I

(EY:n ja Euratomin perustamissopimuksia soveltamalla annetut säädökset, joiden julkaiseminen on pakollista)

ASETUKSET

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 273/2008,

annettu 5 päivänä maaliskuuta 2008,

neuvoston asetuksen (EY) N:o 1255/1999 soveltamista koskevista yksityiskohtaisista säännöistä maidon ja maitotuotteiden analysointi- ja laadunarviointimenetelmien osalta

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon maito- ja maitotuotealan yhteisestä markkinajärjestelystä 17 päivänä toukokuuta 1999 annetun neuvoston asetuksen (EY) N:o 1255/1999 ([1]) ja erityisesti sen 10 ja 15 artiklan, 26 artiklan 3 kohdan, 29 artiklan 1 kohdan ja 31 artiklan 4 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 213/2001 ([2]) vahvistetaan neuvoston asetuksen (EY) N:o 1255/1999 soveltamista koskevat yksityiskohtaiset erityissäännöt maidon ja maitotuotteiden analysoimisen ja laadun arvioimisen osalta. Analyyttisten menetelmien teknisen kehityksen vuoksi asetukseen on tarpeen tehdä merkittäviä lisämuutoksia. Koska muutokset ovat lukuisia ja teknisiä, asetus (EY) N:o 213/2001 olisi selkeyden ja tehokkuuden varmistamiseksi kumottava ja korvattava uudella asetuksella.

(2) Asetuksessa (EY) N:o 1255/1999 säädettyjen järjestelyjen yhteydessä vahvistetut maidon ja maitotuotteiden koostumukseen ja laatuominaisuuksiin liittyvät vaatimukset on tarkistettava sen varmistamiseksi, että niitä voidaan noudattaa tiukasti.

(3) Näissä tarkistuksissa käytettävät vertailumenetelmät ovat usein esimerkiksi Euroopan standardointikomitean (CEN), kansainvälisen meijeriliiton (IDF), kansainvälisen standardisoimisjärjestön (ISO) ja AOAC Internationalin (Scientific Association dedicated to the analytical Excellence) julkaisemia ja säännöllisesti päivittämiä. Eräissä tapauksissa on otettu käyttöön yhteisön vertailumenetelmä, ja eräissä tapauksissa yhteisön lainsäädännössä ei ole täsmennetty vertailumenetelmää. Vertailumenetelmien yhdenmukaisen soveltamisen varmistamiseksi olisi laadittava luettelo vertailumenetelmistä ja säädettävä, että komissio muuttaa luetteloa tarvittaessa.

(4) Rutiinimenetelmien soveltamista ei pidä kieltää. Tästä syystä niiden käytölle olisi täsmennettävä vähimmäisvaatimukset.

(5) Analyysien tulosten yhdenmukaista arviointia, tuotteiden aistinvaraista arviointia ja kiistanalaisten tulosten uudelleentarkastelua varten olisi vahvistettava yhteiset menetelmät.

(6) Tietyille analyyseille ei ole vielä olemassa kansainvälisesti hyväksyttyjä validoituja vertailumenetelmiä, eikä eri laboratorioiden analyysien tulosten välisestä vaihtelusta ole saatavilla tietoja. Sen vuoksi yhteisössä olisi otettava käyttöön kansainvälisten sääntöjen mukaisesti validoituja menetelmiä, joita olisi sovellettava vertailumenetelminä.

(7) Komission asetuksessa (EY) N:o 1898/2005 ([3]) vahvistetaan neuvoston asetuksen (EY) N:o 1255/1999 soveltamista koskevat yksityiskohtaiset säännöt kerman, voin ja voiöljyn myyntiä yhteisön markkinoilla koskevien toimenpiteiden osalta ja säädetään merkkiaineiden lisäämisestä kermaan, voihin ja voiöljyyn tietyissä olosuhteissa kyseisten tuotteiden asianmukaisen loppukäytön varmistamiseksi. Merkkiaineet ovat tärkeitä järjestelmän moitteettoman toiminnan kannalta. Järjestelmään osallistuvien toimijoiden yhtäläisen kohtelun varmistamiseksi olisi vahvistettava eräiden merkkiaineiden määrittämistä koskevat yhteiset menetelmät.

([1]) EYVL L 160, 26.6.1999, s. 48, asetus sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 1152/2007 (EUVL L 258, 4.10.2007, s. 3). Asetus (EY) N:o 1255/1999 korvataan asetuksella (EY) N:o 1234/2007 (EUVL L 299, 16.11.2007, s. 1) 1 päivästä heinäkuuta 2008.

([2]) EYVL L 37, 7.2.2001, s. 1.

([3]) EUVL L 308, 25.11.2005, s. 1, asetus sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 1546/2007 (EUVL L 337, 21.12.2007, s. 68).

(8) Uuhen maidosta valmistettujen juustojen yksityiselle varastoinnille voidaan myöntää tukea asetuksen (EY) N:o 1255/1999 9 artiklan nojalla. Näille tuotteille voidaan myöntää erityistukea mainitun asetuksen 31 artiklan nojalla. Uuhen-, vuohen- tai puhvelinmaidosta taikka uuhen-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksista valmistettuja juustoja voidaan tuoda yhteisöön tietyistä kolmansista maista etuuskohtelujärjestelmän mukaisesti. Edellä esitetyn vuoksi on tarpeen varmistaa asianmukaisilla tarkastuksilla, etteivät kyseiset tuotteet sisällä lehmänmaitoa. Sen vuoksi olisi vahvistettava yhteisön vertailumenetelmä lehmänmaidon osoittamiseksi, sanotun kuitenkaan rajoittamatta rutiinimenetelmien käyttöä, jos ne täyttävät tietyt vaatimukset.

(9) Kaseiinin ja kaseinaattien valmistukseen käytettävän rasvattoman maidon tuen myöntämisestä 10 päivänä lokakuuta 1990 annetun komission asetuksen (ETY) N:o 2921/90 ([1]) mukaan koliformien esiintyminen on tutkittava. Kansainvälisesti hyväksytty vertailumenetelmä koliformien osoittamiseksi maidossa ja maitotuotteissa on ISO 4831. Yhteisön vertailumenetelmä koliformien osoittamiseksi on vahvistettu edellä mainitun standardin perusteella.

(10) Tariffi- ja tilastonimikkeistöstä ja yhteisestä tullitariffista 23 päivänä heinäkuuta 1987 annetussa neuvoston asetuksessa (ETY) N:o 2658/87 ([2]) eritellään nimikkeeseen 2309 kuuluvien rehuseosten tullit niiden maitotuotepitoisuuden perusteella. Sääntöjen yhtenäisen soveltamisen varmistamiseksi olisi määriteltävä kaikissa jäsenvaltioissa pakollisesti sovellettava laktoosipitoisuuden määritysmenetelmä.

(11) Asetuksessa (EY) N:o 1255/1999 säädetään, että interventioon tarkoitetun voin ja rasvattoman maitojauheen tai eläinten ruokinnassa käytetyn rasvattoman maitojauheen on oltava tiettyjen laatuvaatimusten mukainen. Olisi vahvistettava vertailumenetelmät mainittujen vaatimusten noudattamisen varmistamiseksi.

(12) Eräät menetelmät otetaan tällä asetuksella käyttöön ensimmäistä kertaa. Olisi säädettävä riittävän pitkästä ajanjaksosta tämän asetuksen voimaantulon jälkeen, jotta laboratoriot voisivat ottaa kyseiset uudet menetelmät käyttöön ja käyttää niitä asianmukaisesti. Silloin kun jokin standardointijärjestö tarkistaa liitteessä I tarkoitettua vertailumenetelmää ja julkaisee sen, laboratorioiden olisi saatettava analyysimenetelmänsä uuden standardin mukaiseksi kuuden kuukauden kuluessa.

(13) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat maidon ja maitotuotteiden hallintokomitean lausunnon mukaiset,

([1]) EYVL L 279, 11.10.1990, s. 22, asetus sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 1487/2006 (EUVL L 278, 10.10.2006, s. 8).

([2]) EYVL L 256, 7.9.1987, s. 1, asetus sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission asetuksella (EY) N:o 1352/2007 (EUVL L 303, 21.11.2007, s. 3).

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

I LUKU

YLEISET SÄÄNNÖKSET

1 artikla

Kohde ja soveltamisala

1. Tässä asetuksessa vahvistetaan eräät asetuksella (EY) N:o 1255/1999 perustetun maidon ja maitotuotteiden yhteisen markkinajärjestelyn mukaisiin järjestelyihin kuuluvien maidon ja maitotuotteiden kemiallisten, fysikaalisten ja mikrobiologisten muuttujien analysointiin ja aistinvaraiseen arviointiin liittyvät vertailumenetelmät ja niihin sovellettavat säännöt.

2. Tämän asetuksen liitteessä I vahvistetaan luettelo 1 kohdassa tarkoitettuihin analyyseihin sovellettavista vertailumenetelmistä.

3. Komissio päivittää luetteloa asetuksen (EY) N:o 1255/1999 42 artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen.

2 artikla

Rutiinimenetelmät

Yhteisön lainsäädännössä vaadittuihin analyyseihin voidaan käyttää rutiinimenetelmiä, jotka on asianmukaisesti kalibroitu ja tarkistettu säännöllisesti vertailumenetelmän avulla. Tuloksia vertailtaessa on otettava huomioon systemaattinen harha, toistettavuus ja uusittavuus.

Jos tulokset ovat kiistanalaiset, vertailumenetelmällä saatu tulos on ratkaiseva.

Jäsenvaltioiden on ilmoitettava komissiolle 1 artiklassa tarkoitetuissa analyyseissä käytettävistä rutiinimenetelmistä.

II LUKU

ANALYYSIMENETELMÄT

3 artikla

Lakisääteisten raja-arvojen noudattamisen arviointi kustakin erästä

Merkkiaineiden määritystä lukuun ottamatta tämän asetuksen liitettä II sovelletaan määritettäessä, onko erä koostumusta koskevien lakisääteisten vaatimusten mukainen.

4 artikla

Aistinvarainen arviointi

1. Maidon ja muiden maitotuotteiden kuin julkiseen varastointiin tarkoitetun voin osalta jäsenvaltioiden on käytettävä aistinvaraisen arvioinnin vertailumenetelmänä IDF-standardia 99C:1997 tai muita vastaavia menetelmiä, jotka niiden on annettava tiedoksi komissiolle.

Arvioijien suorituksen ja aistinvaraisen arvioinnin tulosten luotettavuuden tarkistamiseksi on sovellettava liitteessä III esitettyjä menetelmiä.

2. Julkiseen varastointiin tarkoitetun voin osalta arvioijien suorituksen ja aistinvaraisen arvioinnin tulosten luotettavuuden tarkistamiseksi on sovellettava liitteessä III esitettyjä menetelmiä.

Aistinvaraisen arvioinnin vertailumenetelmänä sovelletaan liitteessä IV esitettyä menetelmää.

5 artikla

Merkkiaineet

1. Liitteessä V esitettyä määritysmenetelmää sovelletaan vertailumenetelmänä määritettäessä voiöljyn, voin ja kerman enanttihappotriglyseridipitoisuutta.

2. Liitteessä VI esitettyä määritysmenetelmää sovelletaan vertailumenetelmänä määritettäessä voiöljyn, voin tai kerman vanilliinipitoisuutta.

3. Liitteessä VII esitettyä määritysmenetelmää sovelletaan vertailumenetelmänä määritettäessä voiöljyn tai voin β-apo-8'-karoteenihappoetyyliesteripitoisuutta.

4. Liitteessä VIII esitettyä määritysmenetelmää sovelletaan vertailumenetelmänä määritettäessä voin ja voiöljyn stigmasteroli- tai β-sitosterolipitoisuutta.

5. Voiöljyyn, voihin tai kermaan katsotaan lisätyn merkkiaineita yhteisön lainsäädännön mukaisesti, jos saadut tulokset ovat liitteessä V olevan 10 ja 11 kohdan sekä liitteissä VI, VII ja VIII olevan 8 kohdan vaatimusten mukaisia.

6 artikla

Lehmänmaidon kaseiinin osoittaminen

1. Liitteessä IX esitettyä vertailumenetelmää sovelletaan sen varmistamiseksi, ettei juusto, joka on valmistettu yksinomaan uuhen-, vuohen- tai puhvelinmaidosta taikka uuhen-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksista, sisällä lehmänmaidon kaseiinia.

Lehmänmaidon kaseiinia katsotaan esiintyvän, jos analysoitavan näytteen lehmänmaidon kaseiinipitoisuus on yhtä suuri tai suurempi kuin liitteessä IX esitetyn, 1 prosenttia lehmänmaitoa sisältävän vertailunäytteen pitoisuus.

2. Lehmänmaidon kaseiinin osoittamiseksi 1 kohdassa tarkoitetuista juustoista voidaan käyttää rutiinimenetelmiä seuraavin edellytyksin:

a) toteamisraja on enintään 0,5 prosenttia; ja

b) vääriä positiivisia tuloksia ei esiinny; ja

c) lehmänmaidon kaseiini on osoitettavissa vaaditulla herkkyydellä pitkienkin kypsyttämisjaksojen jälkeen, kuten voi tapahtua tavanomaisissa kaupallisissa olosuhteissa.

Jos jokin edellä mainituista edellytyksistä ei täyty, on käytettävä liitteessä IX esitettyjä vertailumenetelmiä.

7 artikla

Koliformien osoittaminen

Koliformien osoittamiseksi voissa, rasvattomassa maitojauheessa, kaseiinissa ja kaseinaateissa käytetään liitteessä X esitettyä vertailumenetelmää.

8 artikla

Laktoosipitoisuuden määrittäminen

CN-koodiin 2309 kuuluvien tuotteiden laktoosipitoisuuden määrittämiseksi käytetään liitteessä XI esitettyä määritysmenetelmää.

9 artikla

Herajuoksetteen osoittaminen

1. Herajuoksetteen osoittamiseksi julkiseen varastointiin tarkoitetussa rasvattomassa maitojauheessa käytetään liitteessä XII esitettyä vertailumenetelmää.

2. Herajuoksetteen osoittamiseksi eläinten ruokintaan tarkoitetussa rasvattomassa maitojauheessa ja rehun esiseoksissa käytetään liitteessä XII esitettyä vertailumenetelmää. Jos herajuoksetetta havaitaan, on sovellettava liitettä XIII.

10 artikla

Kirnupiimän osoittaminen

Kirnupiimän osoittamiseksi rasvattomassa maitojauheessa käytetään liitteessä XIV esitettyä vertailumenetelmää.

11 artikla

Antibioottijäämien osoittaminen

Antibioottijäämien osoittamiseksi rasvattomassa maitojauheessa käytetään liitteessä XV esitettyä vertailumenetelmää.

12 artikla

Rasvattoman maitojauheen pitoisuuden määrittäminen

Rasvattoman maitojauheen pitoisuuden määrittämiseksi rehuseoksissa käytetään liitteessä XVI esitettyä vertailumenetelmää.

13 artikla

Tärkkelyksen osoittaminen

Tärkkelyksen osoittamiseksi rasvattomassa maitojauheessa, denaturoidussa maitojauheessa ja rehuseoksissa käytetään liitteessä XVII esitettyä vertailumenetelmää.

14 artikla

Kuivatun kerman kosteuspitoisuuden määrittäminen

Kuivatun kerman kosteuspitoisuuden määrittämiseksi käytetään liitteessä XVIII esitettyä vertailumenetelmää.

15 artikla

Happaman kirnupiimäjauheen kosteuspitoisuuden määrittäminen

Rehuissa käytettäväksi tarkoitetun happaman kirnupiimäjauheen kosteuspitoisuuden määrittämiseksi käytetään liitteessä XIX esitettyä vertailumenetelmää.

16 artikla

Maitorasvan puhtauden määrittäminen

Maitorasvan puhtauden määrittämiseksi käytetään liitteessä XX esitettyä vertailumenetelmää.

III LUKU

YLEISET SÄÄNNÖKSET JA LOPPUSÄÄNNÖKSET

17 artikla

Laadunvarmistus

Määritykset on tehtävä laboratorioissa, joilla on analyyttinen laadunvarmistusjärjestelmä, johon kuuluu sisäisiä laadunvalvontamenettelyjä. Laboratorioiden, joilla ei ole hyväksyntää, on osallistuttava pätevyystestausjärjestelmään vähintään kerran vuodessa; niiden tulokset voivat poiketa konsensusarvosta enintään $2\sigma_R$ (vertailumenetelmän uusittavuuden standardipoikkeama). Laboratoriossa on oltava saatavilla yksityiskohtainen kuvaus käytettävistä järjestelmistä.

Rehu- ja elintarvikelainsäädännön sekä eläinten terveyttä ja hyvinvointia koskevien sääntöjen mukaisuuden varmistamiseksi suoritetusta virallisesta valvonnasta 29 päivänä huhtikuuta 2004 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 882/2004 ([1]) 12 artiklassa tarkoitettujen standardien mukaisesti akkreditoitujen laboratorioiden ei tarvitse osallistua pätevyystestaukseen.

18 artikla

Näytteenotto ja analyysien tulosten kiistäminen

1. Näytteenotto on tehtävä asianomaista tuotetta koskevien säännösten mukaisesti. Jos näytteenottoa koskevia säännöksiä ei ole, on noudatettava ohjeita, jotka annetaan standardissa ISO 707 | IDF 50 – Maito ja maitovalmisteet. Näytteenotto.

2. Analyysin tuloksista tehdyssä laboratorioraportissa on oltava riittävästi tietoja, jotta tuloksia voidaan arvioida liitteiden II ja XXI mukaisesti.

3. Yhteisön lainsäädännössä säädettyjen analyysien tekemiseksi on otettava kaksoisnäytteitä.

4. Jos toimija ei hyväksy analyysin tuloksia, sovelletaan liitteessä XXI esitettyä menettelyä.

5. Jos valmistaja voi todistaa viiden työpäivän kuluessa näytteenotosta, että näytteenottoa ei suoritettu asianmukaisesti, on mahdollisuuksien mukaan otettava uudet näytteet. Jos uusia näytteitä ei voida ottaa, erä on hyväksyttävä.

19 artikla

Siirtymäkausi

Tämän asetuksen liitteen II mukainen vaatimustenmukaisuusarviointi on tehtävä 12 kuukauden kuluessa asetuksen voimaantulosta. Jäsenvaltioiden on ilmoitettava komissiolle viipymättä, jos kyseisellä ajanjaksolla esiintyy merkittäviä ongelmia tilastollisessa valvontamenettelyssä.

20 artikla

Kumoamiset

Kumotaan asetus (EY) N:o 213/2001.

Viittauksia kumottuun asetuksen pidetään viittauksina tähän asetukseen liitteessä XXII olevan vastaavuustaulukon mukaisesti.

([1]) EUVL L 165, 30.4.2004, s. 1.

21 artikla

Voimaantulo

Tämä asetus tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Sitä sovelletaan 31 päivästä maaliskuuta 2008.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 5 päivänä maaliskuuta 2008.

Komission puolesta
Mariann FISCHER BOEL
Komission jäsen

LIITE I

(1 artikla)

VERTAILUMENETELMIEN LUETTELO

Lyhenneluettelo: Min. = minimi, Max. = maksimi, Liite = mainitun asetuksen liite, IDF = kansainvälinen meijeriliitto, ISO = kansainvälinen standardisoimisjärjestö, IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry, ADPI = American Dairy Products Institute.

A OSA

Komission asetus	Tuote	Parametri	Raja-arvo (1)	Vertailumenetelmä	Huomautus
Asetus (EY) N:o 2771/1999 – Julkinen varastointi	Suolaton voi	Rasva	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vesi	Enintään 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		Rasvaton kuiva-aine	Enintään 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Rasvan happamuus	1,2 mmol/100g rasvaa	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		Peroksidiluku (Max.)	0,3 mekv. happea/1 000g rasvaa	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Huomautus 1
		Koliformit	Ei havaittavissa 1g:ssa	Liite X	Huomautus 3
		Muu kuin maitorasva	Ei havaittavissa triglyseridianalyysissä	Liite XX	
		Merkkiaineet: sterolit	Ei havaittavissa, β-sitosteroli ≤ 40 mg/kg	Liite VIII	
		Muut merkkiaineet			
		— vanilliini	Ei havaittavissa	Liite VI	
		— karoteenihappoetyyliesteri	≤ 6 mg/kg	Liite VII	
		— enanttihappotriglyseridit	Ei havaittavissa	Liite V	
		Aistinvaraiset ominaisuudet	Vähintään 4 5:stä pisteestä ulkonäön, maun ja koostumuksen osalta	Liite IV	

Komission asetus	Tuote	Parametri	Raja-arvo (1)	Vertailumenetelmä	Huomautus
		Irrallinen vesi	Vähintään 4 pistettä	ISO 7586:1985|IDF 112A:1989	
Asetus (EY) N:o 2771/1999 – Yksityinen varastointi	Suolaton voi	Rasva	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vesi	Enintään 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		Rasvaton kuiva-aine	Enintään 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
Asetus (EY) N:o 2771/1999 – Yksityinen varastointi	Suolattu voi	Rasva	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vesi	Enintään 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		Rasvaton kuiva-aine (suola pois luettuna)	Enintään 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Suola	Enintään 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Asetus (EY) N:o 1898/2005, II luku	Suolaton voi	Rasva	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Muu kuin maitorasva		Liite XX	
		Vesi	Enintään 16 % m/m	ISO 3727-1 2001|IDF 80-1:2001	
		Rasvaton kuiva-aine	Enintään 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Merkkiaineet:			
		— sterolit	Ks. liite VIII	Liite VIII	
		— vanilliini	Ks. liite VI	Liite VI	
		— karoteenihappoetyyliesteri	Ks. liite VII	Liite VII	
		— enanttihappotriglyseridit	Ks. liite V	Liite V	
Asetus (EY) N:o 1898/2005, II luku	Suolattu voi	Rasva	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Muu kuin maitorasva		Liite XX	
		Vesi	Enintään 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		Rasvaton kuiva-aine (suola pois luettuna)	Enintään 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Suola	Enintään 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Merkkiaineet:			
		— sterolit	Ks. liite VIII	Liite VIII	
		— vanilliini	Ks. liite VI	Liite VI	

Komission asetus	Tuote	Parametri	Raja-arvo (1)	Vertailumenetelmä	Huomautus
		— karoteenihappoetyyliesteri	Ks. liite VII	Liite VII	
		— enanttihappotriglyseridit	Ks. liite V	Liite V	
Asetus (EY) N:o 1898/2005, II luku	Voiöljy	Rasva	Min. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	
		Vesi ja rasvaton kuiva-aine	Enintään 0,2 % m/m	ISO 5536:2002|IDF 23:2002 (kosteus) IDF 24:1964 (SNF)	
		Rasvan happamuus	1,2 mmol/100 g rasvaa	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		Peroksidiluku (Max.)	0,5 mekv. happea/1 000g rasvaa	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Huomautus 1
		Muu kuin maitorasva	Ei esiinny	Liite XX	
		Maku	Tuore		
		Haju	Ei vieraita hajuja		
		Muut	Ei neutraloivia aineita, antioksidantteja tai säilöntäaineita		
		Merkkiaineet:			
		— sterolit	Ks. liite VIII	Liite VIII	
		— vanilliini	Ks. liite VI	Liite VI	
		— karoteenihappoetyyliesteri	Ks. liite VII	Liite VII	
		— enanttihappotriglyseridit	Ks. liite V	Liite V	
Asetus (EY) N:o 1898/2005, II luku	Kerma	Rasva	Vähintään 35 % m/m	ISO 2450:1999|IDF 16 C:1987	
		Muu kuin maitorasva		Liite XX	
		Merkkiaineet:			
		— sterolit	Ks. liite VIII		Huomautus 2
		— vanilliini	Ks. liite VI	Liite VI	
		— karoteenihappoetyyliesteri	Ks. liite VII		Huomautus 2
		— enanttihappotriglyseridit	Katso liite V	Liite V	

Komission asetus	Tuote	Parametri	Raja-arvo (1)	Vertailumenetelmä	Huomautus
Asetus (EY) N:o 1898/2005, III luku	Voiöljy	Rasva	Min. 96 % m/m		Huomautus 2
		Muu kuin maitorasva		Liite XX	
		Rasvaton kuiva-aine	Enintään 2 % m/m		Huomautus 2
		Merkkiaineet:			
		— stigmasteroli (95 % m/m)	15 g/100 kg voiöljyä	Liite VIII	
		— stigmasteroli (85 % m/m)	17 g/100 kg voiöljyä	Liite VIII	
		— enanttihappotriglyseridit	10,34 kg/t voiöljyä	Liite V	
		— voihappoetyyliesteri ja stigmasteroli		— voihappoetyyliesteri — stigmasteroli: liite VIII	Huomautus 2
		— voihappoetyyliesteri ja enanttihappotriglyseridit		— voihappoetyyliesteri — enanttihappotriglyseridit: liite V	Huomautus 2
		Lesitiini (E 322)	Enintään 0,5 % m/m		Huomautus 2
		NaC1	Enintään 0,75 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Rasvan happamuus	1,2 mmol/100 g rasvaa	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		Peroksidiluku (Max.)	Enintään 0,5 mekv. happea/1 000g rasvaa	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Huomautus 1
		Maku	Tuore		
		Haju	Ei vieraita hajuja		
		Muut	Ei neutraloivia aineita, antioksidantteja tai säilöntäaineita		
Asetus (EY) N:o 1898/2005, IV luku	Suolaton voi	Rasva	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vesi	Enintään 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		Rasvaton kuiva-aine	Enintään 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
Asetus (EY) N:o 1898/2005, IV luku	Suolattu voi	Rasva	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	

Komission asetus	Tuote	Parametri	Raja-arvo (1)	Vertailumenetelmä	Huomautus
		Vesi	Enintään 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		Rasvaton kuiva-aine (suola pois luettuna)	Enintään 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Suola	Enintään 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Asetuksen (EY) N:o 1255/1999 9 artikla ja II osasto	Uuhen ja/tai vuohen maidosta valmistettu juusto	Lehmänmaito	< 1 % m/m	Liite IX	
Asetus (ETY) N:o 2921/90	Liite I – Happokaseiini	Vesi	Enintään 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Rasva	Enintään 1,75 % m/m	ISO 5543:2004|IDF127:2004	
		Vapaa happo	Enintään 0,30 ml 0,1N NaOH -liuosta/g	ISO 5547:1978|IDF 91:1979	
Asetus (ETY) N:o 2921/90	Liite I – Juoksetekaseiini	Vesi	Enintään 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Rasva	Enintään 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Tuhka	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
Asetus (ETY) N:o 2921/90	Liite I – Kaseinaatti	Vesi	Enintään 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Maitoproteiini	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Rasva ja tuhka	Enintään 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Kiinnittynyt tuhka		ISO 5544:1978|IDF 89:1979	
		Tuhka		ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
Asetus (ETY) N:o 2921/90	Liite II – Happokaseiini	Vesi	Enintään 10,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Rasva	Enintään 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Vapaa happo	Enintään 0,20 ml 0,1 N NaOH -liuosta/g	ISO 5547:1978|IDF 91:1979	
		Bakteerien kokonaismäärä (Max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Huomautus 3
		Koliformit	Ei esiinny 0,1g:ssa	Liite X	Huomautus 3
		Termofiilisten bakteerien määrä (Max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Huomautukset 3 ja 4
Asetus (ETY) N:o 2921/90	Liite II – Juoksetekaseiini	Vesi	Enintään 8,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Rasva	Enintään 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Tuhka	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		Bakteerien kokonaismäärä (Max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Huomautus 3
		Koliformit	Ei esiinny 0,1g:ssa	Liite X	Huomautus 3

Komission asetus	Tuote	Parametri	Raja-arvo (1)	Vertailumenetelmä	Huomautus
		Termofiilisten bakteerien määrä (Max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Huomautukset 3 ja 4
Asetus (ETY) N:o 2921/90	Liite II – Kaseinaatit	Vesi	Enintään 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Maitoproteiini	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Rasva ja tuhka	Enintään 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004 ISO 5544:1978|IDF 89:1979 tai ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		Bakteerien kokonaismäärä (Max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Huomautus 3
		Koliformit	Ei esiinny 0,1g:ssa	Liite X	Huomautus 3
		Termofiilisten bakteerien määrä (Max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Huomautukset 3 ja 4
Asetus (ETY) N:o 2921/90	Liite III – Kaseinaatit	Vesi	Enintään 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Maitoproteiini	Min. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Rasva	Enintään 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Laktoosi	Enintään 1,00 % m/m	ISO 5548:2004|IDF 106:2004	
		Tuhka	Enintään 6,50 % m/m	ISO 5544:1978|IDF 89:1979 tai ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		Bakteerien kokonaismäärä (Max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Huomautus 3
		Koliformit	Ei esiinny 0,1g:ssa	Liite X	Huomautus 3
		Termofiilisten bakteerien määrä (Max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Huomautukset 3 ja 4
Asetus (EY) N:o 2799/1999	Rehuseokset ja rasvaton maitojauhe (rehulaatu)	Vesi (hapan kirnupiimäjauhe)	Enintään 5 % m/m	Liite XIX	
		Proteiinit	Min. 31,4 % (rasvattomasta kuiva-aineesta)	ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
		Vesi (rasvaton maitojauhe)	Enintään 5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Rasva (rasvaton maitojauhe)	Enintään 11 % m/m	ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
		Herajuoksete (rasvaton maitojauhe)	Ei esiinny	Liite XIII	Huomautus 6
		Tärkkelys (rasvaton maitojauhe)	Ei esiinny	Liite XVII	
		Vesi (esiseos)	Enintään 5 % m/m rasvattomasta kuiva-aineesta	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Rasva (esiseos)		Komission direktiivi 84/4/ETY (EYVL L 15, 18.1.1984, s. 29)	

Komission asetus	Tuote	Parametri	Raja-arvo (1)	Vertailumenetelmä	Huomautus
		Herajuoksete (esiseos)	Ei esiinny	Liite XIII	
		Rasvattoman maitojauheen pitoisuus (lopputuotteessa)	Min. 50 % m/m	Liite XVI	
		Rasva (lopputuotteessa)	Min. 2,5 % m/m tai 5 % m/m	Komission direktiivi 84/4/ETY (EYVL L 15, 18.1.1984, s. 29)	Huomautus 7
		Tärkkelys (lopputuotteessa)	Min. 2 % m/m	Liite XVII	Huomautus 8
		Kupari (lopputuotteessa)	25 ppm	Komission direktiivi 78/633/ETY (EYVL L 206, 26.7.1987, s. 43)	
Asetus (EY) N:o 214/2001	Rasvaton spraymaitojauhe	Rasva	Enintään 1,0 % m/m	ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
		Proteiinit	Min. 31,4 % (2)m/m (min.) rasvattomasta kuiva-aineesta	ISO 8968-1/2:2001|IDF 20-1/2:2001	
		Vesi	Enintään 3,5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Happamuus	Enintään 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10g rasvaton kuiva-aine	ISO 6091:1980|IDF 86:1981	
		Laktaatit	Enintään 150 mg/100 g rasvatonta kuiva-ainetta	ISO 8069:2005|IDF 69:2005	
		Fosfataasi	Negatiivinen	ISO 11816-1:2006|IDF 155-1:2006	
		Liukenemattomuusindeksi	Enintään 0,5 ml 24 °C:ssa	ISO 8156:2005|IDF 129:2005	
		Palaneet hiukkaset	A- tai B-levy (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		Bakteerien kokonaismäärä	40 000/g	ISO 4833:2003	Huomautus 3
		Koliformit	Negatiivinen/0,1g	Liite X	Huomautus 3
		Kirnupiimä	Negatiivinen	Liite XIV	
		Herajuoksete	Negatiivinen	Liite XII	
		Hapanhera	Negatiivinen		Huomautus 2
		Antimikrobiaineet		Liite XV	

(1) Rajoittamatta erityisasetuksen vaatimusten soveltamista.
(2) Proteiinin vähimmäismäärä on 1 päivästä syyskuuta 2009 alkaen 34 %.

B OSA

B osassa olevia vertailumenetelmiä voidaan soveltaa kaikkien ensimmäisessä sarakkeessa mainitun asetuksen soveltamisalaan kuuluvien tuotteiden analysointiin.

Komission asetus	Tuote	CN-koodi	Parametri	Raja-arvo	Vertailumenetelmä	Huomautus
Asetus (ETY) N:o 2658/87 Asetus (EY) N:o 2535/2001 Asetus (EY) N:o 1282/2006	Maito ja kerma, tiivistämätön ja lisättyä sokeria tai muuta makeutusainetta sisältämätön	0401	Rasva (≤ 6 % m/m)	Sovellettavat raja-arvot täsmennetään kyseisen tuotteen CN-koodin kuvauksessa ja tarvittaessa komission asetuksen (ETY) N:o 3846/87 (EYVL L 366, 24.12.1987, s. 1) vientitukinimikkeistön 9 osassa tai asetuksessa (EY) N:o 2535/2001 (EYVL L 341, 22.12.2001, s. 29)	ISO 1211:2001|IDF 1D:1996	
			Rasva (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999|IDF 16C:1987	
	Maito ja kerma, tiivistetty tai lisättyä sokeria tai muuta makeutusainetta sisältävä	0402	Rasva (nestemäisenä)		ISO 1737:1999|IDF 13C:1987	
			Rasva (kiinteänä)		ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
			Proteiinit		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			Sakkaroosi (tavanomainen pitoisuus)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Sakkaroosi (vähäinen pitoisuus)			Huomautus 2
			Kuiva-aine (makeutettu maitotiiviste)		ISO 6734:1989|IDF 15B:1991	
			Kuiva-aine (maito- tai kermatiiviste)		ISO 6731:1989|IDF 21B:1987	
			Vesi (maitojauhe)		ISO 5537:2004/IDF 26:2004	
			Vesi (kermajauhe)		Liite XVIII	
	Kirnupiimä, käynyt tai hapatettu maito ja kerma, myös tiivistetty, lisättyä sokeria tai muuta makeutusainetta sisältävä	0403	Rasva		ISO 1211:2001|IDF 1D:1996 ISO 1736:2000|IDF 9C:1987 ISO 2450:1999|IDF 16 C:1987 ISO 7208:1999|IDF 22B:1987 ISO 8262-3:2005|IDF 124-3:2005	

Komission asetus	Tuote	CN-koodi	Parametri	Raja-arvo	Vertailumenetelmä	Huomautus
			Proteiinit		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			Sakkaroosi (tavanomainen pitoisuus)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Sakkaroosi (vähäinen pitoisuus)			Huomautus 2
			Vesi (hapan kirnupiimäjauhe)		Liite XIX	
			Vesi (makea kirnupiimäjauhe)		ISO 5537:2004|IDF26:2004	
			Kuiva-aine (muut tuotteet)		Toimivaltaisen viranomaisen hyväksymät menetelmät	
	Hera, myös tiivistetty tai lisättyä sokeria tai muuta makeutusainetta sisältävä; maidon luonnollisista aineosista koostuvat tuotteet	0404	Rasva		ISO 1736:2000|IDF 9C:1987 ISO 2450:1999|IDF 16C:1987 ISO 7208:1999|IDF 22B:1987	
			Proteiinit		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			Sakkaroosi (tavanomainen pitoisuus)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Sakkaroosi (vähäinen pitoisuus)			Huomautus 2
		0404 90	Proteiinit		ISO 8968 1/2 2001|IDF 20-1/2:2001	
			Vesi		IDF 21B:1987	
			Kuiva-aine		ISO 6734:1989|IDF 15B:1991	
			(Tiivistetyt tuotteet)		ISO 6731:1989|IDF 21B:1987	
	Voi ja muut maitorasvat; maidosta valmistetut levitteet	0405	Rasva (jos ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Voi	Vesi		ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
			Rasvaton kuiva-aine		ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	

Komission asetus	Tuote	CN-koodi	Parametri	Raja-arvo	Vertailumenetelmä	Huomautus
			NaCl		ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
			Rasva (jos > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	Voiöljy		Vesi (jos rasva < 99 % m/m)		ISO 5536:2002|IDF 23:2002	
	Juusto ja juustoaine	0406	Rasva		ISO 1735:2004|IDF 5:2004	
			Kuiva-aine		ISO 5534:2004|IDF 4:2004	
			Kuiva-aine (Ricotta)		ISO 2920:2004|IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006|IDF 88:2006	
			Laktoosi		ISO 5765-1/2:2002|IDF 79-1/2:2002	
Asetus (ETY) N:o 2658/87	Rehuseokset	2309	Laktoosi		Liite XI	

Huomautukset luetteloon Euroopan unionin vertailumenetelmistä
Huomautus 1: Maitorasvan erottaminen ISO-standardin 1740:1991 mukaisesti (valolta suojaaminen).
Huomautus 2: Vertailumenetelmää ei ole vahvistettu. Toimivaltaisen viranomaisen hyväksymät menetelmät.
Huomautus 3: Näyte valmistettava ISO-standardin 8261:2001|IDF 122:2001 mukaisesti.
Huomautus 4: Inkubointi 48 tunnin ajan 55 °C:n lämpötilassa. Pyrittävä välttämään kasvatusväliaineen kuivuminen.
Huomautus 5: Rasvattoman kuiva-aineen %-osuus m/m = kuiva-aineen %-osuus m/m – rasvan %-osuus m/m
Huomautus 6: Komission direktiivi 84/4/ETY.
Huomautus 7: Komission asetus (EY) N:o 2799/1999 (EYVL L 340, 31.12.1999, s. 3)
Huomautus 8: Komission direktiivi 78/633/ETY.

LIITE II

(3 artikla)

ARVIOINTI SIITÄ, ONKO ERÄ LAKISÄÄTEISTEN RAJOJEN MUKAINEN

1. PERIAATE

Jos asiaa koskevassa lainsäädännössä on vahvistettu yksityiskohtaiset näytteenottomenetelmät, niitä on noudatettava. Kaikissa muissa tapauksissa tarkastettavasta erästä on otettava satunnaisesti vähintään kolme näyteyksikköä. Voidaan valmistaa yhdistetty näyte. Tulosta verrataan lakisääteisiin rajoihin laskemalla 95 prosentin luottamusväli, joka on 2 kertaa standardipoikkeama, jossa standardipoikkeama riippuu joko siitä, 1) onko menetelmä validoitu kansainvälisessä yhteistyössä ja muuttujille σr ja σ_R vahvistettu arvot tai siitä, 2) onko laskettu laboratorion sisäinen uusittavuus, kun kyseessä on sisäinen validointimenettely. Kyseinen luottamusväli osoittaa tuloksen mittausepävarmuuden.

2. MENETELMÄ ON VALIDOITU KANSAINVÄLISESSÄ YHTEISTYÖSSÄ

Tällöin toistettavuuden standardipoikkeama σr ja uusittavuuden standardipoikkeama σ_R on vahvistettu ja laboratorio voi osoittaa noudattavansa validoitua menetelmää.

Lasketaan *n* kertaa toistetun mittauksen aritmeettinen keskiarvo $\bar{x}$

Lasketaan arvon $\bar{x}$ laajennettu epävarmuus (*k* = 2) seuraavasti:

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

Jos lopullinen mittaustulos $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ tai $x = y_1 / y_2$, on käytettävä tällaisissa tapauksissa noudatettavia tavanomaisia menetelmiä standardipoikkeamien yhdistämiseksi.

Erän katsotaan olevan lakisääteisen ylärajan *UL* vastainen, jos

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

muutoin sen katsotaan olevan ylärajan *UL* mukainen.

Erän katsotaan olevan lakisääteisen alarajan *LL* vastainen, jos

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

muutoin sen katsotaan olevan ylärajan *LL* mukainen.

3. SISÄINEN VALIDOINTIMENETTELY, JOHON LIITTYY UUSITTAVUUDEN SISÄISEN STANDARDIPOIKKEAMAN LASKEMINEN

Jos käytetään muita kuin tässä asetuksessa esitettyjä menetelmiä, eikä ole vahvistettu tarkkuutta koskevia toimenpiteitä, on suoritettava sisäinen validointi. Laajennetun epävarmuuden *U* laskukaavassa on käytettävä standardipoikkeamien σ_r ja σ_R sijasta sisäisen toistettavuuden standardipoikkeamaa s_{ir} ja sisäisen uusittavuuden standardipoikkeamaa s_{iR}.

Päätöksentekoa koskevat säännöt ovat samat kuin vaihtoehdossa 1. Jos erän ei kuitenkaan katsota olevan lakisääteisten rajojen mukainen, mittaukset on toistettava tässä asetuksessa esitetyin menetelmin ja päätös tehtävä vaihtoehdon 1 mukaisesti.

LIITE III

(4 artikla)

ARVIOIJIEN ARVIOINTI JA AISTINVARAISISSA ANALYYSEISSÄ SAATUJEN TULOSTEN LUOTETTAVUUS

Seuraavia menetelmiä sovelletaan käytettäessä pisteytysmenetelmiä (IDF-standardi 99C:1997).

