**Käesolev dokument on vaid dokumenteerimisvahend ja institutsioonid ei vastuta selle sisu eest**

►**B** **KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 273/2008,**

**5. märts 2008,**

**millega kehtestatakse nõukogu määruse (EÜ) nr 1255/1999 üksikasjalikud rakenduseeskirjad piima ja piimatoodete analüüsimise ning kvaliteedi hindamise meetodite kohta**

(ELT L 88, 29.3.2008, lk 1)

Muudetud:

| | | Euroopa Liidu Teataja | | |
|---|---|---|---|---|
| | | nr | lehekülg | kuupäev |
| ►**M1** | Komisjoni rakendusmäärus (EL) nr 565/2013, 18. juuni 2013 | L 167 | 26 | 19.6.2013 |

▼B

**KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 273/2008,**

**5. märts 2008,**

**millega kehtestatakse nõukogu määruse (EÜ) nr 1255/1999 üksikasjalikud rakenduseeskirjad piima ja piimatoodete analüüsimise ning kvaliteedi hindamise meetodite kohta**

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 17. mai 1999. aasta määrust (EÜ) nr 1255/1999 piima- ja piimatooteturu ühise korralduse kohta, ([1]) eriti selle artikleid 10 ja 15 ning artikli 26 lõiget 3, artikli 29 lõiget 1 ja artikli 31 lõiget 4,

ning arvestades järgmist:

(1) Komisjoni määruses (EÜ) nr 213/2001 ([2]) sätestatakse nõukogu määruse (EÜ) nr 1255/1999 üksikasjalikud rakenduseeskirjad seoses piima ja piimatoodete analüüsimise ning kvaliteedi hindamise meetoditega. Analüüsimeetodite tehnilise arengu arvessevõtmiseks tuleb teha olulisi muudatusi. Selguse ja tõhususe huvides ning seoses muudatuste arvu ja tehnilise laadiga tuleb määrus (EÜ) nr 213/2001 kehtetuks tunnistada ja asendada uue määrusega.

(2) Piima ja piimatoodete koostist ja kvaliteeti on vaja kontrollida, et tagada määrusega (EÜ) nr 1255/1999 kehtestatud korras ette nähtud nõuete täpne täitmine.

(3) Kõnealuste vastavustõendamiste standardmeetoditeks on sageli meetodid, mille on avaldanud sellised rahvusvahelised organisatsioonid nagu Euroopa Standardikomitee (CEN), Rahvusvaheline Piimandusföderatsioon (IDF), Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (ISO) ja Analüütilise Keemia Laboratooriumides Töötavate Pädevate Keemikute Rahvusvahelise Assotsiatsioon (AOAC International), kes neid meetodeid ka korrapäraselt ajakohastavad. Mõnel juhul on kehtestatud ühenduse standardmeetod, kuid muudel juhtudel ei ole ühenduse eeskirjadega standardmeetodit määratletud. Standardmeetodite ühtse kohaldamise tagamiseks tuleks koostada standardmeetodite loetelu ning näha ette, et komisjon kohandab nimetatud loetelu vastavalt vajadusele.

(4) Tavapäraste meetodite kasutamist ei peaks eeskirjadega keelama. Seepärast tuleks määratleda nende kasutamise miinimumtingimused.

(5) Samuti tuleks kehtestada ühine kord, et tagada analüüsitulemuste hindamise, asjaomaste toodete organoleptilise hindamise ning vaidlustatud tulemuste uuesti läbivaatamise ühetaolisus.

([1]) EÜT L 160, 26.6.1999, lk 48. Määrust on viimati muudetud määrusega (EÜ) nr 1152/2007 (ELT L 258, 4.10.2007, lk 3). Määrus (EÜ) nr 1255/1999 asendatakse 1. juulil 2008 määrusega (EÜ) nr 1234/2007 (ELT L 299, 16.11.2007, lk 1).

([2]) EÜT L 37, 7.2.2001, lk 1.

▼B

(6) Mõnede analüüside jaoks ei ole praegu rahvusvaheliselt tunnustatud valideeritud standardmeetodeid ning seetõttu ei ole teavet eri laborites saadud analüüsitulemuste erinevuste kohta. Seepärast tuleks kehtestada ühenduse meetodid, mis oleksid valideeritud vastavalt rahvusvaheliselt kehtestatud eeskirjadele ning mida kasutataks standardmeetoditena.

(7) Komisjoni määrusega (EÜ) nr 1898/2005 ([1]) on kehtestatud üksikasjalikud eeskirjad nõukogu määruse (EÜ) nr 1255/1999 rakendamiseks seoses koore, või ja kontsentreeritud või realiseerimisega ühenduse turul ning nähakse teatavatel asjaoludel ette koore, või ja kontsentreeritud või märgistamine, et tagada nende toodete korrektne lõppkasutus. Märgistamine on kava nõuetekohaseks toimimiseks oluline. Selles osalevate ettevõtjate võrdse kohtlemise tagamiseks tuleb kehtestada ühised meetodid mõne kõnealuse märgistusaine kindlaksmääramiseks.

