisnih analitičkih rezultata koje dobije isti analitičar koristeći se istom opremom u istim uvjetima i na istom ispitnom uzorku u kratkom vremenskom intervalu, ne smije biti veća od 2 % relativno. Ako se dva određivanja izvrše pod navedenim uvjetima, relativna razlika između dvaju rezultata ne bi smjela biti veća od 6 % aritmetičke sredine rezultata.

9.2. **Obnovljivost**

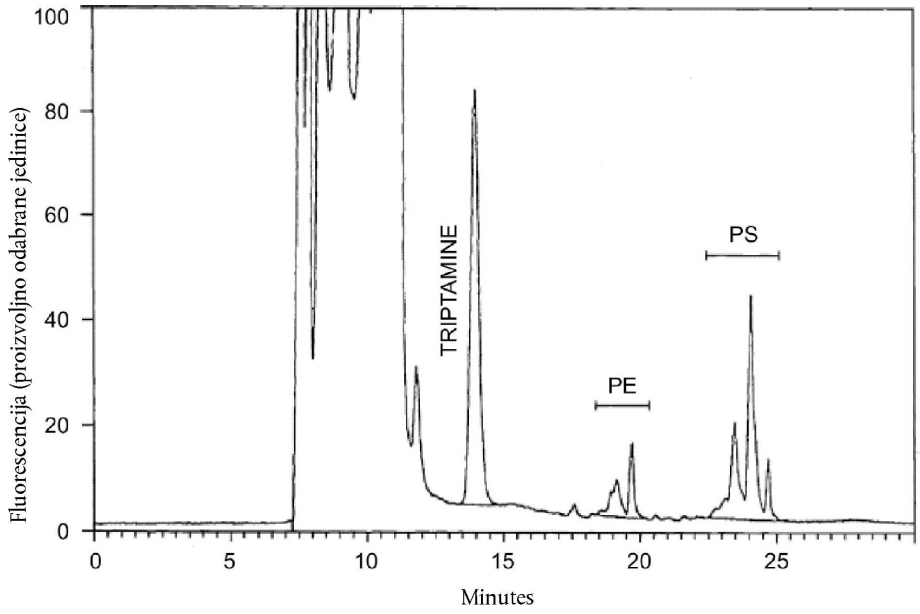
Ako su dva određivanja izvršili analitičari u različitim laboratorijima, u različitim uvjetima, koristeći se različitom opremom, na istom ispitnom uzorku, relativna razlika između dvaju rezultata ne smije biti veća od 11 % aritmetičke sredine rezultata.

10. REFERENTNA LITERATURA

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 struktura OPA-derivata fosfatidilserina (PS) i fosfatidiletanolamina (PE) u metanolnom ekstraktu rekonstituiranog obranog mlijeka u prahu. Prikazan je način integracije pikova fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) i triptamina (interni standard).



Dodatak II.

DETEKCIJA SLATKE SIRUTKE U OBRANOM MLIJEKU U PRAHU ZA JAVNO SKLADIŠTENJE ODREĐIVANJEM SADRŽAJA KAZEINO-MAKROPEPTIDA METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda omogućuje detekciju slatke sirutke u obranom mlijeku u prahu za javno skladištenje određivanjem sadržaja kazeino-makropeptida.

2. REFERENCA

Međunarodna norma ISO 707 – Mlijeko i mliječni proizvodi – Smjernice za uzorkovanje.

3. DEFINICIJA

Sadržaj suhe tvari u slatkoj sirutki definira se kao maseni postotak kazeino-makropeptida prema opisanom postupku.

4. NAČELO

— Rekonstitucija obranog mlijeka u prahu, uklanjanje masti i bjelančevina pomoću trikloroctene kiseline, iza čega slijedi centrifugiranje ili filtracija.

— Utvrđivanje količine kazeino-makropeptida (CMP) u supernatantu metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC).

— Ocjenjivanje rezultata dobivenih za uzorke na temelju usporedbe sa standardnim uzorcima koji se sastoje od obranog mlijeka u prahu s dodatkom poznatog postotka sirutke u prahu ili bez njega.

5. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti priznate analitičke čistoće. Mora se upotrebljavati destilirana voda ili voda barem jednake čistoće.

5.1. **Otopina trikloroctene kiseline**

Otopite 240 g trikloroctene kiseline (CCl_3CCOOH) u vodi i dopunite do 1 000 ml. Otopina bi trebala biti bistra i bezbojna.

5.2. **Otopina eluensa, pH 6,0**

Otopite 1,74 g dikalijeva hidrogen fosfata (K_2HPO_4), 12,37 g kalijeva dihidrogen fosfata, (KH_2PO_4) i 21,41 g natrijeva sulfata (Na_2SO_4) u oko 700 ml vode. Prema potrebi podesiti pH na 6,0 pomoću otopine fosforne kiseline ili kalijeva hidroksida.

Dopunite vodom do 1 000 ml i homogenizirajte.

Napomena: Sastav eluensa može se prilagoditi tako da bude u skladu s potvrdom o sukladnosti sa standardima ili preporukama proizvođača materijala za punjenje kolona.

Prije uporabe profiltrirajte otopinu eluensa kroz membranski filtar s porama promjera 0,45 μm.

5.3. **Otopina za ispiranje**

Pomiješajte jedan volumen acetonitrila (CH_3CN) i devet volumena vode. Prije uporabe profiltrirajte mješavinu kroz membranski filtar s porama promjera 0,45 μm.

Napomena: Može se upotrebljavati bilo koja druga baktericidna otopina za ispiranje koja ne utječe na djelotvornost kolone u smislu rezolucije.

5.4. **Standardni uzorci**

5.4.1. *Obrano mlijeko u prahu koje ispunjava zahtjeve ove Uredbe (tj. [0]).*

5.4.2. *Isto mlijeko u prahu s dodatkom 5 % (m/m) slatke sirutke u prahu standardnog sastava (tj. [5]).*

6. OPREMA

6.1. **Analitička vaga**

6.2. **Centrifuga, neobvezna, koja može postići centrifugalnu silu od 2 200 g, opremljena epruvetama za centrifugiranje s čepom ili navojnim čepom, zapremine oko 50 ml**

6.3. **Mehanička tresilica**

6.4. **Magnetska miješalica**

6.5. **Stakleni lijevci promjera oko 7 cm**

6.6. **Filtar-papiri za srednju brzinu filtracije, promjera oko 12,5 cm**

6.7. **Staklena oprema za filtriranje s membranskim filtrom s promjerom pora 0,45 μm**

6.8. **Graduirane pipete od 10 ml (ISO 648, Klasa A ili ISO/R 835) ili dozirni sustav kapaciteta dobave 10,0 ml u dvije minute**

6.9. **Dozirni sustav koji omogućuje unos 20,0 ml vode na oko 50 °C**

6.10. **Vodena kupelj s termostatom, zagrijana na 25 ± 0,5 °C**

6.11. **Oprema za HPLC koja se sastoji od sljedećeg:**

6.11.1. *Pumpa*

6.11.2. *Injektor, ručni ili automatski, zapremine 15 do 30 μl*

6.11.3. *Dvije kolone u nizu (duljine 30 cm, unutarnjeg promjera 0,75 cm) ili ekvivalentne kolone (npr. jednostruka TSK 2 000-SWxl, jednostruka Agilent Technologies Zorbax GF 250) i pretkolona (3 cm × 0,3 cm) napunjena s I 125 ili materijalom jednake djelotvornosti*

6.11.4. *Grijač kolone s termostatom podešen na 35 ± 1 °C*

6.11.5. *UV detektor prilagodljive valne duljine koji omogućuje mjerenja na 205 nm uz osjetljivost od 0,008 Å*

6.11.6. *Integrator s mogućnošću integriranja dolina-dolina.*

Napomena: Rad s kolonama na sobnoj temperaturi moguć je iako je u tim uvjetima njihova rezolucija niža. U tom slučaju temperatura ne smije varirati za više od ± 5 °C u bilo kojem rasponu analiza.

7. UZORKOVANJE

7.1. Uzorke obvezno treba uzimati u skladu s postupkom utvrđenim u međunarodnoj normi ISO 707. Međutim, agencije za plaćanja mogu se koristiti drugom metodom uzorkovanja pod uvjetom da je u skladu s načelima te norme.

7.2. Uzorke čuvajte u uvjetima koji onemogućavaju kvarenje ili promjene u njihovu sastavu.

8. POSTUPAK

8.1. **Priprema ispitnog uzorka**

Stavite mlijeko u prahu u posudu dvostruko većeg volumena od volumena praha, koja ima hermetički poklopac. Posudu odmah zatvorite. Mlijeko u prahu dobro promiješajte uzastopnim preokretanjem posude.

8.2. **Uzorak za analizu**

Odvagnite 2,000 + 0,001 g ispitnog uzorka u epruvetu za centrifugiranje (6.2.) ili u odgovarajuću tikvicu s čepom (50 ml).

8.3. **Odstranjivanje masti i bjelančevina**

8.3.1. *Uzorku za analizu dodajte 20,0 ml zagrijane vode (50 °C). Otopite prah protresajući ga pet minuta pomoću mehaničke tresilice (6.3.). Epruvetu stavite u vodenu kupelj (6.10.) i pustite da se temperatura uravnoteži na 25 °C.*

8.3.2. *U dvije minute dodajte 10,0 ml otopine triklorooctene kiseline zagrijane na oko 25 °C (5.1.) uz snažno miješanje magnetskom miješalicom (6.4.). Epruvetu stavite u vodenu kupelj (6.10.) i ostavite 60 minuta.*

8.3.3. *Centrifugirajte (6.2.) 10 minuta na 2 200 g ili filtrirajte kroz filtar-papir (6.6.), pri čemu prvih 5 ml filtrata bacite.*

8.4. **Kromatografsko određivanje**

8.4.1. *Ubrizgajte 15 do 30 µl točno izmjerenog supernatanta ili filtrata (8.3.3.) u uređaj za HPLC (6.11.), koji radi uz brzinu protoka od 1,0 ml otopine eluensa (5.2.) u minuti.*

Napomena 1.: Mogu se koristiti različite brzine protoka, ovisno o unutarnjem promjeru kolona koje se koriste ili o uputama proizvođača kolona.