A. TOISTETTAVUUSINDEKSIN MÄÄRITTÄMINEN

Arvioijan on arvioitava kahdentoista kuukauden aikana vähintään kymmenen sokeanäytettä, joita kutakin on kaksi kappaletta. Tämä tapahtuu tavallisesti useissa eri arviointitilaisuuksissa. Yksittäisiä tuotteen laatuominaisuuksia koskevat tulokset arvioidaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

w_I: toistettavuusindeksi

x_{i1}: näytteen x_i ensimmäisen arvioinnin pisteet

x_{i2}: näytteen x_i toisen arvioinnin pisteet

n: näytteiden lukumäärä

Arvioitavien näytteiden on oltava laadultaan tarpeeksi erilaisia. w_I ei saa olla suurempi kuin 1,5 (viiden pisteen asteikko).

B. POIKKEAMAINDEKSIN MÄÄRITTÄMINEN

Tätä indeksiä käytetään tarkistettaessa, käyttääkö arvioija laadun arvioinnissa samaa asteikkoa kuin ryhmä kokeneita arvioijia. Arvioijan antamia pisteitä verrataan ryhmän antamien pisteiden keskiarvoon.

Tulokset määritetään seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

x_{i1}; x_{i2}: ks. A kohta

$\bar{x}_{i1}$; $\bar{x}_{i2}$: arvioijaryhmän antamien pisteiden keskiarvo näytteen x_i ensimmäisessä ja toisessa arvioinnissa

n: näytteiden lukumäärä (vähintään kymmenen näytettä 12 kuukauden aikana)

Arvioitavien näytteiden on oltava laadultaan tarpeeksi erilaisia. D_I ei saa olla suurempi kuin 1,5 (viiden pisteen asteikko).

Jäsenvaltioiden on ilmoitettava tämän menettelyn soveltamisessa ilmenevistä vaikeuksista.

Jos yksittäisen arvioijan havaitaan ylittävän poikkeus- tai toistettavuusindeksiin liittyvän 1,5:n rajan, virallisen viranomaisasiantuntijan on tehtävä kyseisen arvioijan parin seuraavan viikon aikana arvioimille näytteille yksi tai useampi uusintatarkastus tai tehtävä tämän kanssa yhdessä yksi tai useampi tarkastus. Tiivis seuranta on tarpeen sen päättämiseksi, jatketaanko tällaisen arvioijan käyttöä. Tulokset on kirjattava ja säilytettävä todisteena jatkotoimia varten.

C. JÄSENVALTION ERI ALUEILLA JA ERI JÄSENVALTIOISSA SAATUJEN TULOSTEN VERTAILU

Vuosittain on järjestettävä mahdollisuuksien mukaan vähintään yksi koe, jonka avulla on mahdollista vertailla arvioijien eri alueilla saamia tuloksia. Jos tuloksissa ilmenee merkittäviä eroja, on toteutettava tarvittavat toimet niiden syiden selvittämiseksi ja vertailukelpoisiin tuloksiin pääsemiseksi.

Jäsenvaltiot voivat järjestää kokeita, joiden avulla on mahdollista vertailla oman maan arvioijien ja naapurijäsenvaltioiden arvioijien saamia tuloksia. Jos merkittäviä eroja ilmenee, on tehtävä perusteellinen tutkimus vertailukelpoisiin tuloksiin pääsemiseksi.

Jäsenvaltioiden on ilmoitettava komissiolle näiden vertailujen tuloksista.

LIITE IV

(4 artikla)

VOIN AISTINVARAINEN ARVIOINTI

1. SOVELTAMISALA

Tässä esitetyn voin aistinvaraisen arviointimenettelyn tarkoituksena on tarjota käyttöön yhtenäinen menetelmä, jota voidaan soveltaa kaikissa jäsenvaltioissa.

Lisätietoja saa maitoa ja maitotuotteita koskevasta kansainvälisestä IDF-standardista IDF 99: aistinvaraista arviointia koskevan osuuden osat 1, 2 ja 3.

2. MÄÄRITELMÄT

”Aistinvaraisella arvioinnilla” tarkoitetaan tuotteen ominaisuuksien tutkimista aistielinten avulla.

”Raadilla” tarkoitetaan valittujen arvioijien ryhmää, jonka jäsenet tekevät työtään arvioinnin aikana itsenäisesti ja vaikuttamatta toinen toisiinsa.

”Arvioijalla” tarkoitetaan henkilöä, joka on valittu, koska hänellä on kyky tehdä aistinvarainen arviointi. Tämän tyyppisten arvioijien kokemus voi olla vähäinen.

”Asiantuntija-arvioijalla” tarkoitetaan henkilöä, jonka aistiherkkyys on huomattava, jolla on merkittävä kokemus aistinvaraisen arvioinnin menetelmistä ja joka pystyy arvioimaan erilaisia tuotteita johdonmukaisesti ja luotettavasti. Tämän tyyppisillä arvioijilla on oltava hyvä pitkäkestoinen aistimuisti.

”Pisteytyksellä” tarkoitetaan aistinvaraista arviota, jonka raati ilmaisee numeroasteikolla. Arvioinnissa on käytettävä virhenimikkeistöä.

”Luokituksella” tarkoitetaan pisteytyksen perusteella tehtävää laatuluokitusta.

”Valvonta-asiakirjoilla” tarkoitetaan asiakirjoja, joihin kirjataan kunkin ominaisuuden pistemäärä ja tuotteen lopullinen luokitus. (Valvonta-asiakirjaan voidaan merkitä myös tuotteen kemiallinen koostumus.)

3. ARVIOINTIHUONE

Lisätietoja standardeissa ISO 8589 ja ISO/DIS 22935–2 | IDF 99–2, kohta 7.

Järjestelyjen avulla on varmistettava, että ulkoiset tekijät eivät vaikuta arviointihuoneessa oleviin arvioijiin.

Arviointihuoneessa ei saa olla vieraita hajuja, ja huoneen on oltava helposti siivottavissa. Seinien on oltava vaaleat ja valoa heijastamattomat.

Arviointihuoneen ja sen valaistuksen on oltava sellaiset, että ne eivät vaikuta pisteytettävien tuotteiden ominaisuuksiin.

Huoneessa on oltava asianmukainen lämpötilan säätö, jotta voin lämpötila voidaan pitää tasaisena. Voin lämpötilan olisi luokitteluhetkellä oltava 12 °C (± 2 °C).

4. ARVIOIJIEN VALINTA

Arvioijan on tunnettava erityyppiset voit, ja hänen on oltava pätevä tekemään aistinvaraista luokitusta. Toimivaltaisen viranomaisen on tarkasteltava arvioijan pätevyyttä säännöllisesti (vähintään kerran vuodessa).

4.1 Lisätietoja yleisistä vaatimuksista ja seulontakokeista, joita voidaan tehdä ennen uuden arvioijan virallista käyttöä, on standardeissa ISO/DIS 22935–1 | IDF 99–1, kohta 4 (rekrytointi) ja kohta 5.1.

Koulutuksen on oltava jatkuvaa, ja arviointitilaisuuksia olisi järjestettävä säännöllisesti. Raadin koulutusta koskevia tietoja löytyy standardista ISO 8586–1.

4.2 Pohjakoulutuksen on katettava seuraavat aiheet:

— aistinvaraisen arvioinnin yleisteoria ja käytännön merkitys,

— aistituntemuksia koskevat menetelmät, asteikot ja kuvaukset,

— aistinvaraisten ominaisuuksien havaitseminen ja tunnistaminen sekä aistihavaintoihin liittyvät erityisilmaisut,

— voin valmistukseen liittyvä taustakoulutus,

— validoidut vertailutuotteet ja näytteet, jotka auttavat arvioijaa tunnistamaan tuotteen makuja ja makujen intensiteettejä.

5. RAATIA KOSKEVAT VAATIMUKSET

Raadissa on oltava pariton määrä arvioijia, kuitenkin vähintään kolme. Raadin jäsenten enemmistön on oltava toimivaltaisen viranomaisen työntekijöitä tai hyväksyttyjä henkilöitä, jotka eivät ole meijeriteollisuuden palveluksessa.

Raadin johtaja vastaa yleisesti koko menettelystä; hän voi olla raadin jäsen.

Ennen arviointia on otettava huomioon useita seikkoja, jotta arvioijat pystyisivät suoriutumaan tehtävistään mahdollisimman hyvin:

— arvioija ei saa sairastaa tauteja, jotka voivat vaikuttaa hänen tehtäviinsä. Tällaisissa tapauksissa asianomainen arvioija on korvattava toisella arvioijalla,

— voidakseen osallistua arviointiin arvioijien on saavuttava paikalle ajoissa ja varmistettava, että heillä on tarpeeksi aikaa arvioinnin suorittamiseen,

— arvioijat eivät saa käyttää vahvasti tuoksuvia tuotteita (kuten parfyymeja, partavesiä ja deodorantteja) eivätkä syödä vahvasti maustettuja ruokia,

— arvioijat eivät saa tupakoida, syödä tai juoda muuta kuin vettä arviointia edeltävän 30 minuutin aikana.

6. SUORITUS

Kaikkien arvioijien olisi pätevyytensä ylläpitämiseksi osallistuttava säännöllisesti aistinvaraisen arvioinnin raateihin. Tiheys riippuu voin tuotantomääristä; mahdollisuuksien mukaan olisi järjestettävä vähintään yksi raati kuussa.

Vanhempien arvioijien olisi osallistuttava vuosittain tiettyyn määrään raateja, mahdollisuuksien mukaan vähintään kerran kolmessa kuukaudessa.

7. NÄYTTEENOTTO JA NÄYTTEEN VALMISTELU

Puolueellisuuden välttämiseksi näytteiden nimettömyys on säilytettävä arvioinnin ajan. Näytteille on annettava koodit.

Tämä on järjestettävä ennen arviointia. Voi on kuljetettava arviointihuoneeseen lämpötilassa 6 °C ± 2 °C.

Jos aistinvarainen arviointi tehdään kylmävarastolla, näyte otetaan voikairalla. Jos arviointi tehdään muualla kuin kylmävarastolla, näytettä on otettava vähintään 500 g. Voin lämpötilan tulisi arvioinnin ajan olla 12 °C (± 2 °C) (vrt. standardi ISO/DIS 22935–2 | IDF 99–2, jonka mukaan voin arviointilämpötila on oltava 14 °C ± 2 °C). Suuria poikkeamia on vältettävä kaikin keinoin.

8. KUNKIN OMINAISUUDEN ARVIOINTI

8.1 Aistinvarainen arviointi koskee seuraavia kolmea ominaisuutta: ulkonäkö, koostumus ja maku.

”Ulkonäöllä” tarkoitetaan seuraavia piirteitä: väri, silmin havaittava puhtaus, fyysisten epäpuhtauksien ja homekasvun puuttuminen sekä irrallisen veden tasainen jakautuminen. Irrallisen veden esiintyminen tutkitaan IDF-standardin 112A/1989 mukaisesti.

”Koostumuksella” tarkoitetaan seuraavia piirteitä: rakenne, tekstuuri ja kiinteys. Levittyvyyttä voidaan seurata fyysisin keinoin, jos jokin jäsenvaltio niin haluaa tehdä kuluttajien vaatimuksiin vastaamiseksi. Komissio voi päättää tulevaisuudessa yhdenmukaistaa menetelmän.

”Rakenteella” tarkoitetaan tuotteen koossapysyvyyttä sitä kulutettaessa. Rakenne liitetään usein kiinteyteen ja levittyvyyteen, ja sen tulisi olla yhdenmukainen koko tuotteessa. Se liittyy läheisesti tekstuuriin ja on tuotteen kyky pysyä koossa oman painonsa alla. Se ilmenee vastavoimana leikattaessa ja sitä voidaan mitata mekaanisesti sekä suu- ja sormituntumalla.

”Maku” on ominaisuus, joka aistitaan suussa pääasiassa kielen makunystyröillä.

”Tuoksu” on ominaisuus, joka aistitaan nenällä ja hajuaistilla.

Huomattava poikkeama suositellusta lämpötilasta estää koostumuksen ja maun luotettavan arvioinnin. Lämpötilan merkitys on keskeinen.

Voin luokittelua on lykättävä, jos lämpötila on suositusarvojen ulkopuolella.

8.2 Kukin ominaisuus on arvioitava erikseen aistinvaraisesti. Pisteytyksen on oltava taulukon 1 mukainen.

8.3 Arvioijien voi olla aiheellista ennen varsinaisen arvioinnin alkua pisteyttää yhteisesti yhden tai useamman vertailunäytteen ulkonäkö, koostumus ja maku, jotta saavutetaan yhtenäinen arviointikäytäntö.

8.4 Hyväksymisen edellyttämät pistemäärät ovat seuraavat:

Ks. kohta 7 – Nimikkeistö ja pisteisiin sovellettavien kriteerien kuvaus pisteitä annettaessa.

	Enintään	Vaadittu
Ulkonäkö	5	4
Koostumus	5	4
Maku/tuoksu	5	4

— Jos vaadittua pistemäärää ei saavuteta, virhe on kuvattava.

— Kunkin arvioijan antama pistemäärä on kirjattava valvonta-asiakirjaan erikseen jokaisen ominaisuuden osalta.

— Tuote hyväksytään tai hylätään enemmistön päätöksen perusteella.

— Tuloksia, joissa kunkin ominaisuuden pistemäärät poikkeavat toisistaan enemmän kuin yhden pisteen verran, ei saisi esiintyä usein (enintään yhdessä näytteessä 20:stä). Muussa tapauksessa raadin johtajan on tarkistettava raadin pätevyys.

9. VALVONTA

Raadin johtaja, jonka on oltava toimivaltaisen viraston virkamies, vastaa yleisesti koko menettelystä; hän voi olla raadin jäsen. Hänen on allekirjoitettava kunkin ominaisuuden yksittäiset pistemäärät valvonta-asiakirjaan ja sertifioitava tuotteen hyväksyminen tai hylkääminen.

10. NIMIKKEISTÖ

Katso taulukkoa 2.

11. KIRJALLISUUSVIITTEET

FIL-IDF 99C:1997 Sensory evaluation of dairy products by scoring – Reference method

ISO/DIS 22935 | IDF 99 International Standard for Milk and Milk Products – Sensory analysis – Parts 1–3

ISO 8586–1 Sensory analysis- General guidance for selection, training and monitoring of assessors – Part 1

ISO 8589 Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms

FIL-IDF 112A:1989 Butter – Determination of water dispersion value

Taulukko 1

Voin pisteytys

Ulkonäkö			Koostumus			Maku ja tuoksu		
Pisteet	Nro [1]	Huomautukset	Pisteet (laatuluokka)	Nro [1]	Huomautukset	Pisteet (laatuluokka)	Nro [1]	Huomautukset
5		*Erittäin hyvä* ihanteellinen paras laatu (tasaisen kuiva)	5		*Erittäin hyvä* ihanteellinen paras laatu (hyvin levittyvä)	5		*Erittäin hyvä* ihanteellinen paras laatu (ehdottoman puhdas, hienoin tuoksu)
4		*Hyvä* [2] Ei ilmeisiä virheitä	4		*Hyvä* [2]	4		*Hyvä* [2] Ei ilmeisiä virheitä
				17	kova			
				18	pehmeä			
3		*Tyydyttävä (lieviä virheitä)*	3		*Tyydyttävä (lieviä virheitä)*	3		*Tyydyttävä (lieviä virheitä)*
	1	irrallista vettä		14	murea, hauras, mureneva		21	epäpuhdas
	2	epätasainen väri, kaksivärinen		15	paksu, salvamainen, rasvainen		22	vieras maku
							25	hapan
	3	juovikas		16	tahmea		27	keitetyn maku, palaneen maku
	4	kirjava, marmoroitu		17	kova			
	5	väriläiskiä		18	pehmeä		33	rehun maku
	6	öljyn erottumista					34	kitkerä, karvas
	7	liikaa värjätty					35	liian suolainen
	8	huokoinen						
2		*Huono (selviä virheitä)*	2		*Huono (selviä virheitä)*	2		*Huono (selviä virheitä)*
	1	irrallista vettä		14	murea, hauras, mureneva		21	epäpuhdas
	3	juovikas		15	paksu, salvamainen, rasvainen		22	vieras maku
	4	kirjava, marmoroitu					23	vanhan maku
	5	väriläiskiä		16	tahmea		25	hapan
	6	öljyn erottumista		17	kova		32	hapettuneen maku, metallin maku
	10	vieraita aineita		18	pehmeä			
	11	hometta					33	rehun maku
	12	liukenematonta suolaa					34	kitkerä, karvas
							35	liian suolainen
							36	ummehtunut, mädäntynyt
							38	kemikaalin maku
1		*Erittäin huono (vakavia virheitä)*	1		*Erittäin huono (vakavia virheitä)*	1		*Erittäin huono (vakavia virheitä)*
	1	irrallista vettä		14	murea, hauras, mureneva		22	vieras maku
	3	juovikas		15	paksu, salvamainen, rasvainen		24	juustomainen
	4	kirjava, marmoroitu					25	hapan
	5	väriläiskiä		16	tahmea		26	hiivan maku
	6	öljyn erottumista		17	kova		28	homeen maku
	7	liikaa värjätty		18	pehmeä		29	eltaantunut
	9	rakeinen					30	öljyinen, kalan maku
	10	vieraita aineita					31	talin maku
	11	hometta					32	hapettuneen maku, metallin maku
	12	liukenematonta suolaa						
							34	kitkerä, karvas
							35	liian suolainen
							36	ummehtunut, mädäntynyt
							37	maltaan maku
							38	kemikaalin maku

[1] Taulukko 2.

[2] Virheet, jotka mainitaan kohdassa ”hyvä”, ovat hyvin pieniä poikkeamia tavoitellusta laadusta.

Taulukko 2

Taulukko voin virheistä

I	Ulkonäkö
1.	irrallista vettä
2.	epätasainen väri, kaksivärinen
3.	juovikas
4.	kirjava, marmoroitu
5.	väriläiskiä
6.	öljyn erottumista
7.	liikaa värjätty
8.	huokoinen
9.	rakeinen
10.	vieraita aineita
11.	hometta
12.	liukenematonta suolaa
II	Koostumus
14.	murea, hauras, mureneva
15.	paksu, salvamainen, rasvainen
16.	tahmea
17.	kova
18.	pehmeä
III	Maku ja tuoksu
20.	mauton
21.	epäpuhdas [1]
22.	vieras maku
23.	vanhan maku
24.	juustomainen
25.	hapan
26.	hiivan maku
27.	a) keitetyn maku
	b) palaneen maku
28.	homeen maku
29.	eltaantunut
30.	öljyinen, kalan maku
31.	talin maku
32.	a) hapettuneen maku
	b) metallin maku
33.	rehun maku
34.	kitkerä, karvas
35.	liian suolainen
36.	ummehtunut, mädäntynyt
37.	maltaan maku
38.	kemikaalin maku

[1] Tätä virhenimitystä on käytettävä mahdollisimman harvoin ja ainoastaan, jos virhettä ei voida kuvata tarkemmin.

LIITE V

(5 artikla)

VOIÖLJYN, VOIN JA KERMAN ENANTTIHAPPOTRIGLYSERIDIPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN KAASUKROMATOGRAFISELLA TRIGLYSERIDIEN MÄÄRITYSMENETELMÄLLÄ

1. SOVELTAMISALA

Tätä menetelmää käytetään voiöljyn, voin ja kerman enanttihappotriglyseridipitoisuuden määrittämiseksi.

2. ILMAISUT JA MÄÄRITELMÄ

Enanttihappopitoisuus: enanttihappotriglyseridipitoisuus, joka on määritelty tässä menetelmässä esitetyllä tavalla.

Huomautus: Voiöljyn ja voin enanttihappopitoisuus ilmaistaan kilogrammoina tuotetonnia kohden, ja kerman enanttihappopitoisuus ilmaistaan kilogrammoina maitorasvatonnia kohden.

3. PERIAATE

Maitorasva uutetaan tuotteista standardin ISO 14156 | IDF 172:2001 mukaisesti. Enanttihappotrigyseridipitoisuuden määrä uutetussa rasvassa määritetään kapillaarikaasukromatografialla. Näytteestä saatua tulosta arvioidaan vertaamalla sitä sisäisenä standardina käytettyjen kapronihappotrigyseridien antamiin tuloksiin.

Huomautus: Myös tributyriinin on todettu olevan tyydyttävä sisäinen standardi.

4. REAGENSSIT

Kaikkien reagenssien on oltava hyväksyttyä analyysilaatua.

4.1 n-heksaani

4.2 kapronihappotriglyseridistandardi, puhtaudeltaan vähintään 99 %

4.3 enanttihappotriglyseridistandardi, puhtaudeltaan vähintään 99 %

4.4 vedetön natriumsulfaatti (Na_2SO_4)

5. LAITTEET JA TARVIKKEET

Tavalliset laboratoriovälineet ja erityisesti seuraavat:

5.1 analyysivaaka, tarkkuus 1 mg

5.2 mittapulloja, 10 ja 20 ml

5.3 sentrifugiputkia, 30 ml

5.4 pyöröhaihduttaja

5.5 uuni, jonka lämpötila voidaan pitää 50 °C:ssa (± 5 °C)

5.6 suodatinpapereita, keskinopea suodatus, halkaisija noin 15 cm

5.7 kaasukromatografialaitteisto

5.7.1 kaasukromatografi, jossa on split/splitless -injektori tai kolonniin liitetty injektori sekä liekki-ionisaatiodetektori

5.7.2 kaasukromatografikolonni, jossa stationaarifaasi, jota on käytetty onnistuneesti trigyseridien erottamisessa (dimetyylipolysiloksaani 100 % tai fenyylimetyylipolysiloksaani 5 % ja metyylipolysiloksaani 95 %). Valitaan stationaarifaasi, kolonnin pituus (4–15 m), sisähalkaisija (0,22–0,50 mm) ja nestekerroksen paksuus (vähintään 0,12 µm) laboratoriokokemuksen ja injektiojärjestelmän perusteella. Valitun kolonnin on joka tapauksessa sekä erotettava täydellisesti liuotinpiikki ja kapronihappotriglyseridi että tuotettava kapronihappo- ja enanttihappotriglyseridien piikkien välinen perusviivaresoluutio. Esimerkkejä sovellettavista edellytyksistä esitetään jäljempänä.

5.7.2.1 Esimerkkejä split-injektorin käyttöä koskevista edellytyksistä

— kantajakaasu: helium

— paine: 100 kPa

— kolonni: kvartsilasinen kolonni, jonka pituus 12 m, sisähalkaisija 0,5 mm ja nestekerroksen paksuus 0,1 µm

— stationäärifaasi: dimetyylipolysiloksaani 100 % tai fenyylimetyylipolysiloksaani 5 % ja dimetyylipolysiloksaani 95 % (esim. HT5)

— kolonnin lämpötila: alkulämpötila 130 °C, jota pidetään yllä 1 minuutti, nostetaan 20 °C/min 260 °C:seen ja sitten 30 °C/min 360 °C:seen ja pidetään 10 minuuttia 360 °C:ssa

— detektorin lämpötila: 370 °C

— injektorin lämpötila: 350 °C

— jakosuhde 1:30

— Injektiotilavuus: 1 µl.

5.7.2.2 Esimerkkejä kolonniin liitetyn injektorin käyttöä koskevista edellytyksistä

— kantajakaasu: vety (jatkuvan virtauksen järjestelmä)

— paine: 89 kPa

— kolonni: kvartsilasinen kolonni, jonka pituus 4 m, sisähalkaisija 0,32 mm ja nestekerroksen paksuus 0,25 µm

— stationäärifaasi: 5 % fenyyli, 95 % dimetyylipolysiloksaani

— kolonnin lämpötila: alkulämpötila 60 °C, joka pidetään 2 minuutin ajan, sitten nostetaan 35 °C/min 340 °C:seen ja pidetään tässä lämpötilassa 5 minuuttia

— detektorin lämpötila: 350 °C

— injektiotilavuus: 1 µl.

5.8 Injektioruisku, 5 µl

6. NÄYTTEENOTTO

Laboratorion on tärkeää saada aidosti edustava näyte, joka ei ole vahingoittunut eikä muuttunut kuljetuksen tai varastoinnin aikana.

Tässä kansainvälisessä standardissa ei määritellä näytteenottomenetelmää. Suositellaan käytettäväksi IDF-standardissa 50C: 1995 tai ISO-standardissa 707–1997 – Maito ja maitotuotteet: näytteenottomenetelmät – esitettyä näytteenottomenetelmää.

7. SUORITUS

7.1 **Näytteen ja mitattavan näytteen esikäsittely**

Toimitaan standardin ISO 14156 | IDF 172:2001 mukaisesti.

7.1.1 *Voiöljy, voi*

7.1.1.1 Sulatetaan 50–100 g näytettä uunissa (5.5).

7.1.1.2 Pannaan 0,5–1,0 g vedetöntä natriumsulfaattia (5.4) taitettuun suodatinpaperiin.

7.1.1.3 Suodatetaan rasva vedetöntä natriumsulfaattia sisältävän suodatinpaperin läpi ja kerätään suodos uunissa (5.5) pidettyyn dekanterilasiin. Kun sulanutta voita dekantoidaan suodatinpaperiin, varotaan heran siirtämistä.

7.1.2 *Kerma*

7.1.2.1 Näytteen lämpötilan on oltava 20 °C ± 2 °C.

7.1.2.2 Sekoitetaan näyte huolellisesti.

7.1.2.3 Laimennetaan sopiva määrä näytettä siten, että saadaan mittausta varten 100 ml:n näyte, jossa rasvan massaosuus on noin 4 %.

7.1.2.4 Rasvan uuttamiseksi kermasta toimitaan kuten raakamaidon ja homogenoidun maidon kanssa (ks. ISO 14156 | IDF 172:2001, kohta 8.3).

7.1.2.5 Punnitaan 1 g uutettua rasvaa 1 mg:n tarkkuudella 10 ml:n mittapulloon (5.2). Lisätään 1 ml kohdan 7.2.2 liuosta. Täytetään 10 ml:aan n-heksaanilla (4.1) ja homogenoidaan.

7.1.2.6 Siirretään 1 ml kohdan 7.1.1.2 liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.2) ja laimennetaan 10 ml:aan n-heksaanilla (4.1).

7.2 **Kalibrointistandardien valmistus**

7.2.1 Liuotetaan 100 mg enanttihappotriglyseridiä (4.3) 10 ml:aan n-heksaania (4.1).

7.2.2 Liuotetaan 100 mg kapronihappotriglyseridiä (4.2) 10 ml:aan n-heksaania (4.1).

7.2.3 Siirretään 1 ml kohdan 7.2.2 liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.2). Täytetään 10ml:aan n-heksaanilla (4.1).

7.2.4 Siirretään 1 ml kohdan 7.2.1 liuosta ja 1 ml kohdan 7.2.2 liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.2). Täytetään 10 ml:aan n-heksaanilla (4.1).

7.2.5 Siirretään 1 ml kohdan 7.2.4 liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.2) ja täytetään 10 ml:aan n-heksaanilla (4.1).

7.3 **Kromatografinen määritys**

7.3.1 Injektoidaan 1 µl standardiliuosta (7.2.5) kahdesti.

7.3.2 Injektoidaan 1 µl kumpaakin näyteliuosta.

Huomautus: Jos on valittu kolonniin liitetty injektorijärjestelmä, standardi- ja näyteliuoksia pitää laimentaa enemmän.

7.3.3 Toistetaan vaihetta 7.3.1 joka kolmannen näytteen jälkeen, jotta näyte saadaan kaksoisinjektoitujen standardien väliin. Tulokset perustuvat standardikromatogrammien vastekertoimien keskiarvoon.

8. TULOSTEN LASKEMINEN

Integroidaan jokaisesta kromatogrammista enantti- ja kapronihappotriglyserideihin liittyvien piikkien pinta-alat.

Noudatetaan noita ohjeita jokaisen näytesarjan osalta, eli yhdessä näytesarjassa juuri ennen näytettä kaksoisinjektoitu standardi on STD_1 ja juuri näytteen jälkeen kaksoisinjektoitu standardi on STD_2.

8.1 **Kalibrointi**

8.1.1 Lasketaan jokaiselle STD_1:lle vastekertoimet $Rf_1(a)$ ja $Rf_1(b)$.

Rf_1 (a) tai (b) = (kapronihappotriglyseridipiikin pinta-ala/enanttihappotriglyseridipiikin pinta-ala) × 100

Lasketaan vastekertoimen keskiarvo Rf_1.

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

8.1.2 Lasketaan samalla tavoin STD_2:n vastekertoimen keskiarvo Rf_2.

8.1.3 Lasketaan vastekertoimen keskiarvo Rf.

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

8.2 **Näytteet**

Lasketaan jokaisesta STD_1:n ja STD_2:n välillä saadusta näytteen kromatogrammista enanttihappopitoisuus C (kg/tonnia):

C = (enanttihappotriglyseridipiikin pinta-ala × Rf × 100)/(kapronihappotriglyseridipiikin pinta-ala × Wt × 1 000)

jossa:

— Wt = otetun rasvan paino (g)

— 100 = laimennustilavuus näytettä varten

— 1 000 = muuntokerroin (µg/g:sta suhteeseen kg/tonnia)

Voinäytteissä otetaan huomioon voin rasvapitoisuus ja lasketaan korjattu pitoisuusarvo C_{butter} (kg/voitonni).

$$C_{butter} = C_{fat} \times F$$

jossa F on voin rasvapitoisuus.

9. TARKKUUS

Standardin ISO 5725–1 ja ISO 5725–2 mukaisesti tehtävää voin monilaboratoriotestiä koskevat tarkkuutta koskevat tiedot esitetään kohdassa 12.

Toistettavuus- ja uusittavuusrajojen arvot ilmaistaan 95 %:n todennäköisyystasolla, eikä niitä välttämättä voi soveltaa muihin kuin tässä esitettyihin pitoisuusalueisiin ja matriiseihin.

9.1 **Toistettavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka sama henkilö on saanut samassa laboratoriossa lyhyen ajan kuluessa samalla menetelmällä ja samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 0,35 kg tonnia kohden.

9.2 **Uusittavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa samalla menetelmällä ja eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 0,66 kg tonnia kohden.

10. SALLITUT POIKKEAMAT: ALARAJAT (JOS MÄÄRÄT OVAT RIITTÄMÄTTÖMÄT)

10.1 **Merkitystä tuotteesta on otettava kolme näytettä sen tarkastamiseksi, että tuote on merkitty oikein.**

10.2 **Voi ja voiöljy**

10.2.1 Voitonnia kohden lisätään 11 kg enanttihappotriglyseridiä (puhtaus vähintään 95 %) eli 10,45 kg/t.

10.2.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 9,51 kg/t (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä puhtaudeltaan 95 % olevaa enanttihappotriglyseridiä, yksi määritys),

— 6,89 kg/t (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä puhtaudeltaan 95 % olevaa enanttihappotriglyseridiä, yksi määritys),

— interpoloinnissa arvojen 9,51 kg/t ja 6,89 kg/t välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

10.3 **Kerma**

10.3.1 Maitorasvatonnia kohden lisätään 10 kg enanttihappotriglyseridiä (puhtaus vähintään 95 %) eli 9,50 kg/tonnia merkkiaineellista maitorasvaa

10.3.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 8,60 kg/t (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä puhtaudeltaan 95 % olevaa enanttihappotriglyseridiä, yksi määritys),

— 6,23 kg/t (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä puhtaudeltaan 95 % olevaa enanttihappotriglyseridiä, yksi määritys).

— interpoloinnissa arvojen 8,60 kg/t ja 6,23 kg/t välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

11. SALLITUT POIKKEAMAT: YLÄRAJAT (JOS MÄÄRÄ YLITTYY YLI 20 %)

11.1 **Merkitystä tuotteesta on otettava kolme näytettä sen tarkastamiseksi, että tuote on merkitty oikein.**

11.2 **Voi ja voiöljy**

11.2.1 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Tulosten keskiarvoa verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— yläraja on 12,96 kg/t.

11.3 **Kerma**

11.3.1 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Tulosten keskiarvoa verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— yläraja on 11,82 kg/t.

12. LISÄTIEDOT: VOIRASVAN SISÄLTÄMÄN TRIENANTOAATIN TRIGLYSERIDIANALYYSILLÄ TEHDYN MÄÄRITYKSEN TULOSTEN TILASTOLLINEN ANALYYSI

Trienantoaattipitoisuuden määrittämiseksi merkkiaineellisessa voissa on tehty neljä laboratorioiden välistä koetta.

Ensimmäisen vaiheen kokeisiin osallistui 9 laboratoriota, joille ei määrätty mitään tiettyä määritysmenetelmää.

Toisen vaiheen kokeisiin osallistui 10 laboratoriota, jotka käyttivät neljää eri menetelmää:

— metyyliheptanoaatin kvantifiointi käyttäen sisäisenä standardina n-nonaania tai metyylinonanoaattia,

— trienantoaatin kvantifiointi käyttäen sisäisenä standardina trikaproaattia,

— metyyliheptanoaatin kvantifiointi käyttäen kalibrointinäytettä/-seosta,

— metyyliheptanoaatin kvantifiointi käyttäen kalibrointiseosta.

Jos määritettiin rasvahappometyyliestereitä, käytettiin lisäksi kahta erilaista metylointimenetelmää (De Francesco ja Christopherson & Glass).

Saatujen tulosten perustella kolmannen vaiheen testejä varten valittiin kaksi menetelmää:

— metyyliheptanoaatin kvantifiointi käyttäen sisäisenä standardina n-nonaania tai metyylinonanoaattia,

— trienantoaatin kvantifiointi käyttäen sisäisenä standardina trikaproaattia.

Seitsemän laboratorion tulokset osoittivat, että rasvahappometyyliestereiden määritysmenetelmä tuotti enemmän vaihtelua, minkä vuoksi päätettiin käyttää ainoastaan trienantoaatin määritystä triglyseridinä menetelmällä q ”trienantoaatin kvantifiointi käyttäen sisäisenä standardina trikaproaattia”. Lisäksi on tehtävä triglyseridimääritys kapillaarikolonnilla.

Neljännessä koevaiheessa neljää näytettä (A, B, C, D) kierrätettiin, ja tuloksia saatiin yhdeksästä laboratoriosta (taulukot 1 ja 2).

Kaksi laboratoriota (DE ja UE) analysoi näytteen rasvahappometyyliesterien määritysmenetelmällä.

Laboratorioiden vähäisen lukumäärän vuoksi tilastolaskelmat on tehty sekä kaikista tiedoista (kuvat 1 ja 2) rasvahappometyyliesterien määritystulokset mukaan luettuina että triglyseridimäärityksien tiedoista.

Testit rajojen ulkopuolelle jäävien laboratorioiden havaitsemiseksi:

— näyte A: Dixon-, Cochran- ja Grubbs-testit tasoilla 1 ja 5 % osoittivat harha-arvoja yhdessä laboratoriossa,

— näyte B: Grubbs-testi tasolla 5 % osoitti harha-arvoja yhdessä laboratoriossa,

— näyte C: Dixon- ja Grubbs-testit tasoilla 1 ja 5 % osoittivat harha-arvoja yhdessä laboratoriossa,

— näyte D: Dixon- ja Grubbs-testit tasoilla 1 ja 5 % osoittivat harha-arvoja yhdessä laboratoriossa.

Harha-arvoja antaneet laboratoriot on jätetty laskelman ulkopuolelle.

On syytä huomata, että rasvahappometyyliesterien määritysmenetelmällä saatuja tuloksia ei testeissä koskaan pidetty harha-arvoina.

Tarkkuusparametrit

Taulukoissa 1 ja 2 esitetään kaikkien laboratorioiden tulokset ja tarkkuusparametrit, jotka on laskettu hyväksyttävän laboratoriomäärän (8) perusteella. Laboratorioissa ei kuitenkaan valitettavasti käytetty samoja analyysimenetelmiä.

Taulukoissa 3 ja 4 esitetään ainoastaan triglyseridimääritysmenetelmällä saadut tulokset ja vastaavat tarkkuusparametrit. Parametrit voidaan hyväksyä, jos hyväksytään laboratorioiden vähäinen lukumäärä (6).

Kuvissa 3 ja 4 esitetään edellä kuvattuun kahteen sarjaan kuuluvia neljää näytettä koskevien mittaustietojen perusteella laskettujen Sr- ja SR-arvojen suuntaukset.

Taulukossa 5 esitetään Sr- ja SR-arvot yhdessä vastaavien yhdistettyjen arvojen sekä r- ja R-kokonaisparametrien kanssa.

Myös kriittinen ero 95 % todennäköisyydellä on laskettu.

Taulukko 1

Triglyseridien ja rasvahappometyyliesterien* määritysmenetelmien tilastolliset tulokset

Näyte A		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Keskiarvo	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Todellinen arvo	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Toistettavuus r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Suhteellinen toistettavuus r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,23
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR %)	2,04
					Uusittavuus R (95 %)	0,84
					Suhteellinen uusittavuus R %	5,71
Näyte B		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Keskiarvo	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Todellinen arvo	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Toistettavuus r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Suhteellinen toistettavuus r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,35
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR %)	2,61
					Uusittavuus R (95 %)	0,99
					Suhteellinen uusittavuus R %	7,31

Taulukko 2

Tilastotiedot triglyseridimääritysten ja rasvahappometyyliesterien* määritysten tuloksista

Näyte C		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Keskiarvo	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Todellinen arvo	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Toistettavuus r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Suhteellinen toistettavuus r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,17
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR%)	1,82
					Uusittavuus R (95 %)	0,47
					Suhteellinen uusittavuus R %	5,10

Näyte D		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Keskiarvo	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Todellinen arvo	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Toistettavuus r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Suhteellinen toistettavuus r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,24
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR %)	11,43
					Uusittavuus R (95 %)	0,67
					Suhteellinen uusittavuus R %	32,00

Taulukko 3

Tilastotiedot triglyseridimääritysten ja rasvahappometyyliesterien* määritysten tuloksista

Näyte A		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Keskiarvo	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Todellinen arvo	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,09
ËÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Toistettavuus r (95 %)	0,25
					Suhteellinen toistettavuus r %	2,24
					Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,13
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR %)	1,16
					Uusittavuus R (95 %)	0,36
					Suhteellinen uusittavuus R %	3,25
Näyte B		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Keskiarvo	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Todellinen arvo	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Toistettavuus r (95 %)	0,42
					Suhteellinen toistettavuus r %	3,16
					Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,33
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR %)	2,48
					Uusittavuus R (95 %)	0,93
					Suhteellinen uusittavuus R %	6,94

Taulukko 4

Tilastotiedot triglyseridien määritysmenetelmän tuloksista

Näyte C		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Keskiarvo	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Todellinen arvo	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Toistettavuus r (95 %)	0,42
					Suhteellinen toistettavuus r %	4,51
					Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,19
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR %)	2,04
					Uusittavuus R (95 %)	0,53
					Suhteellinen uusittavuus R %	5,71
Näyte D		R_1	R_2	Keski-arvo	Laboratorioiden lukumäärä rajojen ulkopuolelle jääneiden laboratorioiden poistamisen jälkeen	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Harha-arvoja antaneiden laboratorioiden lukumäärä	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	DK
					Keskiarvo	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Todellinen arvo	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Toistettavuuden standardipoikkeama (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Toistettavuus r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Suhteellinen toistettavuus r %	12,01
					Uusittavuuden standardipoikkeama (SR)	0,25
					Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSDR%)	11,90
					Uusittavuus R (95 %)	0,69
					Suhteellinen uusittavuus R %	33,32

Taulukko 5

Toistettavuus ja uusittavuus (rasvahappometyyliesterit mukaan luettuina)

	Laboratorioiden lukumäärä	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	Toistettavuus Sr (95 %)	Uusittavuus SR (95 %)
Näyte A	8	1	0,09	0,23
Näyte B	8	1	0,14	0,35
Näyte C	8	1	0,14	0,17
Näyte D	8	1	0,08	0,24
Yhdistetty arvo			0,116	0,256
			R	**R**
Yhdistetty arvo* 2.8			**0,324**	**0,716**

CrD95 =0.40

Trienantoaatin ilmoitettu puhtausaste = vähintään 95 %.

Voirasvan sisältämän trienantoaatin ilmoitettu vähimmäisraja = 11 kg/t.

Jos otetaan huomioon kriittinen ero 95 %:n todennäköisyydellä, kahden tuloksen keskiarvo ei saa olla pienempi kuin:
10,05 kg/tonni, jos on sisällytetty puhtausasteeltaan 95 % olevaa trienantoaattia.