(8) Määruse (EÜ) nr 1255/1999 artikli 9 alusel võib eraladustusabi anda lambapiimast valmistatud juustude jaoks. Nimetatud toodetele võib anda eritoetust nimetatud määruse artikli 31 alusel. Lamba-, kitse- ja pühvlipiimast või lamba-, kitse- ja pühvlipiima segust valmistatud juustu võib teatavatest kolmandatest riikidest importida ühendusse sooduskorra alusel. Eelnevaid sätteid silmas pidades on tarvis asjakohaseid kontrolle, millega tagatakse, et asjaomastesse toodetesse ei oleks lisatud lehmapiima. Seetõttu tuleks kehtestada ühenduse standardmeetod lehmapiima kindlakstegemiseks, ilma et see piiraks tavapäraste meetodite kasutamist, kui need vastavad teatavatele kriteeriumidele.

(9) Vastavalt komisjoni 10. oktoobri 1990. aasta määrusele (EMÜ) nr 2921/90 lõssist kaseiini ja kaseinaatide tootmiseks antava abi kohta ([2]) tuleb kindlaks teha kolibakterite puudumine. Rahvusvaheliselt aktsepteeritud standardmeetodid kolibakterite kindlakstegemiseks piimas ja piimatoodetes on esitatud standardis ISO 4831. Ühenduse standardmeetod kolibakterite kindlakstegemiseks on kehtestatud eespool nimetatud standardi alusel.

(10) Nõukogu 23. juuli 1987. aasta määruses (EMÜ) nr 2658/87 tariifi- ja statistikanomenklatuuri ning ühise tollitariifistiku kohta ([3]) on ette nähtud erinevad tollimaksumäärad tariifirubriiki nr 2309 kuuluvate segasöötade jaoks, sõltuvalt nende piimatoodete sisaldusest. Kõnealuste eeskirjade ühtse kohaldamise tagamiseks tuleks laktoosisisalduse kindlakstegemiseks kehtestada üldiselt tunnustatud analüüsimeetod kohustuslikuks kasutamiseks kõigis liikmesriikides.

([1]) ELT L 308, 25.11.2005, lk 1. Määrust on viimati muudetud määrusega (EÜ) nr 1546/2007 (ELT L 337, 21.12.2007, lk 68).

([2]) EÜT L 279, 11.10.1990, lk 22. Määrust on viimati muudetud määrusega (EÜ) nr 1487/2006 (ELT L 278, 10.10.2006, lk 8).

([3]) EÜT L 256, 7.9.1987, lk 1. Määrust on viimati muudetud komisjoni määrusega (EÜ) nr 1352/2007 (ELT L 303, 21.11.2007, lk 3).

▼B

(11) Määruse (EÜ) nr 1255/1999 alusel peavad sekkumiseks ette nähtud või ja lõssipulber ning loomatoiduks ette nähtud lõssipulber vastama teatavatele kvaliteedinõuetele. Nende nõuete täitmise kontrollimiseks tuleks kehtestada standardmeetodid.

(12) Teatavad meetodid võetakse käesoleva määrusega kasutusele esmakordselt. Pärast käesoleva määruse jõustumist tuleks laboritele anda piisavalt aega nende uute meetodite nõuetekohaseks rakendamiseks ja kasutuselevõtuks. Kui standardeid arendav organisatsioon on I lisas osutatud standardmeetodi läbi vaadanud ja avaldanud, tuleks laboritele anda kuus kuud aega oma analüütiliste meetodite ajakohastamiseks, et viia need uue standardiga vastavusse.

(13) Käesoleva määrusega ette nähtud meetmed on kooskõlas piima- ja piimatooteturu korralduskomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

I PEATÜKK

**ÜLDSÄTTED**

*Artikkel 1*

**Sisu ja rakendusala**

1. Käesolevas määruses sätestatakse määrusega (EÜ) nr 1255/1999 kehtestatud piima- ja piimatooteturu ühise korralduse jaoks ette nähtud korras kasutatavad piima ja piimatoodete keemilise, füüsikalise ja mikrobioloogilise analüüsi ning organoleptilise hindamise standardmeetodid ning nende meetodite kasutamise eeskirjad.

2. Käesoleva määruse I lisas on esitatud nende standardmeetodite loetelu, mida kasutatakse lõikes 1 osutatud analüüside tegemisel.

3. Komisjon ajakohastab loetelu määruse (EÜ) nr 1255/1999 artiklis 42 sätestatud korras.

*Artikkel 2*

**Tavapärased meetodid**

Ühenduse eeskirjadega nõutavaid analüüse võib teha seni kasutatud meetoditega juhul, kui need on õigesti kalibreeritud ja nende tulemusi kontrollitakse korrapäraselt standardmeetodiga. Tulemusi võrreldakse, võttes arvesse süstemaatilist viga, korratavust ja reprodutseeritavust.