Napomena 2.: Kod svakog prekida kolone isperite vodom. Nikada u njima ne ostavljajte otopinu eluensa (5.2.).

Prije svakog prekida koji traje više od 24 sata isperite kolone vodom i zatim ih najmanje tri sata perite otopinom (5.3.) uz brzinu protoka od 0,2 ml u minuti.

8.4.2. *Rezultati kromatografske analize ispitnog uzorka [E] dobivaju se u obliku kromatograma kod kojeg se pikovi identificiraju prema vremenu zadržavanja (RT) kako slijedi:*

Pik II.:	Drugi pik kromatograma s vremenom zadržavanja (RT) od oko 12,5 minuta.
Pik III.:	Treći pik kromatograma koji odgovara CMP-u, s vremenom zadržavanja (RT) od 15,5 minuta.

Odabir kolone ili kolona može bitno utjecati na vrijeme zadržavanja pojedinačnih pikova.

Integrator (6.11.6.) automatski izračunava površinu A svakog pika:

A_{II}:	Površina pika II.
A_{III}:	Površina pika III.

Važno je prije kvantitativne interpretacije analizirati izgled svakog kromatograma radi otkrivanja bilo kakvih nepravilnosti nastalih zbog neispravnog rada uređaja ili kolona, ili zbog podrijetla i vrste analiziranog uzorka.

U slučaju dvojbe ponovite analizu.

8.5. **Kalibracija**

8.5.1. *Na standardne uzorke (5.4.) točno primijenite postupak opisan od točke 8.2. do točke 8.4.2.*

Upotrebljavajte svježe pripremljene otopine budući da se u 8-postotnoj trikloroоctenoj kiselini CMP razgrađuje. Gubitak se procjenjuje na 0,2 % na sat na temperaturi od 30 °C.

8.5.2. *Prije kromatografske analize uzoraka pripremite kolone ubrizgavanjem standardnog uzorka (5.4.2.) u otopinu (8.5.1.), ponavljajući postupak sve dok se površina i vrijeme zadržavanja pika koji odgovara CMP-u ne ustale.*

8.5.3. *Faktore odziva R utvrdite ubrizgavanjem količine filtrata (8.5.1.) koja je jednaka količini uporabljenoj za uzorke.*

9. PRIKAZ REZULTATA

9.1. **Metoda izračuna i formule**

9.1.1. *Izračun faktora odziva R:*

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

gdje je:

R_{II} = faktori odziva pikova II.;

A_{II} [0] = površine pikova II. standardnog uzorka [0], dobivene u 8.5.3.

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

gdje je:

R_{III} = faktor odziva pika III.;

A_{III} [0] i A_{III} [5] = površine pika III. standardnih uzoraka [0] i [5], dobivene u 8.5.3.;

W = količina sirutke u standardnom uzorku [5], tj. 5.

9.1.2. *Izračun relativne površine pikova u uzorku [E]*

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

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

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

gdje je:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = relativne površine pikova II., III. odnosno IV. u uzorku [E];

A_{II} [E], A_{III} [E] = površine pikova II. odnosno III. u uzorku [E] dobivene u 8.4.2.;

R_{II}, R_{III} = faktori odziva izračunani u 9.1.1.

9.1.3. *Izračun relativnih vremena zadržavanja pika III. u uzorku [E]:*

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$$

gdje je:

RRT_{III} [E] = relativno vrijeme zadržavanja pika III. u uzorku [E];

RT_{III} [E] = vrijeme zadržavanja pika III. u uzorku [E] dobiveno u 8.4.2.;

RT_{III} [5] = vrijeme zadržavanja pika III. u kontrolnom uzorku [5] dobiveno u 8.5.3.

9.1.4. *Ispitivanja su pokazala linearnu povezanost relativnog vremena zadržavanja pika III., odnosno RRT_{III} [E], i postotka sirutke u prahu dodane do 10 %.*

— RRT_{III} [E] je < 1,000 ako je sadržaj sirutke > 5 %;

— RRT_{III} [E] je ≥ 1,000 ako je sadržaj sirutke ≤ 5 %.

Dopuštena nepouzdanost za vrijednosti RRT_{III} iznosi ± 0,002.

U normalnim okolnostima vrijednost RRT_{III} [0] ne odstupa mnogo od 1,034. Ovisno o stanju kolona, navedena se vrijednost može približiti 1,000, ali uvijek mora biti viša.

9.2. **Izračun postotka slatke sirutke u prahu u uzorku:**

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

gdje je:

W = maseni postotak (m/m) slatke sirutke u uzorku [E];

S_{III} [E] = relativna površina pika III. ispitnog uzorka [E] dobivena kao u 9.1.2.;

1,3 = predstavlja relativnu prosječnu površinu pika III. izraženu u gramima slatke sirutke na 100 g, utvrđenu u nepatvorenom obranom mlijeku u prahu različitog podrijetla. Ova je vrijednost dobivena eksperimentalno;

S_{III} [0] = predstavlja relativnu površinu pika III. koja je jednaka $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Ove su vrijednosti dobivene u 9.1.1. odnosno 8.5.3.;

(S_{III} [0] – 0,9) = predstavlja korekciju relativne prosječne površine 1,3 ako S_{III} [0] ne iznosi 0,9. Eksperimentalno dobivena vrijednost relativne prosječne površine pika III. kontrolnog uzorka [0] iznosi 0,9.

9.3. **Preciznost postupka**

9.3.1. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja istodobno ili brzo jedan za drugim izvede isti analitičar koristeći se istom opremom na jednakom ispitnom materijalu ne smije biti veća od 0,2 % m/m.

9.3.2. *Obnovljivost*

Razlika između dva zasebna i neovisna rezultata dobivena u dva različita laboratorija na jednakom ispitnom materijalu ne smije biti veća od 0,4 % (m/m).

9.4. **Tumačenje**

9.4.1. *Pretpostavlja se odsutnost sirutke ako je relativna površina pika III., S_{III} [E], izražena u gramima slatke sirutke na 100 g proizvoda, ≤ 2,0 + (S_{III} [0] − 0,9),*

gdje je:

2,0	maksimalna vrijednost dopuštena za relativnu površinu pika III., uzimajući u obzir relativnu prosječnu površinu pika III., tj. 1,3, nesigurnost zbog promjena u sastavu obranog mlijeka u prahu i obnovljivost metode (9.3.2.);
(S_{III} [0] − 0,9)	korekcija koju treba napraviti ako je površina S_{III} [0] različita od 0,9 (vidjeti točku 9.2.).

9.4.2. *Ako je relativna površina pika III., S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III} [0] − 0,9), a relativna površina pika II., S_{II} [E] ≤ 160, utvrdite sadržaj slatke sirutke kako je navedeno u točki 9.2.*

9.4.3. *Ako je relativna površina pika III., S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III} [0] − 0,9), a relativna površina pika II., S_{II} [E] ≤ 160, utvrdite ukupni sadržaj bjelančevina (P %) te potom analizirajte dijagrame 1. i 2.*

9.4.3.1. *Podaci dobiveni analizom uzoraka nepatvorenog obranog mlijeka u prahu s visokim ukupnim sadržajem bjelančevina sabrani su u dijagramima 1. i 2.*

Puna linija predstavlja lineranu regresiju za koju se koeficijenti računaju metodom najmanjih kvadrata.

Isprekidana ravna linija označava gornju graničnu vrijednost relativne površine pika III., uz vjerojatnost da u 90 % slučajeva nije prekoračena.

Jednadžbe isprekidanih ravnih linija u dijagramima 1. i 2. jesu sljedeće:

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

gdje je:

S_{III} relativna površina pika III. izračunana ili prema ukupnom sadržaju bjelančevina ili prema relativnoj površini pika S_{II} [E];

P % ukupni sadržaj bjelančevina izražen kao maseni postotak;

S_{II} [E] relativna površina uzorka izračunana u točki 9.1.2.

Ove su jednadžbe ekvivalentne vrijednosti 1,3 spomenutoj u točki 9.2.

Razlika (T_1 i T_2) između relativne površine S_{III} [E] i relativne površine S_{III} prikazana je sljedećom formulom: 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. Ako su T_1 i/ili T_2 jednaki ili manji od nule, prisutnost slatke sirutke nije moguće utvrditi.

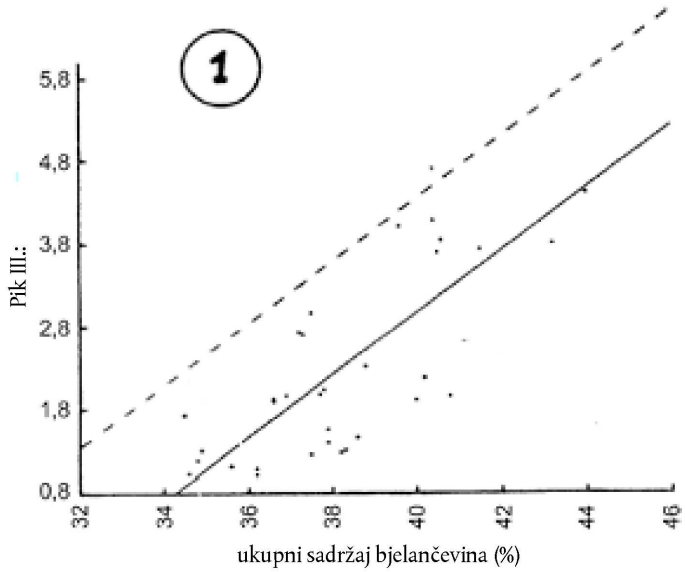
Ako su T_1 i T_2 veći od nule, slatka sirutka je prisutna.