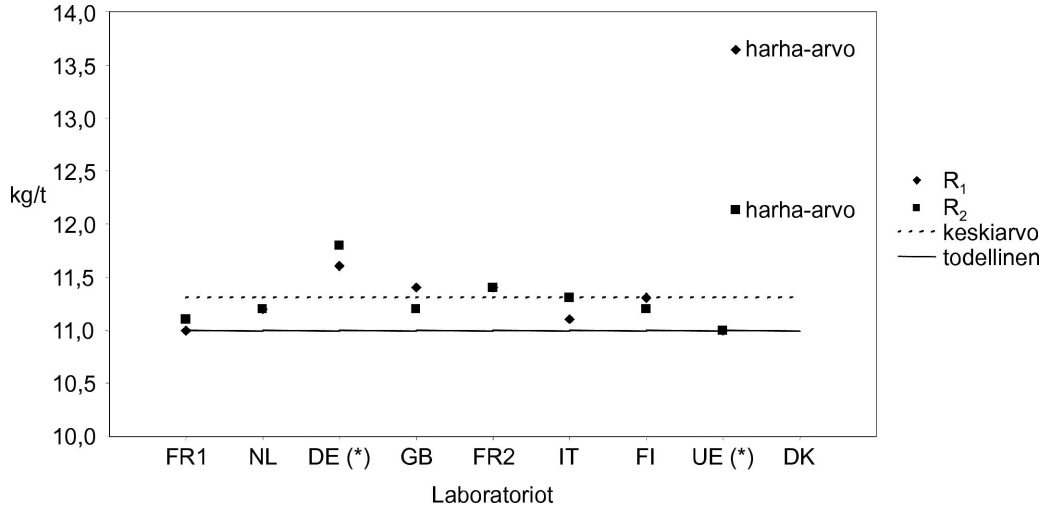
Toistettavuus ja uusittavuus (rasvahappometyyliesterit pois luettuina)

	Laboratorioiden lukumäärä	Harha-arvoja antaneet laboratoriot	Toistettavuus Sr (95 %)	Uusittavuus SR (95 %)
Näyte A	6	1	0,09	0,13
Näyte B	6	1	0,15	0,33
Näyte C	6	1	0,15	0,19
Näyte D	6	1	0,09	0,25
Yhdistetty arvo			0,124	0,237
			r	**R**
Yhdistetty arvo* 2.8			**0,347**	**0,663**

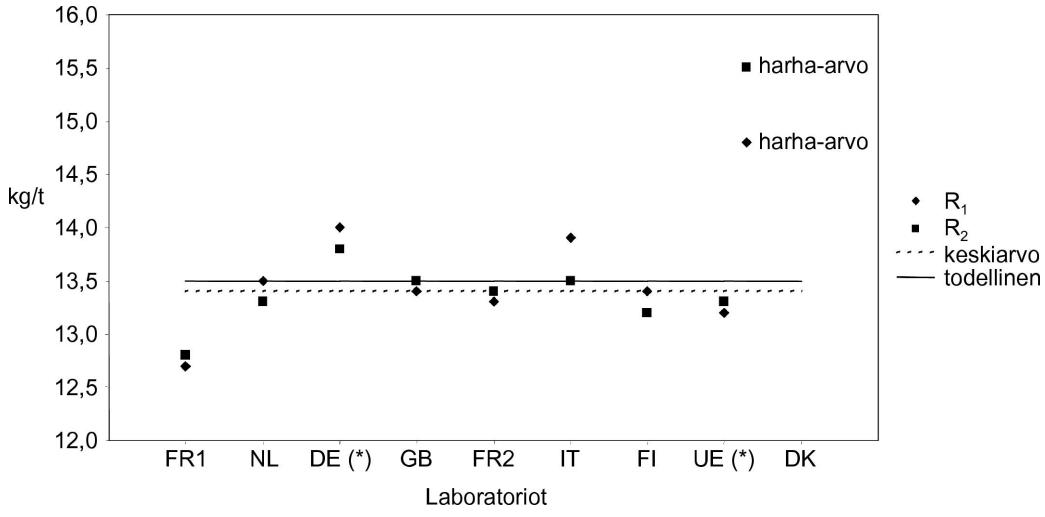
CrD95 =0,36
Trienantoaatin ilmoitettu puhtausaste = vähintään 95 %.
Voirasvan sisältämän trienantoaatin ilmoitettu vähimmäisraja = 11 kg/t.
Jos otetaan huomioon kriittinen ero 95 %:n todennäköisyydellä, kahden tuloksen keskiarvo ei saa olla pienempi kuin:
10,09 kg/tonni, jos on sisällytetty puhtausasteeltaan 95 % olevaa trienantoaattia.

Kuva 1 (*)

Koetulokset: näyte A

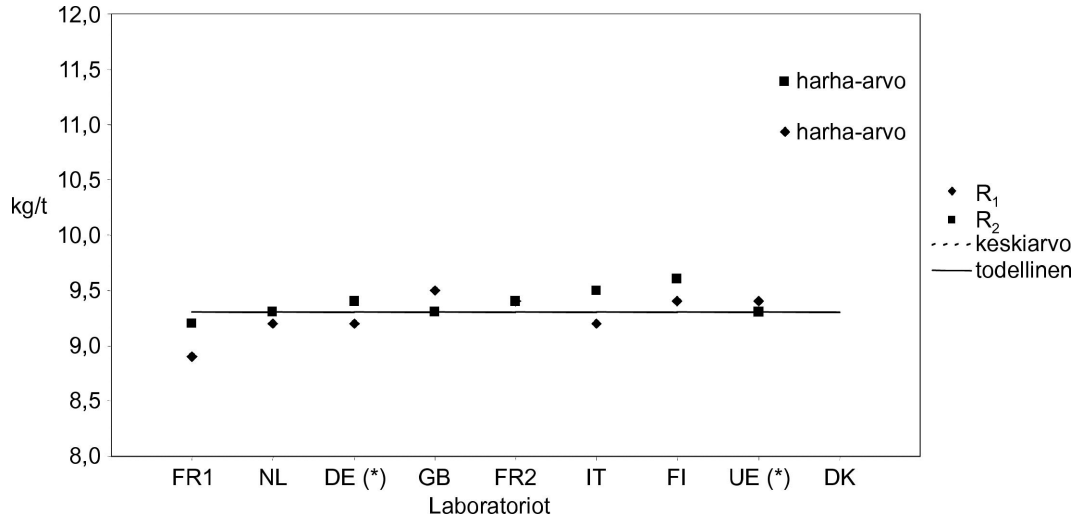


Koetulokset: näyte B

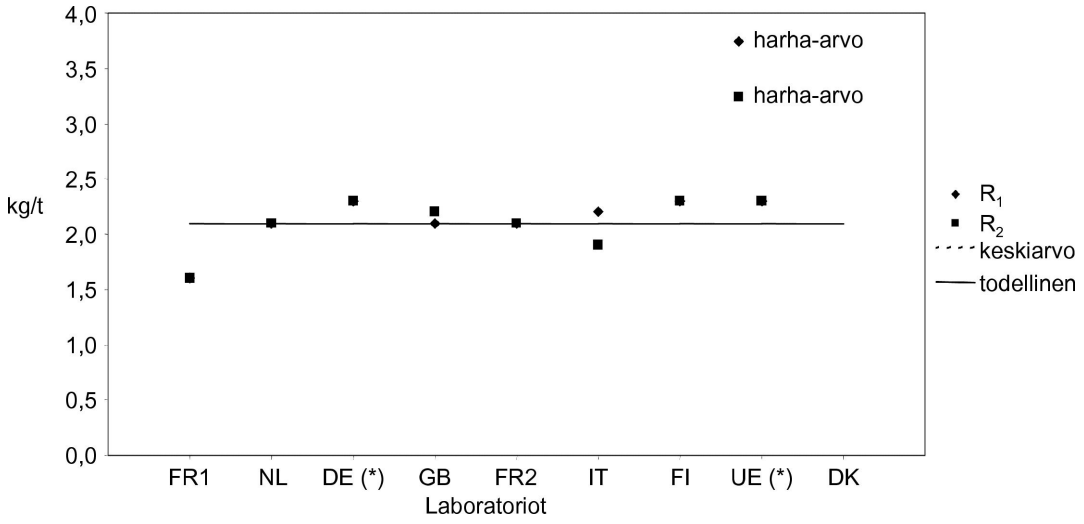


(*) = Rasvahappometyyliesterien määritysmenetelmä

Koetulokset: näyte C

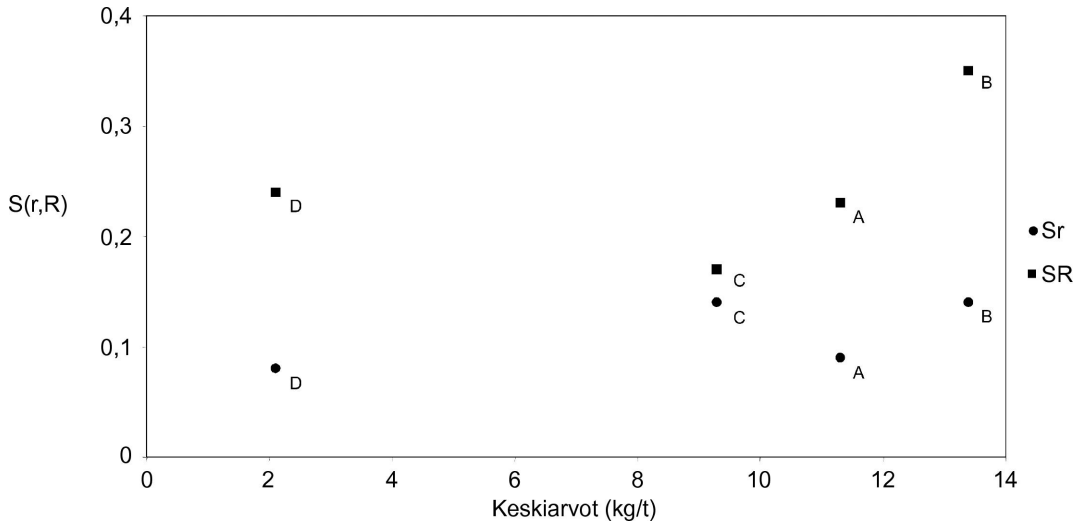


Koetulokset: näyte D



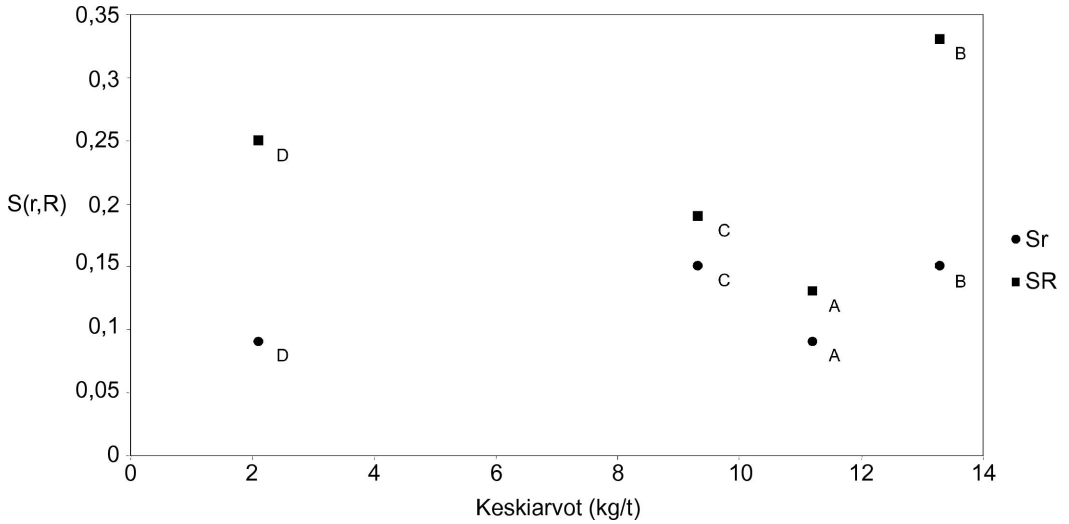
Kuva 2

Toistettavuuden ja uusittavuuden standardipoikkemat eri tasoilla (triglyseridit ja rasvahappometyyliesterit)



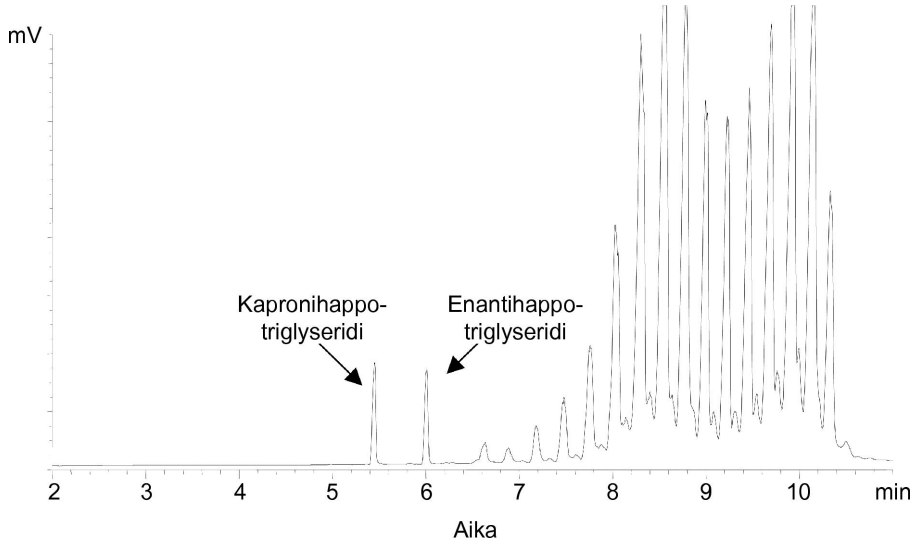
Kuva 3

Toistettavuuden ja uusittavuuden standardipoikkemat eri tasoilla (triglyseridit)



Kuva 4

Esimerkki kolonniin liitetyn injektorin käytöstä



LIITE VI

(5 artikla)

VOIÖLJYN, VOIN TAI KERMAN VANILLIINIPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN HPLC-MENETELMÄLLÄ

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Tässä kuvataan menetelmä vanilliinin kvantitatiiviseksi määrittämiseksi voista, voiöljystä tai kermasta.

2. PERIAATE

Tietynsuuruinen näyte uutetaan isopropanoli/etanoli/asetonitriili -seoksella (1:1:2). Pääosa rasvasta saostetaan jäähdyttämällä – 15 °C:n ja – 20 °C:n välillä, minkä jälkeen näyte sentrifugoidaan.

Laimennetaan vedellä, minkä jälkeen vanilliinipitoisuus määritetään HPLC-menetelmällä.

3. LAITTEET JA TARVIKKEET

Tavalliset laboratoriovälineet ja erityisesti seuraavat:

3.1 pakastin, lämpötilansäätö välille 15 °C–20 °C

3.2 2 ml:n kertakäyttöruiskuja

3.3 kalvosuodattimia, huokoskoko 0,45 µm, joka kestää 5 % uuttoliuosta (4.4) sisältävää liuosta

3.4 nestekromatografi, johon kuuluu pumppu (virtaus 1,0 ml/min), injektiolaite (tilavuus 20 µl, käsikäyttöinen tai automaattinen), UV-detektori (aallonpituus 306 nm, 0,01 ÅU täysi asteikko), piirturi tai integraattori ja 25 °C:een säädetty pylvästermostaatti

3.5 HPLC-kolonni (pituus 250 mm, sisähalkaisija 4,6 mm) pakattu LiChrosper RP 18:lla (Merck, 5 µm) tai vastaavalla

3.6 esikolonni (pituus noin 20 mm, sisähalkaisija 3 mm) kuivapakattu LiChrospher RP 18:lla (5–10 µm) tai vastaavalla.

3.7 sentrifugi, kiihtyvyys 2 000 rpm

4. REAGENSSIT

Kaikkien käytettävien reagenssien on oltava analyysipuhtausluokkaa.

4.1 Isopropanoli

4.2 Etanoli 96 % (v/v)

4.3 Asetonitriili

4.4 Uuttoliuos

Sekoitetaan isopropanolia (4.1), etanolia (4.2) ja asetonitriiliä (4.3) suhteessa 1:1:2 (v/v).

4.5 Vanilliini (4-hydroksi-3-metoksibentsaldehydi) ≥ 98 %

4.5.1 *Vanilliinin kantaliuos (=500 µg/ml)*

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella noin 50 mg (CM mg) vanilliinia (4.5) 100 ml:n mittapulloon, lisätään 25 ml uuttoliuosta (4.4) ja täytetään merkkiin vedellä.

4.5.2 *Vanilliinin standardiliuos (=10 µg/ml)*

Pipetoidaan 5 ml vanilliinin kantaliuosta (4.5.1) 250 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin vedellä.

4.5.3 *Metanoli, HPLC-laatua*

4.5.4 *Jääetikka*

4.5.5 *Vesi, HPLC-laatua*

4.5.6 *HPLC:n liikkuva faasi*

Sekoitetaan 300 ml metanolia (4.5.3), noin 500 ml vettä (4.5.5) ja 20 ml etikkahappoa (4.5.4) 1 000 ml:n mittapullossa ja täytetään merkkiin vedellä (4.5.5). Suodatetaan 0,45 µm:n suodattimen läpi (3.3).

5. SUORITUS

5.1 **Näytteen esikäsittely**

5.1.1 *Voi*

Lämmitetään näytettä kunnes se alkaa sulaa. Varotaan lämpötilan kohoamista paikallisesti yli 30 °C:een. Voi ei saa missään tapauksessa erottua kahteen faasiin. Kun näyte on tarpeeksi juokseva, homogenoidaan ravistamalla. Sekoitetaan voita 15 sekunnin ajan ennen näytteen ottamista. Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 5 g (SM g) voita 100 ml:n mittapulloon.

5.1.2 *Voiöljy*

Juuri ennen näytteenottoa pidetään voiöljyä sisältävää astiaa 40–50 °C:ssa lämpökaapissa kunnes öljy on sulanut täysin. Sekoitetaan näyte pyörivällä liikkeellä tai sekoittamalla välttäen liian voimakkaasta sekoittamisesta aiheutuvia ilmakuplia. Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 4 g (SM g) voiöljyä 100 ml:n mittapulloon.

5.1.3 *Kerma*

Lämmitetään näyte vesihauteessa tai lämpökaapissa 35–40 °C:n lämpötilassa. Sekoitetaan tasaiseksi pyörivällä liikkeellä ja tarvittaessa sekoittamalla. Jäähdytetään näyte nopeasti 20 ± 2 °C:seen. Jollei näyte ole homogeeninen, toistetaan sama menettely. Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 10 g (SM g) kermaa 100 ml:n mittapulloon.

5.2 **Analyysiliuoksen valmistaminen**

Lisätään noin 75 ml uuttoliuosta (4.4) näytteeseen (5.1.1, 5.1.2 tai 5.1.3), sekoitetaan tai ravistellaan voimakkaasti noin 15 minuutin ajan ja täytetään merkkiin uuttoliuoksella (4.4). Siirretään noin 10 ml tätä uutetta tulpalla varustettuun koeputkeen. Sijoitetaan koeputki pakastimeen (3.1) noin 30 minuutiksi. Sentrifugoidaan kylmää uutetta 5 minuuttia, noin 2 000 kierrosta minuutissa, ja dekantoidaan viipymättä. Annetaan dekantoidun liuoksen tulla huoneenlämpöiseksi. Pipetoidaan 5 ml dekantoitua liuosta 100 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin vedellä. Suodatetaan osa siitä kalvosuodattimen läpi (3.3) ruiskulla (3.2). Suodos on valmis HPLC-määritykseen.

5.3 **Kalibrointi**

Pipetoidaan 5 ml vanilliinin standardiliuosta (4.5.2) 100 ml:n mittapulloon. Lisätään 5 ml uuttoliuosta (4.4) ja täytetään merkkiin vedellä. Tämä liuos sisältää 0,5 µg/ml vanilliinia.

5.4 **Määritys HPLC:llä**

Annetaan kromatografialaitteen stabiloitua noin 30 minuutin ajan. Injisoidaan standardiliuos (5.3). Toistetaan kunnes kahden perättäisen injektoinnin piikkien pinta-alojen tai korkeuksien välinen ero on alle 2 %. Edellä kuvatuissa olosuhteissa vanilliinin retentioaika on noin 9 minuuttia. Analysoidaan standardiliuos (5.3) kahdesti injisoimalla 20 µl. Injisoidaan 20 µl testiliuosta (5.2). Määritetään saadun vanilliinipiikin pinta-ala tai korkeus. Toistetaan standardiliuoksen (5.3) rinnakkaismääritys, kun näytteitä on injisoitu 10 kertaa (5.2).

6. TULOSTEN LASKEMINEN

Lasketaan vanilliinipiikkien keskimääräinen piikin pinta-ala (tai korkeus) (AC) rinnakkaismäärityksistä molempien testiliuossarjojen alussa ja lopussa (yhteensä 4 pinta-alaa tai korkeutta).

Lasketaan vastekerroin (R):

$$R = AC / CM$$

jossa CM on vanilliinin massa milligrammoina (4.5.1).

Näytteen vanilliinipitoisuus (C, mg/kg) saadaan kaavasta

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

jossa:

AS = näytteen vanilliinipiikin pinta-ala tai korkeus

SM = näytteen massa grammoina (5.1.1, 5.1.2 tai 5.1.3).

Huomautus: Kun vanilliinipitoisuus analysoidaan kermasta, merkkiainepitoisuus on ilmaistava milligrammoina merkkiainetta/kilogrammassa voirasvaa. Tämä saadaan kertomalla C tekijällä 100/f, jossa f on kerman rasvapitoisuus prosentteina (m/m).

20 = kerroin, jolla otetaan huomioon standardi- ja näytteiden laimennokset

0,96 = korjauskerroin näytteen ensimmäisen laimennoksen rasvapitoisuudelle

Huomautus: Piikkien pinta-alojen sijasta voidaan käyttää piikkien korkeuksia (8.3).

7. MENETELMÄN TARKKUUS

7.1 **Toistettavuus (r)**

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut mahdollisimman lyhyen ajan kuluessa samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 16 mg/kg.

7.2 **Uusittavuus (R)**

Kahden määritystuloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, välinen ero saa olla enintään 27 mg/kg.

8. SALLITUT POIKKEAMAT

8.1 Merkitystä tuotteesta on otettava kolme näytettä homogeenisuuden tarkistamiseksi.

8.2 Vaniljasta tai synteettisestä vanilliinista saatu merkkiaine

8.2.1 4-hydroksi-3-metoksibentsaldehydiä lisätään 250 g voiöljy- tai voitonnia kohden. Kun merkitään kermaa, lisätään 250 g voirasvatonnia kohden.

8.2.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 220,8 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä),

— 158,3 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä).

Interpoloinnissa arvojen 220,8 mg/kg ja 158,3 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

8.3 Vaniljakodista tai näiden kokonaisuutteista saatu merkkiaine

8.3.1 4-hydroksi-3-metoksibentsaldehydiä lisätään 100 g voiöljy- tai voitonnia kohden. Kun merkitään kermaa, lisätään 100 g voirasvatonnia kohden.

8.3.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 78,3 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä),

— 53,3 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä).

Interpoloinnissa arvojen 78,3 mg/kg ja 53,3 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

9. HUOMAUTUKSIA

9.1 Lisätyn vanilliinin takaisinsaanto tasolla 250 mg/kg voiöljyä vaihtelee välillä 97,0–103,8. Todettu keskimääräinen pitoisuus on ollut testeissä 99,9 % ja sen standardipoikkeama 2,7 %.

9.2 Standardiliuos sisältää 5 % uuttoliuosta, joka kompensoi näytteiden 5 %:n uuttoliuospitoisuudesta aiheutuvaa piikkien levenemistä. Tämän ansiosta kvantitatiivinen määritys voidaan suorittaa piikkien korkeuden avulla.

9.3 Analyysi perustuu lineaariseen kalibrointikuvaajaan, jonka leikkauspiste on nollassa.

9.4 Lineaarisuus tulisi tarkastaa käyttäen standardiliuoksen (4.5.2) sopivia laimennoksia ensimmäistä analyysiä suoritettaessa ja sen jälkeen säännöllisin väliajoin sekä aina, kun HPLC-laitteistoon on tehty muutoksia tai sitä on korjattu. Pastöroimattomassa kermassa tai siitä valmistetuissa tuotteissa olevat entsyymit voivat hajottaa vanilliinia vanilliinihapoksi, divanilliiniksi ja muiksi yhdisteiksi.

LIITE VII

(5 artikla)

BEETA-APO-8'-KAROTEENIHAPPOETYYLIESTERIN SPEKTROMETRINEN MÄÄRITYS VOIÖLJYSTÄ JA VOISTA

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Tässä kuvataan menetelmä beeta-apo-8'-karoteenihappoetyyliesterin (apokaroteeniesteri) kvantitatiiviseksi määrittämiseksi voista ja voiöljystä. Apokaroteeniesteri on kaikkien sellaisten menetelmässä kuvatuissa olosuhteissa valmistetussa uutteessa esiintyvien aineiden summa, jotka absorboivat valoa aallonpituudella 440 nm.

2. PERIAATE

Voirasva liuotetaan petrolieetteriin ja absorbanssi mitataan aallonpituudella 440 nm. Apokaroteeniesterin pitoisuus määritetään ulkoiseen standardiin vertaamalla.

3. LAITTEET JA TARVIKKEET

3.1 mittapipettejä, tilavuus 0,25; 0,50; 0,75 ja 1,0 ml

3.2 spektrofotometri, joka sopii käytettäväksi aallonpituudella 440 nm (ja 447–449 nm) ja jonka kyvettien valotie on 1 cm

3.3 mittapulloja, 20 ml ja 100 ml

3.4 analyysivaaka, herkkyys 0,1 mg, tarkkuus 1 mg, luettavuus 0,1 mg

3.5 uuni, 45 °C ± 1 °C

3.6 tuhkattomia suodatinpapereita, nopea suodatus

4. REAGENSSIT

Kaikkien reagenssien on oltava tunnustettua analyysilaatua.

4.1 Apokaroteeniesterin suspensio (noin 20 %)

4.1.1 Suspension pitoisuus todetaan seuraavasti:

Suspensiota lämmitetään 45–50 °C:seen ja homogenoidaan avaamattomassa, alkuperäispakkauksessa. Mittapulloon (100 ml) punnitaan noin 400 mg, liuotetaan 20 ml:aan kloroformia (4.4) ja täytetään merkkiin sykloheksaanilla (4.5). Laimennetaan 5 ml tätä liuosta 100 ml:ksi sykloheksaanilla (liuos A). Laimennetaan 5 ml liuosta A 100 ml:ksi sykloheksaanilla. Mitataan absorbanssi aallonpituudella 447–449 nm (mitataan maksimi käyttäen sykloheksaania nollanäytteenä 1 cm:n kyveteillä).

Apokaroteeniesterin pitoisuus P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **tai** kehitetään: $(Abs_{max}/2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{max} = mittaliuoksen maksimiabsorbanssi

M_{susp} = suspension massa (g)

2 550 = vertailuabsorbanssi (1 %, 1 cm)

P = suspension puhtaus (pitoisuus) (%)

Huomautus: Apokaroteeniesterin suspensio on herkkä ilmalle, lämmölle ja valolle. Sitä voidaan säilyttää viileässä paikassa avaamattomassa, alkuperäisessä pakkauksessaan (typessä) noin 12 kuukautta. Avaamisen jälkeen sisältö on käytettävä nopeasti.

4.1.2 Apokaroteeniesterin standardiliuos, noin 0,2 mg/ml

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 0,100g apokaroteeniesterisuspensiota (4.1.1) (W), liuotetaan liuotinbensiiniin (4.2), siirretään kvantitatiivisesti tilavuudeltaan 100 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin liuotinbensiinillä.

Tämä liuos sisältää (W × P) 10 mg/ml apokaroteeniesteriä.

Huomautus: Liuosta on säilytettävä viileässä paikassa valolta suojattuna. Käyttämätön liuos säilyy kuukauden.

4.2 Liuotinbensiini (40–60 °C)

4.3 Natriumsulfaatti, vedetön, rakeina, kuivattu ennalta 102 °C:ssa kahden tunnin ajan.

4.4 Kloroformi

4.5 Sykloheksaani

5. SUORITUS

5.1 **Näytteen esikäsittely**

5.1.1 *Voiöljy*

Näyte sulatetaan lämpökaapissa noin 45 °C:ssa.

5.1.2 *Voi*

Näyte sulatetaan lämpökaapissa noin 45 °C:ssa ja suodatetaan edustava osa noin 10g vedetöntä natriumsulfaattia (4.3) sisältävän suodattimen läpi voimakkaalta luonnon- ja keinovalolta suojatussa ympäristössä pitäen lämpötila 45 °C:ssa. Kerätään sopiva määrä voirasvaa.

5.2 **Määritys**

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 1g voiöljyä tai voirasvaa (5.1.2), (M). Siirretään kvantitatiivisesti 20 ml:n (V) mittapulloon liuotinbensiiniä (4.2) käyttäen, täytetään merkkiin ja sekoitetaan huolellisesti.

Siirretään määräosa 1 cm:n kyvettiin ja mitataan absorbanssi aallonpituudella 440 nm käyttäen liuotinbensiiniä nollanäytteenä. Liuoksessa esiintyvän apokaroteeniesterin pitoisuus saadaan kalibrointikuvaajasta (C µg/ml).

5.3 **Kalibrointi**

Pipetoidaan 0; 0,25; 0,5; 0,75 ja 1,0 ml apokaroteeniesterin standardiliuosta (4.1.2) viiteen 100 ml:n mittapulloon. Laimennetaan merkkiin saakka liuotebensiinillä (4.2) ja sekoitetaan.

Liuosten pitoisuudet vaihtelevat välillä 0–2 µg/ml, ja ne lasketaan tarkasti vertaamalla standardiliuoksen (4.1.2) pitoisuuteen (W × P/10 mg/ml). Mitataan absorbanssit aallonpituudella 440 nm käyttäen petrolieetteriä (4.2) vertailuarvona.

Laaditaan kuvaaja, jossa absorbanssiarvot ovat y-akselilla ja apokaroteeniesterin konsentraatio x-akselilla. Lasketaan kalibrointikuvaajan yhtälö.

6. TULOSTEN LASKEMINEN

6.1 Apokaroteeniesterin pitoisuus, ilmaistuna mg/kg tuotetta, saadaan seuraavasti:

Voiöljy: (C × V)/M

Voi: 0,82 (C × V)M

jossa:

C = apokaroteeniesterin pitoisuus (µg/ml) kalibrointikuvaajalta (5.3) luettuna

V = koeliuoksen (5.2) määrä (ml)

M = näytteen (5.2) massa (g)

0,82 = korjauskerroin voin voirasvapitoisuudelle

7. MENETELMÄN TARKKUUS

7.1 **Toistettavuus**

7.1.1 *Voianalyysi*

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut mahdollisimman lyhyen ajan kuluessa samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 1,4 mg/kg.

7.1.2 *Voiöljyanalyysi*

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut mahdollisimman lyhyen ajan kuluessa samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 1,6 mg/kg.

7.2 **Uusittavuus**

7.2.1 *Voianalyysi*

Kahden määritystuloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, välinen ero saa olla enintään 4,7 mg/kg.

7.2. **2 Voiöljyanalyysi**

Kahden määritystuloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, välinen ero saa olla enintään 5,3 mg/kg.

7.3 **Tarkkuustietojen lähde**

Tarkkuutta koskevat tiedot määritettiin vuonna 1995 suoritetusta kokeesta, johon osallistui 11 laboratoriota ja jossa määritettiin 12 merkittyä näytettä (kuusi rinnakkaista sokeanäytettä) voin osalta ja 12 merkittyä näytettä (kuusi rinnakkaista sokeanäytettä) voiöljyn osalta.

8. SALLITUT POIKKEAMAT

8.1 Merkitystä tuotteesta on otettava kolme näytettä sen tarkastamiseksi, että tuote on merkitty oikein.

8.2 **Voi**

8.2.1 Kokonaisarvo voille, tausta-absorbanssi mukaan lukien, on 22 mg/kg.

8.2.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 17,7 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä),

— 12,2 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä).

Interpoloinnissa arvojen 17,7 mg/kg ja 12,2 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

8.3 **Voiöljy**

8.3.1 Kokonaisarvo voiöljylle, tausta-absorbanssi mukaan lukien, on 24 mg/kg.

Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 19,2 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä),

— 13,2 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä).

Interpoloinnissa arvojen 19,2 mg/kg ja 13,2 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

LIITE VIII

(5 artikla)

VOIN TAI VOIÖLJYN SISÄLTÄMÄN SITOSTEROLIN TAI STIGMASTEROLIN MÄÄRITYS KAASUKROMATOGRAFISESTI KAPILLAARIKOLONNILLA

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Tässä kuvataan menetelmä voin ja voiöljyn sisältämän sitosterolin tai stigmasterolin kvantitatiiviseksi määrittämiseksi. Sitosteroli on β-sitosterolin ja 22-dihydro-β-sitosterolin summa, kun muita sitosteroleita pidetään merkityksettöminä.

2. PERIAATE

Voi tai voiöljy saippuoidaan kaliumhydroksidin avulla etanoliliuoksessa ja saippuoitumattomat osat uutetaan dietyylieetterillä.

Sterolit muutetaan trimetyylisilyylieettereiksi ja määritetään kaasukromatografisesti kapillaarikolonnin avulla. Sisäisenä standardina on betuliini.

3. VÄLINEISTÖ

3.1 Saippuoimispullo, 150 ml, varustettuna palautusjäähdyttimellä, jossa on hioslasiliitokset

3.2 Erotussuppiloita, 500 ml

3.3 Pulloja, 250 ml

3.4 Paineentasauspulloja, 250 ml tai sisällöltään vastaavia, tarkoitettu pois heitettävän eetterin keräämiseen

3.5 Lasikolonni, 350 mm × 20 mm, varustettuna hioslasiliitoksella

3.6 Vesihaude tai termostoitu mantteli

3.7 Reaktiopulloja, 2 ml

3.8 Kaasukromatografialaitteisto, jossa voidaan käyttää kapillaarikolonnia, varustettuna split-laitteistolla, ja johon kuuluu:

3.8.1 termostoitu kolonniuuni, jossa voidaan ylläpitää haluttu lämpötila ± 1 °C tarkkuudella

3.8.2 lämpötilasäätöinen injektori

3.8.3 liekki-ionisaatiodetektori ja signaalinmuunninvahvistin

3.8.4 integraattori-piirturi, jota voidaan käyttää signaalinmuunninvahvistimen (3.8.3) kanssa

3.9 Kvartsilasinen kapillaarikolonni, joka on kokonaan päällystetty BP 1:llä tai vastaavalla (tai muu vähintään saman resoluution kolonni) aineella tasaisesti 0,25 µm:n paksuudella; kolonnilla on pystyttävä erottamaan lanosterolin ja sitosterolin trimetyylisilyylijohdannaiset. Tähän tarkoitukseen sopii kolonni, jonka pituus on 12 m ja sisähalkaisija 0,2 mm.

3.10 Mikroruisku, jossa on karkaistusta teräksestä oleva neula, 1 µl, kaasukromatografiaa varten.

4. REAGENSSIT

Kaikkien reagenssien on oltava tunnustettua analyysilaatua. Veden on oltava tislattua tai puhtaudeltaan vähintään sitä vastaavaa.

4.1 Etanoli, puhtaudeltaan vähintään 95 %

4.2 Kaliumhydroksidi, 60 % liuos, liuotetaan 600 g kaliumhydroksidia (vähintään 85 %) veteen ja täytetään 1 litraksi vedellä

4.3 Betuliini, puhtaudeltaan vähintään 99 %

4.3.1 Betuliiniliuoksia dietyylieetterissä (4.4)

4.3.1.1 Sitosterolin määritykseen käytettävän betuliiniliuoksen pitoisuuden on oltava 1,0 mg/ml.

4.3.1.2 Stigmasterolin määritykseen käytettävän betuliiniliuoksen pitoisuuden on oltava 0,4 mg/ml.

4.4 Dietyylieetteri, puhtaudeltaan analyysilaatua (ei sisällä peroksideja tai jäämiä)

4.5 Natriumsulfaatti, vedetön, rakeina, kuivattu ennalta 102 °C:ssa kahden tunnin ajan

4.6 Silylointireagenssi, esimerkiksi TRI-SIL (Pierce Chemical Co., Cat nro 49001) tai vastaava. (Varoitus: TRI-SIL on syttyvää, myrkyllistä, syövyttävää ja voi olla karsinogeenista. Laboratoriohenkilökunnan on tunnettava hyvin TRI-SIL:iin sovellettavat turvallisuusohjeet ja heidän on noudatettava välttämättömiä varotoimenpiteitä).

4.7 Lanosteroli

4.8 Sitosteroli, puhtaudeltaan tunnettu, vähintään 90 % (P)

Huomautus 1: Kalibrointiin käytettävien standardiaineiden puhtaus on määritettävä standardimenetelmän avulla. Lähdetään olettamuksesta, että kaikki näytteessä olevat sterolit esiintyvät kromatogrammissa, että piikkien kokonaispinta-ala edustaa 100-prosenttisesti steroleja ja että sterolit antavat saman detektorivasteen. Järjestelmän lineaarisuus on tarkistettava kyseeseen tulevilla pitoisuusalueilla.

4.8.1 Sitosterolin standardiliuos: valmistetaan noin 0,001 mg/ml:n tarkkuudella liuos, joka sisältää noin 0,5 mg/ml (W_1) sitosterolia (4.8) dietyylieetterissä (4.4).

4.9 Stigmasteroli, puhtaudeltaan tunnettu, vähintään 90 % (P)

4.9.1 Stigmasterolin standardiliuos: valmistetaan 0,001 mg/ml:n tarkkuudella liuos, joka sisältää noin 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterolia (4.9) dietyylieetterissä (4.4)

4.10 Seos resoluutiotestiä varten: valmistetaan liuos, joka sisältää 0,05 mg/ml lanosterolia (4.7) ja 0,5 mg/ml sitosterolia (4.8) dietyylieetterissä (4.4).

5. MENETELMÄ

5.1 **Standardiliuosten valmistus kromatografiaa varten**

Lisätään sisäinen standardiliuos (4.3.1) sopivaan sterolistandardiliuokseen samanaikaisesti saippuoidun näytteen (5.2.2) kanssa.

5.1.1 Sitosterolin standardiliuos kromatografiaa varten: siirretään 1 ml sitosterolin standardiliuosta (4.8.1) kahteen reaktiopulloon (3.7) ja poistetaan dietyylieetteri typpivirran avulla. Lisätään 1 ml sisäistä standardiliuosta (4.3.1.1) ja poistetaan dietyylieetteri typpivirran avulla.

5.1.2 Stigmasterolin kromatografinen standardiliuos: siirretään 1 ml stigmasterolin standardiliuosta (4.9.1) kahteen reaktiopulloon (3.7) ja poistetaan eetteri typpivirran avulla. Lisätään 1 ml sisäistä standardiliuosta (4.3.1.2) ja poistetaan eetteri typpivirran avulla.

5.2 **Saippuoitumattomien fraktioiden valmistus:**

5.2.1 Sulatetaan voinäyte enintään 35 °C:n lämpötilassa. Sekoitetaan se huolellisesti.

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 1 g voita (W_2) tai voiöljyä (W_2) 150 ml:n pulloon (3.1). Lisätään 50 ml etanolia (4.1) ja 10 ml kaliumhydroksidiliuosta (4.2). Liitetään pulloon palautusjäähdytin ja kuumennetaan noin 75 °C:ssa 30 minuuttia. Irrotetaan jäähdytin ja annetaan pullon jäähtyä huoneenlämpötilaan.

5.2.2 Lisätään pulloon 1,0 ml sisäistä standardiliuosta (4.3.1.1, jos määritetään sitosterolia tai 4.3.1.2, jos määritetään stigmasterolia). Sekoitetaan huolellisesti. Siirretään pullon sisältö kvantitatiivisesti 500 ml:n erotussuppiloon (3.2). Huuhdellaan pullo 50 ml:lla vettä ja tämän jälkeen 250 ml:lla dietyylieetteriä (4.4). Erotussuppiloa ravistetaan voimakkaasti 2 minuutin ajan ja annetaan faasien erottua. Poistetaan alempi vesifaasi ja huuhdellaan eetterifaasi ravistellen neljällä peräkkäisellä 100 ml:n määrällä vettä.

Huomautus 2: Emulsion muodostumisen välttämiseksi on välttämätöntä, että kaksi ensimmäistä vesihuuhtelua suoritetaan varoen (10 kertaa käännellen). Kolmannessa huuhtelussa voidaan ravistella voimakkaasti 30 sekuntia. Jos emulsio muodostuu, se voidaan poistaa lisäämällä 5–10 ml etanolia. Jos etanolia lisätään, on välttämätöntä suorittaa vielä kaksi voimakasta vesihuuhtelua.

5.2.3 Kaadetaan kirkas, saippuaton eetterikerros lasikolonniin (3.5), joka sisältää 30 g vedetöntä natriumsulfaattia (4.5). Kerätään eetteri 250 ml:n pulloon (3.3). Lisätään yksi kiehumakivi ja haihdutetaan vesihauteessa tai termostoidussa manttelissa lähes kuivaksi huolehtien siitä, että poistettavat liuottimet kerätään talteen.

Huomautus 3: Jos näyteuutteet haihdutetaan kuivaksi liian korkeassa lämpötilassa, voi tapahtua sterolihäviöitä.