Vaidluse korral on otsustavad standardmeetodi abil saadud tulemused.

Liikmesriigid teavitavad komisjoni tavapäraste meetodite kasutamisest artiklis 1 osutatud analüüside tegemisel.

▼B

II PEATÜKK

**ANALÜÜSIMEETODID**

*Artikkel 3*

**Tootepartii sätestatud piirnormidele vastavuse hindamine**

Muudel juhtudel kui märgistusainete analüüs kohaldatakse koostise kohta sätestatud piirnormidele vastavuse kindlakstegemisel käesoleva määruse II lisa.

*Artikkel 4*

**Organoleptiline hindamine**

1. Liikmesriigid kasutavad piima ja piimatoodete (v.a riiklikuks ladustamiseks ette nähtud või) organoleptilise hindamise standardmeetodina standardit IDF 99C:1997 või muid võrreldavaid meetodeid, millest nad teavitavad komisjoni.

Organoleptilise analüüsi puhul kasutatakse hindajate töö ja tulemuste usaldusväärsuse kontrollimiseks III lisas kirjeldatud korda.

2. Riiklikuks ladustamiseks ette nähtud või organoleptilisel hindamisel kasutatakse hindajate töö ja saadud tulemuste usaldusväärsuse kontrollimiseks III lisas kirjeldatud korda.

Organoleptilise hindamise standardmeetodina kasutatakse IV lisas esitatud analüüsimeetodit.

*Artikkel 5*

**Märgistusained**

1. Või, võiõli ja koore enanthappe triglütseriidi sisalduse määramise standardmeetodina kasutatakse V lisas esitatud analüüsimeetodit.

2. Kontsentreeritud või, või ja koore vanilliinisisalduse määramise standardmeetodina kasutatakse VI lisas esitatud analüüsimeetodit.

3. Kontsentreeritud või ja või ß-apo-8'-karoteenhappe etüülestri sisalduse määramise standardmeetodina kasutatakse VII lisas esitatud analüüsimeetodit.

4. Või ja kontsentreeritud või ß-sitosterooli- või stigmasteroolisisalduse määramise standardmeetodina kasutatakse VIII lisas esitatud analüüsimeetodit.

5. Kontsentreeritud või, või ja koor on märgistatud vastavalt kehtivatele ühenduse eeskirjadele, kui saadud tulemused vastavad V lisa punktides 10 ja 11 ning VI, VII ja VIII lisa punktis 8 esitatud spetsifikatsioonidele.

*Artikkel 6*

**Lehmapiima kaseiini tuvastamine**

1. Selle tagamiseks, et juust, mis peaks olema valmistatud üksnes lamba-, kitse- või pühvlipiimast või lamba-, kitse- ja pühvlipiima segust, ei sisaldaks lehmapiima kaseiini, kasutatakse IX lisas esitatud analüüsi standardmeetodit.

▼B

Lehmapiima kaseiini lisandit peetakse tõendatuks, kui analüüsitavas proovis on lehmapiima kaseiini sama palju või rohkem kui IX lisas kehtestatud standardproovis, mis sisaldab 1 % lehmapiima.

2. Tavapäraseid meetodeid lehmapiima kaseiini tuvastamiseks lõikes 1 osutatud juustudes võib kasutada tingimusel, et:

a) avastamispiir on 0,5 % või väiksem;

b) valepositiivseid tulemusi ei esine ja

c) lehmapiima kaseiin on nõutava tundlikkusega tuvastatav isegi pärast pikka laagerdusaega, mis võib esineda tavalistes kaubandustingimustes.

Kui mõni eespool nimetatud nõuetest ei ole täidetud, tuleb kasutada IX lisas esitatud standardmeetodeid.

*Artikkel 7*

**Kolibakterite tuvastamine**

Kolibakterite tuvastamiseks võis, lõssipulbris, kaseiinis ja kaseinaatides kohaldatakse X lisas esitatud standardmeetodit.

*Artikkel 8*

**Laktoosisisalduse määramine**

Kombineeritud nomenklatuuri CN-koodi 2309 alla kuuluvate toodete laktoosisisalduse määramiseks kasutatakse XI lisas esitatud standardmeetodit.

*Artikkel 9*

**Laabivadaku tuvastamine**

1. Riiklikuks ladustamiseks ette nähtud lõssipulbris sisalduva laabivadaku tuvastamiseks kasutatakse XII lisas kehtestatud standardmeetodit.

2. Loomasöödana kasutamiseks ette nähtud lõssipulbris ja selle segudes sisalduva laabivadaku tuvastamiseks kasutatakse XII lisas esitatud standardmeetodit. Laabivadaku tuvastamisel tuleb rakendada XIII lisa.