Sadržaj slatke sirutke računa se prema sljedećoj formuli: $W = T_2 + 0{,}91$

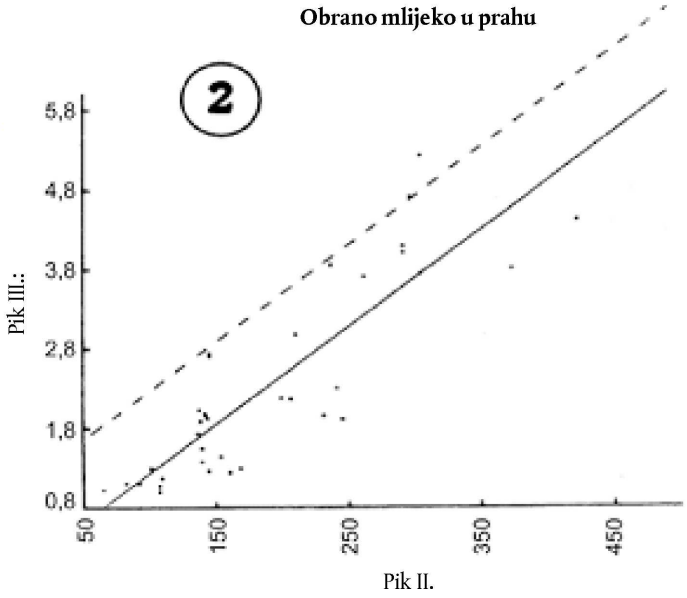
gdje je:

0,91 udaljenost na okomitoj osi između pune i isprekidane ravne linije.

Obrano mlijeko u prahu



Obrano mlijeko u prahu



Dodatak III.

ODREĐIVANJE SUHE TVARI SLATKE SIRUTKE U OBRANOM MLIJEKU U PRAHU

1. SVRHA: DETEKCIJA DODANE SUHE TVARI SLATKE SIRUTKE U:

2. REFERENCA: MEĐUNARODNA NORMA ISO 707

3. DEFINICIJA

Udio suhe tvari slatke sirutke definira se kao maseni postotak kazeino-makropeptida prema opisanom postupku.

4. NAČELO

Uzorci se analiziraju na prisutnost kazeino-makropeptida A metodom reverzno-fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC postupak). Dobiveni se rezultat ocjenjuje uspoređivanjem sa standardnim uzorcima koji se sastoje od obranog mlijeka u prahu sa i bez dodatka poznatog postotka sirutke u prahu. Rezultati iznad 1 % (m/m) ukazuju na prisutnost suhe tvari slatke sirutke.

5. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti priznate analitičke čistoće. Mora se upotrebljavati destilirana voda ili voda barem jednake čistoće. Acetonitril treba biti spektroskopske ili HPLC čistoće.

5.1. **Otopina triklorooctene kiseline**

Otopite 240 g triklorooctene kiseline (CCl_3CCOOH) u vodi i dopunite do 1 000 ml. Otopina bi trebala biti bistra i bezbojna.

5.2. **Eluensi A i B**

Eluens A: U odmjernu tikvicu od 1 000 ml stavite 150 ml acetonitrila (CH_3CN), 20 ml izopropanola ($CH_3CHOHCH_3$) i 1,00 ml trifluorooctene kiseline (TFA, CF_3COOH). Dopunite vodom do 1 000 ml.

Eluens B: U odmjernu tikvicu od 1 000 ml stavite 550 ml acetonitrila, 20 ml izopropanola i 1,00 ml TFA. Dopunite vodom do 1 000 ml. Otopinu eulensa prije uporabe profiltrirajte kroz membranski filtar s promjerom pora od 0,45 µm.

5.3. **Konzerviranje kolone**

Nakon analize kolona se najprije ispere eluensom B (gradijentno ispiranje), a potom i acetonitrilom (gradijentno ispiranje u trajanju od 30 minuta). Kolona se čuva u acetonitrilu.

5.4. **Standardni uzorci**

5.4.1. *Obrano mlijeko u prahu koje ispunjava zahtjeve za javno skladištenje (tj. [0]).*

5.4.2. *Isto mlijeko u prahu s dodatkom 5 % (m/m) slatke sirutke u prahu standardnog sastava (tj. [5]).*

5.4.3. *Isto mlijeko u prahu s dodatkom 50 % (m/m) slatke sirutke u prahu standardnog sastava (tj. [50]).*

6. OPREMA

6.1. **Analitička vaga**

6.2. **Centrifuga, neobvezna, koja može postići centrifugalnu silu od 2 200 g, opremljena epruvetama za centrifugiranje s čepom ili navojnim čepom, zapremine oko 50 ml**

6.3. **Mehanička tresilica**

6.4. **Magnetska miješalica**

6.5. **Stakleni lijevci promjera oko 7 cm**

6.6. **Filtar-papiri za srednju brzinu filtracije, promjera oko 12,5 cm**

6.7. **Staklena oprema za filtriranje s membranskim filtrom s promjerom pora 0,45 μm**

6.8. **Graduirane pipete koje omogućuju prijenos 10 ml (ISO 648, Klasa A ili ISO/R 835) ili dozirni sustav koji omogućuje unos 10,0 ml u dvije minute**

6.9. **Dozirni sustav koji omogućuje unos 20,0 ml vode na oko 50 °C**

6.10. **Vodena kupelj s termostatom, zagrijana na 25 ± 0,5 °C**

6.11. **Oprema za HPLC koja se sastoji od sljedećeg:**

6.11.1. *Pumpni sustav s binarnim gradijentom*

6.11.2. *Injektor, ručni ili automatski, zapremine 100 μl*

6.11.3. *Kolona Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (duljine 25 cm, unutarnjeg promjera 0,46 cm) ili ekvivalentna reverzno-fazna kolona sa širokim porama na bazi silicijeva dioksida*

6.11.4. *Grijač kolone s termostatom podešen na 35 ± 1 °C*

6.11.5. *UV detektor promjenjive valne duljine koji omogućuje mjerenja na 210 nm (prema potrebi se mogu koristiti i veće valne duljine do 220 nm), osjetljivosti od 0,02 Å*

6.11.6. *Integrator koji omogućuje integraciju na zajedničkoj baznoj liniji ili na dva minimuma („dolina–dolina”).*

Napomena: Kolona se može upotrebljavati na sobnoj temperaturi, uz uvjet da temperatura u prostoriji ne varira za više od 1 °C; u protivnom dolazi do prevelikog variranja vremena zadržavanja CMP_A.

7. UZORKOVANJE

7.1. **Uzorci se uzimaju u skladu s postupkom utvrđenim u međunarodnoj normi ISO 707. Međutim, države članice mogu primijeniti neku drugu metodu uzorkovanja pod uvjetom da je ona u skladu s načelima prethodno naveden norme.**

7.2. **Uzorke čuvajte u uvjetima koji onemogućavaju kvarenje ili promjene u njihovu sastavu.**

8. POSTUPAK

8.1. **Priprema ispitnog uzorka**

Stavite mlijeko u prahu u posudu dvostruko većeg volumena od volumena praha, koja ima hermetički poklopac. Posudu odmah zatvorite. Mlijeko u prahu dobro promiješajte uzastopnim preokretanjem posude.

8.2. **Uzorak za analizu**

Odvagnite 2,00 + 0,001 g ispitnog uzorka u epruvetu za centrifugiranje (6.2.) ili u odgovarajuću tikvicu s čepom (50 ml).

Napomena: Kad se radi o smjesi, odvagnite takvu količinu ispitnog uzorka da odmašćeni uzorak za analizu iznosi 2,00 g.

8.3. **Odstranjivanje masti i bjelančevina**

8.3.1. *Uzorku za analizu dodajte 20,0 ml zagrijane vode (50 °C). Otopite prah protresajući ga pet minuta pomoću mehaničke tresilice (6.3.). Epruvetu stavite u vodenu kupelj (6.10.) i pustite da se temperatura uravnoteži na 25 °C.*

8.3.2. *Dodajte 10,0 ml otopine triklorooctene kiseline zagrijane na oko 25 °C (5.1.), postupno u dvije minute, uz snažno miješanje magnetskom miješalicom (6.4.). Epruvetu stavite u vodenu kupelj (6.10.) i ostavite 60 minuta.*

8.3.3. *Centrifugirajte (6.2.) 10 minuta na 2 200 g ili profiltrirajte kroz filtar-papir (6.6.), pri čemu prvih 5 ml filtrata bacite.*

8.4. **Kromatografsko određivanje**

8.4.1. *Reverzno-fazna HPLC metoda isključuje mogućnost lažno pozitivnih rezultata zbog prisutnosti kisele mlaćenice u prahu.*

8.4.2. *Prije reverzno-fazne HPLC analize treba optimizirati uvjete gradijenta. Vrijeme zadržavanja od 26 ± 2 minute za CMP_A optimalno je za gradijentne sustave s mrtvim volumenom od oko 6 ml (volumen od točke gdje se otopine pomiješaju do volumena petlje injektora, uključujući i njega). Optimalno vrijeme zadržavanja za gradijentne sustave s nižim mrtvim volumenom (npr. 2 ml) iznosi 22 minute.*

Uzmite otopine standardnih uzoraka (5.4.) sa 50 %-tnom slatkom sirutkom i bez nje.