5.3 **Trimetyylisilyylieettereiden valmistus**

5.3.1 Siirretään pulloon jäänyt eetteriliuos 2 ml:n reaktiopulloon (3.7) 2 ml:lla eetteriä ja poistetaan eetteri typpivirran avulla. Pestään pullo kahdesti 2 ml:lla eetteriä, siirretään tämä pesuliuososa reaktiopulloon ja poistetaan eetteri joka kerta typellä.

5.3.2 Näyte silyloidaan lisäämällä 1 ml TRI-SILiä (4.6). Pullo suljetaan ja sitä ravistetaan voimakkaasti näytteen liukenemiseksi. Jos liukeneminen on epätäydellistä, lämmitetään 65–70 °C:seen. Annetaan seistä vähintään 5 minuutin ajan ennen injektointia kaasukromatografiin. Standardit silyloidaan samalla tavoin kuin näytteet. Erotuskyvyn testaamiseen käytettävä seos (4.10) silyloidaan samalla tavoin kuin näytteet.

Huomautus 4: Silyloinnin on tapahduttava vedettömissä oloissa. Betuliinin epätäydellinen silyloituminen näkyy betuliinipiikin lähellä olevana toisena piikkinä.

Etanolin läsnäolo silyloinnin aikana häiritsee silylointia. Se voi olla seurausta riittämättömästä huuhtelusta uuton aikana. Jos tämä ongelma toistuu, uuttovaiheeseen voidaan lisätä viides huuhtelu, joka tapahtuu ravistellen voimakkaasti 30 sekunnin ajan.

5.4 **Kaasukromatografinen analyysi**

5.4.1 *Toimintaolosuhteiden valinta*

Kaasukromatografi säädetään valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Ohjeelliset ajon olosuhteet ovat seuraavat:

— kolonnin lämpötila: 265 °C

— injektorin lämpötila: 265 °C

— detektorin lämpötila: 300 °C

— kantajakaasun virtausnopeus: 0,6 ml/min

— vedyn paine: 84 kPa

— ilmanpaine: 155 kPa

— jakosuhde: 10/1–50/1; jakosuhde on optimoitava valmistajan ohjeiden mukaisesti ja detektorin vasteen lineaarisuus on sitten validoitava kyseiselle pitoisuusalueelle.

Huomautus 5: On erityisen tärkeää, että injektorin tiiviste puhdistetaan säännöllisesti.

— Injektiotilavuus: 1 µl TMSE-liuosta.

Annetaan järjestelmän tasapainottua, kunnes saadaan riittävän stabiili vaste ennen minkään analyysin aloittamista.

Näitä olosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografin ominaisuuksien mukaan, jotta saadaan seuraavat edellytykset täyttävät kromatogrammit:

— sitosterolin piikin on erotuttava riittävästi lanosterolista. Kuviossa 1 esitetään tyypillisen kromatogrammi, jollainen on saatava erotustestiin käytetystä silyloidusta seoksesta (4.10),

— seuraavien steroleiden suhteellisten retentioaikojen olisi oltava suunnilleen:

kolesteroli: 1.0

stigmasteroli: 1.3

sitosteroli: 1.5

betuliini: 2.5,

— betuliinin retentioajan olisi oltava noin 24 minuuttia.

5.4.2 *Analyysin suoritus*

Injektoidaan 1 µl silyloitua standardiliuosta (stigmasterolia tai sitosterolia) ja säädetään integraattorin kalibrointiparametrit.

Injektoidaan uudelleen 1 µl silyloitua standardiliuosta vastekertoimen määrittämiseksi suhteessa betuliiniin.

Injektoidaan 1 µl silyloitua näyteliuosta ja mitataan piikkien pinta-ala. Standardit on ajettava aina ennen ja jälkeen näytesarjan.

Standardien injektointi pitäisi yleensä suorittaa kuuden näytteen sarjan jälkeen.

Huomautus 6: Stigmasterolipiikin integroinnin olisi käsitettävä kuviossa 2 b olevassa 1, 2 ja 3 kohdassa osoitettujen pisteiden välinen alue.

Arvioitaessa sitosterolia kokonaisuudessaan sitosterolipiikin integroinnin olisi sisällettävä 22-dihydro-β-sitosterolipiikin (stigmastanoli) pinta-ala, joka eluoituu välittömästi sitosterolin jälkeen (kuvio 3 b).

6. TULOSTEN LASKEMINEN

6.1 Määritetään sterolipiikin ja betuliinipiikin pinta-ala 2 standardeista jokaisen sarjan alussa ja lopussa ja lasketaan R_1:

R_1 = (standardin sterolipiikin keskipinta-ala)/(standardin betuliinipiikin keskipinta-ala)

Määritetään steroli- (stigmasteroli tai sitosteroli) ja betuliinipiikkien pinta-ala näytteestä ja lasketaan R_2:

R_2 = (näytteen sterolipiikin keskipinta-ala)/(näytteen betuliinipiikin keskipinta-ala)

W_1 = sterolin määrä (mg) 1 ml:ssa standardiliuosta (4.8.1 tai 4.9.1)

W_2 = näytteen paino (g) (5.2.1)

P = sterolistandardiliouksen puhtaus (4.8 tai 4.9)

Näytteen sterolipitoisuus (mg/kg) = $((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$

7. MENETELMÄN TARKKUUS

7.1 **Voi**

7.1.1 *Toistettavuus*

7.1.1.1 Stigmasteroli

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut mahdollisimman lyhyen ajan kuluessa samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 19,3 mg/kg.

7.1.1.2 Sitosteroli

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut mahdollisimman lyhyen ajan kuluessa samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 23,0 mg/kg.

7.1.2 *Uusittavuus*

7.1.2.1 Stigmasteroli

Kahden määritystuloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, välinen ero saa olla enintään 31,9 mg/kg.

7.1.2.2 Sitosteroli

Kahden määritystuloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 8,7 % suhteessa määritysten keskiarvoon.

7.1.3 *Tarkkuustietojen lähde*

Tarkkuutta koskevat tiedot määritettiin vuonna 1992 suoritetusta kokeesta, johon osallistui 8 laboratoriota ja jossa määritettiin kuusi näytettä (kolme rinnakkaista sokeanäytettä) stigmasterolista ja kuusi näytettä (kolme rinnakkaista sokeanäytettä) sitosterolista.

7.2 **Voiöljy**

7.2.1 *Toistettavuus*

7.2.1.1 Stigmasteroli

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut mahdollisimman lyhyen ajan kuluessa samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 10,2 mg/kg.

7.2.1.2 Sitosteroli

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut mahdollisimman lyhyen ajan kuluessa samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 3,6 % suhteessa määritysten keskiarvoon.

7.2.2 *Uusittavuus*

7.2.2.1 Stigmasteroli

Kahden määritystuloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, välinen ero saa olla enintään 25,3 mg/kg.

7.2.2.2 Sitosteroli

Kahden määritystuloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 8,9 % suhteessa määritysten keskiarvoon.

7.2.3 *Tarkkuustietojen lähde*

Tarkkuutta koskevat tiedot määritettiin vuonna 1991 suoritetusta kokeesta, johon osallistui yhdeksän laboratoriota ja jossa määritettiin kuusi näytettä (kolme rinnakkaista sokeanäytettä) stigmasterolista ja kuusi näytettä (kolme rinnakkaista sokeanäytettä) sitosterolista.

8. SALLITUT POIKKEAMAT

8.1 Merkitystä tuotteesta on otettava kolme näytettä sen tarkistamiseksi, että tuote on merkitty oikein.

8.2 **Voi**

8.2.1 *Stigmasteroli*

8.2.1.1 Stigmasterolia lisätään 150 g (puhtaus vähintään 95 %) voitonnia kohden eli 142,5 mg/kg tai 170 g (puhtaus vähintään 85 %) voitonnia kohden eli 144,5 mg/kg.

8.2.1.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 115,8 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 85 %).

Interpoloinnissa arvojen 115,8 mg/kg ja 80,1 mg/kg välillä tai arvojen 117,7 mg/kg ja 81,5 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

8.2.2 *Sitosteroli*

8.2.2.1 Sitosterolia lisätään 600 g (puhtaus vähintään 90 %) voitonnia kohden eli 540 mg/kg.

8.2.2.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 482,6 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun sitosterolin puhtaus on 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun sitosterolin puhtaus on 90 %).

Interpoloinnissa arvojen 482,6 mg/kg ja 347,6 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

8.3 **Voiöljy**

8.3.1 *Stigmasteroli*

8.3.1.1 Stigmasterolia lisätään 150 g (puhtaus vähintään 95 %) voiöljytonnia kohden eli 142,5 mg/kg tai 170 g (puhtaus vähintään 85 %) voiöljytonnia kohden eli 144,5 mg/kg.

8.3.1.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 118,5 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun stigmasterolin puhtaus on 85 %).

Interpoloinnissa arvojen 118,5 mg/kg ja 82,9 mg/kg välillä tai arvojen 120,4 mg/kg ja 84,3 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

8.3.2 *Sitosteroli*

8.3.2.1 Sitosterolia lisätään 600 g (puhtaus vähintään 90 %) voiöljytonnia kohden eli 540 mg/kg.

8.3.2.2 Tuoteanalyysin kolmesta näytteestä saatujen tulosten avulla tarkistetaan lisättyjen merkkiaineiden määrä ja homogeenisuus. Pienintä näistä arvoista verrataan seuraaviin raja-arvoihin:

— 480,9 mg/kg (95 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun sitosterolin puhtaus on 90 %),

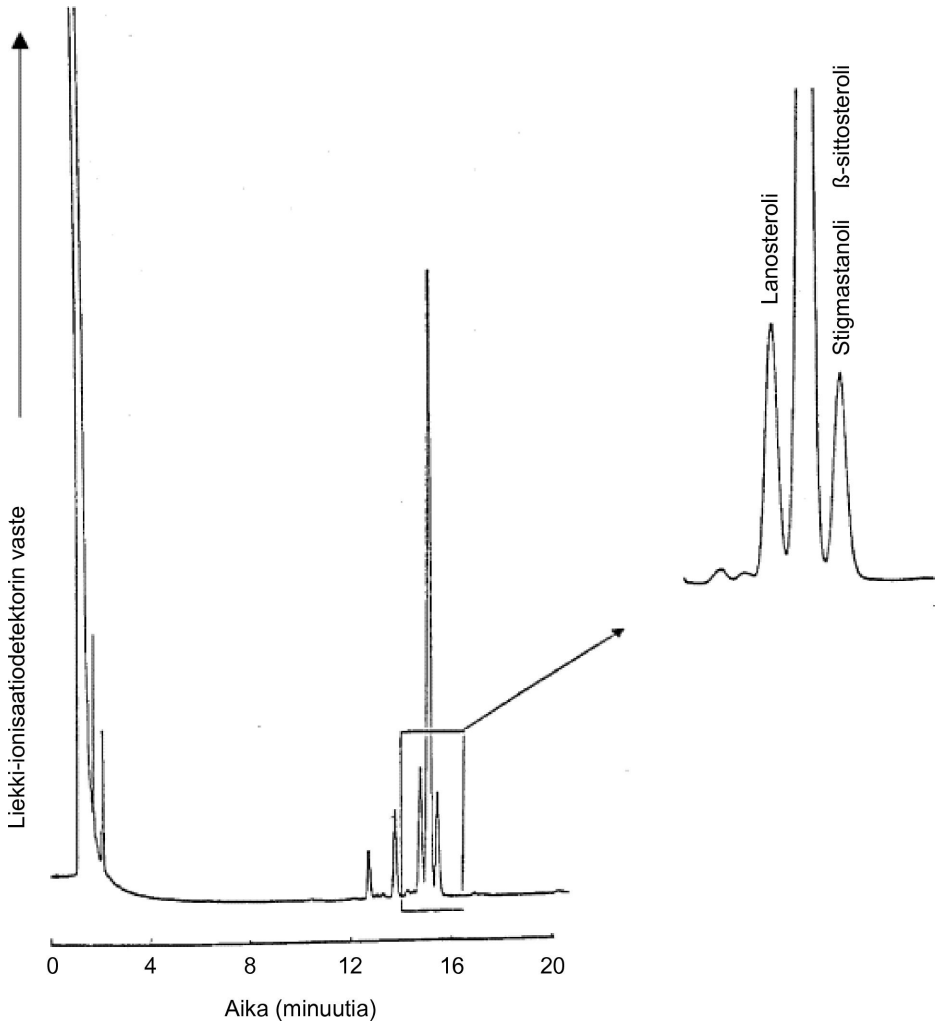
— 345,9 mg/kg (70 % pienimmästä lisättävästä määrästä, kun sitosterolin puhtaus on 90 %).

Interpoloinnissa arvojen 480,9 mg/kg ja 345,9 mg/kg välillä käytetään alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta.

Kuva 1

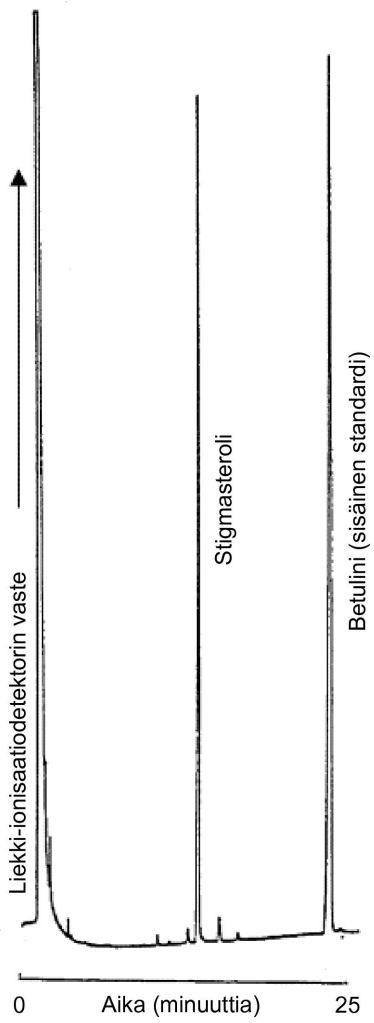
Erotuskyvyn testaamiseen tarkoitetun seoksen kromatogrammi

Täydellinen erottuminen on suotavav eli lanosterolipiikin jäljen on palattava perusviivalla ennen uudelleen nousua sitosterolipiikiksi, vaikka epätäydellinen erottuminen olisi hyväksyttävissä.



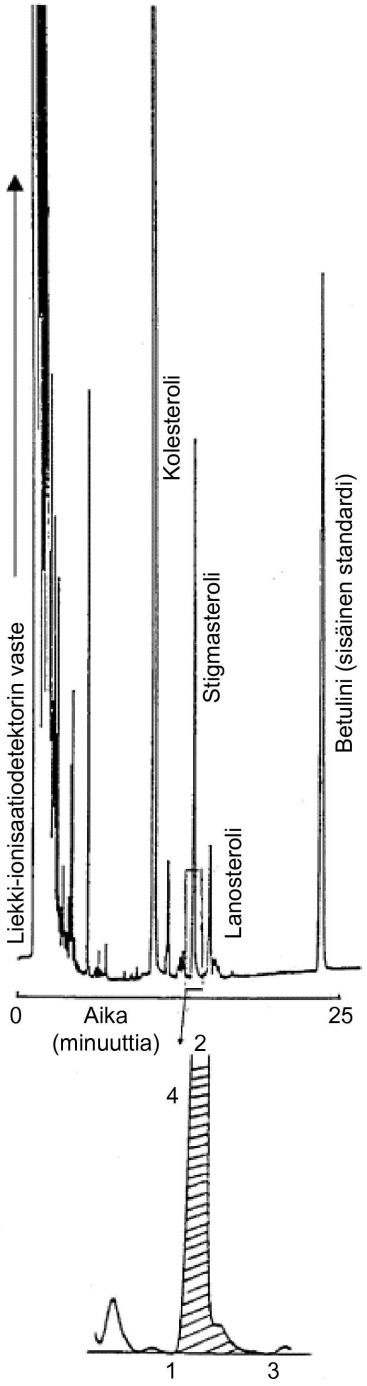
Kuva 2a

Stigmasteroli standardi



Kuva 2b

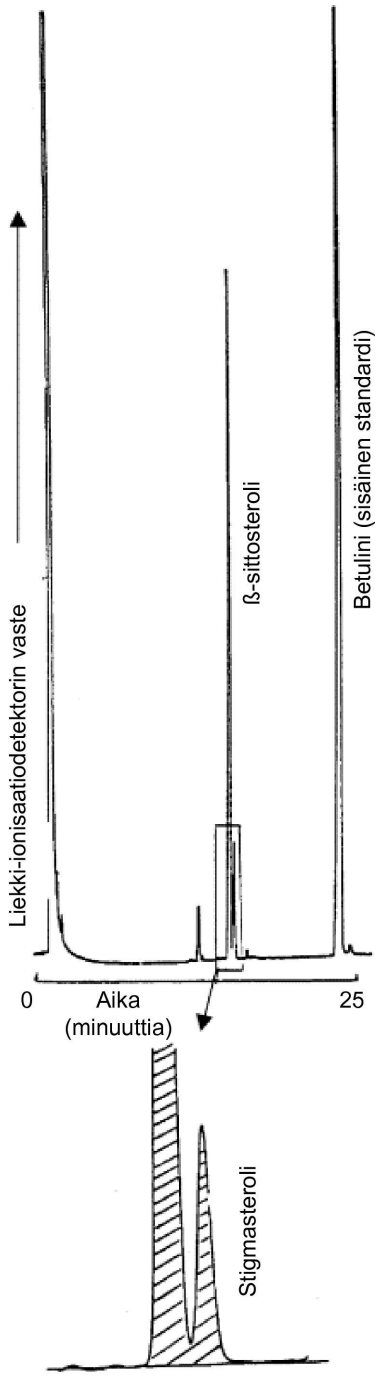
Stigmasterolilla denaturoitu voinäyte



Huomautus: Stigmasterolipiikin integroinnissa otettava mukaan pisteiden 1, 2 ja 3 väliset alueet.

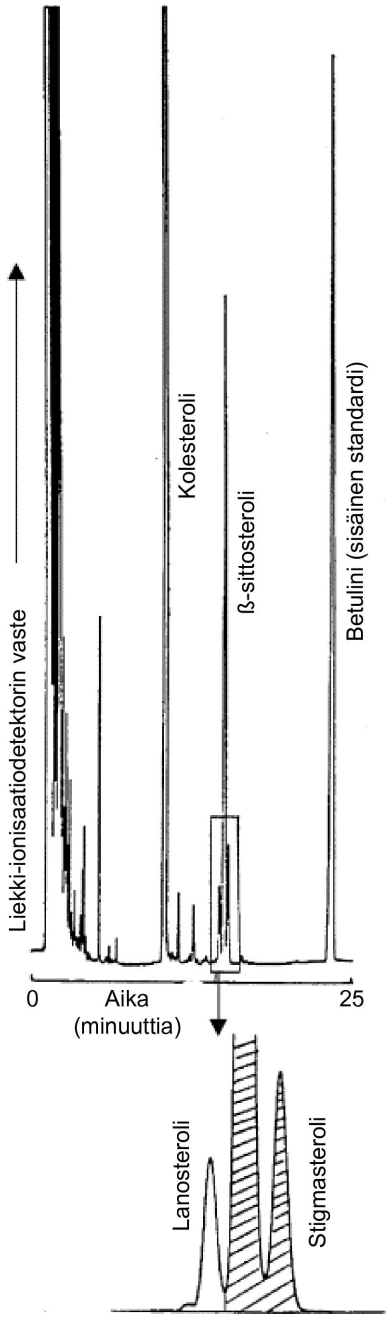
Kuva 3a

Stigmasteroli standardi



Kuva 3b

Stigmasterolilla denaturoitu voinäyte



Huomautus: ß-sitosterolissa on usein epäpuhtautena stigmastanolia, joka eluoituu välittömästi ß-sitosterolin jälkeen. Näiden kahden piikin pinta-alat on laskettava yhteen, kun ß-sitosterolia arvioidaan kokonaisuudessaan.

LIITE IX

(6 artikla)

VERTAILUMENETELMÄ LEHMÄNMAIDON JA KASEINAATIN OSOITTAMISEKSI UUHEN-, VUOHEN- TAI PUHVELINMAIDOSTA TAI UUHEN-, VUOHEN- JA PUHVELINMAIDON SEOKSISTA VALMISTETUISSA JUUSTOISSA

1. SOVELTAMISALA

Lehmänmaidon ja kaseinaatin osoittaminen uuhen-, vuohen- tai puhvelinmaidosta tai uuhen-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksista valmistetuissa juustoissa plasminolyysissä muodostuvien γ-kaseiinien isoelektrisellä fokusoinnilla.

2. SOVELTAMISALA

Menetelmä sopii käsittelemättömän ja lämpökäsitellyn lehmänmaidon ja kaseinaatin osoittamiseen hyvällä herkkyydellä ja spesifistisesti uuhen-, vuohen- tai puhvelinmaidosta tai uuhen-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksista valmistetuissa tuoreissa ja kypsytetyissä juustoissa. Se ei sovellu niiden osoittamiseen, jos maito tai juusto on väärennetty lämpökäsitellyillä naudan heraproteiinikonsentraateilla.

3. MENETELMÄN PERIAATE

3.1 Kaseiinien eristäminen juustosta ja vertailustandardeista.

3.2 Eristettyjen kaseiinien liuottaminen ja pilkkominen plasmiinilla (EC.3.4.21.7).

3.3 Plasmiinilla käsiteltyjen kaseiinien isoelektrinen fokusointi urean läsnäollessa ja proteiinien värjäys.

3.4 Värjättyjen γ_3- ja γ_2-kaseiinikuvioiden (näyttö lehmänmaidosta) arviointi vertaamalla näytteestä saatua kuviota kuvioihin, jotka on saatu samassa geelissä 0 % ja 1 % lehmänmaitoa sisältävistä vertailustandardeista.

4. REAGENSSIT

On käytettävä analyysilaatuisia kemikaaleja, ellei toisin mainita. Veden on oltava kahdesti tislattua tai puhtaudeltaan sitä vastaavaa.

Huomautus: Seuraavia yksityiskohtaisia ohjeita sovelletaan laboratoriossa valmistettuihin ureaa sisältäviin polyakryyliamidigeeleihin, joiden mitat ovat 265 × 125 × 0,25 mm. Jos käytetään muunkokoisia ja -tyyppisiä geelejä, erotusolosuhteita voidaan joutua säätämään.

Isoelektrinen fokusointi

4.1 **Reagenssit ureaa sisältävien polyakryyliamidigeelien valmistamiseksi**

4.1.1 *Geelin kantaliuos*

Liuotetaan

4,85 g akryyliamidia

0,15 g N, N'-metyleeni-bis-akryyliamidia (BIS)

48,05 g ureaa

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

veteen ja täytetään 100 ml:aan, säilytetään ruskeassa lasipullossa jääkaapissa.

Huomautus: Painoltaan määrättyjen hermomyrkyllisten akryyliamidien sijasta voi käyttää myös kaupallisesti saatavaa esisekoitettua akryyliamidi/BIS-liuosta. Liuosta, jossa on 30 % w/v akryyliamidia ja 0,8 % w/v BIS:ä, käytetään 16,2 ml. Varastoliuoksen säilyvyys on enintään 10 päivää; jos sen johtokyky on suurempi kuin 5 µS, on suoritettava ioninpoisto sekoittamalla sitä 2 g:n Amberlite MB-3 kanssa 30 minuutin ajan ja sitten suodatettava 0,45 µm:n kalvon läpi.

4.1.2 *Geeliliuos*

Valmistetaan geeliliuos sekoittamalla varastoliuokseen lisäaineita ja amfolyyttejä (ks. 4.1.1).

9,0 ml varastoliuosta
24 mg de β-alaniinia
500 µl amfolyyttiä, pH 3,5–9,5 (1)
250 µl amfolyyttiä, pH 5–7 (1)
250 µl amfolyyttiä, pH 6–8 (1).

Geeliliuosta sekoitetaan ja poistetaan ilmaa 2–3 minuutin ajan ultraäänihauteessa tai tyhjiössä.

Huomautus: Geeliliuos valmistetaan välittömästi ennen sen kaatamista (ks. 6.2).

4.1.3 *Katalyyttiliuokset*

4.1.3.1 N, N, N', N'-tetrametyylietyleenidiamiini (TEMED)

4.1.3.2 40 % w/v ammoniumpersulfaatti (PER):

Liuotetaan 800 mg PER:ää veteen ja täytetään 2 ml:aan.

Huomautus: Aina on käytettävä juuri valmistettua PER-liuosta.

4.2 **Kontaktineste**

Petroli tai parafiiniöljy.

4.3 **Anodiliuos**

Liuotetaan 5,77 g fosforihappoa (85 % w/w) veteen ja laimennetaan 100 ml:ksi.

4.4 **Katodiliuos**

Liuotetaan 2,00 g natriumhydroksia veteen ja laimennetaan 100 ml:ksi vedellä.

Näytteen valmistus

4.5 **Reagenssit proteiinien eristämiseksi**

4.5.1 *Laimea etikkahappo (25,0 ml jääetikkaa täytetään 100 ml:aan vedellä)*

4.5.2 *Dikloorimetaani*

4.5.3 *Asetoni*

4.6 **Proteiinia liuottava puskuriliuos**

Liuotetaan

5,75 g glyserolia (87 % w/w)
24,03 g ureaa
250 mg ditiotreitolia

veteen ja täytetään 50 ml:aan.

Huomautus: Säilytetään jääkaapissa, säilyvyys enintään 1 viikko.

4.7 **Reagenssit kaseiinien pilkkomiseksi plasmiinilla**

4.7.1 *Ammoniumkarbonaattipuskuri*

Titrataan 0,2 mol/l ammoniumvetykarbonaattiliuos (1,58 g/100 ml vettä), joka sisältää 0,05 mol/l etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA, 1,46 g/100 ml vettä), 0,2 mol/l ammoniumkarbonaattiliuoksella (1,92 g/100 ml vettä), joka sisältää 0,05 mol/l EDTA:a, siten että pH:ksi saadaan 8.

(1) Valmisteet Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) ja Resolyte® pH 5–7 ja pH 6–8 (BHD, Merck) ovat osoittautuneet erityisen sopiviksi γ-kaseiinien erottamiseksi.

4.7.2 *Naudan plasmiini (E.C.3.4.21.7), aktiivisuus vähintään 5 U/ml*

4.7.3 *ε-Aminokapronihappoliuos entsyymi-inhibitiota varten*

Liuotetaan 2,624 g ε-aminokapronihappoa (6-amino-n-heksaanihappoa) 100 ml:aan 40 % (v/v) etanolia.

4.8 **Standardit**

4.8.1 *Varmennettuja vertailustandardeja juoksetetusta rasvattomasta uuhenmaidon ja vuohenmaidon seoksesta, joka sisältää 0 % ja 1 % lehmänmaitoa, on saatavana vertailumateriaalien ja -mittausten tutkimuslaitoksesta (IRMM), B-2440 Geel, Belgia.*

4.8.2 *Laboratorion omien standardien valmistaminen puhvelin juoksutetusta maidosta, joka sisältää 0 % ja 1 % lehmänmaitoa.*

Rasvaton maito valmistetaan sentrifugoimalla joko puhvelin tai naudan käsittelemätöntä irtomaitoa 37 °C:ssa, 2 500 g 20 minuutin ajan. Kun koeputki ja sen sisältö on jäähdytetty nopeasti lämpötilaan 6–8 °C, poistetaan ylempi rasvakerros kokonaan. 1 % standardin valmistamiseksi lisätään 5,00 ml naudan rasvatonta maitoa 495 ml:aan puhvelin rasvatonta maitoa 1 l:n dekantterilasissa, säädetään pH:n arvoksi 6,4 laimeaa maitohappoa (10 % w/v) lisäämällä. Säädetään lämpötila 35 °C:seen ja lisätään 100 µl vasikanjuoksetetta (juoksetteen aktiivisuus 1:10 000, n. 3 000 U/ml), sekoitetaan 1 minuutin ajan ja sen jälkeen dekantterilasi jätetään seisomaan alumiinifoliolla päällystettynä 35 °C:seen yhdeksi tunniksi juustomassan muodostamiseksi. Kun juustomassa on muodostunut, juoksettunut maito kylmäkuivataan kokonaisuudessaan ilman enempää homogenointia tai heran valuttamista. Kylmäkuivauksen jälkeen se jauhetaan hienoksi homogeenisen jauheen saamiseksi. 0 % standardin valmistamiseksi suoritetaan sama menettely aitoa rasvatonta puhvelinmaitoa käyttäen. Standardeja on säilytettävä lämpötilassa – 20 °C.

Huomautus: On suositeltavaa tarkistaa puhvelinmaidon puhtaus plasmiini-käsiteltyjen kaseiinien isoelektrisellä fokusoinnilla ennen standardien valmistamista.

Reagenssit proteiinien värjäykseen

4.9 **Kiinnitysaine**

Liuotetaan 150 g trikloorietikkahappoa veteen ja täytetään 1 000 ml:aan.

4.10 **Värinpoistoliuos**

Laimennetaan 500 ml metanolia ja 200 ml jääetikkaa 2 000 ml:ksi tislatulla vedellä.

Huomautus: Joka päivä on valmistettava tuoreeksi värinpoistoliuos; se voidaan valmistaa sekoittamalla yhtä suuret tilavuudet varastoliuoksia, 50 % (v/v) metanolia ja 20 % (v/v) jääetikkaa.

4.11 **Värjäysliuokset**

4.11.1 *Värjäysliuos (kantaliuos 1)*

Liuotetaan 3,0 g Coomassie-briljanttisinistä G 250 (C.I. 42655) 1 000 ml:aan 90 % (v/v) metanolia magneettisekoittajaa käyttäen (n. 45 minuuttia), suodatetaan kahden keskinopean taitetun suodatinpaperin läpi.

4.11.2 *Värjäysliuos (kantaliuos 2)*

Liuotetaan 5,0 g kuparisulfaattipentahydraattia 1 000 ml:aan 20 % (v/v) etikkahappoa.

4.11.3 *Värjäysliuos (työskentelyliuos)*

Sekoitetaan yhteen 125 ml kumpaakin varastoliuosta (4.11.1, 4.11.2) välittömästi ennen värjäystä.

Huomautus: Värjäysliuos tulisi valmistaa sinä päivänä, jolloin sitä käytetään.

5. LAITTEET JA TARVIKKEET

5.1 lasilevyjä (265 × 125 × 4 mm); kumitela (leveys 15 cm); vaakatasopöytä

5.2 kantaja-arkki geelille (265 × 125 mm)

5.3 peitearkki (280 × 125 mm). Kiinnitetään teippinauha (280 × 6 × 0,25 mm) kummallekin pitkälle sivulle (ks. kuva 1).

5.4 elektrofokusointikammio, jossa on jäähdytyslevy (esim. 265 × 125 mm) ja sopiva virtalähde (≥ 2,5 kV) tai automaattinen elektroforeesilaite.

5.5 kiertokryostaatti, säädetty termostaatilla lämpötilaan 12 ± 0,5 °C

5.6 sentrifugi, säädettävissä nopeuteen 3 000 g

5.7 elektrodiliuskat (pituus ≥ 265 mm)

5.8 muovisia tippapulloja anodi- ja katodiliuoksille

5.9 näyteapplikaattoreita (10 × 5 mm, viskoosia tai suodatinpaperia, joka ei absorboi proteiineja)

5.10 ruostumatonta terästä olevia saksia, leikkausveitsiä ja pinsettejä

5.11 ruostumatonta terästä olevia tai lasisia värjäys- ja värinpoistoastioita (esim. 280 × 150 mm instrumenttitarjottimia)

5.12 säädettävissä oleva sauvahomogenisaattori (varren halkaisija 10 mm), rpm alueella 8 000–20 000

5.13 magneettisekoitin

5.14 ultraäänihaude

5.15 kalvojen saumaukseen sopiva laite

5.16 mikropipettejä, 25 µl

5.17 tyhjiöhaihdutin tai kylmäkuivain

5.18 vesihaude, joka on termostaatilla säädeltävissä lämpötiloihin 35 ja 40 ± 1 °C, ravistelijalla varustettuna

5.19 tiheysmittari, luettavissa aallonpituudella λ = 634 nm

6. SUORITUS

6.1 **Näytteen valmistus**

6.1.1 *Kaseiinien eristäminen*

Punnitaan 5:ttä g:aa juuston kuiva-ainetta vastaava määrä näytettä tai vertailustandardeja 100 ml:n sentrifugiputkeen, lisätään 60 ml tislattua vettä ja homogenoidaan sauvahomogenisaattorilla (8 000–10 000 rpm). Säädetään pH-arvoon 4,6 laimealla etikkahapolla (4.5.1) ja sentrifugoidaan (5 min., 3 000 g). Dekantoidaan rasva ja hera, homogenoidaan jäännös kierrosnopeudella 20 000 rpm 40 ml:n kanssa tislattua vettä, jonka pH on säädetty arvoon 4,5 laimealla etikkahapolla (4.5.1), lisätään 20 ml dikloorimetaania (4.5.2), homogenoidaan jälleen ja sentrifugoidaan (5 min., 3 000 g). Poistetaan lastalla kaseiinikerros, joka kelluu vesifaasin ja orgaanisen faasin välissä (ks. kuva 2) ja dekantoidaan molemmat faasit pois. Homogenoidaan kaseiini uudelleen 40 ml:n tislattua vettä (ks. edellä) ja 20 ml:n dikloorimetaania (4.5.2) kanssa ja sentrifugoidaan. Toistetaan menettely, kunnes molemmat uuttofaasit ovat värittömiä (2–3 kertaa). Homogenoidaaan proteiinijäännös 50 ml:lla asetonia (4.5.3) ja suodatetaan keskinopean taitetun suodatinpaperin läpi. Pestään suodatinpaperille jäävä jäännös kahdesti kahdella erillisellä 25 ml:n annoksella asetonia ja annetaan kuivua ilmassa tai typpivirrassa; tämän jälkeen jauhetaan hienoksi huhmareessa.

Huomautus: Eristetyt kuivat kaseiinit on säilytettävä lämpötilassa – 20 °C.

6.1.2 *β-kaseiinien pilkkominen plasmiinilla γ-kaseiinin määrityksen helpottamiseksi*

Dispergoidaan 25 mg eristettyjä kaseiineja (6.1.1) 0,5 ml:aan ammoniumkarbonaattipuskuria (4.7.1) ja homogenoidaan 20 minuutin ajan esim. ultraäänellä. Kuumennetaan lämpötilaan 40 °C ja lisätään 10 µl plasmiinia (4.7.2), sekoitetaan ja inkuboidaan tunnin ajan 40 °C:ssa jatkuvasti ravistellen. Entsyymin inhiboimiseksi lisätään 20 µl ε-kapronihappoliuosta (4.7.3), tämän jälkeen lisätään 200 mg kiinteää ureaa ja 2 mg ditiotreitolia.

Huomautus: Symmetrisempien kaseiinijuovien saamiseksi fokusoinnissa on suositeltavaa kylmäkuivata liuos ε-kapronihappoliuoksen lisäämisen jälkeen ja liuottaa sitten jäännökset 0,5 ml:aan proteiinia liuottavaan puskuriin (4.6).

6.2 **Ureaa sisältävien polyakryyliamidigeelien valmistus**

Muutaman vesipisaran avulla levitetään geelin kantaja-arkki (5.2) lasilevyn (5.1) päälle ja kuivataan kaikki ylimääräinen vesi paperipyyhkeellä. Samoin levitetään peitearkki (5.3), jossa on välikkeet (0,25 mm), toisen lasilevyn päälle. Asetetaan levy vaakasuoraan vaakatasopöydälle.

Lisätään 10 µl TEMED:tä (4.1.3.1) valmistettuun ilmattomaan geeliliuokseen (4.1.2), sekoitetaan ja lisätään 10 µl PER-liuosta (4.1.3.2), sekoitetaan huolellisesti ja kaadetaan välittömästi tasaisesti peitearkin keskikohtaan. Asetetaan geelin kantajalevyn yksi reuna (arkkipuoli alaspäin) peitearkin päälle ja lasketaan sitä hitaasti niin, että geelikerros muodostuu arkkien väliin ja leviää tasaisesti ja ilman kuplien muodostumista (kuva 3). Lasketaan varovasti geelin kantajalevy kokonaan alas ohutta lastaa käyttäen ja asetetaan vielä kolme lasilevyä sen päälle painoksi. Kun polymeroituminen on tapahtunut (noin 60 min), poistetaan geelin kantaja-arkille polymeroitunut geeli yhdessä peitearkin kanssa lasilevyjä koputellen. Puhdistetaan kantaja-arkin kääntöpuolelta huolellisesti geelijäännökset ja urea. Saumataan geeli-sandwich kalvoon ja säilytetään jääkaapissa (enintään 6 viikkoa).

Huomautus: Välikkeellistä peitearkkia voidaan käyttää uudelleen. Polyakryyliamidigeeli voidaan leikata pienempiin osiin, mitä suositellaan, kun näytteitä on ainoastaan muutama tai jos käytetään automaattista elektroforeesilaitetta (2 geeliä, koko 4,5 × 5 cm).

6.3 **Isoelektrinen fokusointi**

Säädetään jäähdyttävä termostaatti 12 °C:seen. Pyyhkäistään geelin kantaja-arkin kääntöpuoli petrolilla, tipautetaan sitten muutama pisara petrolia (4.2) jäähdytyslohkon keskelle. Sen jälkeen geeli-sandwich levitetään kantajapuoli alaspäin lohkon päälle siten, ettei muodostu kuplia. Pyyhkäistään ylimääräinen petroli pois ja poistetaan peitearkki. Imeytetään elektrodiliuskoihin elektrodiliuoksia (4.3, 4.4), leikataan geelin pituisiksi ja asetetaan asianmukaisille paikoille (elektrodien etäisyys 9,5 cm).

Isoelektrisen fokusoinnin olosuhteet:

6.3.1 *Geelikoko 265 × 125 × 0,25 mm*

Vaihe	Aika (min.)	Jännite (V)	Sähkövirta (mA)	Teho (W)	Volttituntia (Vh)
1. Esifokusointi	30	enint. 2 500	enint. 15	vak. 4	n. 300
2. Näytteen fokusointi (1)	60	enint. 2 500	enint. 15	vak. 4	n. 1 000
3. Lopullinen fokusointi	60	enint. 2 500	enint. 5	enint. 20	n. 3 000
	40	enint. 2 500	enint. 6	enint. 20	n. 3 000
	30	enint. 2 500	enint. 7	enint. 25	n. 3 000

(1) Näytteiden lisääminen: Esifokusoinnin jälkeen (vaihe 1) pipetoidaan 18 µl näytettä ja standardiliuoksia näyteaplikaattoreille (10 × 5 mm), asetetaan ne geelin päälle 1 mm:n etäisyydellä toisistaan ja 5 mm:n päähän pituussuunnassa anodista ja painetaan niitä kevyesti. Fokusoidaan edellä annettuja olosuhteita noudattaen, ja näyteapplikaattorit poistetaan varovasti, kun näytettä on fokusoitu 60 minuuttia.

Huomautus: Jos geelien paksuutta tai leveyttä muutetaan, sähkövirran ja tehon arvoja on säädettävä sopivasti (esim. sähkövirran ja tehon arvot on kaksinkertaistettava, jos käytetään 265 mm × 125 mm × 0,5 mm geeliä).

6.3.2 *Esimerkki automaattisen elektroforeesilaitteen jänniteohjelmasta (2 kooltaan 5,0 × 4,5 cm geeliä); elektrodit asetetaan suoraan geeliin ilman liuskoja.*

Vaihe	Jännite	Sähkövirta	Teho	Lämpötila	Volttituntia
1. Esifokusointi	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Näytteen fokusointi	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusointi	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusointi	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Asetetaan näyteapplikaattori vaiheessa 2, kun volttitunnit ovat 0 Vh.

Poistetaan näyteapplikaattori vaiheessa 2, kun volttitunnit ovat 30 Vh.

6.4 **Proteiinien värjäys**

6.4.1 *Proteiinien kiinnitys*

Poistetaan elektrodinauhat välittömästi voimanlähteen sammuttamisen jälkeen ja asetetaan geeli välittömästi värjäys/värinpoistoastiaan, joka on täytetty 200 ml:lla kiinnitysainetta (4.9); jätetään 15 minuutiksi, jatkuvasti ravistellen.

6.4.2 *Geelilevyn pesu ja värjäys*

Valutetaan kiinnitysaine huolellisesti pois ja pestään geelilevy kahdesti, 30 sekuntia kummallakin kerralla, 100 ml:lla värinpoistoliuosta (4.10). Kaadetaan värinpoistoliuos pois ja täytetään astia 250 ml:lla värjäysliuosta (4.11.3); annetaan värjäytyä 45 minuuttia kevyesti ravistellen.

6.4.3 *Geelilevyn värinpoisto*

Kaadetaan värjäysliuos pois, pestään geelilevy kahdesti käyttäen 100 ml värinpoistoliuosta (4.10) kummallakin kerralla, ravistellaan sitten 15 minuutin ajan 200 ml:ssa värinpoistoliuosta ja toistetaan värinpoistovaihe vähintään 2 tai 3 kertaa, kunnes tausta on kirkas ja väritön. Huuhdellaan geelilevy sen jälkeen tislatulla vedellä (2 × 2 min.) ja kuivataan ilmassa (2–3 tuntia) tai hiustenkuivaajalla (10–15 min.).