*Artikkel 10*

**Petipiima tuvastamine**

Lõssipulbris sisalduva petipiima tuvastamiseks kasutatakse XIV lisas esitatud standardmeetodit.

*Artikkel 11*

**Mikroobivastaste ainete jääkide tuvastamine**

Mikroobivastaste ainete jääkide tuvastamiseks lõssipulbris kasutatakse XV lisas esitatud standardmeetodit.

▼B

*Artikkel 12*

**Lõssipulbrisisalduse määramine**

Segasöötade lõssipulbrisisaldus määratakse XVI lisas esitatud standardmeetodiga.

*Artikkel 13*

**Tärklisesisalduse tuvastamine**

Tärklise tuvastamiseks lõssipulbris, denatureeritud piimapulbris ja segasöötades kasutatakse XVII lisas esitatud standardmeetodit.

*Artikkel 14*

**Koorepulbri niiskusesisalduse määramine**

Koorepulbri niiskusesisaldus määratakse XVIII lisas esitatud standardmeetodiga.

*Artikkel 15*

**Hapukoorepetipulbri niiskusesisalduse määramine**

Loomasöödas kasutamiseks ette nähtud hapukoorepetipulbri niiskusesisaldus määratakse XIX lisas esitatud standardmeetodiga.

*Artikkel 16*

**Piimarasva puhtusastme määramine**

Piimarasva puhtusastme määramiseks kasutatakse XX lisas esitatud standardmeetodit.

III PEATÜKK

**ÜLD- JA LÕPPSÄTTED**

*Artikkel 17*

**Kvaliteedi tagamine**

Analüüsid tehakse laborites, milles on analüüsi kvaliteedi tagamise süsteem, mis hõlmab ka sisemise kvaliteedikontrolli korda. Akrediteerimata laborid osalevad vähemalt kord aastas tasemekatsetes ning nende tulemuste erinevus kokkulepitud väärtusest ei tohi olla suurem kui $2\sigma_R$ (reprodutseeritavuse standardhälve standardmeetodi puhul). Laboris peab olema võimalik tutvuda kasutatavate süsteemide üksikasjaliku kirjeldusega.

Euroopa Parlamendi ja nõukogu 29. aprilli 2004. aasta määruse (EÜ) nr 882/2004 (ametlike kontrollide kohta, mida tehakse sööda- ja toidualaste õigusnormide ning loomatervishoidu ja loomade heaolu käsitlevate

▼B

eeskirjade täitmise kontrollimise tagamiseks) ([1]) kohaselt akrediteeritud laborid vabastatakse tasemekatsetes osalemise kohustusest.

*Artikkel 18*

**Proovi võtmine ja analüüsitulemuste vaidlustamise**

1. Proovi võtmine toimub asjaomast toodet käsitleva eeskirja kohaselt. Kui proovi võtmiseks ei ole sätteid kehtestatud, toimitakse vastavalt standardile ISO 707 IDF 50 — Piim ja piimatooted — Proovi võtmise juhend.

2. Laboratoorse analüüsi tulemuste aruanne peab sisaldama piisavalt teavet, et tulemusi oleks võimalik hinnata vastavalt II ja XXI lisale.

3. Ühenduse eeskirjadega ette nähtud analüüside jaoks tuleb võtta kordusproovid.

4. Kui ettevõtja ei nõustu analüüsi tulemustega, kasutatakse XXI lisas kirjeldatud meetodit.

5. Kui ettevõtja suudab viie tööpäeva jooksul pärast proovi võtmist tõendada, et proovi ei võetud õigesti, tuleb võimaluse korral võtta kordusproov. Kui kordusproovi ei ole võimalik võtta, tuleb analüüsitud tootepartii heaks kiita.

▼M1

———

*Artikkel 19a*

**Teatised**

Artiklis 2, artikli 4 lõikes 1 ja III lisa C osas sätestatud teavitamine toimub kooskõlas komisjoni määrusega (EÜ) nr 792/2009 ([2]).

▼B

*Artikkel 20*

**Kehtetuks tunnistamised**

Määrus (EÜ) nr 213/2001 tunnistatakse kehtetuks.

Viiteid kehtetuks tunnistatud määrusele käsitatakse viidetena käesolevale määrusele ning loetakse vastavalt XXII lisas esitatud vastavustabelile.

*Artikkel 21*

**Jõustumine**

Käesolev määrus jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Seda hakatakse kohaldama alates 31. märtsist 2008.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

([1]) ELT L 165, 30.4.2004, lk 1.
([2]) ELT L 228, 1.9.2009, lk 3.