Ubrizgajte 100 µl supernatanta ili filtrata (8.3.3.) u HPLC uređaj koji funkcionira u uvjetima referentnog gradijenta navedenim u tablici 1.

Tablica 1.

Uvjeti referentnog gradijenta za optimizaciju kromatografije

Vrijeme (min)	Protok (ml/min)	% A	% B	Krivulja
Početak	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

Usporedba dvaju kromatograma trebala bi otkriti položaj pika CMP_A.

Sastav otopine koju treba koristiti za normalni gradijent (vidjeti 8.4.3.) može se izračunati prema sljedećoj formuli: $\%\ B = 10 - 2{,}5 + (13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 30 / 27$ $\%\ B = 7{,}5 + (13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 1{,}11$

gdje je:

RT_{cmpA}: vrijeme zadržavanja CMP_A u referentnom gradijentu;

10: početni % B referentnog gradijenta;

2,5: % B u središnjoj točki minus % B na početku u normalnom gradijentu;

13,5: vrijeme u središnjoj točki referentnog gradijenta;

26: potrebno vrijeme zadržavanja CMP_A;

6: omjer nagiba referentnog gradijenta i normalnog gradijenta;

30: % B na početku minus % B nakon 27 minuta u referentnom gradijentu;

27: vrijeme primjene referentnog gradijenta.

8.4.3. *Uzmite otopine ispitnih uzoraka.*

Ubrizgajte 100 µl točno izmjerenog supernatanta ili filtrata (8.3.3.) u HPLC uređaj koji radi uz brzinu protoka od 1,0 ml otopine eluensa (5.2.) u minuti.

Sastav eluensa na početku analize dobiva se na način opisan u točki 8.4.2. On obično približno odgovara omjeru A:B = 76:24 (5.2.). Odmah nakon ubrizgavanja pokreće se linearni gradijent, posljedica čega je 5 % viši postotak od B nakon 27 minuta. Potom se pokreće linearni gradijent koji u pet minuta mijenja sastav eluensa u 90 % B. Taj se sastav održava pet minuta, nakon čega se pomoću linearnog gradijenta mijenja, da bi se nakon pet minuta ponovo vratio na početni sastav. Ovisno o unutarnjem volumenu pumpnog sustava, sljedeće se ubrizgavanje može izvršiti 15 minuta nakon postizanja početnih uvjeta.

Napomena 1.: Vrijeme zadržavanja CMP_A trebalo bi iznositi 26 ± 2 minute. To je moguće postići mijenjanjem početnih i konačnih uvjeta prvog gradijenta. Međutim, razlika u % B između početnih i konačnih uvjeta prvog gradijenta mora ostati 5 % B.

Napomena 2.: Eluense treba otpliniti u dovoljnoj mjeri te tako otplinjeni moraju i ostati. To je od ključne važnosti za pravilan rad gradijentnog pumpnog sustava. Standardna devijacija vremena zadržavanja pika CMP_A mora biti manja od 0,1 minute (n = 10).

Napomena 3.: Nakon svakih 5 uzoraka treba ubrizgati referentni uzorak [5] te s pomoću njega izračunati novi faktor odziva R (9.1.1.).

8.4.4. *Rezultati kromatografske analize ispitnog uzorka (E) dobiju se u obliku kromatograma u kojem se pik CMP_A utvrđuje na temelju vremena zadržavanja koje iznosi oko 26 minuta.*

Integrator (6.11.6.) automatski izračunava visinu H pika CMP_A. Na svakom kromatogramu treba provjeriti položaj bazne linije. Analizu ili integriranje treba ponoviti ako bazna linija nije pravilno smještena.

Napomena: Ako je pik CMP_A dovoljno odvojen od drugih pikova, treba koristiti alokaciju bazne linije dolina-dolina, u suprotnom slučaju koristite padajuće okomice na baznu liniju, koje trebaju imati ishodište blizu pika CMP_A (prema tome ne kad je t = 0 min!). Za standard i uzorke primjenjujte istu vrstu integracije te u slučaju zajedničke bazne linije provjerite njezinu konzistentnost za uzorke i standard.

Prije kvantitativne interpretacije od ključne je važnosti analizirati izgled svakog kromatograma radi otkrivanja bilo kakvih nepravilnosti nastalih zbog neispravnog rada uređaja ili kolona, ili zbog podrijetla i vrste analiziranog uzorka. U slučaju dvojbe ponovite analizu.

8.5. **Kalibracija**

8.5.1. *Na standardne uzorke (od 5.4.1. do 5.4.2.) točno primijenite postupak opisan od točke 8.2. do točke 8.4.4. Upotrebljavajte svježe pripremljene otopine budući da se u 8-postotnoj triklorooctenoj kiselini na sobnoj temperaturi CMP razgrađuje. Na temperaturi od 4 °C otopina ostaje stabilna 24 sata. U slučaju velike serije analiza, poželjna je uporaba ohlađenog stalka za uzorke u automatskom injektoru.*

Napomena: točka 8.4.2. može se izostaviti ako je % B u početnim uvjetima poznat iz prethodnih analiza.

Kromatogram referentnog uzorka [5] mora biti analogan slici 1. 1. Na toj slici piku CMP_A prethode dva manja pika. Ključno je dobiti slično razdvajanje.

8.5.2. *Prije kromatografskog određivanja uzoraka ubrizgajte 100 µl standardnog uzorka bez slatke sirutke [0] (5.4.1.).*

Kromatogram ne smije pokazivati pik u vremenu zadržavanja pika CMP_A.

8.5.3. *Odredite faktore odziva R ubrizgavanjem količine filtrata (8.5.1.) jednake količini koja je korištena za uzorke.*

9. PRIKAZ REZULTATA

9.1. **Metoda izračuna i formule**

9.1.1. *Izračun faktora odziva R:*

$$\text{Pik } CMP_A\text{: } R = W/H$$

gdje je:

R = faktor odziva za pik CMP_A;

H = visina pika CMP_A;

W = količina sirutke u standardnom uzorku [5].

9.2. **Izračun postotka slatke sirutke u prahu u uzorku**

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

gdje je:

W(E) = postotak (m/m) slatke sirutke u uzorku (E);

R = faktor odziva za pik CMP_A (9.1.1.);

H(E) = visina pika CMP_A uzorka (E).

Ako je W(E) veći od 1 % i ako je razlika između vremena zadržavanja i vremena standardnog uzorka [5] manja od 0,2 minute, to ukazuje na prisutnost suhe tvari slatke sirutke.

9.3. **Preciznost postupka**

9.3.1. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja istodobno ili brzo jedan za drugim izvede isti analitičar koristeći se istom opremom na jednakom ispitnom materijalu ne smije biti veća od 0,2 % m/m.

9.3.2. *Obnovljivost*

Nije određena.

9.3.3. *Linearnost*

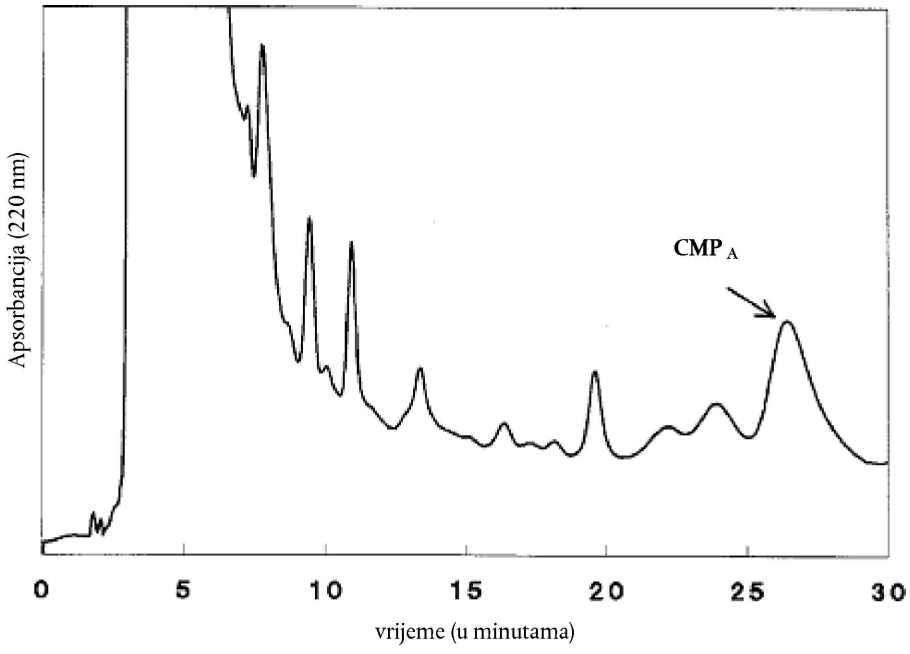
Od 0 do 16 % slatke sirutke linearni se odnos treba dobiti s korelacijskim koeficijentom > 0,99.

9.4. **Tumačenje**

Granica od 1 % uključuje nesigurnost zbog obnovljivosti.

Slika 1.

Ni—4.6 standard



(*) Međunarodna norma IDF 135B/1991. Mlijeko i mliječni proizvodi. Obilježja preciznosti metoda analize. Prikaz postupka međulaboratorijske studije."