Huomautus 1: Kiinnitys, pesu, värjäys ja värinpoisto on tehtävä 20 °C:ssa. Korkeampia lämpötiloja ei saa käyttää.

Huomautus 2: Jos herkempää hopeavärjäystä (esim. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code N:o 17–1150–01) pidetään parempana, plasmiinilla käsitellyt kaseiininäytteet on laimennettava 5 mg/ml:ksi.

7. ARVIOINTI

Arviointi suoritetaan vertaamalla tuntemattoman näytteen proteiinikuviota vertailustandardeihin samassa geelissä. Lehmänmaidon toteaminen uuhen-, vuohen- ja puhvelinmaidosta sekä uuhen-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksesta valmistetuissa juustoissa tapahtuu γ_2- ja γ_3-kaseiinien välityksellä, joiden isoelektriset pisteet vaihtelevat välillä pH 6,5–7,5 (kuvat 4 a ja 4 b, kuva 5). Toteamisraja on alle 0,5 %.

7.1 **Silmämääräinen arviointi**

Naudanmaidon määrän arvioimiseksi silmämääräisesti on suositeltavaa säätää näytteiden ja standardien pitoisuudet samantasoisten väri-intensiteettien saamiseksi lampaan, vuohen ja/tai puhvelin γ_2- ja γ_3-kaseiineille (ks. "γ_2 E, G, B" ja "γ_3 E, G, B" kuvissa 4 a ja 4 b ja kuvassa 5). Naudanmaidon määrä (vähemmän kuin, yhtä paljon kuin tai enemmän kuin 1 %) tuntemattomassa näytteessä voidaan todeta suoraan vertaamalla naudan γ_3- ja γ_2-kaseiinien isoelektrisessä fokusoinnissa saadun värin intensiteettiä (ks. "γ_3 C" ja "γ_2 C" kuvissa 4 a, 4 b ja 5) vastaaviin 0 %:n ja 1 %:n vertailustandardeihin (uuhi, vuohi) tai laboratoriostandardeihin (puhveli).

7.2 **Tiheysmittaukseen perustuva arviointi**

Jos mahdollista, käytetään tiheysmittaria (5.19) naudan γ_2- ja γ_3-kaseiinien piikkien pinta-alojen määrittämiseksi suhteessa lampaan, vuohen ja/tai puhvelin vastaaviin (ks. kuva 5). Tätä arvoa verrataan 1 %:n vertailustandardin (uuhi, vuohi) tai laboratorion standardin (puhveli) γ_2- ja γ_3-kaseiinipiikkien pinta-alan suhteeseen, kun analysointi on suoritettu samassa geelissä.

Huomautus: Menetelmä toimii tyydyttävästi, jos 1 %:n vertailustandardissa esiintyy selvä positiivinen merkki sekä naudan γ_2- että γ_3-kaseiineista, muttei merkkejä 0 %:n vertailustandardeissa. Jos näin ei ole, menettelyä on parannettava noudattamalla täsmällisesti menetelmän yksityiskohtia.

Näyte todetaan positiiviseksi, jos naudan sekä γ_2- että γ_3-kaseiinien tai vastaavien piikkien pinta-alojen suhteet ovat yhtä suuret tai suuremmat kuin 1 %:n vertailustandardin taso.

8. VIITTEET

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

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

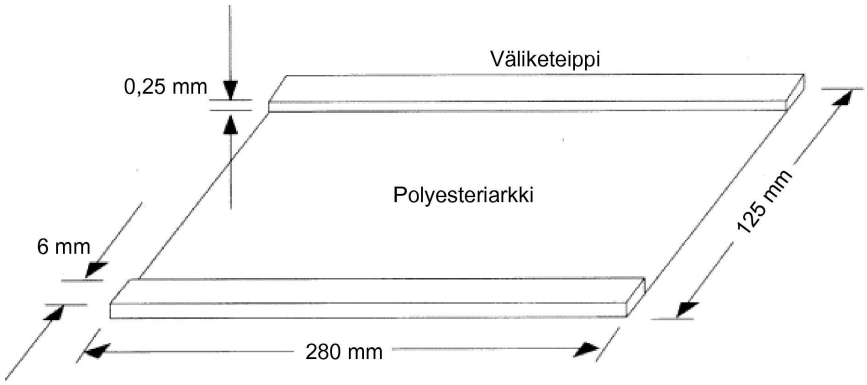
3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. in: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389–393,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

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

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

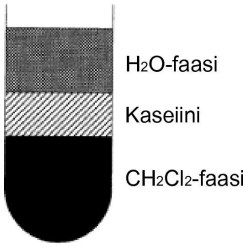
Kuva 1

Kuva peitearkista



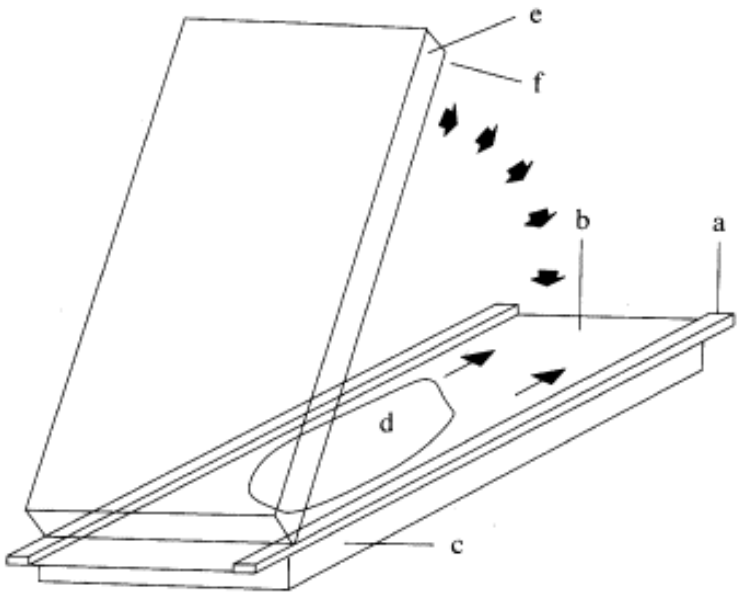
Kuva 2

Vesifaasin ja orgaanisen faasin välissä kelluva kaseiinikerros sentrifugoinnin jälkeen



Kuva 3

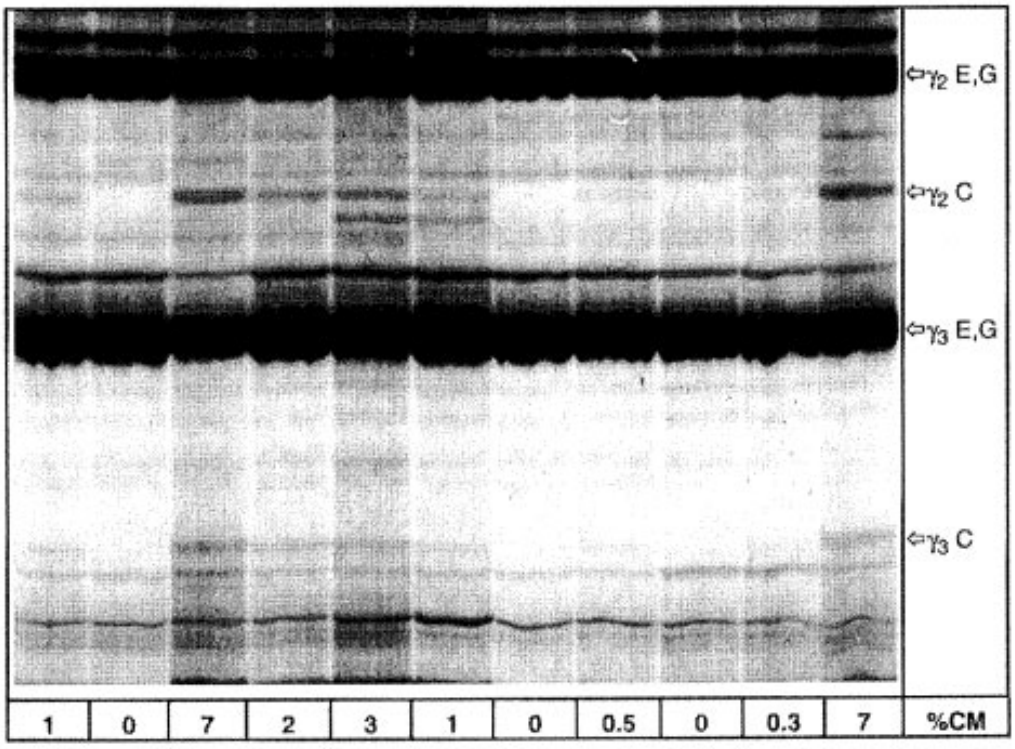
Sulkemistekniikka erittäin ohuiden polyakryyliamidigeelien valmistamiseksi



a = väliketeippi (0,25 mm); b = peitearkki (5.3); c, e = lasilevyt (5.1); d = geeliliuos (4.1.2); f = geelin kantaja-arkki (5.2)

Kuva 4 a

Uuhen- ja vuohenmaidosta valmistetun, eri määriä lehmänmaitoa sisältävän juuston plasmiinilla käsiteltyjen kaseiinien isoelektrinen fokusointi

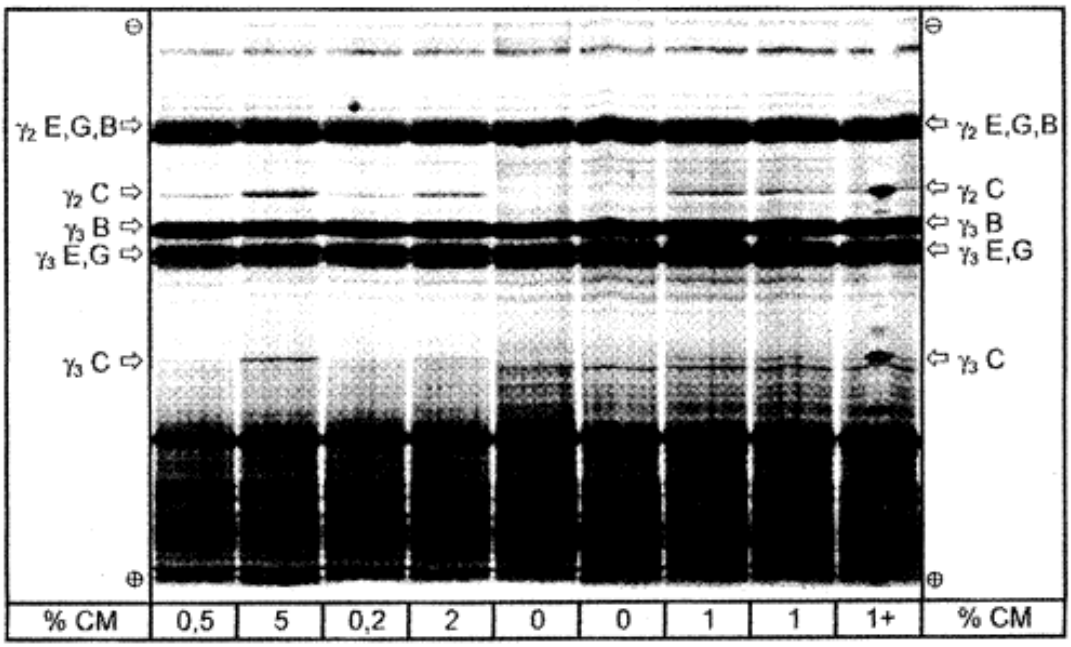


% CM = lehmänmaidon prosenttiosuus, C = lehmä, E = uuhi, G = vuohi.

Kuvassa on esitetty IEF-geelin ylempi puolisko.

Kuva 4 b

Uuhen-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksista valmistetun, eri määriä lehmänmaitoa sisältävän juuston plasmiinilla käsiteltyjen kaseiinien isoelektrinen fokusointi

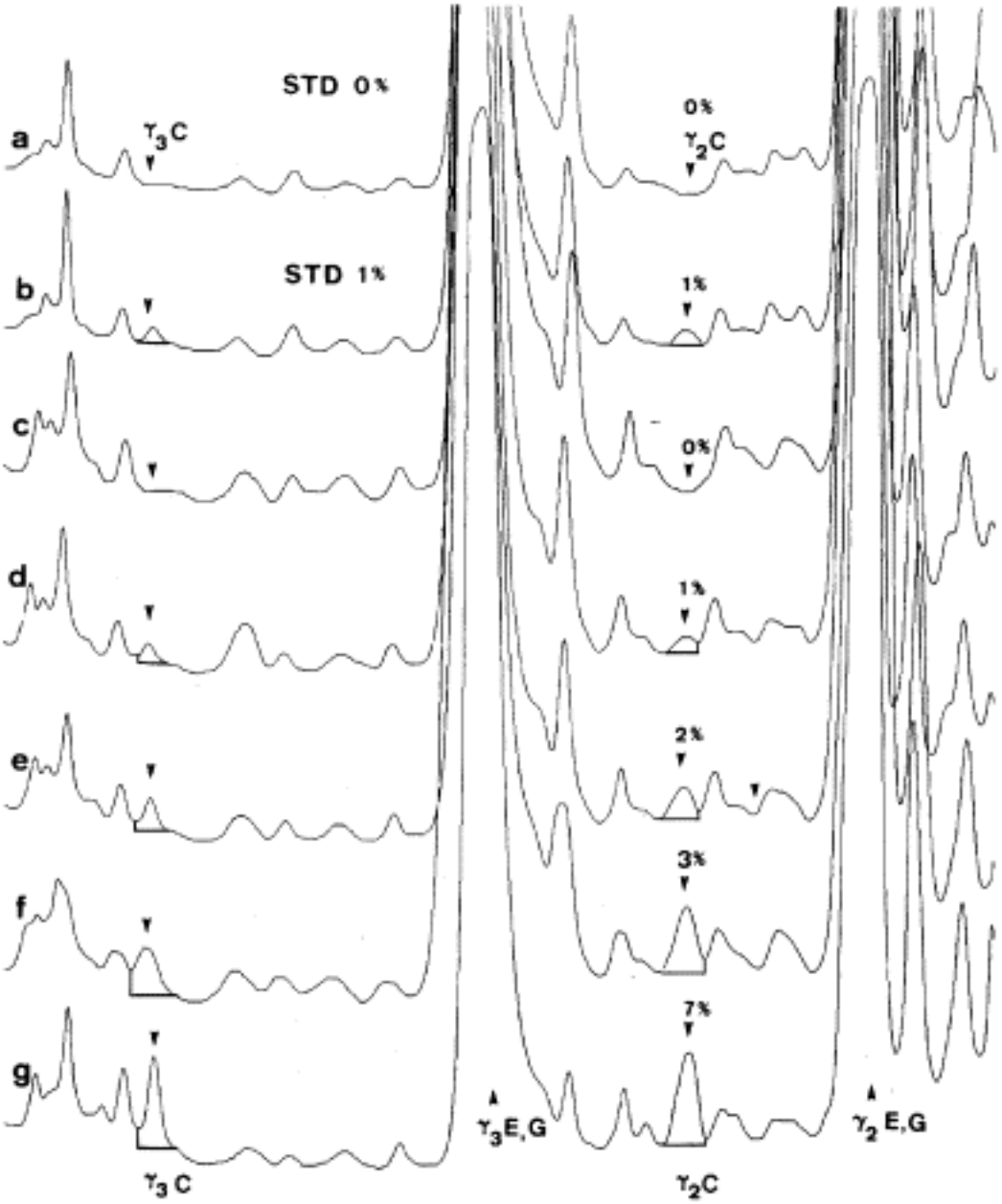


% CM = lehmänmaidon prosenttiosuus; 1 + = näyte, joka sisältää 1 % lehmänmaitoa ja johon on lisätty puhdasta naudan kaseiinia aplikoidun elektroforeesinäytteen keskikohdalle. C = lehmä, E = uuhi; G = vuohi, B = puhveli.

Kuvassa on esitetty IEF-geelin koko erotusetäisyys.

Kuva 5

Standardin (STD) sekä uuhen- ja vuohenmaidon seoksesta valmistetun juuston näytteiden densitogrammit päällekkäin asetettuna isoelektrisen fokusoinnin jälkeen.



a, b = standardit, jotka sisältävät 0 ja 1 % lehmänmaitoa; c–g = juustonäytteet, jotka sisältävät 0, 1, 2, 3 ja 7 % lehmänmaitoa. C = lehmä, E = uuhi, G = vuohi.

Ylempi puolisko IEF-geelistä tutkittiin aallonpituudella λ = 634 nm.

LIITE X

(7 artikla)

VERTAILUMENETELMÄ KOLIFORMIEN OSOITTAMISEKSI VOISSA, RASVATTOMASSA MAITOJAUHEESSA, KASEIINISSA JA KASEINAATEISSA

1. NÄYTTEIDEN VALMISTELU

   ISO-standardi 8261

2. SUORITUS

   ISO-standardi 4831

   Näytteet, jotka vastaavat 1 g:aa voita tai 0,1 g:aa rasvatonta maitojauhetta tai kaseiinia/kaseinaatteja, inokuloidaan kasvatusväliaineeseen.

   Näytettä pannaan kolmeen putkeen.

3. TULOKSET

   Jos kolme putkea antaa kolme negatiivista tulosta, tulos on ”vaatimustenmukainen”.

   Jos kolme putkea antaa kaksi tai kolme positiivista tulosta, tulos on ”vaatimustenvastainen”.

   Jos kolme putkea antaa kaksi negatiivista tulosta, analyysi on tehtävä kahdesti uudelleen (kahdella putkella).

   — Jos nämä kaksi tulosta ovat negatiivisia, tulos on ”vaatimustenmukainen”.

   — Jos yksikin tulos on positiivinen, tulos on ”vaatimustenvastainen”.

LIITE XI

(8 artikla)

LAKTOOSIPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN REHUSEOKSISSA

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Laktoosipitoisuuden määrittäminen rehuseoksissa

2. VIITE

Laktoosipitoisuus ilmoitetaan massaprosentteina ja määritetään tässä esitetyllä menetelmällä.

3. MÄÄRITELMÄ

Vedetön laktoosipitoisuus ilmaistaan grammoina 100:aa grammaa kohden.

4. PERIAATE

Rehuseos rekonstituoidaan vedellä. Lisätään Biggs-liuosta laimeaan punnittuun määräosaan rehuseoksen sisältämän rasvan ja proteiinien saostamiseksi. Näyte suodatetaan (tai sentrifugoidaan) ja suodos (tai supernatantti) injektoidaan kationinvaihto-HPLC-kolonniin (lyijymuodossa) käyttämällä liikkuvana faasina HPLC-laatuista vettä. Eluoitunut laktoosi osoitetaan differentiaalisella taitekerroindetektorilla [i].

5. REAGENSSIT

5.1 **Yleistä**

Jollei toisin täsmennetä, kaikkien reagenssien on oltava tunnustettua analyysilaatua; lisäksi on käytettävä vain HPLC-laatua olevaa vettä, josta on poistettu kaasut.

5.2 **Laktoosi**

D-laktoosimonohydraatti ($(C_{12}H_{22})O_{11}.\ H_2O$) voi imeä itseensä ylimääräistä kosteutta. Ennen käyttöä mitataan veden todellinen määrä Karl-Fisher-menetelmällä tai poistetaan ylimääräinen kosteus pitämällä laktoosia 8 tuntia uunissa, lämpötila 105 °C (tässä käsittelyssä laktoosista ei katoa kidevesi).

5.3 **Konsentroitu Biggs/Szijarto-liuos** [ii]

Liuotetaan 9,10 g sinkkiasetaattidihydraattia ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) ja 5,46 g fosfowolframihappomonohydraattia ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) noin 70 ml:aan HPLC-laatuista vettä (6.8) 100 ml:n mittapullossa.

Lisätään 5,81 ml jääetikkaa (CH_3COOH). Laimennetaan 100 ml:n merkkiin saakka HPLC-laadun vedellä (6.8) ja sekoitetaan. Liuos säilyy huoneenlämmössä yhden vuoden ajan.

5.4 **Laimea Biggs/Szijarto-liuos**

Laimennetaan 25 ml konsentroitua Biggs/Szijarto-liuosta (5.3) vedellä 500 ml:aan mittapullossa. Liuosta voidaan säilyttää huoneenlämmössä yhden kuukauden ajan.

5.5 **HPLC-laatua olevan veden valmistus**

Suodatetaan ultrapuhdasta vettä (6.8) tyhjiössä (6.9). Pumpun toiminnan parantamiseksi ja vakaan perusviivan saamiseksi liikkuvasta faasista poistetaan kaasut päivittäin jollakin käytettävissä olevista tekniikoista, kuten heliumilla, ultraäänellä, tyhjiössä tai in-line-kaasunpoistojärjestelmällä.

Huomautus: Kolonnin käyttöiän pidentämiseksi eluentin hiilidioksidipitoisuuden on oltava mahdollisimman alhainen eikä eluaattia saa päästä takaisin kolonniin.

6. LAITTEET JA TARVIKKEET

Tavalliset laboratoriovälineet ja erityisesti seuraavat:

6.1 **HPLC-ioninvaihtohartsikolonni**

Kolonnin pakkaaminen: 8 % ristisidottu polystyreeni-divinyylibentseenin kopolymeeri, jossa on funktionaalisina ryhminä lyijymuodossa olevia kationinvaihtoryhmiä.

Kolonnin pituus 300 mm, sisäinen halkaisija noin 8 mm.

Halkaisijaltaan erikokoisia kolonneja voidaan käyttää, jos virtausnopeutta muutetaan vastaavasti.

6.2 **Esikolonni**

Esikolonni on seuraavien yhdistelmä: erillinen kationinvaihtaja (H^+) ja anioninvaihtaja (CO_3-), jotka molemmat on pakattu noin 30 mm × 4,6 mm (L × ID) kokoisiin kolonneihin (esim. Micro-Guard-kolonni Micro-Guard-pidikkeessä) ja yhdistetty sarjaan tai jotka ovat samassa hartsissa, jossa AG 50W–X4, – 400 mesh (H^+) ja AG3-X4A, 200–400 mesh (OH-) ovat manuaalisesti pakattuina suhteessa 35:65 (m/m) noin 20 × 9 mm (L × ID) kokoiseen kolonniin.

6.3 **Kolonniuuni**

Uuni, joka voidaan pitää tasaisessa lämpötilassa 85 °C ± 1 °C.

6.4 **HPLC-pumppu**

Pumppu, joka pystyy kehittämään tasaisen virtausnopeuden (< 0,5 % vaihtelu) 0,2–1,0 m/min.

6.5 **HPLC-injektiolaite**

Automaattinen näytteensyöttäjä, joka pystyy injektoimaan 25 µL ja jonka toistettavuus on < 0,5 %.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää manuaalista laitetta (samat vaatimukset kuin automaattisella näytteensyöttäjällä).

6.6 **HPLC-detektori**

Erittäin herkkä taitekerroindetektori, jonka kohina on < $5{,}10^{-9}$ RI-yksikköä.

6.7 **Integraattori**

Ohjelmisto tai laitteeseen kuuluva integraattori, joka kerää ja prosessoi datan sekä laskee piikkien pinta-alat ja korkeudet, jotka voidaan muuntaa laktoosipitoisuuksiksi.

6.8 **Vedenpuhdistusyksikkö**

Järjestelmä, jolla saadaan ultrapuhdasta vettä (tyyppi 1), jonka vastus on >14 MΩ.cm.

6.9 **Liuottimien suodatusyksikkö**

Järjestelmä veden suodattamiseksi kalvosuodattimella, jonka huokoskoko on 0,45 µm.

Huomautus: Monissa vedenpuhdistusyksiköissä (6.8) on sisäänrakennettu 0,45 tai 0,2 µm:n suodatin. Jos tätä vettä käytetään suoraan, lisäsuodatus voidaan jättää tekemättä.

6.10 **Analyysivaaka**

Vaaka, jossa saa lukemat 0,1 mg:n tarkkuudella

6.11 **Vesihaude**

Vesihaude, joka voidaan pitää lämpötilassa 40 °C (± 0,5).

6.12 **Sentrifugi**

Sentrifugi, joka pystyy kehittämään vähintään 3 000 g Eppendorf-putkille tai vastaaville tai suuremmille putkille.

6.13 **Mittapullo, 50 mL**

Vetoisuus 50 mL, A-luokka.

Huomautus: Muunvetoisia pulloja voidaan käyttää, jos vetoisuus otetaan huomioon.

6.14 **Mittapullo, 100 mL**

Vetoisuus 100 mL, A-luokka.

6.15 **Mittapipetti**

Mittapipetti, 10 mL

Huomautus: Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää 5 mL:n pipetointilaitetta, jolloin pipetoidaan 5 mL:n reagenssimäärä (5.3) kahdesti.

7. NÄYTTEENOTTO

Laboratorion on tärkeää saada ISO-standardia ISO 707/IDF 50 [iii] noudattaen otettu aidosti edustava näyte, joka ei ole vahingoittunut kuljetuksen tai varastoinnin aikana.

8. STANDARDILAKTOOSILIUOKSEN VALMISTAMINEN

8.1 **Standardi 1**

Liuotetaan tarkasti (0,1 mg:n tarkkuudella) mitattu noin 50 mg:n määrä laktoosimonohydraattia (5.2) 100 mL:n mittapulloon (6.14) ja täytetään merkkiin vedellä.

8.2 **Standardi 2**

Liuotetaan tarkasti (0,1 mg:n tarkkuudella) mitattu noin 100 mg:n määrä laktoosimonohydraattia (5.2) 100 mL:n mittapulloon (6.14) ja täytetään merkkiin vedellä.

Huomautus: Standardiliuoksia voidaan varastoida enintään yksi viikko noin 5 °C:ssa.

9. NÄYTTEEN ESIKÄSITTELY

9.1 **Näytteen ennastus**

Mitataan noin 5 g jauhetta 50 mL:n pulloon (6.13) ja merkitään paino muistiin 1 mg:n tarkkuudella (W_1 (11)). Lisätään 50 mL vettä ja merkitään muistiin painon lisääntyminen (W_2 (11)) 0,01 g:n tarkkuudella. Pidetään suljettua pulloa vesihauteessa (6.11) 30 minuuttia välillä käännellen. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöiseksi.

9.2 **Näytteen käsittely**

Otetaan noin 1 g tätä liuosta ja pannaan se 50 mL:n mittapulloon (6.13), merkitään paino muistiin 1 mg:n tarkkuudella (W_3 (11)), lisätään 20 mL vettä ja 10 mL laimeaa Biggs/Szijarto-reagenssia (5.4) ja täytetään mittaan vedellä. Käännellään pulloa varovasti 5 kertaa ensimmäisten 30 minuutin aikana.

Otetaan tunnin kuluttua määränäyte, joka sentrifugoidaan (6.12) 3 000 g:ssä 10 minuutin ajan (voidaan käyttää korkeampaa g-arvoa vastaavasti lyhyemmän ajan). HPLC-määritykseen käytetään määräosa supernatantista.

10. HPLC-MÄÄRITYS

10.1 **HPLC:n esivalmistelu**

10.1.1 *Kolonnin ja esikolonnin asentaminen*

Asenna esikolonni (6.2) kolonniuunin ulkopuolelle (6.3) ja kolonni (6.1) uuniin.

Huomautus: Jos uunissa ei ole eluointiliuoksen esikuumentamiseen tarkoitettua putkistoa, eluointiliuoksen on kuljettava uunissa noin 15 cm:n pituisessa ruostumattomasta teräksestä valmistetussa putkistossa ennen kolonniin menoa (eluointiliuos on ehdottomasti lämmitettävä ennen kolonniin menoa, koska muutoin piikki levenee).

10.1.2 *Detektori ja alkuvirtausnopeus*

Vakaan perusviivan saamiseksi detektori (6.6) kytketään päälle vähintään 24 tuntia ennen määrityksen aloittamista. Säädetään detektorin sisälämpötilaksi 35 °C. Säädetään virtausnopeudeksi 0,2 ml/min (6.4) vähintään 20 minuutin ajaksi ja kolonniuuni (6.3) huoneenlämpötilaan.

10.1.3 *Kolonniuuni ja lopullinen virtausnopeus*

Säädetään kolonniuunin (6.3) lämpötilaksi 85 °C. Kun lämpötila on saavutettu, lisätään 30 minuutin kuluttua virtausnopeutta asteittain nopeudesta 0,2 ml/min nopeuteen 0,6 ml/min (6.4). Annetaan järjestelmän tasaantua kyseisellä virtausnopeudella 85 °C:ssa 2 tunnin ajan tai kunnes perusviiva on vakaa.

10.1.4 *Integrointi*

Valitaan huolellisesti tiedonkeräys- ja integrointiparametrit (6.7), kuten keräystaajuus, herkkyys, aikavakio, piikin leveys ja kynnys.

Laktoosin retentioaika on noin 11 minuuttia.

Huomautus: Monilla tiedonkeräysohjelmilla (6.7) voidaan helposti mitata teoreettinen pohjaluku. Mitataan standardin 1 (8.1) teoreettinen pohjaluku säännöllisesti ja vaihdetaan kolonni (6.1), kun pohjaluku on 25 % pienempi kuin uuden kolonnin alkuarvo.

10.1.5 *Esikolonnitesti*

Tarkistetaan säännöllisesti (vähintään kerran joka näytemittaussarjassa) esikolonnin (6.2) kyky eliminoida näytteestä suoloja injektoimalla 25 µL 0,05 % natriumkloridiliuosta. Jos piikkejä ilmaantuu, esikolonni on vaihdettava.

10.2 **Standardien ajo**

Injektoidaan kunkin määrityssarjan alussa ensin 25 µL (6.5) standardia 1 (8.1) ja sitten standardia 2 (8.2). Toistetaan tämä joka 10–20:nnen näytteen jälkeen ja myös sarjan päätyttyä.

10.3 **Näytteiden ajo**

Injektoidaan 25 µL näytteen supernatanttia (9.2).

11. TULOSTEN LASKEMINEN JA ILMOITTAMINEN

11.1 **Kalibrointi**

Tulosten laskennassa käytetään tavallisesti piikin korkeutta, mutta jos signaalissa on liikaa kohinaa, voidaan käyttää piikin pinta-alaa (piikin korkeuden mukaan tehtävään kvantitointiin vaikuttavat vähemmän komponentit, joiden pitoisuus on alhainen ja jotka eroavat liian vähän laktoosipiikistä).

Ohjelmiston (6.7) olisi laskettava linaarinen kalibrointikuvaaja, joka menee nollapisteen kautta. Tarkistetaan, ettei kuvaaja ole epälineaarinen (näkyvä epälineaarisuus johtuu todennäköisimmin standardin 1 (8.1) tai 2 (8.2) valmistuksessa tapahtuneesta virheestä, huonosta integroinnista ja vähemmän todennäköisesti huonosti toimivasta injektorista).

Syötetään tietokoneeseen standardin 1 (8.1) ja 2 (8.2) vedettömänä laktoosina lasketut laktoosikonsentraatiot, mg/mL.

Kalibrointikuvaajan kulmakerroin (RF) lasketaan pinta-alan ja konsentraation (mg/mL) suhteesta.

11.2 **Näytteet**

Määrityksen tulos ilmaistaan grammoina 100 grammaa kohden ja lasketaan ohjelmistolla (6.7) tai seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

C: laktoosikonsentraatio g/100 g jauhetta

H: näytteen sisältämän laktoosin piikin korkeus

RF: kalibrointikuvaajan kulmakerroin, mV/mg/mL

W_1: jauhenäytteen (9.1) paino grammoina

W_2: jauhenäytteeseen (9.1) lisätyn veden paino grammoina

W_3: jauheesta ennastetun liuosnäytteen (9.2) paino grammoina

50: kohdassa 9.2 käytetyn mittapullon tilavuus

0,1: tuloksen muunto yksiköksi g/100 g

12. TARKKUUS

Tästä monilaboratoriotestistä saatuja arvoja ei välttämättä voi soveltaa muihin kuin esitettyihin pitoisuusalueisiin ja matriiseihin. Toistettavuuden ja uusittavuuden arvot johdetaan ISO-standardin 5725 ([iv]) mukaisesti tehdyn monilaboratoriotestin tuloksista.

12.1 **Toistettavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka sama henkilö on saanut samassa laboratoriossa lyhyen ajan kuluessa samalla menetelmällä ja samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin xxx (määritetään laboratorioiden välisellä kokeella) ([v]).

12.2 **Uusittavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa samalla menetelmällä ja eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 0,5 g/100 g (määritetään laboratorioiden välisellä kokeella).

13. VIITTEET

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

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

([iii]) ISO 707 (IDF 50), Milk and milk products – Methods of sampling.

([iv]) ISO 5725–1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions.

([v]) ISO 5725–2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: A basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

LIITE XII

(9 artikla)

JULKISEEN VARASTOINTIIN TARKOITETUN RASVATTOMAN MAITOJAUHEEN HERAJUOKSETTEEN OSOITTAMINEN KASEIINIMAKROPEPTIDIEN MÄÄRITYKSEN AVULLA SUUREN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIAA (HPLC) KÄYTTÄEN

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Tämän menetelmän avulla voidaan osoittaa herajuoksetteen esiintyminen julkiseen varastointiin tarkoitetussa rasvattomassa maitojauheessa kaseiinimakropeptidien määrityksen avulla.

2. VIITE

Kansainvälinen standardi ISO 707 – ”Maito ja maitotuotteet – Näytteenotto-menetelmät” liitteessä I olevan 2 kohdan c alakohdan viimeisen luetelmakohdan mukaisesti.

3. MÄÄRITELMÄ

Kuiva herajuoksetepitoisuus ilmoitetaan massaprosentteina ja määritetään kaseiinimakropeptidipitoisuutena tässä esitetyllä menetelmällä.

4. PERIAATE

— Rasvattoman maitojauheen ennastus, rasvojen ja proteiinien poisto trikloorietikkahapolla ja sentrifugointi tai suodatus.

— Supernatantissa esiintyvien kaseiinimakropeptidien (CMP) määrän määritys suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC).

— Saadun tuloksen arviointi suhteessa rasvattoman maitojauheen standardinäytteisiin, joissa ei ole tai joihin on lisätty tunnettu prosenttimäärä herajauhetta.

5. REAGENSSIT

Kaikkien reagenssien on oltava tunnustettua analyysilaatua. Veden on oltava tislattua tai puhtaudeltaan vähintään sitä vastaavaa.

5.1 **Trikloorietikkahappoliuos**

Liuotetaan 240 g trikloorietikkahappoa (CCl_3COOH) veteen ja täytetään 1 000 ml:ksi. Liuoksen tulee olla kirkasta ja väritöntä.

5.2 **Eluointiliuos, pH 6,0**

Liuotetaan 1,74 g dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4), 12,37 g monokaliumdivetyfosfaattia (KH_2PO_4) ja 21,41 g natriumsulfaattia (Na_2SO_4) noin 700 ml:aan vettä. Tarvittaessa säädetään pH 6,0:ksi fosforihappo- tai kaliumhydroksidiliuoksen avulla.

Täytetään 1 000 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan.

Huomautus: Eluointiliuoksen koostumusta voidaan ajantasaistaa standardista annetun todistuksen tai kolonninpakkausmateriaalin valmistajan suositusten mukaisesti.

Eluointiliuos suodatetaan ennen käyttöä huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi.

5.3 **Pesuliuos**

Sekoitetaan yksi tilavuusosa asetonitriiliä (CH_3CN) 9 tilavuusosaan vettä. Suodatetaan seos ennen käyttöä 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi.

Huomautus: Tässä voidaan käyttää mitä tahansa pesuliuosta, jolla on bakteereja tappava vaikutus ja joka ei heikennä kolonnien erotuskykyä.

5.4 **Standardinäytteet**

5.4.1. *Tämän asetuksen vaatimuksia vastaava rasvaton maitojauhe eli [0].*

5.4.2. *Sama rasvaton maitojauhe, jossa on 5 % (m/m) juoksetetyyppistä, vakio-koostumuksen omaavaa herajauhetta eli [5].*

6. LAITTEET JA TARVIKKEET

6.1 analyysivaaka

6.2 sentrifugi, jolla voidaan saavuttaa 2 200 g:n keskipakovoima, varustettuna noin 50 ml:n sentrifugiputkilla, joissa on tulppa tai korkki

6.3 mekaaninen ravistelija

6.4 magneettisekoitin

6.5 lasisuppiloita, halkaisija noin 7 cm

6.6 suodatinpapereita, keskinopea suodatus, halkaisija noin 12,5 cm

6.7 lasinen suodatuslaite, varustettuna huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimella

6.8 mittapipettejä, joilla voidaan annostella 10 ml (ISO 648, luokka A tai ISO/R 835) tai laite, jolla voidaan annostella 10,0 ml kahdessa minuutissa

6.9 laite, jolla voidaan annostella 20,0 ml vettä noin 50 °C:ssa

6.10 vesihaude säädettynä termostaatilla 25 ± 0,5 °C:seen

6.11 HPLC-laitteisto, johon kuuluu:

6.11.1 pumppu

6.11.2 käsikäyttöinen tai automaattinen injektori, jonka injektiotilavuus on 15–30 µl

6.11.3 kaksi TSK 2 000 SW -kolonnia sarjassa (pituus 30 cm, sisähalkaisija 0,75 cm) tai tehokkuudeltaan vastaavat kolonnit (esim. yksi TSK 2 000-SWxl, yksi Agilent Technologies Zorbax GF 250) ja esikolonni (3 cm × 0,3 cm) pakattuna I 125:llä tai tehokkuudeltaan vastaavalla materiaalilla

6.11.4 kolonniuuni, jonka lämpötila on säädetty termostaatilla 35 ± 1 °C:seen

6.11.5. aallonpituudeltaan säädettävissä oleva UV-detektori, jolla voidaan suorittaa mittauksia 205 nm:ssä 0,008 A:n herkkyydellä

6.11.6 integraattori, jolla voidaan integroida laaksosta laaksoon.

Huomautus: Huoneenlämpötilassa olevilla kolonneilla voidaan työskennellä, mutta niiden erotuskyky on hieman heikompi. Tässä tapauksessa lämpötilan muutosten saman analyysisarjan aikana täytyy olla alle ± 5 °C.

7. NÄYTTEENOTTO

7.1 Näytteet otetaan kansainvälisessä ISO-standardissa 707 kuvatun menettelyn mukaisesti. Jäsenvaltiot voivat kuitenkin käyttää muuta näytteenottomenetelmää, jos se on edellä mainitun standardin periaatteiden mukainen.

7.2 Näyte on säilytettävä olosuhteissa, joissa näyte ei pilaannu eikä koostumus muutu.

8. SUORITUS

8.1 **Näytemateriaalin valmistelu**

Maitojauhe siirretään astiaan, joka on siihen verrattuna tilavuudeltaan noin kaksinkertainen ja jossa on ilmatiivis kansi. Astia suljetaan välittömästi. Maitojauhe sekoitetaan käännellen astiaa toistuvasti ympäri.

8.2 **Mitattavaksi tarkoitettu näyte**

Punnitaan 2,000 ± 0,001 g näytettä sentrifugiputkeen (6.2) tai suljettuun pulloon (50 ml).

8.3 **Rasvan ja proteiinien poisto**

8.3.1 Lisätään 20,0 ml lämmintä vettä (50 °C) näytteeseen. Liuotetaan jauhe ravistaen 5 minuutin ajan ravistelijalla (6.3). Asetetaan putki vesihauteeseen (6.10) ja annetaan putken lämpötilan tasaantua 25 °C:ksi.

8.3.2 Lisätään 10,0 ml trikloorietikkahappoliuosta (5.1), noin 25 °C, kahden minuutin aikana magneettisekoittajalla (6.4) voimakkaasti sekoittaen. Asetetaan putki vesihauteeseen (6.10) ja pidetään sitä siellä 60 minuuttia.

8.3.3 Sentrifugoidaan (6.2) kiihtyvyydellä 2 200 g kymmenen minuuttia, tai suodatetaan paperin läpi (6.6), poistetaan suodoksen viisi ensimmäistä millilitraa.

8.4 **Kromatografinen määritys**

8.4.1 Injektoidaan tarkasti mitattuna 15–30 µl supernatanttia tai suodosta (8.3.3) HPLC-laitteistoon (6.11), jonka virtausnopeus on 1,0 ml eluointiliuosta (5.2) minuutissa.

Huomautus 1. Muuta virtausnopeutta voidaan käyttää, jos otetaan huomioon kolonnien sisähalkaisija tai kolonnin valmistajan ohjeet.

Huomautus 2. Eluointiliuos (5.2) on pidettävä koko kromatografisen määrityksen ajan 85 °C:ssa eluaatin pitämiseksi kaasuttomana ja kaiken bakteerikasvun estämiseksi. Mitä tahansa saman vaikutuksen tuottavaa varotoimea voidaan käyttää.

Huomautus 3. Jokaisen keskeytyksen aikana kolonnit on huuhdeltava vedellä. Eluointiliuosta (5.2) ei saa koskaan jättää niihin.