▼B

*I LISA*

**(Artikkel 1)**

**STANDARDMEETODITE LOETELU**

*Kasutatud lühendid:* Min. = alamväärtus, minimaalselt; maks. = maksimumväärtus; lisa = osutatud määruse lisa; SNF = rasvavaba kuivaine (*solids non fat*); PV = peroksiidarv (*peroxide value*); A = välimus (*appearance*); F = maitse (*flavour*); C = konsistents (*consistency*); TBC = bakterite üldarv (*totalbacterial count*); Term = termofiilsete bakterite arv, MS = liikmesriik (*Member State*), IDF = Rahvusvaheline Piimandusföderatsioon (*InternationalDairy Federation*); ISO = Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (*International Standards Organisation*); IUPAC = Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit (*International Union of Pure and Applied Chemistry*); ADPI = Ameerika Piimatoodete Instituut (*American Dairy Products Institute*); SCM = suhkruga kondenspiim (*sweetened condensed milk*); EMC = suhkruta kondenspiim või koor (*evaporated milk or cream*); SMP = lõssipulber (*skimmed milk powder*).

A OSA

| Komisjoni määrus | Toode | Parameeter | Piirnorm ([1]) | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|
| Määrus (EÜ) nr 2771/1999 — riiklik ladustamine | Mage või | Rasv | Min. 82 massiprotsenti | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Vesi | Kuni 16 massiprotsenti | ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001 | |
| | | SNF | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| | | Rasva happesus | 1,2 mmooli 100 g rasva kohta | ISO 1740:2004IDF 6:2004 | |
| | | PV (maks.) | 0,3 mekv hapnikku 1 000 g rasva kohta | ISO 3976:2006IDF 74:2006 | Märkus 1 |
| | | Kolibakterid | 1 grammis ei ole avastatavad | X lisa | Märkus 3 |
| | | Mittepiimarasv | Triglütsetriidide analüüsiga ei ole avastatav | XX lisa | |
| | | Steroolmärgised | Ei ole avastatavad, β-sitosterool ≤ 40 mg/kg | VIII lisa | |
| | | Muud märgistusained | | | |
| | | — vanilliin | Ei ole avastatav | VI lisa | |
| | | — karoteenhappe etüülester | ≤ 6 mg/kg | VII lisa | |
| | | — enanthappe triglütseriidid | Ei ole avastatavad | V lisa | |
| | | Organoleptilised omadused | A, F ja C puhul vähemalt 4 punkti 5 punktist | IV lisa | |
| | | Eraldunud vesi | Vähemalt 4 punkti | ISO 7586:1985 — IDF 112A:1989 | |
| Määrus (EÜ) nr 2771/1999 — eraladustamine | Mage või | Rasv | Min. 82 massiprotsenti | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Vesi | Kuni 16 massiprotsenti | ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001 | |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | Parameeter | Piirnorm ([1]) | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SNF | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| Määrus (EÜ) nr 2771/1999 — eraladustamine | Soolatud või | Rasv | Min. 80 massiprotsenti | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Vesi | Kuni 16 massiprotsenti | ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001 | |
| | | SNF (v.a sool) | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| | | Sool | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 15648:2004IDF 179:2004 | |
| Määruse (EÜ) nr 1898/2005 II peatükk | Mage või | Rasv | Min. 82 massiprotsenti | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Mittepiimarasv | | XX lisa | |
| | | Vesi | Kuni 16 massiprotsenti | ISO 3727–1 2001IDF 80–1:2001 | |
| | | SNF | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| | | Märgistusained: | | | |
| | | — steroolid | Vt VIII lisa | VIII lisa | |
| | | — vanilliin | Vt VI lisa | VI lisa | |
| | | — karoteenhappe etüülester | Vt VII lisa | VII lisa | |
| | | — enanthappe triglütseriidid | Vt V lisa | V lisa | |
| Määruse (EÜ) nr 1898/2005 II peatükk | Soolatud või | Rasv | Min. 80 massiprotsenti | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Mittepiimarasv | | XX lisa | |
| | | Vesi | Kuni 16 massiprotsenti | ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001 | |
| | | SNF (v.a sool) | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| | | Sool | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 15648:2004IDF 179:2004 | |
| | | Märgistusained: | | | |
| | | — steroolid | Vt VIII lisa | VIII lisa | |
| | | — vanilliin | Vt VI lisa | VI lisa | |
| | | — karoteenhappe etüülester | Vt VII lisa | VII lisa | |
| | | — enanthappe triglütseriidid | Vt V lisa | V lisa | |
| Määruse (EÜ) nr 1898/2005 II peatükk | Kontsentreeritud või | Rasv | Min. 99,8 massiprotsenti | IDF 24:1964 | |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | Parameeter | Piirnorm ([1]) | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Vesi ja SNF | Kuni 0,2 massiprotsenti | ISO 5536:2002IDF 23:2002 (niiskus)<br>IDF 24:1964 (SNF) | |