3. Dodaju se sljedeći prilozi:

„*PRILOG VI.*

Metode analize maslaca u privatnom skladištenju

Parametar	Metoda
Masti ([1])	ISO 17189 ili ISO 3727 dio 3
Voda	ISO 3727 dio 1
Bezmasna suha tvar (bez soli)	ISO 3727 dio 2
Sol	ISO 15648

([1]) Metodu koja se primjenjuje odobrava agencija za plaćanja.

PRILOG VII.

Metode analize obranog mlijeka u prahu u privatnom skladištenju

Parametar	Metoda
Masti	ISO 1736
Bjelančevine	ISO 8968 dio 1
Voda	ISO 5537

PRILOG VIII.

Metode analize sira u privatnom skladištenju

1. Metoda analize utvrđena u Dodatku upotrebljava se kako bi se osiguralo da sir napravljen isključivo od ovčjeg, kozjeg ili bivoljeg mlijeka ili od mješavine ovčjeg, kozjeg ili bivoljeg mlijeka ne sadržava kazein kravljeg mlijeka.

   Ako je udio kazeina kravljeg mlijeka u analiziranom uzorku jednak udjelu u referentnom uzorku koji sadržava 1 % kravljeg mlijeka ili viši od njega, kako je utvrđeno u Dodatku, smatra se da je kazein kravljeg mlijeka prisutan.

2. Metode za detekciju kazeina kravljeg mlijeka u sirevima iz stavka 1. mogu se primijeniti pod uvjetom da:

   (a) granica detekcije iznosi maksimalno 0,5 %;

   (b) nema lažno pozitivnih rezultata;

   (c) kazein kravljeg mlijeka može se detektirati uz potrebnu osjetljivost čak i nakon dužih razdoblja zrenja, što se može dogoditi u uobičajenim trgovinskim uvjetima.

   Ako bilo koji od gore navedenih zahtjeva nije ispunjen, upotrebljavaju se referentne metode utvrđene u Dodatku.

Dodatak

METODA ZA DETEKCIJU KRAVLJEG MLIJEKA I KAZEINATA U SIREVIMA OD OVČJEG, KOZJEG ILI BIVOLJEG MLIJEKA ILI OD MJEŠAVINA OVČJEG, KOZJEG I BIVOLJEG MLIJEKA

1. PODRUČJE PRIMJENE

Detekcija kravljeg mlijeka i kazeinata u sirevima od ovčjeg, kozjeg ili bivoljeg mlijeka ili od mješavina ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka izoelektričnim fokusiranjem γ-kazeina nakon plazminolize.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Metoda je prikladna za osjetljivu i specifičnu detekciju sirovog i toplinski obrađenog kravljeg mlijeka i kazeinata u svježim ili zrelim sirevima od ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka, ili od mješavina ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka. Nije primjerena za otkrivanje patvorenja mlijeka i sira toplinski obrađenim koncentratima bjelančevina sirutke od kravljeg mlijeka.

3. NAČELO METODE

3.1. **Izolacija kazeina iz sira i referentni standardi**

3.2. **Otapanje izoliranih kazeina i njihovo podvrgavanje plazminskom cijepanju (EC.3.4.21.7)**

3.3. **Izoelektrično fokusiranje plazminski obrađenih kazeina u prisutnosti ureje i bojenje bjelančevina**

3.4. **Ocjenjivanje obojenih obrazaca γ_3- i γ_2-kazeina (dokaz kravljeg mlijeka) na temelju usporedbe obrasca dobivenog iz uzorka s obrascima dobivenim u istom gelu iz referentnih standarda koji sadržavaju 0 % i 1 % kravljeg mlijeka**

4. REAGENSI

Ako nije navedeno drukčije, moraju se upotrebljavati kemikalije analitičke čistoće. Voda mora biti dvostruko destilirana ili jednake čistoće.

Napomena: Sljedeći detalji odnose se na laboratorijski pripravljene poliakrilamidne gelove koji sadržavaju ureju, dimenzija 265 × 125 × 0,25 mm. U slučajevima kad se upotrebljavaju druge veličine i vrste gelova, možda treba podesiti uvjete razdvajanja.

Izoelektrično fokusiranje

4.1. **Reagensi za proizvodnju poliakrilamidnih gelova koji sadržavaju ureju**

4.1.1. *Osnovna otopina gela*

Otopite:

4,85 g akrilamida,

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

48,05 g ureje,

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

u vodi, dopunite do 100 ml i pohranite u smeđoj staklenoj bočici u hladnjak.

Napomena: Umjesto navedenih fiksnih masa neurotoksičnih akrilamida može se upotrijebiti gotova mješavina otopina akrilamida/BIS-a, koja je dostupna na tržištu. Ako takva otopina sadržava 30 % w/v akrilamida i 0,8 % w/v BIS-a, umjesto navedenih fiksnih masa za pripravak upotrebljava se količina od 16,2 ml. Rok valjanosti osnovne otopine je najviše 10 dana; ako je njena vodljivost veća od 5 μS, otopinu treba deionizirati miješajući je 30 minuta s 2 g Amberlita MB-3 i potom profiltrirati kroz membranu od 0,45 μm.

4.1.2. *Otopina gela*

Pripremite otopinu gela miješanjem aditiva i amfolita (*) s osnovnom otopinom gela (vidjeti 4.1.1.).

9,0 ml osnovne otopine

24 mg β-alanina

500 µl amfolita pH 3,5-9,5

250 µl amfolita pH 5-7

250 µl amfolita pH 6-8

Otopinu gela pomiješajte i otplinjavajte dvije do tri minute u ultrazvučnoj kupelji ili vakuumu.

Napomena: Otopinu gela pripremite neposredno prije uporabe (vidjeti 6.2.).

4.1.3. *Otopine katalizatora*

4.1.3.1. N, N, N′ N′ – tetrametiletilendiamin (Temed).

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

Otopite 800 mg PER-a u vodi i dopunite do 2 ml.

Napomena: Uvijek upotrebljavajte svježe pripremljenu otopinu PER-a.

4.2. **Kontaktna tekućina**

Kerozin ili tekući parafin

4.3. **Anodna otopina**

Otopite 5,77 g fosforne kiseline (85 % w/w) u vodi i razrijedite do 100 ml.

4.4. **Katodna otopina**

Otopite 2,00 g natrijeva hidroksida u vodi i razrijedite vodom do 100 ml.

Priprema uzorka

4.5. **Reagensi za izolaciju bjelančevina**

4.5.1. *Razrijeđena octena kiselina (25,0 ml ledene octene kiseline razrijedite vodom do 100 ml)*

4.5.2. *Diklorometan*

4.5.3. *Aceton*

4.6. **Pufer za rastapanje bjelančevina**

Otopite:

5,75 g glicerola (87 % w/w),

24,03 g ureje,

250 mg ditiotreitola

u vodi i nadopunite do 50 ml.

Napomena: Spremite pufer u hladnjak; maksimalni rok trajanja jest tjedan dana.

4.7. **Reagensi za plazminsko cijepanje kazeina**

4.7.1. *Pufer amonijeva karbonata*

Titrirajte 0,2 mol/l otopine amonijeva hidrogen-karbonata (1,58 g/100 ml vode), koja sadržava 0,05 mol/l etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA, 1,46 g/100 ml), s 0,2 mol/l otopine amonijeva karbonata (1,92 g/100 ml vode), koja sadržava 0,05 mol/l kiseline EDTA do pH 8.

4.7.2. *Plazmin kravljeg mlijeka (EC. 3.4.21.7), aktivnosti najmanje 5 U/ml*

4.7.3. *Otopina ε-aminokapronske kiseline za inhibiranje enzima*

Otopite 2,624 g ε-aminokapronske kiseline (6-amino-n-heksanske kiseline) u 100 ml 40 %-tnog (v/v) etanola.

4.8. **Standardi**

4.8.1. *Potvrđeni referentni standardi za mješavinu usirenog obranog ovčjeg i kozjeg mlijeka koja sadržava 0 % i 1 % kravljeg mlijeka dostupni su na Institutu Komisije za referentne materijale i mjerenja, B-2440, Geel, Belgija.*

4.8.2. *Priprema privremenih laboratorijskih standarda za usireno bivolje mlijeko koje sadržava 0 % i 1 % kravljeg mlijeka.*

Obrano se mlijeko priprema centrifugiranjem 2 500 g bivoljeg ili kravljeg sirovog mlijeka na temperaturi od 37 °C u trajanju od 20 minuta. Nakon brzog hlađenja epruvete i sadržaja na 6 do 8 °C, potpuno uklonite gornji sloj masti. Za pripremu standarda od 1 % dodajte 5,00 ml obranog kravljeg mlijeka u 495 ml obranog bivoljeg mlijeka u laboratorijskoj čaši od 1 l, podesite pH na 6,4 dodavanjem razrijeđene mliječne kiseline (10 % w/v). Podesite temperaturu na 35 °C i dodajte 100 µl telećeg sirila (aktivnost sirila 1: 10 000, oko 3 000 U/ml), miješajte 1 minutu i potom ostavite posudu pokrivenu aluminijskom pločom jedan sat na temperaturi od 35 °C da bi se mogao formirati gruš. Nakon formiranja gruša, cijelo usireno mlijeko liofilizira se bez prethodne homogenizacije ili cijeđenja sirutke. Nakon liofilizacije, sitno ga sameljite da biste dobili homogeni prah. Za pripremu standarda od 0 % provodi se isti postupak uz uporabu isključivo obranog bivoljeg mlijeka. Standardi se čuvaju na temperaturi od – 20 °C.

Napomena: Prije pripreme standarda preporuča se provjeriti čistoću bivoljeg mlijeka metodom izoelektričnog fokusiranja kazeina razgrađenih djelovanjem plazmina.