Ennen jokaista yli 24 tunnin keskeytystä kolonnit on huuhdeltava vedellä ja pestävä sitten liuoksella (5.3) vähintään kolmen tunnin ajan virtausnopeudella 0,2 ml/minuutti.

8.4.2 Näytteen [E] kromatografisen määrityksen tulokset saadaan kromatogrammin muodossa, jossa jokainen piikki tunnistetaan sen retentioajasta RT seuraavasti:

Piikki II:	kromatogrammin toinen piikki, jonka RT on noin 12,5 minuuttia
Piikki III:	kromatogrammin kolmas piikki, joka on CMP, joiden RT on 15,5 minuuttia

Kolonnien valinta voi vaikuttaa merkittävästi eri piikkien retentioaikoihin.

Integraattori (6.11.6) laskee automaattisesti jokaisen piikin pinta-alan A, eli:

A_{II}:	piikin II pinta-ala
A_{III}:	piikin III pinta-ala

Laitteiston tai kolonnien huonosta toiminnasta tai määritetyn näytteen luonteesta ja alkuperästä johtuvien mahdollisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi on välttämätöntä tutkia jokainen kromatogrammi ennen kvantitatiivista tulkintaa.

Jos esiintyy epäilyjä, määritys on toistettava.

8.5 **Kalibrointi**

8.5.1 Standardinäytteisiin (5.4) sovelletaan täsmälleen 8.2–8.4.2 kohdassa kuvattua menettelyä.

On käytettävä juuri valmistettuja liuoksia, sillä CMP:t hajoavat 8 % triklooriasetaatissa. Niiden pitoisuus pienenee noin 0,2 %/tunti 30 °C:ssa.

8.5.2 Ennen näytteiden kromatografista määritystä kolonnit on valmisteltava injektoimalla toistuvasti standardinäytteen (5.4.2) liuosta (8.5.1), kunnes CMP:jä vastaavan piikin pinta-ala ja retentioaika pysyvät vakiona.

8.5.3 Määritetään vastekertoimet R injektoimalla sama tilavuusmäärä suodoksia (8.5.1) kuin näytteitä.

9. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

9.1 **Laskutapa ja kaavat**

9.1.1 *Vastekertoimen R laskeminen:*

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

jossa:

R_{II} = piikin II vastekertoimet

A_{II} [0] = kohdassa 8.5.3 saatu standardinäytteen [0] piikkien II pinta-ala

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

jossa:

R_{III} = piikin III vastekerroin

A_{III} [0] and A_{III} [5] = 8.5.3 kohdassa saadut standardinäytteiden [0] ja [5] piikin III pinta-alat

W = standardinäytteessä [5] esiintyvän heran määrä eli 5.

9.1.2 *Näytteen [E] piikkien suhteellisen pinta-alan laskeminen*

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

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

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

jossa:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = näytteen [E] piikkien II, III ja IV suhteelliset pinta-alat

A_{II} [E], A_{III} [E] = kohdassa 8.4.2 saadut näytteen [E] piikkien II ja III pinta-alat

R_{II}, R_{III} = 9.1.1 kohdassa lasketut vastekertoimet

9.1.3 *Näytteen [E] piikin III suhteellisen retentioajan laskeminen:* $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$

jossa:

RRT_{III} [E] = näytteen [E] piikin III suhteellinen retentioaika

RT_{III} [E] = 8.4.2 kohdassa saatu näytteen [E] piikin III retentioaika

RT_{III} [5] = 8.5.3 kohdassa saatu vertailunäytteen [5] piikin III retentioaika

9.1.4 Kokeet ovat osoittaneet, että piikin III suhteellisen retentioajan eli RRT_{III} [E]:n ja aina 10 %:iin asti lisätyn herajauheen prosenttiosuuden välillä on olemassa lineaarinen riippuvuus:

— RRT_{III} [E] on < 1,000, kun herapitoisuus on > 5 %,

— RRT_{III} [E] on ≥ 1,000, kun herapitoisuus on ≤ 5 %.

Sallittu epätarkkuus RRT_{III}-arvoille on ± 0,002.

Tavallisesti RRT_{III} [0]-arvo eroaa vähän arvosta 1,034. Kolonnien kunnosta riippuen tämä arvo voi lähestyä arvoa 1,000, mutta sen on oltava aina tätä suurempi.

9.2 Näytteessä esiintyvän herajuoksetejauheen prosenttiosuuden laskeminen:

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

jossa:

W	=	näytteen [E] herajuoksetteen prosenttiosuus m/m
S_{III} [E]	=	kohdassa 9.1.2 saatu näytteen [E] piikin III suhteellinen pinta-ala
1,3	=	piikin III suhteellinen keskimääräinen pinta-ala grammoina herajuoksetetta 100 grammassa määritettynä alkuperältään erilaisista muuntamattomista rasvattomista maitojauheista. Tämä luku on saatu kokeellisesti.
S_{III} [0]	=	piikin III pinta-ala, joka on yhtä suuri kuin $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Nämä arvot saadaan kohdissa 9.1.1 ja 8.5.3.
(S_{III} [0] – 0,9)	=	suhteelliseen pinta-alaan 1,3 tehtävä korjaus, kun S_{III} [0] ei ole yhtä suuri kuin 0,9. Kokeellisesti vertailunäytteen [0] piikin III keskimääräinen suhteellinen pinta-ala on 0,9.

9.3 **Menetelmän tarkkuus**

9.3.1 *Toistettavuus*

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut samanaikaisesti tai aivan perätysten samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 0,2 % m/m.

9.3.2 *Uusittavuus*

Kahden toisistaan riippumattoman yksittäisen tuloksen, jotka on saatu kahdessa eri laboratoriossa täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 0,4 % m/m.

9.4 **Tulkinta**

9.4.1 Todetaan herattomuus, jos piikin III suhteellinen pinta-ala S_{III} [E], grammoina herajuoksetetta 100:aa tuotegrammaa kohti ilmaistuna, on ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), jossa

2,0	=	suurin sallittu arvo piikin III suhteelliselle pinta-alalle ottaen huomioon piikin III suhteellinen pinta-ala (eli 1,3), epätarkkuus, joka johtuu rasvattomien maitojauheiden koostumuksen vaihteluista, ja menetelmän uusittavuus (9.3.2)
(S_{III} [0] – 0,9)	=	tehtävä korjaus, kun pinta-ala S_{III} [0] eroaa 0,9:stä (ks. 9.2 kohta)

9.4.2 Jos piikin III suhteellinen pinta-ala $S_{III}[E]$ on > 2,0 + ($S_{III}[0]$ – 0,9) ja piikin II suhteellinen pinta-ala S_{II} [E] ≤ 160, määritetään herajuoksetteen pitoisuus 9.2 kohdassa esitetyllä tavalla.

9.4.3 Jos piikin III suhteellinen pinta-ala S_{III} [E] on > 2,0 + ($S_{III}[0]$ – 0,9) ja piikin II suhteellinen pinta-ala S_{II} [E] ≤ 160, määritetään kokonaisproteiinipitoisuus (P %); sitten tutkitaan kuvia 1 ja 2.

9.4.3.1 Kuvissa 1 ja 2 esitetään tiedot, jotka on saatu analysoitaessa runsaasti proteiineja sisältäviä muuntamattomia rasvattomia maitojauheita.

Yhtenäisellä viivalla kuvattu suora edustaa lineaarisen regression suoraa, jonka kertoimet on laskettu pienimmän neliösumman menetelmällä.

Katkoviivalla kuvattu suora määrää piikin III suhteellisen pinta-alan ylärajan, joka ei ylity todennäköisyydellä 90 % tapauksista.

Kuvien 1 ja 2 katkoviivalla kuvattujen suorien yhtälöt ovat

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

jossa

S_{III} = piikin III suhteellinen pinta-ala laskettuna joko proteiinien kokonaispitoisuudesta tai piikin S_{II} [E] suhteellisesta pinta-alasta,

P % = kokonaisproteiinipitoisuus painoprosentteina ilmaistuna,

S_{II} [E] = 9.1.2 kohdassa laskettu näytteen suhteellinen pinta-ala.

Nämä yhtälöt vastaavat 9.2 kohdassa mainittua lukua 1,3.

Poikkeama (T_1 ja T_2) saadun suhteellisen pinta-alan S_{III} [E] ja suhteellisen pinta-alan S_{III} välillä saadaan seuraavista yhtälöistä: $T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$ $T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$

9.4.3.2.

Jos T_1 ja/tai T_2 ovat pienempiä tai yhtä suuria kuin nolla, herajuoksetteen esiintymistä ei voida määrittää.

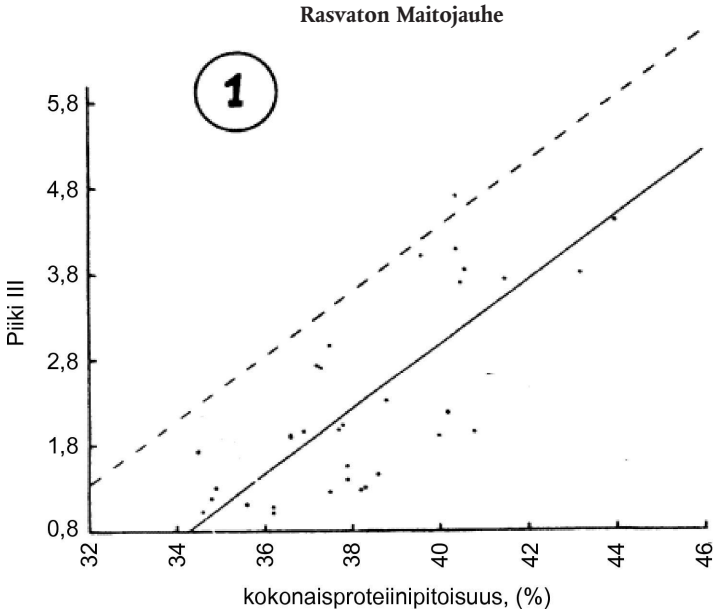
Jos T_1 ja T_2 ovat suurempia kuin nolla, herajuoksetetta todetaan esiintyvän.

Herajuoksetteen pitoisuus lasketaan seuraavalla kaavalla: $W = T_2 + 0{,}91$

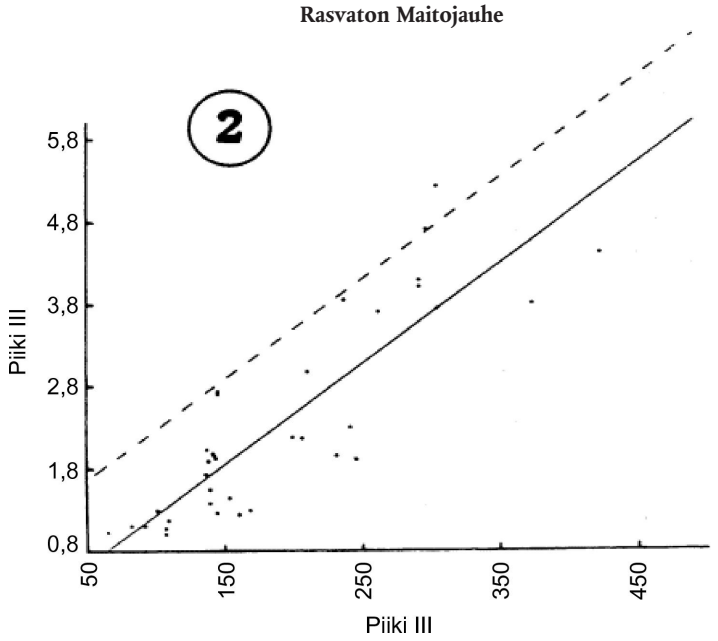
jossa:

0,91 on etäisyys pystyakselilla yhtenäisellä viivalla kuvatun suoran ja katkoviivalla kuvatun suoran välillä.

Rasvaton Maitojauhe



Rasvaton Maitojauhe



LIITE XIII

(9 artikla)

ASETUKSESSA (EY) N:O 2799/1999 TARKOITETUSSA RASVATTOMASSA MAITOJAUHEESSA JA ESISEOKSISSA OLEVAN KUIVAN HERAJUOKSETTEEN MÄÄRITYS

1. TARKOITUS: LISÄTYN KUIVAN HERAJUOKSETTEEN OSOITTAMINEN SEURAAVISSA TUOTTEISSA:

a) asetuksen (ETY) N:o 2799/1999 2 artiklassa määritelty rasvaton maitojauhe; ja

b) asetuksen (ETY) N:o 2799/1999 4 artiklassa määritellyt esiseokset.

2. VIITE: KANSAINVÄLINEN ISO-STANDARDI 707

3. MÄÄRITELMÄ

Kuiva herajuoksetepitoisuus ilmoitetaan massaprosentteina ja määritetään kaseiinimakropeptidipitoisuutena tässä esitetyllä menetelmällä.

4. PERIAATE

Kaseiinimakropeptidipitoisuus määritetään liitteen XII mukaisesti. Positiivisia tuloksia antavista näytteistä määritetään kaseiinimakropeptidi A suuren erotuskyvyn nestekromatografialla käänteisfaasimenetelmällä (HPLC). Vaihtoehtoisesti näytteet analysoidaan suoraan käänteisfaasi-HPLC-menetelmällä. Tulos arvioidaan vertaamalla sitä rasvatonta maitojauhetta sisältäviin standardinäytteisiin, joista toisiin on ja toisiin ei ole lisätty herajauhetta. Jos tulos on yli 1 % (m/m), näytteessä on kuivaa herajuoksetta.

5. REAGENSSIT

Kaikkien reagenssien on oltava tunnustettua analyysilaatua. Veden on oltava tislattua tai puhtaudeltaan vähintään sitä vastaavaa. Asetonitriilin on oltava spektroskopia- tai HPLC-laatua.

Menetelmässä käytettävät reagenssit selostetaan tämän asetuksen liitteessä XII.

Käänteisfaasi-HPLC-menetelmässä tarvittavat reagenssit

5.1 **Trikloorietikkahappoliuos**

Liuotetaan 240 g trikloorietikkahappoa (CCl_3COOH) veteen ja täytetään 1 000 ml:ksi. Liuoksen tulee olla kirkasta ja väritöntä.

5.2 **Eluointiliuokset A ja B**

Eluointiliuos A: Mitataan 1 000 ml:n mittapulloon 150 ml asetonitriiliä (CH_3CN), 20 ml isopropanolia ($CH_3CHOHCH_3$) ja 1,00 ml trifluorietikkahappoa (TFA, CF_3COOH). Täytetään 1 000 ml:aan vedellä.

Eluointiliuos B: Mitataan 1 000 ml:n mittapulloon 550 ml asetonitriiliä, 20 ml isopropanolia ja 1,00 ml TFA:a. Täytetään 1 000 ml:aan vedellä. Eluointiliuos suodatetaan ennen käyttöä 0,45 µm kalvosuodattimen läpi.

5.3 **Kolonnin säilytys**

Määritysten jälkeen kolonni huuhdellaan ensin eluointiliuoksella B (gradientilla) ja sitten asetonitriilillä (gradientilla 30 minuuttia). Kolonni säilytetään asetonitriilissä.

5.4 **Standardinäytteet**

5.4.1 Julkista varastointia koskevia vaatimuksia vastaava rasvaton maitojauhe eli [0].

5.4.2 Sama rasvaton maitojauhe sekoitettuna 5-prosenttiseksi (m/m) juoksetetyyppisellä, koostumukseltaan standardilla herajauheella eli [5].

5.4.3 Sama rasvaton maitojauhe sekoitettuna 50 prosenttiseksi (m/m) juoksetetyyppisellä, koostumukseltaan standardilla herajauheella eli [50] ([1]).

6. LAITTEET JA TARVIKKEET

Tarvittavat laitteet kuvataan tämän asetuksen liitteessä XII.

6.1 analyysivaaka

6.2 sentrifugi, jolla voidaan saavuttaa 2 200 g:n keskipakovoima, varustettuna noin 50 ml:n sentrifugiputkilla, joissa on tulppa tai korkki

6.3 mekaaninen ravistelija

6.4 magneettisekoitin

6.5 lasisuppiloita, halkaisija noin 7 cm

6.6 suodatinpapereita, keskinopea suodatus, halkaisija noin 12,5 cm

6.7 lasinen suodatuslaite, varustettuna huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimella

6.8 mittapipettejä, joilla voidaan annostella 10 ml (ISO 648, luokka A tai ISO/R 835) tai laite, jolla voidaan annostella 10,0 ml kahdessa minuutissa

6.9 laite, jolla voidaan annostella 20,0 ml vettä noin 50 °C:ssa

6.10 vesihaude säädettynä termostaatilla 25 ± 0,5 °C:seen

6.11 HPLC-laitteisto, johon kuuluu:

6.11.1 kaksikanavainen gradienttipumppu

6.11.2 käsikäyttöinen tai automaattinen injektori, tilavuus 100 µl

6.11.3 Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 -kolonni (pituus 25 cm, sisähalkaisija 0,46 cm) tai vastaava käänteisfaasikolonni, silikapohjainen, suurihuokoinen

6.11.4 kolonniuuni, jonka lämpötila on säädetty termostaatilla 35 ± 1 °C:seen

6.11.5 aallonpituudeltaan muunneltavissa oleva UV-detektori, jolla voidaan mitata 210 nm:ssä (tarvittaessa voidaan käyttää suurempaa aallonpituutta aina 220 nm:iin asti), herkkyys 0,02 ÅU

6.11.6 integraattori, jolla voidaan integroida yhteiseen perusviivaan tai laaksosta laaksoon

Huomautus: Kolonneja voi käyttää myös huoneenlämmössä, jos lämpötilavaihtelua on enintään 1 °C; muussa tapauksessa CMP_A:n retentioajassa esiintyy melko suuria vaihteluita.

7. NÄYTTEENOTTO

7.1 Näytteet otetaan kansainvälisessä ISO-standardissa 707 kuvatun menettelyn mukaisesti. Jäsenvaltiot voivat kuitenkin käyttää muuta näytteenottomenetelmää, jos se on edellä mainitun standardin periaatteiden mukainen.

7.2 Näyte on säilytettävä olosuhteissa, joissa näyte ei pilaannu eikä koostumus muutu.

([1]) Vakiokoostumuksen omaavan juoksetetyypin herajauhetta sekä muunnettua rasvatonta maitojauhetta on saatavana osoitteesta NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL-6710 BA Ede. Muitakin NIZOn jauheita vastaavia tuloksia antavia jauheita voidaan käyttää.

8. SUORITUS

8.1 **Näytteen esikäsittely**

Maitojauhe siirretään astiaan, joka on siihen verrattuna tilavuudeltaan noin kaksinkertainen ja jossa on ilmatiivis kansi. Astia suljetaan välittömästi. Maitojauhe sekoitetaan käännellen astiaa toistuvasti ympäri.

8.2 **Mitattavaksi tarkoitettu näyte**

Punnitaan 2,00 ± 0,001 g näytettä sentrifugiputkeen (6.2) tai tulpalliseen pulloon (50 ml).

Huomautus: Kun kyseessä ovat esiseokset, punnitaan sellainen määrä näytettä, että rasvattoman näytteen osuus on 2,00 g.

8.3 **Rasvan ja proteiinien poisto**

8.3.1 Lisätään näytteeseen 20,0 ml lämmintä vettä (50 °C). Liuotetaan jauhe ravistamalla viisi minuuttia tai sekoitetaan hapan kirnupiimä ravistamalla sitä 30 minuuttia mekaanisella ravistimella (6.3). Asetetaan putki vesihauteeseen (6.10) ja annetaan putken lämpötilan tasaantua 25 °C:ksi.

8.3.2 Lisätään kahden minuutin aikana 10,0 ml noin 25 °C trikloorietikkahappoliuosta (5.1), koko ajan voimakkaasti magneettisekoittimella sekoittaen (6.4). Asetetaan putki vesihauteeseen (6.10) ja pidetään sitä siellä 60 minuuttia.

8.3.3 Sentrifugoidaan (6.2) kiihtyvyydellä 2 200 g kymmenen minuuttia tai suodatetaan paperin läpi (6.6). Heitetään pois suodoksen viisi ensimmäistä millilitraa.

8.4 **Kromatografinen määritys**

8.4.1 Tehdään liitteessä XII kuvattu HPLC-määritys. Jos tulos on negatiivinen, analysoitu näyte ei sisällä havaittavia määriä herajuoksetetta. Jos tulos on positiivinen, on käytettävä jäljempänä kuvattua käänteisfaasi-HPLC-menetelmää. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää suoraan käänteisfaasi-HPLC-menetelmää. Jos käytetään liitteessä XII kuvattua menetelmää, jauheena oleva hapan kirnupiimä voi johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin. Käänteisfaasi-HPLC-menetelmä sulkee pois tämän mahdollisuuden.

8.4.2 Ennen käänteisfaasi-HPLC-määritystä on gradientin olosuhteet optimoitava. Retentioaika 26 ± 2 minuuttia CMP_A:lle on ihanteellinen gradienttijärjestelmille, joissa kuollut tilavuus on noin 6 ml (tilavuus siitä kohdasta, jossa liuottimet yhtyvät siihen kohtaan, jossa injektiosilmukka loppuu). Gradienttijärjestelmissä, joissa kuollut tilavuus on pienempi (esimerkiksi 2 ml), on käytettävä 22 minuuttia optimaalisena retentioaikana.

Otetaan standardinäytteet (5.4) ilman 50-prosenttista herajuoksetetta ja sen kanssa.

Injektoidaan 100 µl supernatanttia tai suodosta (8.3.3) HPLC-laitteistoon käyttäen taulukossa 1 esitettyjä gradientin viiteolosuhteita.

Taulukko 1

Gradientin viiteolosuhteet kromatografian optimoimiseksi

Aika (min.)	Virtausnopeus (ml/min)	% A	% B	Kuvaaja
Alku	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lineaarinen
32	1,0	10	90	lineaarinen
37	1,0	10	90	lineaarinen
42	1,0	90	10	lineaarinen

Näiden kahden kromatogrammin vertailun avulla olisi voitava paikallistaa CMP_A-piikki.

Jäljempänä annetulla kaavalla voidaan laskea normaalille gradientille alussa käytettävän liuottimen koostumus (8.4.3) seuraavasti: $\%\ B = 10 - 2{,}5 + (13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 30 / 27$ $\%\ B = 7{,}5 + (13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 1{,}11$

jossa:

RT_{cmpA}: CMP_A:n retentioaika viitegradientissa

10: B-liuoksen prosenttiosuus

2,5: B-liuoksen prosenttiosuus keskikohdassa miinus B-liuoksen prosenttiosuus alussa normaaligradientissa

13,5: viitegradientin keskikohdan ajankohta

26: CMP_A:lle vaadittu retentioaika

6: viitegradientin ja normaaligradientin kulmakertoimien suhde

30: B-liuoksen prosenttiosuus alussa miinus B-liuoksen prosenttiosuus 27 minuutin kohdalla viitegradientissa

27: viitegradientin ajoaika

8.4.3 Näytteiden injektointi

Injektoidaan tarkasti mitattuna 100 µl supernatanttia tai suodosta (8.3.3) HPLC-laitteistoon virtausnopeudella 1,0 ml eluointiliuosta (5.2) minuutissa.

Määrityksen alussa eluenttikoostumus saadaan 8.4.2 kohdasta. Se on tavallisesti lähellä arvoa A:B = 76:24 (5.2). Välittömästi injektoinnin jälkeen aloitetaan lineaarinen gradientti, joka johtaa 5 % suurempaan B:n prosenttiosuuteen 27 minuutin jälkeen. Sen jälkeen aloitetaan lineaarinen gradientti, joka saa eluaattikoostumuksen B:n 90 %:ksi viidessä minuutissa. Tätä koostumusta ylläpidetään viisi minuuttia. Sen jälkeen aina lineaarisen gradientin avulla palataan alkuperäiseen koostumukseen viidessä minuutissa. Pumppausjärjestelmän sisäisestä tilavuudesta riippuen seuraava injektointi voidaan tehdä 15 minuutin kuluttua siitä kun alkuperäiset olosuhteet on saavutettu.

Huomautus 1. CMP_A:n retentioajan olisi oltava 26 ± 2 minuuttia. Tämä voidaan saavuttaa vaihtelemalla ensimmäisen gradientin alku- ja loppuolosuhteita. Ensimmäisen gradientin B %:n alku- ja loppuolosuhteiden eron on kuitenkin pysyttävä 5 %:ssa B:stä.

Huomautus 2. Eluenteista on poistettava kaasut riittävässä määrin, ja ne on myös säilytettävä kaasuttomina. Tämä on välttämätöntä gradientin pumppausjärjestelmän asianmukaisen toiminnan kannalta. CMP_A-piikin retentioajan standardipoikkeaman on oltava pienempi kuin 0,1 minuuttia (n = 10).

Huomautus 3. Joka viidennen näytteen jälkeen on injektoitava vertailunäytettä (5) ja käytettävä sitä uuden vastekertoimen R laskemiseksi (9.1.1).

8.4.4 Näytteen (E) kromatografisen määrityksen tulokset saadaan kromatogrammina, jossa CMP_A-piikki tunnistetaan sen retentioajasta, joka on noin 26 minuuttia.

Integraattori (6.11.6) laskee automaattisesti CMP_A-piikin korkeuden H. Jokaisen kromatogrammin perusviiva on tarkistettava. Määritys tai integrointi on toistettava, jos perusviiva on sijainnut väärässä kohdassa.

Huomautus: Jos CMP_A-piikki erottuu riittävästi muista piikeistä, olisi käytettävä perusviivaa laaksosta laaksoon; muutoin tehdään kohtisuorat viivat yhteiseen perusviivaan, jonka pitäisi alkaa läheltä CMP_A-piikkiä (eli ei t = 0 min!). Standardille ja näytteelle on käytettävä samaa integrointityyppiä, ja jos käytetään yhteistä perusviivaa, on tarkistettava, että se on näytteen ja standardin osalta johdonmukainen.

Mahdollisesti laitteiston tai kolonnin huonosta toiminnasta tai määritettävän näytteen alkuperästä ja luonteesta johtuvien poikkeavuuksien havaitsemiseksi on välttämätöntä tarkastella jokaista kromatogrammia ennen kvantitatiivista tulkintaa. Jos esiintyy epäilyjä, määritys on toistettava.

8.5 **Kalibrointi**

8.5.1 Standardinäytteille (5.4.1–5.4.2) sovelletaan täsmälleen 8.2–8.4.4 kohdassa kuvattua menettelyä. On käytettävä juuri valmistettuja liuoksia, sillä CMP hajoaa 8 % trikloorietikkahapossa huoneenlämmössä. 4 °C:ssa liuos pysyy stabiilina 24 tuntia. Jos määrityssarjat ovat pitkiä, on toivottavaa käyttää jäähdytettyä näytetarjotinta automaatti-injektorissa.

Huomautus: Edellä oleva 8.4.2 kohta voidaan jättää pois, jos B % tunnetaan alkuolosuhteissa aikaisempien määritysten perusteella.

Vertailunäytteen [5] kromatogrammin on oltava kuvan 1 mukainen. Tässä kuvassa CMP_A-piikkiä edeltää kaksi pientä piikkiä. On välttämätöntä saada samanlainen erottuminen.

8.5.2 Ennen näytteiden kromatografista määritystä injektoidaan 100 µl standardinäytettä, joka ei sisällä herajuoksetetta [0] (5.4.1).

Kromatogrammissa ei saa esiintyä piikkiä CMP_A-piikin retentioajan kohdalla.

8.5.3 Määritetään vastekertoimet R injektoimalla sama tilavuusmäärä suodoksia (8.5.1) kuin näytteitä.

9. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

9.1 **Laskutapa ja kaavat**

9.1.1 *Vastekertoimen R laskeminen:*

CMP_A-piikki: $R = W/H$

jossa:

R = CMP_A-piikin vastekerroin

H = CMP_A -piikin korkeus

W = standardinäytteen [5] sisältämän heran määrä

9.2 **Näytteessä esiintyvän herajuoksetejauheen prosenttiosuuden laskeminen**

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

jossa:

W(E) = näytteen (E) herajuoksetteen osuus m/m

R = CMP_A-piikin vastekerroin (9.1.1)

H(E) = näytteen (E) CMP_A-piikin korkeus

Jos W(E) on yli 1 % ja jos näytteen retentioajan ja standardinäytteen [5] retentioajan välinen ero on pienempi kuin 0,2 minuuttia, herajuoksetteen esiintyminen on osoitettu.

9.3 **Menetelmän tarkkuus**

9.3.1 *Toistettavuus*

Kahden määritystuloksen, jotka sama henkilö on saanut samanaikaisesti tai aivan perätysten samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, ero saa olla enintään 0,2 % m/m.

9.3.2 *Uusittavuus*

Ei määritetty.

9.3.3 *Lineaarisuus*

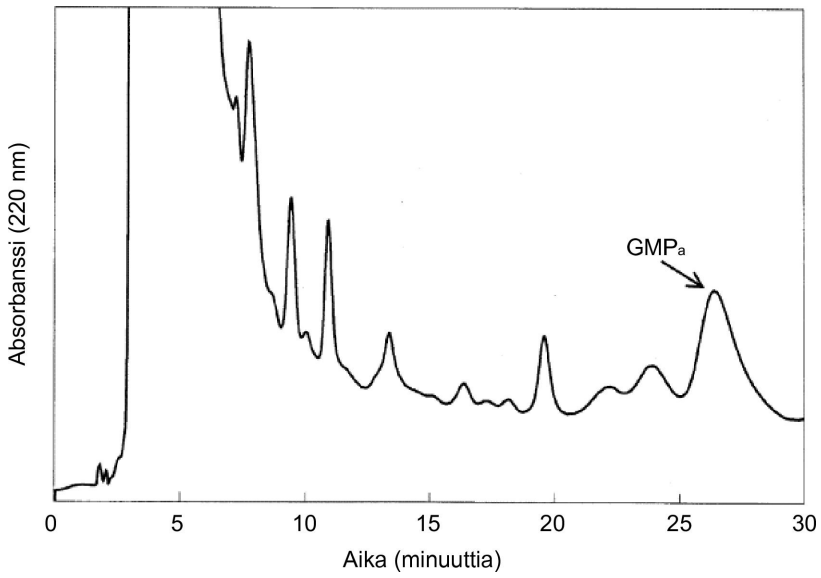
Kuvaajan on oltava lineaarinen herajuoksetteen pitoisuusalueella 0–16 %, ja korrelaatiokertoimen on oltava > 0,99.

9.4 **Tulkinta**

Edellinen 1 %:n raja on vahvistettu asetuksen (EY) N:o 214/2001 liitteessä XIX olevan 9.2 ja 9.4.1 kohdan säännösten mukaisesti, ja se sisältää uusittavuudesta johtuvan epävarmuuden.

Taulukko 1.

Ni–4.6 standardi



LIITE XIV

(10 artikla)

RASVATON MAITOJAUHE: FOSFATIDYYLISERIININ JA FOSFATIDYYLIETANOLIAMIININ MÄÄRITYS

Menetelmä: käänteisfaasi-HPLC-menetelmä

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Tässä kuvataan menetelmä rasvattomassa maitojauheessa (RMJ) olevan fosfatidyyliseriinin (FS) ja fosfatidyylietanoliamiinin (FE) kvantitatiiviseksi määrittämiseksi. Menetelmän avulla voidaan havaita RMJ:ssä esiintyvät kirnupiimän kiintoaineet.

2. MÄÄRITELMÄ

FS + FE -pitoisuus: aineen massafraktio määritettynä tässä esitetyllä menetelmällä. Tulos ilmaistaan milligrammoina (mg) fosfatidyylietanoliamiinidipalmitoyyliä (FEDP) 100 grammassa jauhetta.

3. MENETELMÄN PERIAATE

Aminofosfolipidit uutetaan ennastetusta maitojauheesta metanolilla. FS ja FE määritetään o-ftaalidialdehydi (OFA)-johdannaisina käänteisfaasi-HPLC:llä (RP-HPLC) ja fluoresenssidetektion avulla. Näytteen FS- ja FE -pitoisuudet määritetään kvantitatiivisesti vertaamalla standardinäytteeseen, joka sisältää tunnetun määrän FEDP:tä.

4. REAGENSSIT

Kaikkien reagenssien on oltava tunnustettua analyysilaatua. Veden on oltava tislattua tai puhtaudeltaan vähintään sitä vastaavaa, ellei toisin määritellä.

4.1 **Standardi: FEDP, puhtaus vähintään 99 %**

Huomautus: Standardia on säilytettävä –18 °C:n lämpötilassa.

4.2 **Reagenssit standardinäytteen ja näytteen valmistamiseksi**

4.2.1 metanoli, HPLC-laatua

4.2.2 kloroformi, HPLC-laatua

4.2.3 tryptamiinimonohydrokloridi

4.3 **Reagenssit o-ftaalidialdehydijohdannaisten valmistamiseen**

4.3.1 natriumhydroksidi, 12 M vesiliuos

4.3.2 boorihappo, 0,4 M vesiliuos, pH säädettynä arvoon 10,0 natriumhydroksidin (4.3.1) avulla

4.3.3 2-merkaptoetanoli

4.3.4 o-ftaalidialdehydi (OFA)

4.4 **HPLC-eluutioliuottimet**

4.4.1 Eluutioliuottimet on valmistettava HPLC-laatuisia reagensseja käyttäen.

4.4.2 vesi, HPLC-laatua

4.4.3 metanoli, puhtaus tutkittu fluorometrillä

4.4.4 tetrahydrofuraani

4.4.5 natriumdivetyfosfaatti

4.4.6 natriumasetaatti

4.4.7 etikkahappo

5. LAITTEET JA TARVIKKEET

5.1 analyysivaaka, tarkkuus 1 mg, luettavuus 0,1 mg

5.2 dekantterilaseja, tilavuus 25 ja 100 ml

5.3 pipettejä, annokset 1 ja 10 ml

5.4 magneettisekoitin

5.5 mittapipettejä, joilla voi pipetoida annokset 0,2, 0,5 ja 5 ml

5.6 mittapulloja, tilavuus 10, 50 ja 100 ml

5.7 injektioruiskuja, tilavuus 20 ja 100 µl

5.8 ultraäänihaude

5.9 sentrifugi, 27 000 × g

5.10 lasipulloja, tilavuus noin 5 ml

5.11 mittalasi, tilavuus 25 ml

5.12 pH-mittari, tarkkuus 0,1 pH-yksikköä

5.13 HPLC-laite

5.13.1 säädettävä gradientin pumppausjärjestelmä, virtausnopeus 1,0 ml/min 200 barin paineessa

5.13.2 automaattinen näytteenkäsittelijä, jossa voi valmistaa johdannaisia

5.13.3 pylväsuuni, joka pysyy lämpötilassa 30 °C ± 1 °C

5.13.4 fluoresenssidetektori, joka toimii heräteaallonpituudella 330 nm ja emissioaallonpituudella 440 nm

5.13.5 integraattori tai tietojenkäsittelyohjelmisto, jolla pystytään mittaamaan piikkien pinta-aloja

5.13.6 Lichrosphere-100 -kolonni (250 × 4,6 mm) tai vastaava kolonni, joka on pakattu oktadekyylisilaanilla (C 18), hiukkaskoko 5 µm

6. NÄYTTEENOTTO

Näytteet otetaan ISO-standardin 707 mukaisesti.

7. SUORITUS

7.1 **Sisäisen standardiliuoksen valmistus**

7.1.1. Punnitaan 30,0 ±0,1 mg tryptamiinimonohydrokloridia (4.2.3) 100 ml:n mittapulloon (5.6) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1).

7.1.2. Pipetoidaan 1 ml (5.3) tätä liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.6) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1), jotta saadaan 0,15 mM:n tryptamiinipitoisuus.

7.2 **Näyteliuoksen valmistus**

7.2.1 Punnitaan 1,000 ± 0,001 g RMJ:ta 25 ml:n dekantterilasiin (5.2). Lisätään pipetillä 10 ml tislattua vettä (5.3), lämpötila 40 °C ± 1 °C, ja sekoitetaan magneettisekoittimella (5.4) 30 minuutin ajan mahdollisten paakkujen liuottamiseksi.

7.2.2 Pipetoidaan 0,2 ml (5.5) ennastettua maitoa 10 ml:n mittapulloon (5.6), lisätään injektioruiskulla (5,7) 100 µl 0,15 mM:n tryptamiiniliuosta (7.1) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1). Sekoitetaan huolellisesti käännellen ja käsitellään ultraäänellä (5.8) 15 minuutin ajan.

7.2.3 Sentrifugoidaan (5.9) kiihtyvyydellä 27 000 × g 10 minuutin ajan ja kerätään supernatantti neste pieneen lasipulloon (5.10).

Huomautus: Näyteliuos on säilytettävä 4 °C:n lämpötilassa, kunnes HPLC-analyysi suoritetaan.

7.3 **Ulkoisen standardiliuoksen valmistus**

7.3.1 Punnitaan 55,4 mg FEDP:tä (4.1) 50 ml:n mittapulloon (5.6) ja lisätään mittalasilla (5.11) noin 25 ml kloroformia (4.2.2). Kuumennetaan tulpallinen pullo lämpötilaan 50 °C ± 1 °C ja sekoitetaan huolellisesti, kunnes FEDP liukenee. Jäähdytetään pullo 20 °C:n lämpötilaan, täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1) ja sekoitetaan käännellen.

7.3.2 Pipetoidaan (5.3) 1 ml tätä liuosta 100 ml:n mittapulloon (5.6) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1). Pipetoidaan (5.3) 1 ml tätä liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.6), lisätään 100 µl (5.7) 0,15 mM tryptamiiniliuosta (7.1) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1). Sekoitetaan käännellen.

Huomautus: Vertailunäyteliuos on säilytettävä 4 °C:n lämpötilassa, kunnes HPLC-analyysi suoritetaan.

7.4 **Derivointireagenssin valmistus**

Punnitaan 25,0 ± 0,1 mg OFA:ta (4.3.4) 10 ml:n mittapulloon (5.6), lisätään 0,5 ml (5.5) metanolia (4.2.1) ja sekoitetaan huolellisesti OFA:n liuottamiseksi. Täytetään merkkiin boorihappoliuoksella (4.3.2) ja lisätään injektioruiskulla (5.7) 20 µl 2-merkaptoetanolia (4.3.3).

Huomautus: Derivointireagenssi on säilytettävä 4 °C:n lämpötilassa ruskeassa lasipullossa. Se pysyy stabiilina 1 viikon ajan.

7.5 **Määritys HPLC:llä**

7.5.1 *Eluutioliuottimet (4.4)*

Liuotin A: 0,3 mM natriumdivetyfosfaattiliuos ja 3mM natriumasetaattiliuos (pH säädettynä etikkahapolla arvoon 6,5 ±0,1): metanoli:tetrahydrofuraani = 558:440:2 (v/v/v).

Liuotin B: metanoli

7.5.2 *Ehdotettu eluointigradientti:*

Aika (min)	Liuotin A (%)	Liuotin B (%)	Virtausnopeus (ml/min)
Alku	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

Huomautus: Eluointigradientti voi vaatia pieniä muutoksia kuviossa 1 esitetyn erotuskyvyn saamiseksi.

Kolonnin lämpötila: 30 °C.

7.5.3 *Injektiotilavuus: 50 µl derivointireagenssia ja 50 µl näyteliuosta*

7.5.4 *Kolonnin tasapainotus*

Järjestelmä käynnistetään päivittäin. Kolonnia huuhdellaan 100-prosenttisella liuottimella B 15 minuutin ajan, tämän jälkeen asetetaan A:B = 40:60 ja saatetaan tasapainoon virtausnopeuden ollessa 1 ml/min 15 minuutin ajan. Suoritetaan ajo injektoimalla metanolia (4.2.1) sokeakokeeksi.

Huomautus: Jos kolonnia ei aiota käyttää pitkään aikaan, sitä huuhdellaan metanolin ja kloroformin seoksella (80:20 (v/v)) 30 minuutin ajan.

7.5.5 *Määritetään näytteen FS + FE -pitoisuus*

7.5.6 *Suoritetaan kromatografisten analyysien sarja pitäen ajojen välinen aika vakiona vakioisten retentioaikojen saamiseksi. Ulkoista standardiliuosta (7.3) injektoidaan aina 5–10 näyteliuoksen välein vastekertoimen laskemiseksi.*

Huomautus: Kolonni on huuhdeltava 100-prosenttisella liuottimella B (7.5.1) vähintään 30 minuutin ajan aina 20–25 ajon jälkeen.

7.6 **Integrointimenetelmä**

7.6.1 *FEDP-piikki*

FEDP eluoituu yhtenä piikkinä. Määritetään piikin pinta-ala integroimalla laaksosta laaksoon.

7.6.2 *Tryptamiinipiikki*

Tryptamiini eluoituu yhtenä piikkinä (kuvio 1). Määritetään piikin pinta-ala integroimalla laaksosta laaksoon.