| | | Rasva happesus | 1,2 mmooli 100 g rasva kohta | ISO 1740:2004IDF 6:2004 | |
| | | PV (maks.) | 0,5 mekv hapnikku 1 000 g rasva kohta | ISO 3976:2006IDF 74:2006 | Märkus 1 |
| | | Mittepiimarasv | Puudub | XX lisa | |
| | | Maitse | Puhas | | |
| | | Lõhn | Võõrad lõhnad puuduvad | | |
| | | Muu | Neutraliseerimisvahendid, antioksüdandid ja säilitusained puuduvad | | |
| | | Märgistusained: | | | |
| | | — steroolid | Vt VIII lisa | VIII lisa | |
| | | — vanilliin | Vt VI lisa | VI lisa | |
| | | — karoteenhappe etüülester | Vt VII lisa | VII lisa | |
| | | — enanthappe triglütseriidid | Vt V lisa | V lisa | |
| Määruse (EÜ) nr 1898/2005 II peatükk | Koor | Rasv | Min. 35 massiprotsenti | ISO 2450:1999IDF 16 C:1987 | |
| | | Mittepiimarasv | | XX lisa | |
| | | Märgistusained: | | | |
| | | — steroolid | Vt VIII lisa | | Märkus 2 |
| | | — vanilliin | Vt VI lisa | VI lisa | |
| | | — karoteenhappe etüülester | Vt VII lisa | | Märkus 2 |
| | | — enanthappe triglütseriidid | Vt V lisa | V lisa | |
| Määruse (EÜ) nr 1898/2005 III peatükk | Kontsentreeritud või | Rasv | Min. 96 massiprotsenti | | Märkus 2 |
| | | Mittepiimarasv | | XX lisa | |
| | | SNF | Kuni 2 massiprotsenti | | Märkus 2 |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | Parameeter | Piirnorm ([1]) | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Märgistusained: | | | |
| | | — stigmasterool (95 massiprotsenti) | 15 g 100 kg kontsentreeritud või kohta | VIII lisa | |
| | | — stigmasterool (85 massiprotsenti) | 17 g 100 kg kontsentreeritud või kohta | VIII lisa | |
| | | — enanthappe triglütseriidid | 10,34 kg ühe tonni kontsentreeritud või kohta | V lisa | |
| | | — võihappe etüülester ja stigmasterool | | — võihappe etüülester<br>— stigmasterool: VIII lisa | Märkus 2 |
| | | — võihappe etüülester ja enanthappe triglütseriidid | | — võihappe etüülester<br>— enanthappe triglütseriidid: V lisa | Märkus 2 |
| | | Letsitiin (E 322) | Kuni 0,5 massiprotsenti | | Märkus 2 |
| | | NaC1 | Kuni 0,75 massiprotsenti | ISO 15648:2004IDF 179:2004 | |
| | | Rasva happesus | 1,2 mmooli 100 g rasva kohta | ISO 1740:2004IDF 6:2004 | |
| | | PV (maks.) | Kuni 0,5 mekv hapnikku 1 000 g rasva kohta | ISO 3976:2006IDF 74:2006 | Märkus 1 |
| | | Maitse | Puhas | | |
| | | Lõhn | Võõrad lõhnad puuduvad | | |
| | | Muu | Neutraliseerimisvahendid, antioksüdandid ja säilitusained puuduvad | | |
| Määruse (EÜ) nr 1898/2005 IV peatükk | Mage või | Rasv | Min. 82 massiprotsenti | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Vesi | Kuni 16 massiprotsenti | ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001 | |
| | | SNF | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| Määruse (EÜ) nr 1898/2005 IV peatükk | Soolatud või | Rasv | Min. 80 massiprotsenti | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Vesi | Kuni 16 massiprotsenti | ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001 | |
| | | SNF (v.a sool) | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| | | Sool | Kuni 2 massiprotsenti | ISO 15648:2004IDF 179:2004 | |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | Parameeter | Piirnorm ([1]) | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|
| Määruse (EÜ) nr 1255/1999 II jaotis ja artikkel 9 | Lamba- ja/või kitsepiimast valmistatud juust | Lehmapiim | < 1 massiprotsent | IX lisa | |
| Määrus (EMÜ) nr 2921/90 | I lisa — happekaseiin | Vesi | Kuni 12,00 massiprotsenti | ISO 5550:2006IDF 78:2006 | |
| | | Rasv | Kuni 1,75 massiprotsenti | ISO 5543:2004IDF 127:2004 | |
| | | Vabad rasvhapped | Kuni 0,30 ml 0,1 N NaOH lahust ühe grammi kohta | ISO 5547:1978IDF 91:1979 | |
| Määrus (EMÜ) nr 2921/90 | I lisa — laabikaseiin | Vesi | Kuni 12,00 massiprotsenti | ISO 5550:2006IDF 78:2006 | |
| | | Rasv | Kuni 1,00 massiprotsenti | ISO 5543:2004IDF 127:2004 | |
| | | Tuhk | Min. 7,50 massiprotsenti | ISO 5545:1978IDF 90:1979 | |
| Määrus (EMÜ) nr 2921/90 | I lisa — kaseinaadid | Vesi | Kuni 6,00 massiprotsenti | ISO 5550:2006IDF 78:2006 | |
| | | Piimavalk | Min. 88,00 massiprotsenti | ISO 5549:1978IDF 92:1979 | |
| | | Rasv ja tuhk | Kuni 6,00 massiprotsenti | ISO 5543:2004IDF 127:2004 | |
| | | Seotud tuhk | | ISO 5544:1978IDF 89:1979 | |
| | | Tuhk | | ISO 5545:1978IDF 90:1979 | |
| Määrus (EMÜ) nr 2921/90 | II lisa — happekaseiin | Vesi | Kuni 10,00 massiprotsenti | ISO 5550:2006IDF 78:2006 | |
| | | Rasv | Kuni 1,50 massiprotsenti | ISO 5543:2004IDF 127:2004 | |