Reagensi za bojenje bjelančevina

4.9. **Fiksator**

Otopite 150 g triklorooctene kiseline u vodi i dopunite do 1 000 ml.

4.10. **Otopina za odbojavanje**

Razrijedite 500 ml metanola i 200 ml ledene octene kiseline destiliranom vodom do količine od 2 000 ml.

Napomena: Svaki dan pripremite svježu otopinu za odbojavanje; možete je pripremiti miješanjem jednakih količina osnovnih otopina 50 %-tnog (v/v) metanola i 20 %-tne (v/v) ledene octene kiseline.

4.11. **Otopine za bojenje**

4.11.1. *Otopina za bojenje (osnovna otopina 1)*

Otopite 3,0 g boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) u 1 000 ml 90 %-tnog (v/v) metanola s pomoću magnetske miješalice (oko 45 minuta), filtrirajte kroz dva naborana filtra srednje brzine.

4.11.2. *Otopina za bojenje (osnovna otopina 2)*

Otopite 5,0 g bakrenog sulfata pentahidrata u 1 000 ml 20 %-tne (v/v) octene kiseline.

4.11.3. *Otopina za bojenje (radna otopina)*

Pomiješajte po 125 ml od svake osnovne otopine (4.11.1., 4.11.2.) neposredno prije bojenja.

Napomena: Otopina za bojenje priprema se na dan kad se koristi.

5. OPREMA

5.1. **Staklene ploče (265 × 125 × 4 mm); gumeni valjak (širine 15 cm); stol s nagibnom radnom površinom**

5.2. **Noseća ploča za gel (265 × 125 mm)**

5.3. **Pokrivna ploča (280 × 125 mm). Na sve duge bridove (vidjeti sliku 1.) nanesite ljepljivu traku (280 × 6 × 0,25 mm).**

5.4. **Komora za elektrofokusiranje s rashladnom pločom (npr. 265 × 125 mm) i odgovarajućim električnim napajanjem (≥ 2,5 kV) ili uređajem za automatsku elektroforezu**

5.5. **Cirkulacijski kriostat, termostatski reguliran na 12 ± 0,5 °C**

5.6. **Centrifuga, podesiva do 3 000 g**

5.7. **Elektrodne trake (duljine ≥ 265 mm)**

5.8. **Plastične boce s kapaljkom za anodnu i katodnu otopinu**

5.9. **Aplikatori za uzorke (10 × 5 mm, od viskoze ili od filtar-papira koji slabo adsorbira bjelančevine)**

5.10. **Posude za bojenje i odbojavanje od nehrđajućeg čelika ili stakla (npr. plitice za instrumente dimenzija 280 × 150 mm)**

5.12. **Podesivi štapni homogenizator (promjera osovine 10 mm), raspona brzine od 8 000 do 20 000 o/min**

5.13. **Magnetska miješalica**

5.14. **Ultrazvučna kupelj**

5.15. **Uređaj za zavarivanje ploče**

5.16. **Mikropipete od 25 µl.**

5.17. **Vakuumski koncentrator ili liofilizator**

5.18. **Vodena kupelj, termostatski regulirana između 35 i 40 ± 1 °C s vibracijskom miješalicom**

5.19. **Denzitometar za očitavanje na valnoj duljini λ = 634 nm**

6. POSTUPAK

6.1. **Priprema uzorka**

6.1.1. *Izolacija kazeina*

Odvagnite količinu koja je ekvivalent 5 g suhe mase sira ili referentnih standarda u epruvetu za centrifugiranje od 100 ml, dodajte 60 ml destilirane vode i homogenizirajte štapnim homogenizatorom (8 000 do 10 000 o/min). Podesite pH na 4,6 pomoću razrijeđene octene kiseline (4.5.1.) i centrifugirajte (5 minuta, 3 000 g). Dekantirajte mast i sirutku, ostatak homogenizirajte na 20 000 o/min u 40 ml destilirane vode čija je pH vrijednost od 4,5 podešena pomoću razrijeđene octene kiseline (4.5.1.); dodajte 20 ml diklorometana (4.5.2.), ponovno homogenizirajte i centrifugirajte (5 minuta, 3 000 g). Špatulom uklonite sloj kazeina koji se nalazi između vodene i organske faze (vidjeti sliku 2.) i dekantirajte obje faze. Kazein ponovo homogenizirajte u 40 ml destilirane vode (vidjeti gore) i 20 ml diklorometana (4.5.2.) i centrifugirajte. Ponavljajte postupak sve dok obje faze ekstrakcije ne postanu bezbojne (dva do tri puta). Ostatak bjelančevina homogenizirajte pomoću 50 ml acetona (4.5.3.) i filtrirajte kroz naborani filtar-papir srednje brzine filtracije. Ostatak na filtru isperite dva puta, svaki put upotrebljavajući po 25 ml acetona, ostavite da se osuši na zraku ili u struji dušika te fino usitnite u tarioniku.

Napomena: Suhe izolate kazeina treba držati na temperaturi od – 20 °C.

6.1.2. *Plazminsko cijepanje β-kazeina radi intenzifikacije γ-kazeina*

Disperzirajte 25 mg izoliranih kazeina (6.1.1.) u 0,5 ml puferske otopine amonijeva karbonata (4.7.1.) i homogenizirajte 20 minuta, npr. ultrazvučnim postupkom. Zagrijte do 40 °C i dodajte 10 µl plazmina (4.7.2.), promiješajte i inkubirajte jedan sat na 40 °C uz neprestano tresenje. Radi inhibicije enzima dodajte 20 µl otopine ε-aminokapronske kiseline (4.7.3.) te potom dodajte 200 mg ureje u krutom obliku i 2 mg ditiotreitola.

Napomena: Radi postizanja veće simetrije fokusiranih kazeinskih vrpci, preporučuje se liofiliziranje otopine nakon dodavanja ε-aminokapronske kiseline i potom otapanje ostatka u 0,5 ml pufera za otapanje bjelančevina (4.6.).

6.2. **Priprema poliakrilamidnih gelova koji sadržavaju ureju**

S pomoću nekoliko kapi vode i valjka noseću ploču za gel (5.2.) stavite na staklenu ploču (5.1.), a višak vode uklonite papirnatim ubrusom ili ručnikom. Na isti način pokrivnu ploču (5.3.) s odstojnicima (0,25 mm) stavite na drugu staklenu ploču. Položite ploču vodoravno na stol s nagibnom radnom površinom.

Dodajte 10 µl Temeda (4.1.3.1.) u pripremljenu i deaeriranu otopinu gela (4.1.2.), promiješajte i dodajte 10 µl otopine PER (4.1.3.2.), dobro izmiješajte i jednakomjerno razlijte po sredini pokrivne ploče. Stavite jedan rub noseće ploče za gel (ploča okrenuta prema dolje) na pokrivnu ploču i preostali dio polagano spuštajte tako da se između dvije plohe stvori tanki sloj gela koji će se jednakomjerno raširiti bez stvaranja mjehurića (slika 3.). Pažljivo spustite noseću ploču do kraja, koristeći se pritom tankom špatulom, i na nju položite još tri staklene ploče koje će poslužiti kao utezi. Po završetku polimerizacije (oko 60 minuta), gel koji se polimerizirao na nosećoj ploči maknite zajedno s pokrivnom pločom, laganim nakretanjem staklenih ploča. Pažljivo očistite naličje noseće ploče da biste uklonili ostatake gela i ureje. Zatvorite „gel-sendvič" u cjevastu foliju i pohranite u hladnjak (najviše šest tjedana).

Napomena: Pokrivna ploča s odstojnicima može se ponovo upotrebljavati. Poliakrilamidni gel može se razrezati na manje dijelove, što se preporučuje u slučaju manjeg broja uzoraka ili ako se upotrebljava uređaj za automatsku elektroforezu (dva gela, dimenzija 4,5 × 5 cm).

6.3. **Izoelektrično fokusiranje**

Termostat za hlađenje podesite na 12 °C. Kerozinom očistite stražnju stranu noseće ploče za gel i potom dodajte nekoliko kapljica kerozina (4.2.) u sredinu rashladnog bloka. Zatim na njega stavite gel-sendvič s nosećom stranom okrenutom prema dolje i povaljajte ga valjkom, pazeći da se pritom ne stvaraju mjehurići. Obrišite višak kerozina i skinite pokrivnu ploču. Elektrodne trake natopite elektrodnim otopinama (4.3., 4.4.), izrežite ih prema duljini gela i položite na predviđena mjesta (razmak između elektroda 9,5 cm).

Uvjeti za izoelektrično fokusiranje:

6.3.1. *Veličina gela 265 × 125 × 0,25 mm*

Faza	Vrijeme (min)	Napon (V)	Jakost (mA)	Snaga (W)	Volt-sati (Vh)
1. Predfokusiranje	30	maksimalni 2 500	maksimalna 15	konstantna 4	oko 300
2. Fokusiranje uzorka ([1])	60	maksimalni 2 500	maksimalna 15	konstantna 4	oko 1 000
3. Konačno fokusiranje	60	maksimalni 2 500	maksimalna 5	maksimalna 20	oko 3 000
	40	maksimalni 2 500	maksimalna 6	maksimalna 20	oko 3 000
	30	maksimalni 2 500	maksimalna 7	maksimalna 25	oko 3 000

([1]) Aplikacija uzorka: nakon predfokusiranja (1. faza) otpipetirajte 18 µl uzorka i standardne otopine na aplikatore uzoraka (10 × 5 mm), poslažite ih na gel u razmacima od 1 mm, odnosno 5 mm uzdužno od anode te ih lagano pritisnute. Izvršite fokusiranje sukladno gore navedenim uvjetima te nakon 60 minuta fokusiranja aplikatore uzoraka pažljivo uklonite.