7.6.3 *FS- ja FE-piikkiryhmät*

Kuvatuissa olosuhteissa (kuvio 1) FS eluoituu kahtena pääasiallisena, osittain erottumattomana piikkinä, jota edeltää pieni piikki. FE eluoituu kolmena pääasiallisena, osittain erottumattomana piikkinä. Määritetään jokaisen piikkiryhmän kokonaispinta-ala asettaen pohjaviiva kuviossa 1 esitetyllä tavalla.

8. TULOSTEN LASKEMINEN JA ILMOITTAMINEN

Näytteen FS- ja FE-pitoisuus lasketaan kaavasta $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

jossa:

C = näytteen FS- tai FE-pitoisuus (mg/100 g jauhetta)

A_1 = standardinäyteliuoksen (7.3) FEDP-piikin pinta-ala

A_2 = näyteliuoksen (7.2) FS- tai FE-piikin pinta-ala

T_1 = standardinäyteliuoksen (7.3) tryptamiinipiikin pinta-ala

T_2 = näyteliuoksen (7.2) tryptamiinipiikin pinta-ala

9. MENETELMÄN TARKKUUS

Huomautus: Toistettavuusarvot on laskettu kansainvälisen IDF-standardin ([1]) mukaisesti. Uusittavuutta koskeva väliaikainen raja-arvo lasketaan liitteessä III olevan b kohdan mukaisesti.

9.1 **Toistettavuus**

Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama, joka ilmaisee saman henkilön samalla laitteella samoissa olosuhteissa samasta näytteestä lyhyin väliajoin saamien toisistaan riippumattomien määritystulosten vaihtelevuutta, ei saa olla yli 2 % suhteellisesti. Jos näillä edellytyksillä tehdään kaksi määritystä, kahden tuloksen suhteellinen ero saa olla enintään 6 % tulosten aritmeettisesta keskiarvosta.

([1]) Kansainvälinen IDF-standardi 135B/1991. Maito ja maitotuotteet. Tunnusmerkit analyyttisten menetelmien tarkkuudelle. Yhteenveto kollaboratiivisesta tutkimusmenettelystä.

9.2 **Uusittavuus**

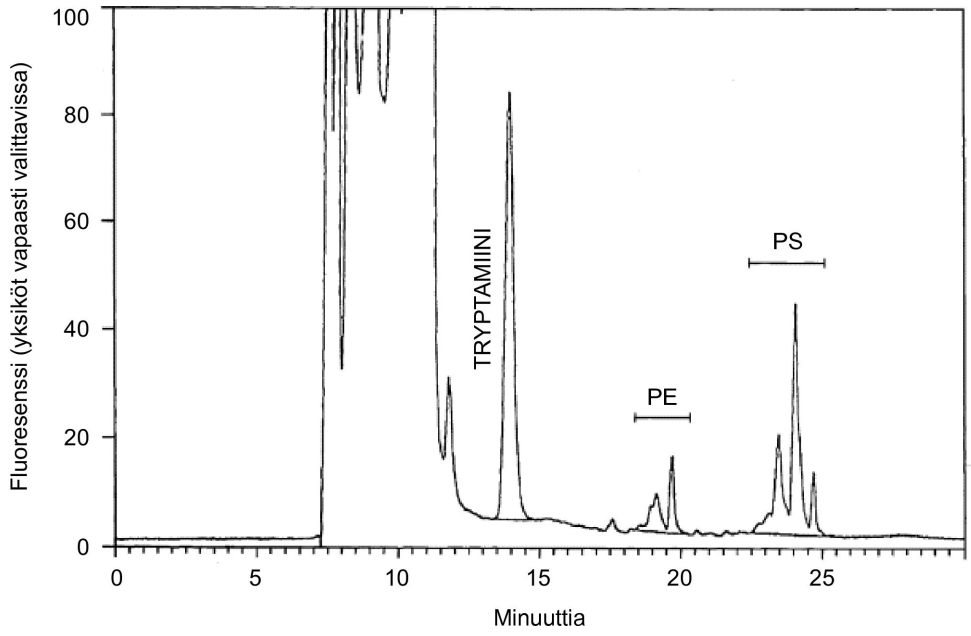
Kun eri henkilöt tekevät eri laboratorioissa eri välineistöillä ja eri olosuhteissa määritykset samasta näytteestä, näiden kahden tuloksen välinen suhteellinen ero saa olla enintään 11 % tulosten aritmeettisesta keskiarvosta.

10. VIITTEET

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).*

Kuva 1

HPLC-kuvio fosfatidyyliseriinin (FS) ja fosfatidyylietanoliamiinin (FE) OFA-johdannaisista ennastetun rasvattoman maitojauheen metanoliuutteessa. Kuviossa esitetään FS-, FE- ja tryptamiini- (sisäinen standardi) piikkien integrointitapa.



LIITE XV

(11 artikla)

ANTIBIOOTTIJÄÄMIEN HAVAITSEMINEN RASVATTOMASSA MAITOJAUHEESSA

Käytetään mikrobi-inhibitioon perustuvaa seulontatestiä, jossa testin mikro-organismina toimiva *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (samanlainen kuin C953-kanta) on riittävän herkkä havaitsemaan 4 µg bentsyylipenisilliiniä maitolitrassa ja 100 µg sulfadimidiiniä maitolitrassa. Kaupallisia testipakkauksia on saatavissa ja niitä voidaan käyttää, jos niillä on vaadittava herkkyys bentsyylipenisilliinille ja sulfadimidiinille.

Testiä varten käytetään ennastettua rasvatonta maitojauhetta (1 g jauhetta + 9 ml tislattua vettä). Testi suoritetaan kuten standardin ISO/TS 26844:2006 Milk and milk products – Determination of antimicrobial residues – Tube diffusion test IDF – Bulletin No 258/1991 1 osan 2 luvussa on kuvattu tai testipakkauksen valmistajan ohjeiden mukaisesti [1].

Positiiviset tulokset tulkitaan seuraavasti:

1. β-laktaamien esiintyminen voidaan varmistaa toistamalla testi lisäämällä penisillinaasia testijärjestelmään [2]:

   Negatiivinen tulos: Inhiboiva aine on β-laktaamiantibiootti.

   Edelleen positiivinen tulos: Inhiboivaa ainetta ei voida tunnistaa tällä menettelyllä; jatka kohdan 2 mukaisesti.

2. Sulfonamidien esiintyminen voidaan varmistaa toistamalla testi lisäämällä p-aminobentsoehappoa testijärjestelmään:

   Negatiivinen tulos: Inhiboiva aine on sulfonamidi.

   Edelleen positiivinen tulos: Inhiboivaa ainetta ei voida tunnistaa tällä menettelyllä; jatka kohdan 3 mukaisesti.

3. β-laktaamin ja sulfonamidin esiintyminen voidaan varmistaa toistamalla testi lisäämällä penisillinaasia + p-aminobentsoehappoa testijärjestelmään:

   Negatiivinen tulos: Inhiboivat aineet ovat β-laktaamiantibiootti ja sulfonamidi.

   Positiivinen tulos: Inhiboivaa ainetta ei voida tunnistaa tällä menettelyllä.

---

(1) Tärkeää huomata: Kun rasvatonta maitojauhetta analysoidaan, voidaan saada vääriä positiivisia tuloksia. Siksi on tärkeää varmistaa, että käytetty testijärjestelmä ei anna vääriä positiivisia tuloksia.

(2) Jotkin ß-laktaamit ovat vähemmän herkkiä ß-laktamaasille. Tällöin suositellaan, että näytteelle tehdään ylimääräinen esikäsittely (1 ml näytettä käsitellään 0,3 ml:lla penisillinaasikonsentraatilla 37 °C:ssa 2 tunnin ajan).

LIITE XVI

(12 artikla)

REHUSEOKSESSA ESIINTYVÄN RASVATTOMAN MAITOJAUHEEN KVANTITATIIVINEN MÄÄRITYS PARA-KASEIININ ENTSYMAATTISELLA KOAGULOINNILLA

1. TARKOITUS

Rehuseoksessa esiintyvän rasvattoman maitojauheen kvantitatiivinen määritys para-kaseiinin entsymaattisella koaguloinnilla.

2. SOVELTAMISALA

Tämä menetelmä sopii rehuseoksille, jotka sisältävät vähintään 10 % rasvatonta maitojauhetta; kirnupiimän ja/tai tiettyjen proteiinien esiintyminen merkittävinä määrinä voi häiritä määritystä.

3. MENETELMÄN PERIAATE

3.1 Rehuseoksen sisältämän kaseiinin saattaminen liukoiseksi natriumsitraattiliuoksella uuttamalla

3.2 Kalsiumionien pitoisuuden säätäminen para-kaseiinin saostamisen edellyttämälle tasolle lisäämällä juoksetetta

3.3 Typpi määritetään saostetusta para-kaseiinista standardissa ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001 kuvatulla Kjeldahl-menetelmällä. Rasvattoman maitojauheen määrän laskeminen perustuu oletukseen, että kaseiinin vähimmäispitoisuus on 27,5 % (ks. 8.1).

4. REAGENSSIT

Käytettävien reagenssien on oltava analyysilaatua. Käytetyn veden on oltava tislattua tai puhtaudeltaan vastaavaa. Juoksetetta (4.5) lukuun ottamatta reagensseissa ja liuoksissa ei saa olla typpipitoisia yhdisteitä.

4.1 trinatriumsitraattidihydraatti (1 % m/v-liuos)

4.2 kalsiumkloridi (noin 5 M liuos).

Liuotetaan 75 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$:ta 100 ml:aan tislattua vettä ravistamalla (huomioidaan eksoterminen reaktio). Annetaan seistä yön yli ja suodatetaan liuos. Säilytetään liuos jääkaapissa.

4.3 natriumhydroksidi, 0,1 N

4.4 kloorivetyhappo, 0,1 N

4.5 nestemäinen vasikan juoksutusmahan uute (aktiivisuus noin 100 IMCU/ml standardin ISO 11815/IDF 157 mukaisesti). Säilytetään jääkaapissa 4–6 °C:ssa.

4.6 reagenssit typen määrittämiseksi kvantitatiivisesti standardissa ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001 kuvatulla Kjeldahl-menetelmällä.

5. LAITTEET JA TARVIKKEET

Tavanomaiset laboratoriovälineet ja erityisesti:

5.1 huhmar tai homogenointimylly

5.2 analyysivaaka, tarkkuus 1 mg, luettavuus 0,1 mg

5.3 pöytäsentrifugi (500 g tai 2 000–3 000 kierrosta minuutissa) varustettuna 50 ml:n sentrifugiputkilla, ja toinen sentrifugi, 2 000 g

5.4 magneettisekoittaja ja 10–15 mm:n sauvat

5.5 dekantterilaseja, 150–200 ml

5.6 kolveja, 250 ml ja 500 ml

5.7 lasisuppiloita, halkaisija 60–80 mm

5.8 tuhkattomia pyöreitä suodatinpapereita, nopea suodatus, halkaisija 150 mm (Whatman N° 41 tai vastaava)

5.9 erikokoisia pipettejä

5.10 vesihaude säädettynä termostaatilla lämpötilaan 37 °C ± 1 °C

5.11 pH-mittari, tarkkuus 0,1 yksikköä

5.12 lämpömittareita, tarkkuus 1 °C

6. SUORITUS

6.1 **Näytteen valmistelu**

Jauhetaan 10–20 g näytettä huhmaressa tai homogenoidaan, kunnes seos on tasainen.

6.2 **Maitojauheen saattaminen liukoiseksi ja liukenemattoman jäännöksen erottaminen**

6.2.1 Punnitaan 1,000 ± 0,002 g hyvin homogenoitua (6.1) rehuseosta suoraan 50 ml:n sentrifugiputkeen. Lisätään 30 ml trinatriumsitraattiliuosta (4.1), joka on ennalta lämmitetty lämpötilaan 45 °C ± 2 °C. Sekoitetaan jauhetta vähintään viiden minuutin ajan magneettisekoittajalla tai voimakkaasti manuaalisesti ravistellen.

6.2.2 Sentrifugoidaan kiihtyvyydellä 500 g (2 000–3 000 kierrosta minuutissa) 10 minuutin ajan ja kaadetaan kirkas supernatantti 150–200 ml:n dekantterilasiin. On varottava, ettei liukenemattomia hiukkasia tule mukaan tässä yhteydessä.

6.2.3 Uutetaan jäännös vielä kaksi kertaa noudattaen samaa menettelyä ja yhdistetään nämä kolme vesiuutetta.

6.2.4 Jos pintaan muodostuu öljykerros, jäähdytetään jääkaapissa kunnes rasvafaasi kovettuu, ja poistetaan se sitten lastalla.

6.3 **Kaseiinin koagulointi juoksetteen entsyymeillä**

6.3.1 Yhdistettyihin vesiuutteisiin (noin 100 ml) lisätään pisaroittain samalla sekoittaen 2 ml kalsiumkloridia (4.2). Säädetään pH-arvoon 6,4–6,5 laimealla NaOH- (4.3) tai HCl (4.4)--liuoksella. Asetetaan liuos 37 °C:n +/– 1 °C termostaattihauteeseen 15–20 minuutiksi suolatasapainon saavuttamiseksi. Tämä nähdään siitä, että liuos muuttuu hieman sameaksi.

6.3.2 Siirretään neste yhteen sentrifugiputkeen ja sentrifugoidaan kiihtyvyydellä 2 000 g 10 minuuttia sakan poistamiseksi. Siirretään supernatantti pohjasakkaa pesemättä toiseen sentrifugiputkeen.

6.3.3 Saatetaan kelluvan nesteen lämpötila 37 °C:seen ± 1 °C. Lisätään uutteeseen pisaroittain sekoitellen 0,5 ml nestemäistä juoksetetta (4.5). Koaguloituminen tapahtuu kahdessa minuutissa.

6.3.4 Näyte laitetaan uudelleen vesihauteeseen ja jätetään 15 minuutiksi lämpötilaan 37 °C ± 1 °C. Näyte otetaan hauteesta ja rikotaan koagulantti sekoitellen. Sentrifugoidaan kiihtyvyydellä 2 000 g 10 minuuttia. Suodatetaan supernatantti sopivan suodatinpaperin läpi (5.8) ja säilytetään suodatinpaperi. Pohjasakka pestään sentrifugiputkessa 50 ml:lla vettä noin 35 °C:ssa pohjasakkaa sekoitellen.

Sentrifugoidaan uudelleen kiihtyvyydellä 2 000 g 10 minuuttia. Suodatetaan supernatantti aikaisemmasta säilytetyn suodatinpaperin läpi.

6.4 **Kaseiinitypen määritys**

6.4.1 Pesun jälkeen pohjasakka siirretään kvantitatiivisesti aikaisemmasta säilytetylle suodatinpaperille (6.3.4) tislatun veden avulla. Kuivattu suodatinpaperi siirretään Kjeldahl-kolviin. Typpipitoisuus määritetään standardissa ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001 kuvatulla Kjeldahl-menetelmällä.

7. SOKEAKOE

7.1 Sokeakoe tehdään järjestelmällisesti suorittamalla mineralisointi standardissa ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001 kuvatulla Kjeldahl-menetelmällä. Tuhkaton suodatinpaperi (5.8) kostutetaan seoksella, jossa on 90 ml natriumsitraattiliuosta (4.1), 2 ml kalsiumkloridiliuosta (4.2), 0,5 ml nestemäistä juoksetetta (4.5), ja pestään 3 × 15 ml:lla tislattua vettä.

7.2 Sokeakokeeseen tarvittava määrä happoa (4.4) on vähennettävä tutkittava näytteen titraukseen käytettävästä happomäärästä.

8. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

8.1 Rehuseoksessa olevan rasvattoman maitojauheen prosenttiosuus lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\% \text{ SMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6{,}38}{27{,}5} \times 100\right) - 2{,}81}{0{,}908}$$

jossa

N = on para-kaseiinin typen prosenttiosuus,

27,5 = on tekijä, jolla muunnetaan määritetty kaseiini rasvattoman maitojauheen prosenttiosuudeksi,

2,81 ja 0,908 ovat regressioanalyysillä saatuja korjaustekijöitä.

9. MENETELMÄN TARKKUUS

9.1 **Toistettavuus**

Kaksoismäärityksen tulosten, jotka sama henkilö on saanut samassa laboratoriossa samalle näytteelle, eron on oltava vähintään 95 %:ssa tutkituista tapauksista enintään 2,3 g rasvatonta maitojauhetta/100 g rehuseosta.

9.2 **Uusittavuus**

Määritystulosten, jotka kaksi laboratoriota on saanut samalle näytteelle, eron on oltava vähintään 95 %:ssa tutkituista tapauksista enintään 6,5 g rasvatonta maitojauhetta/100 g rehuseosta.

10. HUOMAUTUKSET

10.1 Tiettyjen muiden kuin maitoproteiinien ja erityisesti soijaproteiinien lisääminen merkittävinä prosenttiosuuksina aiheuttaa liian suuria tuloksia, jos näitä proteiineja kuumennetaan maitojauheen kanssa; tämä johtuu mainittujen proteiinien saostumisesta yhdessä maidon parakaseiinin kanssa.

10.2 Kirnupiimän lisääminen voi toisinaan johtaa liian pieniin tuloksiin, sillä määritys tehdään ainoastaan rasvattomasta uutteesta. Tietynlaisen happaman kirnupiimän lisääminen voi antaa huomattavan pieniä tuloksia, sillä sen liukeneminen sitraattiliuokseen on epätäydellistä.

10.3 Vähintään 0,5 %:n lesitiinilisäys voi myös johtaa liian pieniin tuloksiin.

10.4 Korkeaan lämpötilaan kuumennetun maitojauheen (high-heat) lisääminen voi antaa liian suuria tuloksia, mikä johtuu tiettyjen heraproteiinien saostumisesta yhdessä maidon para-kaseiinin kanssa.

LIITE XVII

(13 artikla)

TÄRKKELYKSEN OSOITTAMINEN RASVATTOMASTA MAITOJAUHEESTA, DENATUROIDUSTA MAITOJAUHEESTA JA REHUSEOKSISTA

1. SOVELTAMISALA

Tätä menetelmää sovelletaan denaturoiduissa maitojauheissa merkkiaineena käytetyn tärkkelyksen toteamiseksi.

Menetelmän toteamisraja on 0,05 g tärkkelystä noin 100 g:ssa näytettä.

2. PERIAATE

Reaktio perustuu jodometriaan:

— kolloidiset aineet kiinnittävät vapaata jodia vesiliuoksessa,

— tärkkelysmisellit absorboivat jodin, jolloin muodostuu väriä.

3. REAGENSSIT

3.1 Jodiliuos:

— jodi: 1,0 g,

— kaliumjodidi: 2,0 g,

— tislattu vesi: 100 ml,

— liuotetaan 1,0 g jodia ja 2,0 g kaliumjodidia veteen 100 ml:n mittapullossa. Laimennetaan 100 ml:n merkkiin saakka vedellä ja sekoitetaan.

4. LAITTEET JA TARVIKKEET

4.1 analyysivaaka

4.2 kiehuva vesihaude

4.3 koeputkia, 25 × 200 mm

5. SUORITUS

Punnitaan 1,0 g näytettä 0,1 g:n tarkkuudella ja siirretään koeputkeen (4.3).

Lisätään 20 ml tislattua vettä ja ravistetaan näytteen dispergoimiseksi.

Asetetaan kiehuvaan vesihauteeseen (4.2) 5 minuutiksi.

Otetaan vesihauteesta ja annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan.

Lisätään 0,5 ml jodiliuosta (3.1); ravistetaan ja havaitaan saatu väri.

6. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Sininen väri osoittaa natiivitärkkelyksen esiintymisen näytteessä.

Kun näyte sisältää muunnettua tärkkelystä, väri voi olla muu kuin sininen.

7. HUOMAUTUKSET

Väri, värin voimakkuus ja tärkkelyksen mikroskooppinen muoto vaihtelee natiivitärkkelyksen alkuperän (esimerkiksi: maissi tai peruna) ja näytteessä esiintyvän muunnetun tärkkelystyypin mukaisesti.

Kun esiintyy muunnettuja tärkkelyksiä, saatu väri vaihtelee violettiin, punaiseen tai ruskeaan natiivitärkkelyksen kiderakenteen muunnosasteesta riippuen.

LIITE XVIII

(14 artikla)

KUIVATUN KERMAN KOSTEUSPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN

1. SOVELTAMISALA

Tässä liitteessä esitetään menetelmä kuivatun kerman kosteuspitoisuuden määrittämiseksi.

2. ILMAISUT JA MÄÄRITELMÄT

Tätä liitettä sovellettaessa sovelletaan seuraavaa määritelmää:

kosteuspitoisuus: tässä kansainvälisessä standardissa kuvatulla menetelmällä määritetty painohäviö.

Se ilmaistaan massaprosentteina.

3. PERIAATE

Kuivataan näytettä lämpötilassa 102 ± 2 °C, kunnes massa pysyy vakiona, ja punnitaan painohäviön määrittämiseksi.

4. LAITTEET JA TARVIKKEET

Tavalliset laboratoriovälineet ja erityisesti seuraavat:

4.1 analyysivaaka, tarkkuus 1 mg, luettavuus 0,1 mg

4.2 kuivausuuni, jossa on tuuletus ja lämpötilan säätö ja jonka koko työtilan lämpötila pysyy 102 ± 2 °C:ssa

4.3 eksikkaattori, jossa on juuri kuivattua, kosteuden osoittavaa ainetta sisältävää silikageeliä tai muuta tehokasta kuivausainetta

4.4 tasapohjaisia maljoja, korkeus noin 25 mm, halkaisija noin 50 mm, jotka on valmistettu sopivasta materiaalista (esim. lasi, ruostumaton teräs, nikkeli tai alumiini) ja joissa on sopivan kokoiset helposti irrotettavat kannet

4.5 tiiviillä tulpilla varustettuja pulloja laboratorionäytteiden sekoittamista varten

5. NÄYTTEENOTTO

Laboratorion on tärkeää saada aidosti edustava näyte, joka ei ole vahingoittunut eikä muuttunut kuljetuksen tai varastoinnin aikana.

Tässä kansainvälisessä standardissa ei määritellä näytteenottomenetelmää. Suositellaan käytettäväksi standardissa ISO 707|IDF 50 esitettyä näytteenottomenetelmää.

Näyte on säilytettävä olosuhteissa, joissa näyte ei pilaannu eikä koostumus muutu.

6. LABORATORIONÄYTTEEN ESIKÄSITTELY

Sekoitetaan näyte huolellisesti ravistamalla ja kääntelemällä astiaa toistuvasti (tarvittaessa sen jälkeen, kun kaikki näytteet on siirretty ilmatiiviiseen astiaan, joka on riittävän iso tämän vaiheen suorittamiseksi).

Jos tällä menetelmällä näytettä ei saada täysin homogeeniseksi, valmistetusta näytteestä otetaan kaksi annosta (kahta eri määritystä varten) mahdollisimman kaukana toisistaan.

7. SUORITUS

7.1 **Maljan esikäsittely**

7.1.1 Maljaa ja kantta (4.4) kuumennetaan erillään uunissa (4.2), jonka lämpötilan on pysyttävä 102 ± 2 °C:ssa vähintään yhden tunnin ajan.

7.1.2 Maljan päälle asetetaan kansi ja se pannaan eksikkaattoriin (4.3). Annetaan jäähtyä vaakahuoneen lämpötilaan, punnitaan 1 mg:n tarkkuudella ja kirjataan paino 0,1 mg:n tarkkuudella.

7.2 **Näyte**

Siirretään 1–3 g valmistettua näytettä (6) maljaan, pannaan kansi päälle, punnitaan 1 mg:n tarkkuudella ja kirjataan paino 0,1 mg:n tarkkuudella.

7.3 **Määritys**

7.3.1 Irrota kansi ja pane malja kansineen uuniin (4.2), jonka lämpötilaksi on säädetty 102 ± 2 °C vähintään kahden tunnin ajaksi.

7.3.2 Kansi pannaan maljan päälle. Malja kansineen siirretään eksikkaattoriin, annetaan jäähtyä vaakahuoneen lämpötilaan, punnitaan 1 mg:n tarkkuudella ja kirjataan paino 0,1 mg:n tarkkuudella.

7.3.3 Kansi irrotetaan, ja maljaa kansineen lämmitetään uudelleen uunissa yhden tunnin ajan. Toistetaan vaihe 7.3.2.

7.3.4 Toistetaan lämmitystä ja punnitusta, kunnes massa pienenee enintään 1 mg tai kasvaa kahden peräkkäisen punnituksen välillä.

Laskentaa varten valitaan alhaisin kirjattu massa.

8. TULOSTEN LASKEMINEN JA ILMOITTAMINEN

8.1 **Laskenta**

Kosteuspitoisuus, joka ilmaistaan grammoina 100 grammaa kohden, on yhtä suuri kuin:

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

jossa:

m_0 = on maljan ja kannen (7.1.2) massa grammoina;

m_1 = on maljan, kannen ja näytteen massa grammoina ennen kuivaamista (7.2);

m_2 = on maljan, kannen ja näytteen massa grammoina kuivaamisen jälkeen (7.3.4).

Tulos ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

9. TARKKUUS

Huomautus: Toistettavuus- ja uusittavuusarvot on johdettu monilaboratoriotestin tuloksista (ks. Steiger, G. Bulletin of IDF No 285/1993, s. 21–28), joka on tehty standardin IDF 135B:1991. Milk and milk products – Precision characteristics of analytical methods – Outline of collaborative study procedure mukaisesti.

9.1 **Toistettavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka sama henkilö on saanut samassa laboratoriossa lyhyen ajan kuluessa samalla menetelmällä ja samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 0,20g kosteutta / 100g tuotetta.

9.2 **Uusittavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa samalla menetelmällä ja eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 0,40g kosteutta / 100g tuotetta.

10. MÄÄRITYSSELOSTE

Määritysselosteessa on ilmoitettava

— kaikki tiedot, jotka tarvitaan näytteen tunnistamiseksi yksiselitteisesti,

— käytetty näytteenottomenetelmä, jos se on tiedossa,

— käytetty määritysmenetelmä ja viittaus tähän kansainväliseen standardiin,

— kaikki suoritukseen liittyvät tiedot, joita ei mainita tässä kansainvälisessä standardissa tai joita pidetään valinnaisina, sekä tiedot tuloksiin mahdollisesti vaikuttaneista tapahtumista,

saadut tulokset, ja jos toistettavuus on tarkistettu, lopullinen kirjattu tulos.

LIITE XIX

(15 artikla)

HAPPAMAN KIRNUPIIMÄJAUHEEN KOSTEUSPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN

1. SOVELTAMISALA

Alun perin eläinten rehuksi tarkoitetun happaman kirnupiimäjauheen kosteuspitoisuuden määrittäminen.

2. PERIAATE

Näyte kuivataan alipaineessa. Painohäviö todetaan punnitsemalla.

3. LAITTEET JA TARVIKKEET

3.1 analyysivaaka, tarkkuus 1 mg, luettavuus 0,1 mg

3.2 korroosionkestävästä metallista tai lasista valmistettuja maljoja, jotka voidaan sulkea ilmatiiviillä kannella; työtaso, jolle testattava näyte voidaan levittää niin, että sitä on noin 0,3 g/cm^2.

3.3 säädettävä sähkölämmitteinen vakuumilämpökaappi, jossa on öljypumppu ja johon voidaan johtaa kuumaa, kuivaa ilmaa tornista, joka sisältää esimerkiksi kalsiumoksidia tai kalsiumsulfaattia (joihin on lisätty kosteutta ilmaisevaa ainetta)

3.4 eksikkaattori, joka sisältää tehokasta kuivausainetta

3.5 säädettävissä oleva kuivatuskaappi 102 ± 2 °C, jossa on tuuletusjärjestelmä

4. SUORITUS

Kuumennetaan maljaa (3.2) kansineen lämpökaapissa (3.5) vähintään 1 tunnin ajan. Suljetaan astia kannella ja siirretään ne välittömästi eksikkaattoriin (3.4), annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, punnitaan 1 mg:n tarkkuudella ja kirjataan paino 0,1 milligramman tarkkuudella.

Kansi irrotetaan ja siirretään noin 5 grammaa näytettä astiaan, punnitaan 1 milligramman tarkkuudella ja kirjataan massa 0,1 mg:n tarkkuudella. Malja asetetaan kansineen 83 °C:een lämmitettyyn vakuumilämpökaappiin (3.3). Lämpökaapin lämpötilan tarpeettoman laskun välttämiseksi malja viedään uuniin mahdollisimman nopeasti.

Paine säädetään 100 torriksi (13,3 kPa) ja annetaan näytteen kuivua (noin neljän tunnin ajan) tässä paineessa kuumassa, kuivassa ilmavirrassa, kunnes massa pysyy vakiona.

Kuivausaika lasketaan siitä hetkestä, kun lämpökaapin lämpötila on palannut 83 °C:een. Kuivausajan päätyttyä lämpökaapin paine palautetaan varovasti normaalipaineeseen. Lämpökaappi avataan, näyteastia suljetaan välittömästi kannella ja otetaan pois lämpökaapista, annetaan jäähtyä 30–45 minuuttia eksikkaattorissa (3.4), punnitaan 1 milligramman tarkkuudella ja kirjataan paino 0,1 mg:n tarkkuudella. Näytteen annetaan kuivua vielä 30 minuuttia vakuumikuivauskaapissa (3.3) 83 °C:ssa, minkä jälkeen punnitaan uudelleen. Toistetaan lämmitystä ja punnitusta, kunnes astian ja kannen yhteismassa pienenee enintään 1 mg tai kasvaa kahden peräkkäisen punnituksen välillä. Laskentaa varten valitaan alhaisin kirjattu massa.

5. LASKENTA

Kosteusprosentti = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %

jossa

m_0 on maljan ja kannen massa;

m_1 on maljan, kannen ja näytteen massa ennen kuivaamista;

m_2 on maljan, kannen ja näytteen massa kuivaamisen jälkeen.

Tulos kirjataan tarkkuudella 0,1 g / 100 g.

6. TARKKUUS

6.1 **Toistettavuusraja**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka sama henkilö on saanut samassa laboratoriossa lyhyen ajan kuluessa samalla menetelmällä ja samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 0,4 g vettä / 100 g kirnupiimäjauhetta.

6.2 **Uusittavuusraja**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa samalla menetelmällä ja eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 0,6 g vettä / 100 g hapanta kirnupiimäjauhetta.

6.3 **Tarkkuustietojen lähde**

Tarkkuutta koskevat tiedot määritettiin vuonna 1995 suoritetusta koejärjestelystä, johon osallistui kahdeksan laboratoriota ja kaksitoista näytettä (kuusi sokeakokeen kaksoisnäytettä).

LIITE XX

(16 artikla)

VERTAILUMENETELMÄ MAITORASVAN PUHTAUDEN MÄÄRITTÄMISEKSI TRIGLYSERIDIEN KAASUKROMATOGRAFISEN MÄÄRITYKSEN AVULLA – VERSIO 2

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Tässä standardissa esitetään vertailumenetelmä maitorasvan puhtauden määrittämiseksi triglyseridien kaasukromatografisen määrityksen avulla. Sillä voidaan havaita sekä kasvirasvat että eläinrasvat, kuten naudantali ja ihra.

Maitorasvan puhtaus määritetään tiettyjä triglyseridiyhtälöitä käyttäen. Menetelmää sovelletaan naudan irtomaitoon tai siitä valmistettuihin tuotteisiin riippumatta naudan rodusta, ruokinnasta tai maidonerityksestä. Vääriä positiivisia tuloksia voidaan saada ainoastaan, jos ruokinnassa käytetään paljon puhtaita kasvirasvoja, kuten rypsiöljyä. Yksittäisistä lehmistä saadut maitotuotteet voivat myös antaa väärän positiivisen tuloksen.

Menetelmää sovelletaan erityisesti sellaisista maitotuotteista uutettuun rasvaan, joiden väitetään sisältävän puhdasta maitorasvaa muuttumattomassa koostumuksessa, kuten voihin, kermaan, maitoon ja maitojauheeseen. Maitorasvan tekninen käsittely, kuten kolesterolin poisto, tai fraktioiminen voivat antaa väärän positiivisen tuloksen. Tämä pätee myös rasvattomasta maidosta tai kirnupiimästä saatuun maitorasvaan. Menetelmää ei voida aina soveltaa juustosta uutettuun rasvaan, koska kypsymisprosessi voi vaikuttaa rasvan koostumukseen niin voimakkaasti, että saadaan väärä positiivinen tulos.

Huomautus 1: Koska voihappoa eli n-butaanihappoa (C_4) esiintyy yksinomaan maitorasvassa, sen avulla voidaan tehdä kvantitatiivisia arvioita pienistä ja keskisuurista maitorasvapitoisuuksista kasvi- ja eläinrasvoissa. Vieraista rasvoista on kuitenkin vaikea saada kvalitatiivista ja kvantitatiivista tietoa silloin kun puhtaaseen maitorasvaan on lisätty enintään 20 % vierasta rasvaa; tämä johtuu siitä, että maitorasvan C_4-pitoisuus likimääräisessä prosentuaalisessa massafraktiossa vaihtelee suuresti, kun rasvaa on 3,1–3,8 % [1].

Huomautus 2: Kvantitatiivisia tuloksia ei voida käytännössä johtaa kasvirasvojen sterolipitoisuudesta, koska ne vaihtelevat tuotanto- ja käsittelyolosuhteiden mukaan. Vieraan rasvan kvalitatiivinen määritys steroleja käyttäen on vielä tulkinnanvaraisempaa.

2. MÄÄRITELMÄ

Maitorasvan puhtaus: maitorasvassa ei ole kasvi- ja eläinrasvoja tässä standardissa esitetyllä menetelmällä määritettynä.

Huomautus: Puhtaus määritellään käyttäen S-arvoja, jotka lasketaan triglyseridikoostumuksesta. Triglyseridimassafraktiot ilmaistaan prosenttiosuuksina.

3. MENETELMÄN PERIAATE

Maidosta tai maitotuotteista uutettu rasva analysoidaan kaasukromatografisesti käyttämällä pakattua tai lyhyttä kapillaarikolonnia hiiliatomien kokonaismäärän perusteella erottuvien triglyseridien määrittämiseksi. S-arvot lasketaan sijoittamalla erikokoisten rasvamolekyylien (C_{24}–C_{54}; vain parilliset C-luvut) prosenttiosuutena ilmaistu massafraktio sopiviin triglyseridiyhtälöihin. Jos puhtaalle maitorasvalle vahvistetun S-arvon rajat ylittyvät, vieraan rasvan esiintyminen on osoitettu.

Huomautus 1: Sekä pakattujen että kapillaarikolonnien soveltuvuus ja vastaavuus on osoitettu aiemmin [2–4].

Huomautus 2: S-arvo on triglyseridien massafraktioiden summa kerrottuna tietyillä kertoimilla.

4. REAGENSSIT

Kaikkien reagenssien on oltava tunnustettua analyysilaatua.

4.1 kantajakaasu: typpeä tai vaihtoehtoisesti heliumia tai vetyä, puhtausaste vähintään 99,995 %

4.2 rasvastandardeja maitorasvastandardin vakiointiin 7.3.3 kohdan mukaisesti

4.2.1 triglyseridistandardeja, tyydyttyneitä; sopivia tuotteita on saatavilla kaupallisesti.

4.2.2 kolesterolistandardi

4.3 metanoli (CH_3OH), vedetön

4.4 n-heksaani ($CH_3(CH_2)4CH_3$)

4.5 n-heptaani ($CH_3(CH_2)5CH_3$)

4.6 muita kaasuja, vetyä, puhtausaste vähintään 99,995 %, vailla orgaanisia epäpuhtauksia (C_nH_m < 1 µl/l); synteettistä ilmaa, vailla orgaanisia epäpuhtauksia (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7 vedetöntä natriumsulfaattia (Na_2SO_4)

5. LAITTEET JA TARVIKKEET

Tavalliset laboratoriovälineet ja erityisesti seuraavat:

5.1 **Korkean lämpötilan kaasukromatografi**

Korkean lämpötilan kaasukromatografin on oltava sellainen, että se soveltuu vähintään 400 °C:n lämpötiloihin ja on varustettu liekki-ionisaatiodetektorilla (FID). Injektorissa käytettävien tiivisteiden on oltava sellaisia, että ne kestävät korkeita lämpötiloja ja vuotavat erittäin vähän. Kapillaarikaasukromatografissa käytetään kolonniin liitettyä injektoria. Kolonnin sekä injektorin ja/tai detektorin (tapauksen mukaan) liittämiseksi on aina käytettävä grafiittitiivisteitä.

5.2 **Kromatografiakolonni**

5.2.1 *Pakattu kolonni*

Käytetään lasikolonnia, jonka sisähalkaisija on 2 mm ja pituus 500 mm ja joka on pakattu stationaarifaasilla 3 % OV-1, 125–150 µm (100–120 mesh) Gas ChromQ:ssa [1]. Pakatun kolonnin valmistelu, silylointi, pakkaaminen ja esikäsittely kuvataan liitteessä A.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kapillaarikolonnia (5.2.2).

5.2.2 *Kapillaarikolonni*

Käytetään lyhyttä (esim. 5 m) kapillaarikolonnia, jossa on pooliton stationaarifaasi, joka kestää vähintään 400 °C:n lämpötilaa [2]. Kolonni vakioidaan tekemällä maitorasvaliuokselle (7.2) 20 määritystä 2–3 päivän aikana kohdassa 7.3.4.2 esitetyin säädöin. Sen jälkeen vastekerrointen (7.3.3) tulee olla lähes 1 ja alle 1,20.

Huomautus: Voidaan käyttää muunkokoisia kolonneja, joissa on erilainen pooliton, korkeita lämpötiloja kestävä faasi, kunhan niiden suoritus on tämän standardin mukainen. Ks. myös kohta 7.3.4.2.

5.3 extrelut-kolonni, 1–3 ml, jossa on silikageeliä, maitorasvan uuttamiseksi ainoastaan kohdan 7.1.3 mukaisesti

5.4 grafiittitiivisteitä, jotka kestävät vähintään 400 °C:n lämpötilaa; käytetään kaasukromatografikolonnin liittämiseksi sekä injektorin ja/tai detektorin insertteihin

5.5 vesihaude, joka voidaan pitää lämpötilassa 50 °C ± 2 °C.

5.6 uuni, joka toimii lämpötilassa 50 °C ± 2 °C ja 100 °C ± 2 °C

5.7 mikrolitrapipetti

[1] Esimerkki sopivasta saatavilla olevasta kaupallisesta tuotteesta. Tuote mainitaan tämän kansainvälisen standardin käyttäjille vain esimerkkinä, ei mainoksena.

[2] CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) on esimerkki kaupallisesti saatavilla olevasta sopivasta tuotteesta. Tuote mainitaan tämän kansainvälisen standardin käyttäjille vain esimerkkinä, ei mainoksena.

5.8 mittapipetti, 5 ml

5.9 kolvi, 50 ml

5.10 erlenmeyerpullo, nimellistilavuus 250 ml

5.11 suppilo

5.12 suodatinpaperi, jossa on pieni huokoskoko

5.13 pyöröhaihduttaja

5.14 ampulleja, 1 ml, joissa on polytetrafluorieteeni-tiivisteellä varustettu alumiininen puristettu tai kierretulppa

5.15 injektioruiskuja, joiden mäntä ei ulotu neulan kärkeen (kaasukromatografia pakattua kolonnia käyttäen)

Huomautus: Näillä ruiskuilla saadaan parempi toistettavuustulos.

5.16 Analyysivaaka, tarkkuus 1 mg, luettavuus 0,1 mg

6. NÄYTTEENOTTO

Laboratorion on saatava edustava näyte, joka ei ole vahingoittunut eikä muuttunut kuljetuksen tai varastoinnin aikana.

Tässä kansainvälisessä standardissa ei määritellä näytteenottomenetelmää. Suositellaan käytettäväksi standardissa ISO 707IDF 50 [5] esitettyä näytteenottomenetelmää.

7. SUORITUS

7.1 **Laboratorionäytteen esikäsittely**

Laboratorionäytteen esikäsittelyä varten käytetään jotakin seuraavista kolmesta maitorasvan uuttamismenetelmästä.

7.1.1 *Voin tai voiöljyn eristäminen*

Sulatetaan 50–100 g näytettä 50 °C:ssa käyttäen vesihaudetta (5.5) tai uunia (5.6). Pannaan 0,5–1,0 g natriumsulfaattia (4.7) taitettuun suodatinpaperiin (5.12). Esikuumennetaan 250 ml:n erlenmeyerpullo (5.10) ja suodatinpaperilla varustettu suppilo (5.11) uunissa (5.6), jonka lämpötilaksi on säädetty 50 °C. Suodatetaan sulaneen näytteen rasvakerros siten, että esikuumennettu pullo ja suodatinpaperilla varustettu suppilo ovat uunissa. Varotaan, ettei heraa siirry.

Vain silloin kun näytettä on saatavilla rajattu määrä, voidaan käyttää pienempää näytettä, ja menetelmää on mukautettava vastaavasti. Pienempää näytettä käsiteltäessä on kuitenkin suurempi vaara saada ei-edustava näyte.

Huomautus 1: Voi voidaan valmistaa kermasta kirnuamalla ja pesemällä voirakeet.