| | | Vabad rasvhapped | Kuni 0,20 ml 0,1 N NaOH lahust ühe grammi kohta | ISO 5547:1978IDF 91:1979 | |
| | | TBC (maks.) | 30 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkus 3 |
| | | Kolibakterid | 0,1 grammis puuduvad | X lisa | Märkus 3 |
| | | Term (maks.) | 5 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkused 3 ja 4 |
| Määrus (EMÜ) nr 2921/90 | II lisa — laabikaseiin | Vesi | Kuni 8,00 massiprotsenti | ISO 5550:2006IDF 78:2006 | |
| | | Rasv | Kuni 1,00 massiprotsenti | ISO 5543:2004IDF 127:2004 | |
| | | Tuhk | Min. 7,50 massiprotsenti | ISO 5545:1978IDF 90:1979 | |
| | | TBC (maks.) | 30 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkus 3 |
| | | Kolibakterid | 0,1 grammis puuduvad | X lisa | Märkus 3 |
| | | Term (maks.) | 5 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkused 3 ja 4 |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | Parameeter | Piirnorm ([1]) | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|
| Määrus (EMÜ) nr 2921/90 | II lisa — kaseinaadid | Vesi | Kuni 6,00 massiprotsenti | ISO 5550:2006IDF 78:2006 | |
| | | Piimavalk | Min. 88,00 massi-protsenti | ISO 5549:1978IDF 92:1979 | |
| | | Rasv ja tuhk | Kuni 6,00 massiprotsenti | ISO 5543:2004IDF 127:2004<br>ISO 5544:1978IDF 89:1979 või<br>ISO 5545:1978IDF 90:1979 | |
| | | TBC (maks.) | 30 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkus 3 |
| | | Kolibakterid | 0,1 grammis puuduvad | X lisa | Märkus 3 |
| | | Term (maks.) | 5 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkused 3 ja 4 |
| Määrus (EMÜ) nr 2921/90 | III lisa — kaseinaadid | Vesi | Kuni 6,00 massiprotsenti | ISO 5550:2006IDF 78:2006 | |
| | | Piimavalk | Min. 85,00 massi-protsenti | ISO 5549:1978IDF 92:1979 | |
| | | Rasv | Kuni 1,50 massiprotsenti | ISO 5543:2004IDF 127:2004 | |
| | | Laktoos | Kuni 1,00 massiprotsenti | ISO 5548:2004IDF 106:2004 | |
| | | Tuhk | Kuni 6,50 massiprotsenti | ISO 5544:1978IDF 89:1979 või<br>ISO 5545:1978IDF 90:1979 | |
| | | TBC (maks.) | 30 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkus 3 |
| | | Kolibakterid | 0,1 grammis puuduvad | X lisa | Märkus 3 |
| | | Term (maks.) | 5 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkused 3 ja 4 |
| Määrus (EÜ) nr 2799/1999 | Segasöödad ja lõssipulber (SMP) (söötades kasutamiseks) | Vesi (hapukoorepetipulber) | Kuni 5 massiprotsenti | XIX lisa | |
| | | Valk | 31,4 massiprotsenti (min.) rasvata kuivainest | ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001 | |
| | | Vesi (SMP) | Kuni 5 massiprotsenti | ISO 5537:2004IDF 26:2004 | |
| | | Rasvad (SMP) | Kuni 11 massiprotsenti | ISO 1736:2000IDF 9C:1987 | |
| | | Laabivadak (SMP) | Puudub | XIII lisa | Märkus 6 |
| | | Tärklis (SMP) | Puudub | XVII lisa | |
| | | Vesi (segudes) | Kuni 5 massiprotsenti rasvata kuivainest | ISO 5537:2004IDF 26:2004 | |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | Parameeter | Piirnorm (1) | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Rasv (segudes) | | Komisjoni direktiiv 84/4/EMÜ (EÜT L 15, 18.1.1984, lk 29) | |
| | | Laabivadak (segudes) | Puudub | XIII lisa | |
| | | SMP sisaldus (lõpptootes) | Min. 50 massiprotsenti | XVI lisa | |
| | | Rasv (lõpptootes) | Min. 2,5 või 5 massiprotsenti | Komisjoni direktiiv 84/4/EMÜ (EÜT L 15, 18.1.1984, lk 29 | Märkus 7 |
| | | Tärklis (lõpptootes) | Min. 2 massiprotsenti | XVII lisa | Märkus 8 |
| | | Vask (lõpptootes) | 25 ppm | Komisjoni direktiiv 78/633/EMÜ (EÜT L 206, 26.7.1987, lk 43) | |
| Määrus (EÜ) nr 214/2001 | SMP (valmistatud pihustuskuivatuse meetodil) | Rasv | Kuni 1,0 massiprotsenti | ISO 1736:2000IDF 9C:1987 | |
| | | Valk | 31,4 massiprotsenti (2)(min.) rasvata kuivainest | ISO 8968–1/2:2001IDF 20–1/2:2001 | |
| | | Vesi | Kuni 3,5 massiprotsenti | ISO 5537:2004IDF 26:2004 | |
| | | Happesus | Kuni 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10 g rasvavaba kuivainet | ISO 6091:1980IDF 86:1981 | |
| | | Laktaadid | Kuni 150 mg 100 g rasvavaba kuivaine kohta | ISO 8069:2005IDF 69:2005 | |
| | | Fosfataas | Negatiivne | ISO 11816–1:2006IDF 155–1:2006 | |
| | | Mittelahustuvuse indeks | Kuni 0,5 ml temperatuuril 24 °C | ISO 8156:2005IDF 129:2005 | |
| | | Kõrbenud osakesed | A või B ketas (15,0 mg) | ADPI (1990) | |
| | | TBC | 40 000 ühe grammi kohta | ISO 4833:2003 | Märkus 3 |
| | | Kolibakterid | Negatiivne 0,1 grammis | X lisa | Märkus 3 |
| | | Petipiim | Negatiivne | XIV lisa | |
| | | Laabivadak | Negatiivne | XII lisa | |
| | | Happevadak | Negatiivne | | Märkus 2 |
| | | Mikroobivastased ained | | XV lisa | |