Napomena: Ako se promijeni debljina ili širina gela, vrijednosti za jakost i snagu treba podesiti u skladu s promjenom (npr. udvostručiti vrijednosti jakosti i snage ako se upotrebljava gel dimenzija 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. *Primjer naponskog režima za uređaj za automatsku elektroforezu (2 gela dimenzija 5,0 × 4,5 cm); elektrode bez traka nanesene izravno na gel*

Faza	Napon	Jakost	Snaga	Temp.	Volt-sati
1. Predfokusiranje	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Fokusiranje uzorka	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

Postavite aplikator za uzorak u fazi 2. pri 0 Vh.

Uklonite aplikator za uzorak u fazi 2. pri 30 Vh.

6.4. **Bojenje bjelančevina**

6.4.1. *Fiksacija bjelančevina*

Čim isključite struju, uklonite elektrodne trake i odmah stavite gel u posudu za bojenje/odbojavanje s 200 ml fiksatora (4.9.); ostavite 15 minuta uz neprekidno mućkanje.

6.4.2. *Ispiranje i bojenje ploče s gelom*

Dobro ocijedite fiksator i ploču s gelom dva puta ispirite po 30 sekundi, svaki put s po 100 ml otopine za odbojavanje (4.10.). Izlijte otopinu za odbojavanje i u posudu nalijte 250 ml otopine za bojenje (4.11.3.); ostavite 45 minuta da boja djeluje, uz lagano protresanje.

6.4.3. *Odbojavanje ploče s gelom*

Izlijte otopinu za bojenje, ploču s gelom dva puta isperite, svaki put sa 100 ml otopine za odbojavanje (4.10.), zatim 15 minuta protresajte sa 200 ml otopine za odbojavanje te ponavljajte postupak odbojavanja, najmanje dva do tri puta, dok pozadina ne postane bistra i bezbojna. Ploču s gelom isperite destiliranom vodom (2 × 2 minute) i osušite na zraku (2 do 3 sata) ili sušilom za kosu (10 do 15 minuta).

Napomena 1.: Izvršite fiksaciju, ispiranje, bojenje i odbojavanje na temperaturi od 20 °C. Ne koristite više temperature.

Napomena 2.: Ako radije primjenjujete osjetljiviju metodu bojenja srebrom (npr. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, oznaka br. 17-1150-01), uzorke kazeina obrađene plazminom treba razrijediti na 5 mg/ml.

7. OCJENJIVANJE

Ocjenjivanje se provodi usporedbom struktura bjelančevina u nepoznatim uzorcima s referentnim standardima na istom gelu. Prisutnost kravljeg mlijeka u sirevima od ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka i mješavinama ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka utvrđuje se na temelju γ_3 - and γ_2 -kazeina, čije se izoelektrične točke nalaze između pH 6,5 i pH 7,5 (slike 4.a i b i slika 5.). Granica detekcije niža je od 0,5 %.

7.1. **Vizualna procjena**

Za vizualnu procjenu količine kravljeg mlijeka preporuča se izjednačiti koncentracije uzoraka i standarda radi dobivanja istih razina intenziteta ovčjih, kozjih i/ili bivoljih γ_2- i γ_3-kazeina (vidjeti „γ_2 E, G, B” i „γ_3 E, G, B” na slikama 4.a, 4.b i 5.). Nakon toga se količina kravljeg mlijeka (manje, jednako ili više od 1 %) u nepoznatom uzorku može izravno procijeniti usporedbom intenziteta kravljih γ_3- i γ_2-kazeina (vidjeti „γ_3 C” i „γ_2 C” na slikama 4.a i b te na slici 5.) s onima u referentnim standardima od 0 % i 1 % (ovčji, kozji) ili u privremenim laboratorijskim standardima (bivolji).

7.2. **Denzitometrijska procjena**

Za utvrđivanje omjera površina pikova kravljih i ovčjih, kozjih i/ili bivoljih kazeina γ_2 i γ_3 (vidjeti sliku 5.) primijenite denzitometriju (5.19.), ako je moguće. Usporedite tu vrijednost s omjerom površina pikova kazeina γ_2- i γ_3 referentnog standarda od 1 % (ovčji, kozji) ili privremenog laboratorijskog standarda (bivolji) analiziranih na istom gelu.

Napomena: Ova je metoda zadovoljavajuća ako postoji jasan pozitivan signal za oba kravlja γ_2- i γ_3-kazeina, u referentnom standardu od 1 %, ali ne i u referentnom standardu od 0 %. U protivnom, optimizirajte postupak pažljivo slijedeći detaljne upute navedene u metodi.

Uzorak se smatra pozitivnim ako su oba kravlja γ_2- i γ_3-kazeina ili odgovarajući omjeri površina pikova jednaki razini u referentnoj normi od 1 % ili veći od te razine.

8. REFERENTNA LITERATURA

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

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

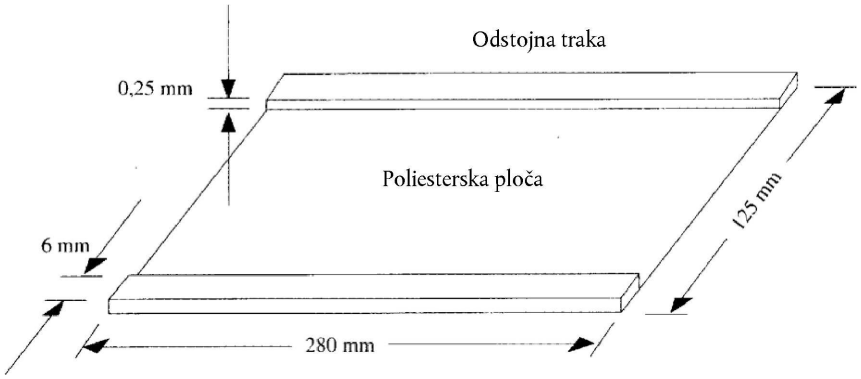
Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier, v: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ur.), Bode-Verlag,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

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

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.

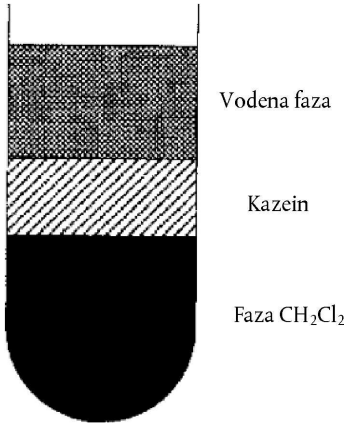
Slika 1.

Shematski crtež pokrivne ploče



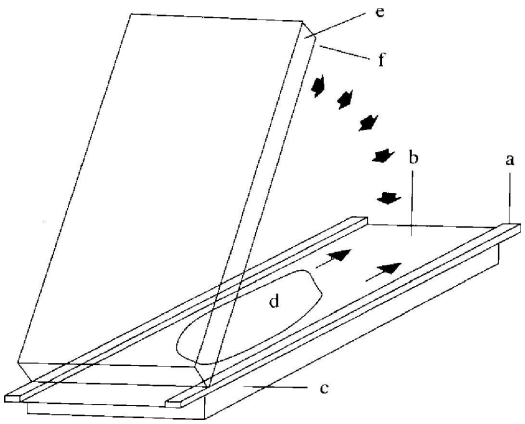
Slika 2.

Sloj kazeina koji nakon centrifugiranja pluta između vodene i organske faze



Slika 3.

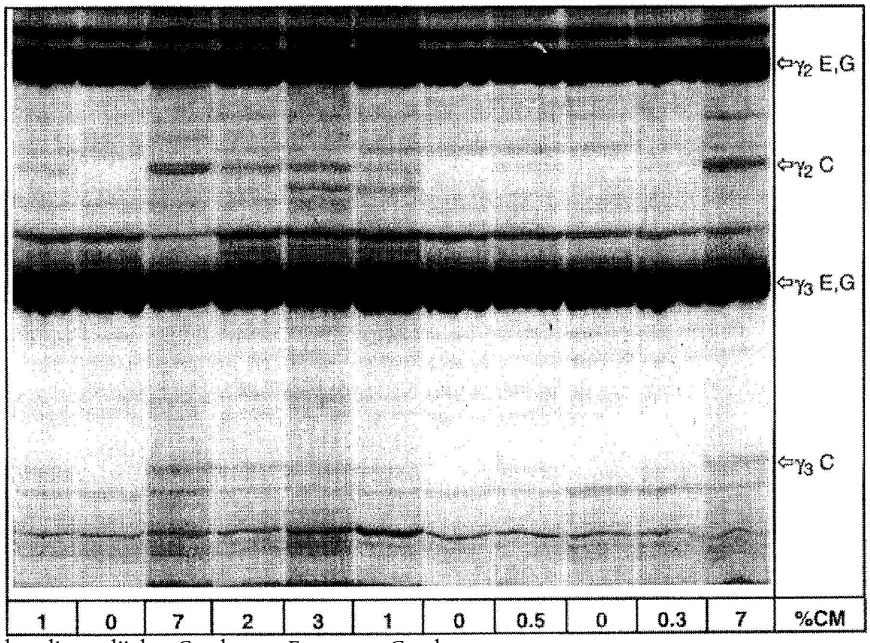
Tehnika lijevanja ultratankih poliakrilamidnih gelova poklapanjem



a = odstojnik (0,25 mm); b = pokrivna ploča (5.3.); c, e = staklene ploče (5.1.); d = otopina gela (4.1.2.); f = noseća ploča za gel (5.2.)