Huomautus 2: Menetelmällä 7.1.1 saatu maitorasva ei sisällä juuri lainkaan fosfolipidejä.

7.1.2 *Uuttaminen Röse–Gottliebin gravimetrisellä menetelmällä*

Rasvafraktio uutetaan näytteestä jossakin seuraavista standardeista kuvatulla gravimetrisellä menetelmällä: ISO 1211IDF 001D, ISO 2450IDF 016C tai ISO 7328IDF 116A.

Huomautus: Jos saadussa maitorasvassa on fosfolipidejä, saadaan noin 0,1 % suurempi kolesterolipiikki. Ne eivät siten vaikuta mainittavasti triglyseridien koostumukseen, joka vakioidaan 100 %:iin kolesteroli mukaan luettuna.

7.1.3 *Uuttaminen maidosta silikageelikolonnin avulla*

Mikrolitrapipetillä (5.7) annostellaan 0,7 ml 20 °C:n lämpötilaan lämmitettyä näytettä 1–3 ml:n Extrelut-kolonniin (5.2). Maidon annetaan levitä tasaisesti silikageelin päälle noin 5 minuutin ajan.

Valkuais-lipidikompleksit denaturoidaan lisäämällä mittapipetillä (5.8) Extrelut-kolonniin 1,5 ml metanolia (4.3). Tämän jälkeen rasvafraktio uutetaan näytteestä 20 ml:lla *n*-heksaania (4.4). *n*-heksaani lisätään hitaasti pieninä erinä. Eluaatti kerätään 50 ml:n kolviin (5.9), joka on etukäteen kuivattu tunnettuun vakiomassaan, joka punnitaan 1 mg:n tarkkuudella ja kirjataan 0,1 mg:n tarkkuudella.

Uuttamisen jälkeen kolonnin annetaan valua tyhjäksi. Liuottimet tislataan eluaatista pyöröhaihduttimen (5.13) avulla vesihauteessa 40–50 °C:n lämpötilassa. Kun liuottimet on tislattu, kolvi kuivataan ja punnitaan sisältöineen 1 mg:n tarkkuudella ja massa kirjataan 0,1 mg:n tarkkuudella. Rasvamassamäärä määritetään vähentämällä saadusta massasta kuivatun tyhjän kolvin massa.

Huomautus: Rasvan uuttaminen Gerber-, Weibull–Berntrop- tai Schmid–Bondzynski–Ratzlaff-menetelmällä taikka maitorasvan eristäminen detergenteillä (BDI-menetelmä) ei sovellu triglyseridimääritykseen, koska näissä menetelmissä rasvafaasiin voi joutua suurehkoja määriä osittaisia glyseridejä tai fosfolipidejä. Sen vuoksi tätä kansainvälistä standardia voidaan soveltaa tiettyihin tuotteisiin, erityisesti juustoihin, vain rajallisesti.

7.2 **Näyteliuoksen valmistaminen**

Kaasukromatografiaa varten valmistetaan 5 %:*n* (tilavuusosuus) liuos kohdan 7.1 mukaisesti saadusta rasvasta n-heksaaniin (4.4) tai *n*-heptaaniin (4.5). Kolonnin koon mukaan käytetään 1 %:*n* pitoisuutta (leveä halkaisija, 0,53 mm ID) tai alhaisempaa, jos kyseessä on suora injektio kapillaarikolonniin.

Määritetään näyteainekseen lisättävän liuottimen (4.4 tai 4.5) määrä käytetyn kolonnin ja kohdan 7.1.3 mukaisesti saadun rasvamassan perusteella, joka punnitaan 1 mg:n tarkkuudella ja kirjataan 0,1 mg:n tarkkuudella. Liuotetaan jäljelle jäävä aines täydellisesti.

Siirretään noin 1 ml näyteliuosta ampulliin (5.14).

7.3 **Triglyseridien kromatografinen määritys**

7.3.1 *Perusviivan ryömintä*

Perusviivan nousun minimoimiseksi kolonni on vakioitava kohdassa 5.2.2 (kapillaarikolonni) tai liitteessä A.4 (pakattu kolonni) esitetyllä tavalla.

Huomautus: Kolonnin korkean lämpötilan vuoksi perusviivan nousu voi häiritä erityisesti niiden triglyseridien määrityksessä, joissa on pitkät hiiliketjut.

7.3.2 *Injektiotekniikka*

7.3.2.1 Pakattu kolonni

Jotta triglyseridit eivät erottuisi eri tavalla, sovelletaan kuumainjektiomenettelyä, jolla myös saadaan parempia kvantitatiivisia tuloksia, kun on kyse korkeassa lämpötilassa kiehuvista triglyseridikomponenteista. Neula täytetään ilmalla imemällä rasvaliuos ruiskuun. Työnnetään neula injektiolaitteeseen. Lämmitetään neulaa ennen injektiota noin 3 sekunnin ajan. Tämän jälkeen ruiskun sisältö injektoidaan nopeasti.

7.3.2.2 Kapillaarikolonni

Kun käytetään kylmää on-column-injektiota (7.3.4.2), ruiskun neula työnnetään injektioporttiin ja injektoidaan välittömästi. Neula ei saa viipyä injektioportissa niin kauan, että liuotinpiikkiin jää häntä.

Huomautus: Optimaalinen viipymisaika on noin 3 sekuntia.

7.3.3 *Kalibrointi*

7.3.3.1 Yleistä

Näytteiden kalibroimiseksi tehdään joka päivän aluksi 2–3 vakioidun maitorasvan määritystä. Vakioidun maitorasvan viimeistä määritystä käytetään triglyseridien ja kolesterolin vastekertoimien RF_{si} (massafraktio/pinta-alafraktio) määrittämiseksi; näitä vastekertoimia sovelletaan seuraaviin näytteisiin (ks. 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

jossa

w_{si} on vakioidun maitorasvan kunkin triglyseridin tai kolesterolin massafraktio prosentteina ilmaistuna,

A_{si} on vakioidun maitorasvan kunkin triglyseridin tai kolesterolin piikin pinta-alan numeerinen arvo.

Jotta saataisiin vakioitua maitorasvaa, jonka triglyseridikoostumus on tunnettu, käytetään joko kohdassa 7.3.3.2 tai 7.3.3.3 esitettyä standardia.

7.3.3.2 Kaupallinen maitorasvastandardi

Paras tapa määrittää näytteen kaikkien komponenttien vastekertoimet on käyttää vakioitua maitorasvaa, jonka triglyseridikoostumus on sertifioitu.

Huomautus: Soveltuva standardi on CRM 519 (vedetön maitorasva), jota voi ostaa Geelissä (Belgia) sijaitsevasta vertailumateriaalien ja -mittausten tutkimuslaitoksesta (IRMM) ([1]).

7.3.3.3 Laboratoriossa tehty maitorasvastandardi

Valmistetaan noin 1 g rasvastandardien seosta (ks. kohta 4.2, sisältää vähintään tyydyttyneitä triglyseridejä: C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48}, C_{54} ja kolesteroli sekä mielellään myös C_{50} ja C_{52}) punnitsemalla 1 mg:n tarkkuudella ja kirjaamalla massa 0,1 mg:n tarkkuudella, jotta saadaan maitorasvan kaltainen suhteellinen triglyseridikoostumus.

Analysoidaan toistaen rasvastandardiseosliuosta *n*-heksaanissa (4.4) tai *n*-heptaanissa (4.5) kohdan 7.3.4 mukaisesti. Analysoidaan toistaen samassa määrityssarjassa keskimääräisen koostumuksen omaavaa maitorasvaa.

Määritetään rasvastandardiseoksesta triglyseridien vastekertoimet. Niiden triglyseridien, joita seoksessa ei ole, vastekertoimet voidaan määrittää interpoloimalla. Saatuja vastekertoimia sovelletaan maitorasvaan vakioidun koostumuksen saamiseksi. Näin saatu vakioitu maitorasva säilyy useita vuosia, jos se säilytetään typpiatmosfäärissä enintään – 18 °C:ssa.

7.3.4 *Kromatografiset olosuhteet*

Huomautus: Pakattuja kolonneja tai kapillaarikolonneja käytettäessä tuloksena on yleensä kuvan 1 kaltainen erotus. Parillisten triglyseridien eriytymistä ei yleensä esiinny, ja sitä on vältettävä.

7.3.4.1 Pakattu kolonni

a) Lämpötilaohjelma: Säädetään uunin alkulämpötilaksi 210 °C. Pidetään tässä lämpötilassa 1 minuutin ajan, minkä jälkeen nostetaan lämpötilaa 6 °C minuutissa 350 °C:een. Tätä (lopullista) lämpötilaa pidetään 5 minuutin ajan.

b) Detektorin ja injektorin lämpötila: 370 °C

c) Kantajakaasu: typpi, tasainen virtausnopeus noin 40 ml/min. Kantajakaasuvirtaus on säädettävä tarkasti siten, että C_{54} eluoituu 341 °C:ssa.

d) Määrityksen kesto: 29,3 min

e) Injektiotilavuus: 0,5 µl 5-prosenttista (tilavuusosuus) näyteliuosta

([1]) Esimerkki sopivasta saatavilla olevasta kaupallisesta tuotteesta. Tuote mainitaan tämän kansainvälisen standardin käyttäjille vain esimerkkinä, ei mainoksena.

Jos triglyseridimäärityksiä ei tehdä, pidetään a alakohdassa esitetty uunin alkulämpötila, b alakohdassa esitetty detektorin ja injektorin lämpötila sekä c alakohdassa esitetty kantajakaasun virtausnopeus tasaisena, myös öisin, viikonloppuisin ja juhlapyhien ajan. Näin varmistetaan kolonnin optimaalinen toiminta.

7.3.4.2 Kapillaarikolonni

a) Lämpötilaohjelma: Säädetään uunin alkulämpötilaksi 80 °C. Pidetään tässä lämpötilassa 0,5 minuutin ajan, minkä jälkeen nostetaan lämpötilaa 50 °C minuutissa 190 °C:een ja sitten 6 °C minuutissa 350 °C:een. Tätä (lopullista) lämpötilaa pidetään 5 minuutin ajan.

b) Detektorin lämpötila: 370 °C

c) Kantajakaasu: typpi, tasainen virtausnopeus noin 3 ml/min

d) Määrityksen kesto: 34,4 min

e) Injektiotilavuus: 0,5 µl 1-prosenttista (tilavuusosuus) näyteliuosta.

Säilytetään optimaalisen toiminnan varmistamiseksi (ks. 7.3.4.1) nämä asetukset silloinkin, kun määrityksiä ei tehdä.

Kohdassa 7.3.4.2 esitetyt asetukset soveltuvat käytettäviksi kohdassa 5.2.2 esitetyissä halkaisijaltaan leveissä kolonneissa (0,53 mm ID). Muita asetuksia voidaan soveltaa, jos käytetään muunkokoisia tai -faasisia kolonneja.

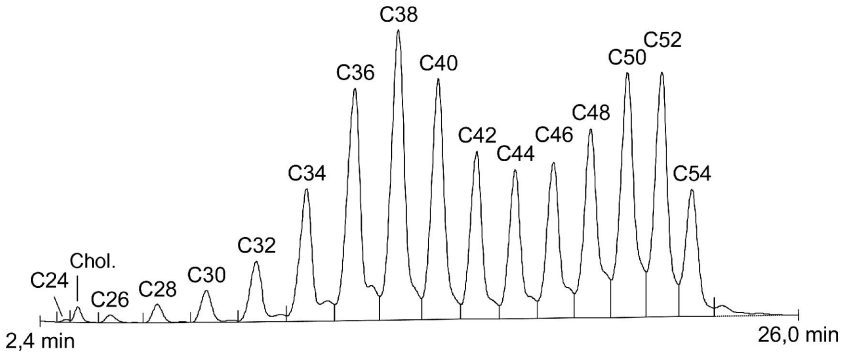
8. INTEGROINTI, ARVIOINTI JA ANALYYTTISEN SUORITUSKYVYN KONTROLLOINTI

Kromatografin piikit arvioidaan integraattorilla, joka voi piirtää perusviivan ja suorittaa uudelleenintegroinnin. Kuvassa 1 esitetään oikein integroitu kromatogrammi, ja kuvassa 2 esiintyy C_{54}:n jälkeen päättyvässä perusviivassa satunnainen virhe, joka vaikuttaa kaikkien triglyseridien prosenttiosuuksiin. Arvioinnissa ei kuitenkaan tule ottaa huomioon C_{54}:n jälkeen eluoituvia piikkejä.

Triglyseridit, joiden asyyli-C-luku on pariton ($2n + 1$), yhdistetään edeltävään parilliseen triglyseridiin ($2n$). Alhaisia C_{56}-pitoisuuksia ei oteta huomioon. Muiden triglyseridien (kolesteroli mukaan luettuna) pinta-alojen prosenttiosuudet kerrotaan vastaavilla vakioidun maitorasvan vastekertoimilla (viimeinen kalibrointi) ja normalisoidaan 100 prosenttiin kohdan 9.1 mukaisesti.

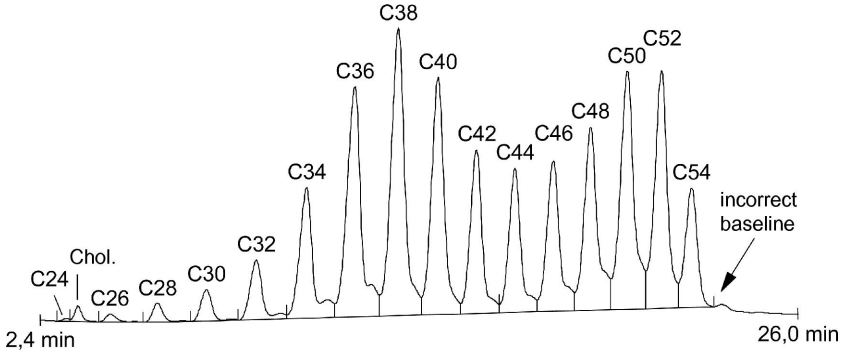
Kuva 1

Esimerkki maitorasvan triglyseridien kromatogrammista, jonka perusviiva on oikein



Kuva 2

Esimerkki maitorasvan triglyseridien kromatogrammista, jonka perusviiva on väärin perusviiva väärin



Mittausolosuhteiden tarkistamiseksi verrataan vaihtelukertoimia taulukossa 1 esitettyihin eri triglyseridien prosenttiosuuksina ilmaistuihin vaihtelukertoimiin, jotka on laskettu saman maitorasvan 19 peräkkäisen analyysin perusteella.

Jos vaihtelukertoimet ovat huomattavasti taulukossa esitettyjä arvoja suuremmat, kromatografiset olosuhteet eivät ole asianmukaiset.

Huomautus: Taulukossa 1 annetut arvot eivät ole sitovia. Niitä voidaan käyttää laadunvalvonnassa ohjeellisina.

Jos kuitenkin hyväksytään korkeampia vaihtelukertoimia, on noudatettava 10 kohdassa esitettyjä toistettavuutta ja uusittavuutta koskevia raja-arvoja.

Taulukko 1

Triglyseridipitoisuuksien vaihtelukertoimet (19 peräkkäistä analyysiä)

Triglyseridi	Vaihtelukerroinprosentti
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. TULOSTEN LASKEMINEN JA ILMOITTAMINEN

9.1 **Triglyseridikoostumus**

9.1.1 *Laskenta*

Lasketaan kunkin triglyseridin (ts. C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52} ja C_{54}) sekä kolesterolin massafraktio w_i, ilmaistuna prosenttiosuutena näytteen triglyseridien kokonaispitoisuudesta seuraavalla yhtälöllä:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum (A_1 \times RF_{si})} \times 100 \qquad (2)$$

jossa

A_i on näytteen kunkin triglyseridin piikin pinta-alan numeerinen arvo,

RF_{si} on kunkin triglyseridin kalibroimalla (7.3.3) määritetty vastekerroin.

9.1.2 *Testitulosten ilmoittaminen*

Tulos ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

9.2 **S-arvot**

9.2.1 *Laskenta*

9.2.1.1 Prosentteina ilmaistut S-arvot lasketaan sijoittamalla asianomaisten triglyseridien prosenttiosuuksien w_i (9.1.1) kaavoihin 3–7. Kaikkia kaavoja käytetään riippumatta siitä, minkä vieraan rasvan esiintymistä epäillään.

9.2.1.2 Soijapapu-, auringonkukka-, oliivi-, rapsinsiemen-, pellavansiemen-, vehnänalkio-, maissinalkio-, puuvillansiemen- ja kalaöljy

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3 Kookos- ja palmunydinrasva

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4 Palmuöljy ja naudantali

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5 Ihra

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6 Yleisyhtälö

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2 *Testitulosten ilmoittaminen*

Tulos ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

9.3 **Vieraiden rasvojen toteaminen**

Verrataan kohdan 9.2.1 mukaisesti saatua viittä *S*-arvoa taulukon 2 vastaaviin *S*-arvoihin.

Jos kaikki viisi *S*-arvoa ovat taulukossa 2 mainittujen rajojen sisäpuolella, näytettä pidetään puhtaana maitorasvana. Jos jokin *S*-arvo on vastaavien rajojen ulkopuolella, näytteessä katsotaan olevan vierasta rasvaa.

Vaikka yksittäiset yhtälöt 3–6 ovat herkempiä eräille vieraille rasvoille kuin yleisyhtälö 7 (ks. taulukko B.1), vieraan rasvan tyypistä ei voida tehdä johtopäätöstä vain yhdellä yhtälöistä 3–6 saadun positiivisen tuloksen perusteella.

Liitteessä B kuvataan menetelmä, jolla lasketaan kasvi- tai eläinrasvan pitoisuus muunnetussa maitorasvassa. Menetelmää ei ole validoitu, joten se on vain ohjeellinen.

Taulukko 2

Puhtaan maitorasvan *S*-arvot

Vieras rasva	Yhtälö	*S*-arvot [a]
Soijapapu-, auringonkukka-, oliivi-, rapsinsiemen-, pellavansiemen-, vehnänalkio-, maissinalkio-, puuvillansiemen- ja kalaöljy	(3)	98,05–101,95
Kookos- ja palmunydinrasva	(4)	99,42–100,58
Palmuöljy ja naudantali	(5)	95,90–104,10
Ihra	(6)	97,96–102,04
Yleisyhtälö	(7)	95,68–104,32

[a] Laskettu 99 %:n luottamustasolla, joten vieraan rasvan lisääminen on todennäköistä vain, jos asianomaisen yhtälön toteamisrajat ylittyvät (ks. taulukko B.1).

10. TARKKUUS

10.1 **Monilaboratoriotesti**

Toistettavuus- ja uusittavuusarvot on määritelty puhdasta maitorasvaa käyttäen kaavojen 3–7 perusteella, eikä niitä välttämättä voi soveltaa muihin kuin tässä esitettyihin matriiseihin.

10.2 **Toistettavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka sama henkilö on saanut samassa laboratoriossa lyhyen ajan kuluessa samalla menetelmällä ja samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin taulukossa 3 esitetty raja-arvo.

Taulukko 3

Toistettavuuden raja-arvot (*r*) kaavoille 3–7

Vieras rasva	Yhtälö	r %
Soijapapu-, auringonkukka-, oliivi-, rapsinsiemen-, pellavansiemen-, vehnänalkio-, maissinalkio-, puuvillansiemen- ja kalaöljy	(3)	0,67
Kookos- ja palmunydinrasva	(4)	0,12
Palmuöljy ja naudantali	(5)	1,20
Ihra	(6)	0,58
Yleisyhtälö	(7)	1,49

10.3 **Uusittavuus**

Kahden yksittäisen testituloksen, jotka eri henkilöt ovat saaneet eri laboratorioissa samalla menetelmällä mutta eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille, absoluuttinen ero saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin taulukossa 4 esitetty raja-arvo.

Taulukko 4

Uusittavuuden raja-arvot (R) kaavoille 3–7

Vieras rasva	Yhtälö	R %
Soijapapu-, auringonkukka-, oliivi-, rapsinsiemen-, pellavansiemen-, vehnänalkio-, maissinalkio-, puuvillansiemen- ja kalaöljy	(3)	1,08
Kookos- ja palmunydinrasva	(4)	0,40
Palmuöljy ja naudantali	(5)	1,81
Ihra	(6)	0,60
Yleisyhtälö	(7)	2,07

11. MITTAUSTEN EPÄVARMUUS

Toistettavuuden (*r*) ja uusittavuuden (*R*) avulla voidaan laskea *S*-arvolle laajennettu epävarmuus.

Kun laajennettu epävarmuus (rinnakkaismääritysten perusteella) sisällytetään taulukon *S*-arvoihin, tuloksena ovat laajennetut *S*-arvot, jotka esitetään taulukossa 5.

Taulukko 5

Puhtaan maitorasvan laajennetut *S*-arvot laajennettu epävarmuus huomioon otettuna

Vieras rasva	Yhtälö	Laajennetut *S*-arvot
Soijapapu-, auringonkukka-, oliivi-, rapsinsiemen-, pellavansiemen-, vehnänalkio-, maissinalkio-, puuvillansiemen- ja kalaöljy	(3)	97,36–102,64
Kookos- ja palmunydinrasva	(4)	99,14–100,86
Palmuöljy ja naudantali	(5)	94,77–105,23
Ihra	(6)	97,65–102,35
Yleisyhtälö	(7)	94,42–105,58

12. MÄÄRITYSSELOSTE

Määritysselosteen on sisällettävä

— kaikki tiedot, jotka tarvitaan näytteen täydelliseksi tunnistamiseksi,

— käytetty näytteenottomenetelmä, jos se on tiedossa,

— käytetty määritysmenetelmä ja viittaus tähän kansainväliseen standardiin,

— kaikki suoritukseen liittyvät tiedot, joita ei mainita tässä kansainvälisessä standardissa tai joita pidetään valinnaisina, sekä tiedot tuloksiin mahdollisesti vaikuttaneista tapahtumista.

— saadut tulokset, ja jos toistettavuus on tarkistettu, lopullinen kirjattu tulos.

LIITE A

(pakollinen)

PAKATUN KOLONNIN ESIKÄSITTELY

A.1 REAGENSSIT JA LAITTEET

A.1.1 **tolueeni** ($C_6H_5CH_3$)

A.1.2 **dimetyylidikloorisilaaniliuos** [$Si(CH_3)_2Cl_2$]

Liuotetaan 50 ml dimetyylidikloorisilaania 283 ml:aan tolueenia (A.1.1).

A.1.3 **kaakaovoiliuos**, jossa on 5 % kaakaovoita (massafraktio) n-heksaanissa (4.4) tai n-heptaanissa (4.5).

A.1.4 **stationaarifaasi**, 3 % OV-1 125–150 µm (100–120 mesh) Gas ChromQ ([1]).

Huomautus: Raekoon ilmaisemisessa on siirrytty mikrometriin standardin BS 410 (kaikki osat)[6] mukaisesti.

A.1.5 **lasikolonni**, sisähalkaisija 2 mm ja pituus 500 mm, U:n muotoinen.

A.1.6 **laite** pakatun kolonnin täyttämistä varten

A.1.6.1 *täyttöpylväs*, jonka päissä on kierretulpat ja jossa on stationaarifaasin täyttökorkeutta osoittava merkki

A.1.6.2 *tiheä seula* (reikien koko noin 100 µm), jossa on kierretulppa, joka kiinnittyy lasikolonniin kuvassa A.3 esitetyllä tavalla

A.1.6.3 *silanoitua lasivillaa*, deaktivoitua

A.1.6.4 *tärytin*, jolla varmistetaan stationaarifaasin tasainen jakautuminen täytön aikana

A.1.6.5 *silanointilaitteisto* kolonnin lasipinnan silanoimiseksi

A.1.6.6 *Wulffin pullo*

A.1.6.7 *vesi-imupumppu*

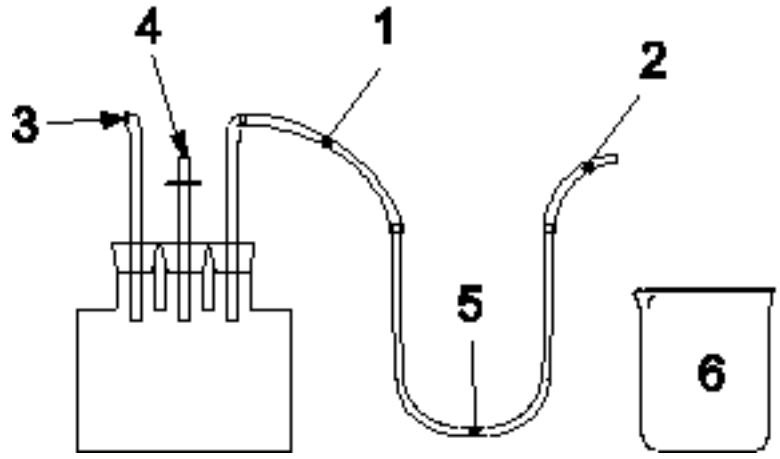
A.2 SILANOINTI (LASIPINNAN DEAKTIVOINTI)

Kun Wulffin pullo (A.1.6.6) on liitetty vesi-imupumppuun (A.1.6.7), letku 2 upotetaan (ks. kuva A.1) dimetyylidikloorisilaaniliuokseen (A.1.2). Kolonni (A.1.5) täytetään liuoksella sulkemalla sulkuhana. Avataan sulkuhana uudestaan ja poistetaan molemmat letkut. Kolonni kiinnitetään telineeseen ja täytetään kokonaan dimetyylidikloorisilaaniliuoksella (A.1.2) käyttäen pipettiä.

([1]) Esimerkki sopivasta saatavilla olevasta kaupallisesta tuotteesta. Tuote mainitaan tämän kansainvälisen standardin käyttäjille vain esimerkkinä, ei ISO:n tai IDF:n suorittamana mainostuksena.

Kuva A.1

Silanointilaite



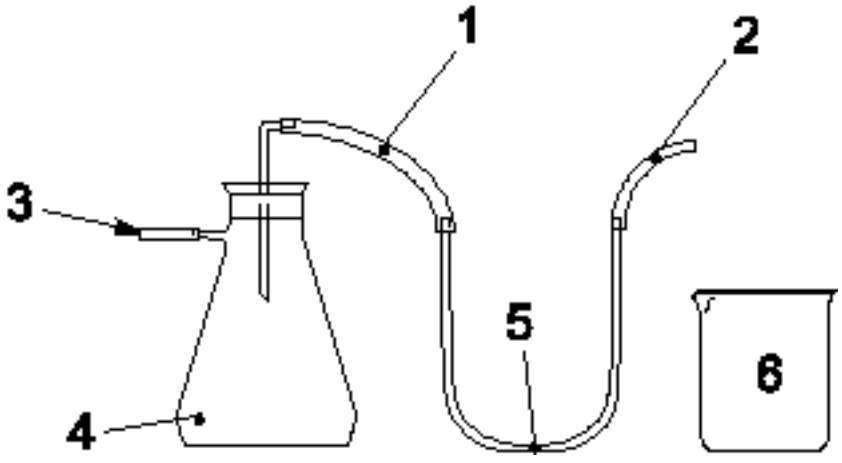
Selitykset:

1. letku 1
2. letku 2
3. vesi-imupumppu
4. sulkuhana
5. lasikolonni
6. dimetyylidikloorisilaani ja tolueeni.

Kolonnin annetaan seistä 20–30 minuuttia. Wulffin pullon tilalle vaihdetaan suodatinpullo. Kolonni tyhjennetään liittämällä se vesi-imupumppuun (A.1.6.7) (ks. kuva A.2). Tyhjennettyä kolonnia huuhdellaan useaan kertaan 75 ml:lla tolueenia (A.1.1) ja 50 ml:lla metanolia (4.3) upottamalla letku 2 liuottimeen. Huuhdeltua kolonnia kuivataan uunissa (5.6) 100 °C:n lämpötilassa noin 30 minuuttia.

Kuva A.2

Huuhtelulaite



Selitykset:

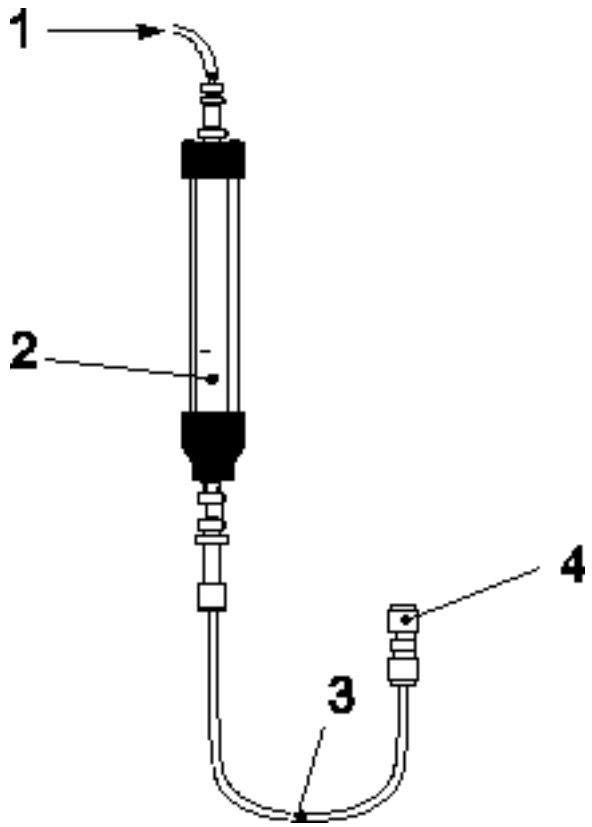
1. letku 1
2. letku 2
3. vesi-imupumppu
4. suodatinpullo
5. lasikolonni
6. huuhteluaine.

A.3 TÄYTTÖ

Kolonni täytetään kuvassa A.3 esitetyllä laitteella. Täyttökolonni (A.1.6.1) täytetään stationaarifaasilla (A.1.4) merkkiin asti. Täytettävän lasikolonnin alapäähän työnnetään noin 1 cm:n pituinen tiivis silanoitu lasivillatulppa. Kolonnin pää suljetaan tiheällä seulalla (A.1.6.2).

Kuva A.3

Lasikolonnin täyttö



Selitykset:

1. typen sisääntulo
2. täyttökolonni, täytetään merkkiin OV-1:llä
3. täytettävä lasikolonni
4. suodattimella varustettu kierretulppa, jota vasten lasikuitu ja stationaarifaasi painetaan.

Kolonni täytetään stationaarifaasilla paineen alaisena (300 kPa ja typpivirtaus). Tärytintä siirrellään edestakaisin lasikolonnia pitkin, jotta kolonni täyttyisi yhtenäisesti, kauttaaltaan ja tiiviisti. Täytön jälkeen pakatun kolonnin toiseen päähän painetaan tiivis silanoitu lasivillatulppa (A.1.6.3). Putkesta esiintulevat kuidut leikataan pois. Tulppaa työnnetään sisään päin muutama millimetri käyttäen spaattelia.

A.4 KOLONNIN ESIVALMISTELU

Saastumisen välttämiseksi kolonnin loppupäätä ei kiinnitetä detektoriin vaiheiden a–c aikana. Täytetty kolonni (A.3) käsitellään seuraavasti:

a) huuhdellaan kolonnia typellä 15 minuuttia virtausnopeudella 40 ml/min kaasukromatograafin uuni säädettynä 50 °C:een;

b) kuumennetaan kolonni 1 °C/min lämpötilaan 355 °C typen virtausnopeuden ollessa 10 ml/min;

c) pidetään kolonni 355 °C:ssa 12–15 tuntia;

d) injektoidaan kahdesti 1 µl kaakaovoiliuosta (A.1.3) käyttäen kohdassa 7.3.4.1 esitettyä pakatun kolonnin lämpötilaohjelmaa.

Huomautus: Kaakaovoi koostuu lähes yksinomaan korkeassa lämpötilassa kiehuvista triglyserideistä C_{50}–C_{54}, joten kolonnin valmistelu on helpompaa vastaavien vastekerrointen osalta.

e) injektoidaan 20 kertaa 0,5 µl maitorasvaliuosta (7.2) 2–3 päivän ajan käyttäen kohdassa 7.3.4.1 esitettyä pakattua kolonnia koskevia asetuksia.

— Näytteiden määritystä varten on käytettävä ainoastaan sellaisia kolonneja, joiden vastekertoimet ovat liki 1. Vastekertoimet eivät saa olla suurempia kuin 1,20.

LIITE B

(ohjeellinen)

VIERAAN RASVAN PITOISUUDEN KVANTIFIOIMINEN

B.1 YLEISTÄ

Taulukossa B.1 esitetään erilaisten vieraiden rasvojen toteamisrajat, jotka on laskettu 99 %:n luottamustasolla. Keskimmäisessä sarakkeessa esitetään kaavoista 3–6 parhaan yksittäisen yhtälön toteamisrajat.

Oikeanpuoleisessa sarakkeessa esitetyt yleisyhtälön 7 toteamisrajat ovat hieman korkeammat. Periaatteessa yhtälöä 7 tarvitaan vain vieraan rasvan kvantifioimiseksi.

Kaikilla kaavoilla voidaan todeta myös eri vieraiden rasvojen yhdistelmiä. Yhdenlaisen vieraan rasvan yksittäisten näytteiden väliset triglyseridipitoisuuksien vaihtelut eivät vaikuta merkittävästi toteamisrajoihin.

Kun käytetään sekä yksittäisiä kaavoja että yleisyhtälöä, sovelletaan yksittäisten yhtälöiden toteamisrajoja. Joissakin tapauksissa (B.2) kvantifiointiin tarvitaan kuitenkin yleisyhtälön *S*-arvoa.

Taulukko B.1

99 %:n luottamustasolla lasketut maitorasvaan lisätyn vieraan rasvan toteamisrajat prosenttiosuuksina

Vieras rasva	Yksittäinen yhtälö %	Yleisyhtälö %
Soijaöljy	2,1	4,4
Auringonkukkaöljy	2,3	4,8
Oliiviöljy	2,4	4,7
Kookosöljy	3,5	4,3
Palmuöljy	4,4	4,7
Palmunydinrasva	4,6	5,9
Rypsiöljy	2,0	4,4
Pellavansiemenöljy	2,0	4,0
Vehnänalkioöljy	2,7	6,4
Maissinalkioöljy	2,2	4,5
Puuvillansiemenöljy	3,3	4,4
Ihra	2,7	4,7
Naudantali	5,2	5,4
Kovetettu kalaöljy	5,4	6,1

B.2 LASKENTA

Vieraan rasvan kvantitatiivinen määritys tehdään vain, jos vähintään yksi *S*-arvoista (taulukko 2 tai 5) ylittyy. Kvantitatiivisen tiedon saamiseksi näytteestä lasketaan prosenttiosuutena ilmaistava vieraan rasvan tai vieraan rasvan seoksen massafraktio w_f, seuraavalla yhtälöllä:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (B.1)$$

jossa

S on tulos, joka saadaan kun maitorasvan, johon on lisätty vierasta rasvaa tai vieraan rasvan seosta, triglyseridejä koskevat tiedot sisällytetään johonkin yhtälöistä 3–7,

S_f on vakio, joka riippuu lisätyn vieraan rasvan tyypistä.

Jos lisätyn vieraan rasvan tyyppiä ei tiedetä, käytetään yleistä S_f-arvoa 7,46 (taulukko B.2). Jos jonkin muun yhtälön kuin yhtälön 7 *S*-arvo ylittyy, yhtälöstä 7 satua *S*-arvoa tulee aina käyttää, vaikka sen *S*-arvot eivät ylittyisikään.

Kun kyseessä ovat tunnetut vieraat rasvat, sijoitetaan niiden S_f-arvot (taulukko B.2) yhtälöön (B.1). Valitaan yhtälöistä 3–6 asianomainen vieraan rasvan yhtälö *S*-arvon laskemiseksi.

Taulukko B.2

Eräiden vieraiden rasvojen S_f-arvot

Vieras rasva	S_f
Tuntematon	7,46
Soijaöljy	8,18
Auringonkukkaöljy	9,43
Oliiviöljy	12,75
Kookosöljy	118,13
Palmuöljy	7,55
Palmunydinöljy	112,32
Rypsiöljy	3,30
Pellavansiemenöljy	4,44
Vehnänalkioöljy	27,45
Maissinalkioöljy	9,29
Puuvillansiemenöljy	41,18
Ihra	177,55
Naudantali	17,56
Kalaöljy	64,12

B.3 TESTITULOSTEN ILMOITTAMINEN

Testitulos ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

Kirjallisuutta

1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, s. 82–85

2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, s. 16–17

3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, s. 265–270

4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, s. 791–797

5) ISO 707IDF 50, Milk and milk products – Guidance on sampling

6) BS 410:1988, Test sieves – Technical requirements and testing

7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, s. 219–242

8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol.*, 93, 1991, s. 538–544

9) DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis]

10) Commission of the European Communities: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93

11) Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, s. 505–510.

LIITE XXI

(18 artikla)

MENETTELY, JOTA ON SOVELLETTAVA, KUN KEMIALLISTEN ANALYYSIEN TULOKSET OVAT KIISTANALAISIA

1. Uusi analyysi tehdään valmistajan pyynnöstä toisessa toimivaltaisen viranomaisen hyväksymässä laboratoriossa asianmukaisella menetelmällä, jos tuotteesta on saatavilla sinetöityjä rinnakkaisnäytteitä ja jos ne on asianmukaisesti varastoitu toimivaltaisten viranomaisten tiloihin. Pyyntö on tehtävä seitsemän työpäivän kuluessa ensimmäisen analyysin tulosten toimittamisesta. Analyysi on tehtävä 21 työpäivän kuluessa pyynnöstä. Toimivaltainen viranomainen toimittaa nämä näytteet toiseen laboratorioon valmistajan pyynnöstä ja tämän kustannuksella. Laboratorion on oltava virallisten analyysien suorittamiseen hyväksytty laboratorio ja todistetusti pätevä kyseessä olevan analyysin suorittamiseen.

2. Laboratoriossa 1 toistettujen mittausten $\bar{y}_1$ keskiarvon $n_1$ja laboratoriossa 2 toistettujen mittausten $\bar{y}_2$ keskiarvonn$_2$ laajennetut epävarmuudet (k = 2) ovat:

3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ ja $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$, jossa σ_r on menetelmän toistettavuuden standardipoikkeama ja σ_R uusittavuuden standardipoikkeama. Jos laboratoriomittausten lopputulos y lasketaan kaavalla $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ tai $y = x_1/x_2$, epävarmuuden määrittämiseksi on sovellettava tällaisissa tapauksissa noudatettavia menetelmiä standardipoikkeamien yhdistämiseksi.

4. Sen testaamiseksi, ovatko kahden laboratorion tulokset menetelmän uusittavuuden standardipoikkeaman σ_R mukaisia, lasketaan erotuksen $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$ laajennettu epävarmuus seuraavasti:

5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Jos laboratorioiden keskiarvojen erotuksen absoluuttinen arvo $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ ei ole suurempi kuin sen epävarmuus $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

kahden laboratorion tulokset ovat uusittavuuden standardipoikkeaman σ_r mukaisia, ja kahden laboratorion keskiarvojen aritmeettinen keskiarvo

$$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2},$$

ilmoitetaan lopullisena tuloksena. Sen laajennettu epävarmuus on

$$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Erä on hylättävä sillä perusteella, että se ei ole ylemmän lakisääteisen raja-arvon UL mukainen, jos

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} > \text{UL};$$

muutoin sen katsotaan olevan raja-arvon UL mukainen.

Erä on hylättävä sillä perusteella, että se ei ole alemman lakisääteisen raja-arvon LL mukainen, jos

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} < \text{LL};$$

muutoin sen katsotaan olevan raja-arvon LL mukainen.

Jos laboratorioiden keskiarvojen erotuksen absoluuttinen arvo $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ on suurempi kuin sen epävarmuus $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

kahden laboratorion tulokset eivät ole uusittavuuden standardipoikkeaman mukaisia.

Jos toinen analyysi vahvistaa ensimmäisen, erä on hylättävä sillä perusteella, että se on vaatimustenvastainen. Muutoin erä katsotaan vaatimustenmukaiseksi.

Toimivaltaisen viranomaisen on toimitettava lopullinen tulos valmistajalle mahdollisimman pian. Toisesta analyysistä aiheutuvista kustannuksista vastaa valmistaja, jos erä hylätään.

LIITE XXII

VASTAAVUUSTAULUKKO

Asetus (EY) N:o 213/2001	Tämä asetus
1 artikla	1 artikla
2 artikla	1 artikla
3 artikla	2 artikla
—	3 artikla
4 artikla	—
5 artikla	—
6 artikla	4 artikla
7 artikla	18 artikla
8 artikla	—
9 artikla	5 artikla
10 artikla	6 artikla
11 artikla	7 artikla
12 artikla	8 artikla
13 artikla	9 artikla
14 artikla	10 artikla
15 artikla	11 artikla
16 artikla	12 artikla
17 artikla	13 artikla
—	14 artikla
18 artikla	15 artikla
19 artikla	16 artikla
	17 artikla
	19 artikla
20 artikla	—
21 artikla	—
22 artikla	20 artikla
23 artikla	21 artikla