Slika 4.a

Izoelektrično fokusiranje kazeina obrađenih plazminom iz sireva od ovčjeg i kozjeg mlijeka koji sadržavaju različite količine kravljeg mlijeka

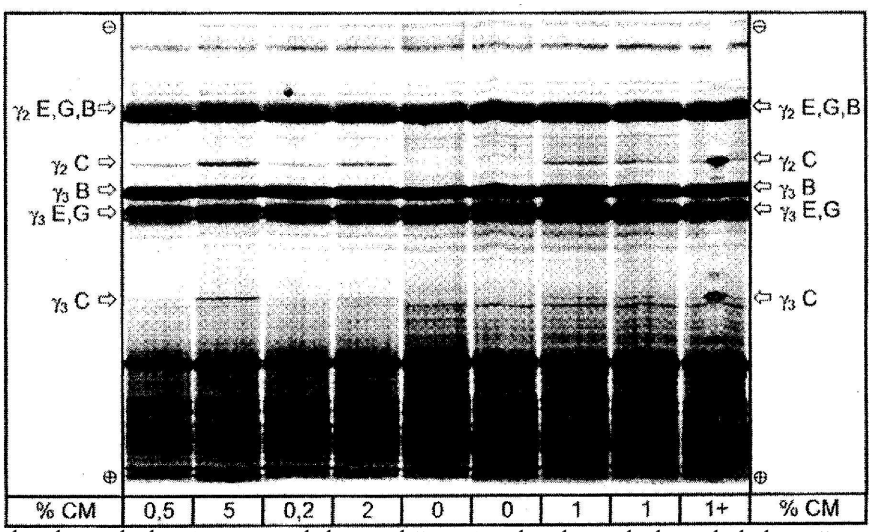


% CM = postotak kravljeg mlijeka, C = krava, E = ovca, G = koza

Prikazana je gornja polovica IEF gela.

Slika 4.b

Izoelektrično fokusiranje kazeina obrađenih plazminom iz sireva od mješavina ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka koji sadržavaju različite količine kravljeg mlijeka

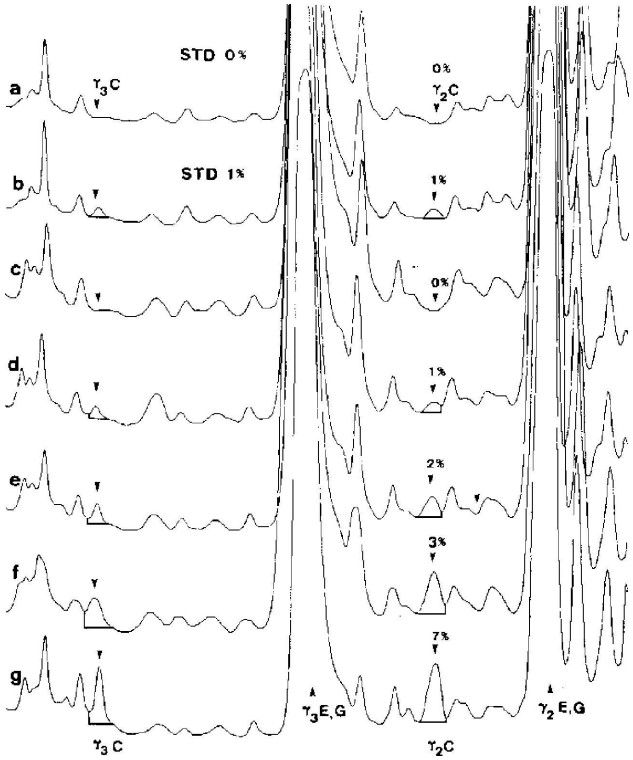


% CM = postotak kravljeg mlijeka; 1+ = uzorak koji sadržava 1 % kravljeg mlijeka s dodatkom čistog kravljeg kazeina u sredini traga; C = krava, E = ovca, G = koza, B = bivol

Prikazana je potpuna razdaljina razdvajanja IEF gela.

Slika 5.

Preklapanje denzitograma standarda (STD) i uzoraka sireva od mješavine ovčjeg i kozjeg mlijeka nakon izoelektričnog fokusiranja



a,b = standardi koji sadržavaju 0 % i 1 % kravljeg mlijeka; c-g = uzorci sireva koji sadržavaju 0, 1, 2, 3 i 7 % kravljeg mlijeka; C = krava, E = ovca, G = koza

Skenirana je gornja polovica IEF gela na λ = 634 nm.

PRILOG IX.

Ocjenjivanje analiza

1. **Osiguranje kvalitete**

Analize se provode u laboratorijima određenima u skladu s člankom 12. Uredbe (EZ) br. 882/2004 ili laboratorijima koje su odredila nadležna tijela država članica.

2. **Uzorkovanje i sporovi povezani s rezultatima analiza**

1. Uzorkovanje se provodi u skladu s uredbom koja je relevantna za predmetni proizvod. Ako odredbe o uzorkovanju nisu izričito predviđene, primjenjuju se odredbe utvrđene normom ISO 707, Mlijeko i mliječni proizvodi – Smjernice za uzorkovanje.

2. Laboratorijska izvješća o rezultatima analiza moraju sadržavati dovoljno informacija za ocjenjivanje rezultata koje se provodi u skladu s Dodatkom.

3. Za analize koje se traže u skladu s pravilima Zajednice uzorci se uzimaju u duplikatu.

4. U slučaju spora oko rezultata, agencija za plaćanja dat će ponovno provesti potrebnu analizu predmetnog proizvoda, a troškove snosi stranka koja izgubi spor.

Navedena analiza provodi se pod uvjetom da su raspoložive zapečaćene kopije uzoraka proizvoda koje je nadležno tijelo čuvalo na propisan način. Proizvođač agenciji za plaćanja šalje zahtjev za provedbu analize u roku od sedam radnih dana po objavi rezultata prve analize. Agencija za plaćanja provodi analizu unutar razdoblja od 21 radnog dana od primitka zahtjeva.

5. Rezultat žalbe smatra se konačnim.

6. Ako proizvođač u roku od pet radnih dana nakon uzorkovanja može dokazati da postupak uzorkovanja nije bio ispravno proveden, uzorkovanje se ponavlja, ako je moguće. Ako se uzorkovanje ne može ponoviti, pošiljka se mora prihvatiti.

Dodatak

Ocjenjivanje sukladnosti pošiljke s propisanim ograničenjima

1. **Načelo**

Ako su detaljni postupci uzorkovanja utvrđeni zakonodavstvom o javnoj intervenciji i privatnom skladištenju, primjenjuju se ti postupci. U svim drugim slučajevima uzima se uzorak koji se sastoji od najmanje 3 jedinice uzorka koje se nasumično uzmu iz pošiljke koja je dana na pregled. Može se pripremiti i kompozitni uzorak. Dobiveni rezultat uspoređuje se s propisanim graničnim vrijednostima na temelju izračuna 95 %-tnog intervala pouzdanosti kao dvostruke standardne devijacije, pri čemu relevantna standardna devijacija ovisi o tome (1) je li metoda potvrđena u okviru međunarodne suradnje kroz vrijednosti za σ_r i σ_R ili je (2), u slučaju interne validacije, izračunana interna obnovljivost. Ovaj interval pouzdanosti bit će tada jednak mjernoj nesigurnosti rezultata.

2. **Metoda se validira kroz međunarodnu suradnju**

U ovom slučaju standardna devijacija ponovljivosti σ_r i standardna devijacija obnovljivosti σ_R utvrđene su i laboratorij može dokazati sukladnost s izvedbenim karakteristikama validirane metode.

Izračunajte aritmetičku sredinu $\bar{x}$ za n ponovljenih mjerenja.

Izračunajte proširenu nesigurnost ($k = 2$) $\bar{x}$ kao

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

Ako se konačni rezultat mjerenja izračunava upotrebom formule u obliku $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ ili $x = y_1/y_2$, u takvim se slučajevima primjenjuju uobičajeni postupci za kombiniranje standardnih devijacija.

Pošiljka se ocjenjuje kao nesukladna s propisanom gornjom graničnom vrijednošću UL ako je

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

inače se ocjenjuje kao sukladna s propisanom gornjom graničnom vrijednošću UL.

Pošiljka se ocjenjuje kao nesukladna s propisanom donjom graničnom vrijednošću LL ako je

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

inače se ocjenjuje kao sukladna s LL.

3. **Interna validacija izračunom standardne devijacije interne obnovljivosti**

U slučajevima kad se primjenjuju metode koje nisu navedene u ovoj Uredbi i kad nisu utvrđene mjere za preciznost, mora se provesti interna validacija. U formuli za izračun proširene nesigurnosti $_U$, umjesto σ_r i σ_R treba upotrijebiti standardnu devijaciju interne ponovljivosti σ_{ir}, odnosno standardnu devijaciju interne obnovljivosti σ_{iR}.

Pravila koja treba slijediti za utvrđivanje sukladnosti s propisanim ograničenjima navode se u točki 1. Međutim, ako se ocijeni da je pošiljka nesukladna s propisanim ograničenjem, mjerenja se moraju ponoviti uz primjenu metode navedene u ovoj Uredbi, a rezultat se ocjenjuje u skladu s točkom 1.

(*) Proizvodi Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) i Resolyte® pH 5-7 i pH 6-8 (BDH, Merck) pokazali su se kao posebno primjereni za postizanje potrebnog odvajanja γ-kazeina.

(**) Uredba (EZ) br. 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o službenim kontrolama koje se provode radi provjeravanja poštivanja propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja (SL L 165, 30.4.2004., str. 1.).”