(1) Ilma et see piiraks erimääruse nõuete kohaldamist.
(2) Alates 1. septembrist 2009 on minimaalne valgusisaldus 34 %.

▼B

B OSA

B osas loetletud standardmeetodeid võib kasutada kõikide esimeses veerus nimetatud määrustega hõlmatud toodete analüüsimisel.

| Komisjoni määrus | Toode | CN-kood | Parameeter | Piirnorm | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Määrus (EMÜ) nr 2658/87<br>Määrus (EÜ) nr 2535/2001<br>Määrus (EÜ) nr 1282/2006 | Piim ja rõõsk koor, kontsentreerimata, suhkru- või muu magusainelisandita | 0401 | Rasv (≤ 6 massiprotsenti) | Piirnormid on samad, mis on määratletud asjaomase CN-koodi alla kuuluva toote kirjelduses ning vajaduse korral täpsustatud komisjoni määruse (EMÜ) nr 3846/87 (EÜT L 366, 24.12.1987, lk 1) ekspordinomenklatuuri käsitlevas 9. osas või määruses (EÜ) nr 2535/2001 (EÜT L 341, 22.12.2001, lk 29). | ISO 1211:2001IDF 1D:1996 | |
| | | | Rasv (> 6 massiprotsenti) | | ISO 2450:1999IDF 16C:1987 | |
| | Piim ja rõõsk koor, kontsentreeritud või suhkru- või muu magusainelisandiga | 0402 | Rasv (vedelal kujul) | | ISO 1737:1999IDF 13C:1987 | |
| | | | Rasv (tahkel kujul) | | ISO 1736:2000IDF 9C:1987 | |
| | | | Valk | | ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001 | |
| | | | Sahharoos (tavaline sisaldus) | | ISO 2911:2004IDF 35:2004 | |
| | | | Sahharoos (väike sisaldus) | | | Märkus 2 |
| | | | Tahked ained (SCM) | | ISO 6734:1989IDF 15B:1991 | |
| | | | Tahked ained (EMC) | | ISO 6731:1989IDF 21B:1987 | |
| | | | Vesi (piimapulber) | | ISO 5537:2004IDF 26:2004 | |
| | | | Vesi (koorepulber) | | XVIII lisa | |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | CN-kood | Parameeter | Piirnorm | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Petipiim, kalgendatud piim ja koor, kontsentreeritud või kontsentreerimata, suhkru- või muu magusainelisandiga | 0403 | Rasv | | ISO 1211:2001IDF 1D:1996<br>ISO 1736:2000IDF 9C:1987<br>ISO 2450:1999IDF 16 C:1987<br>ISO 7208:1999IDF 22B:1987<br>ISO 8262–3:2005IDF 124–3:2005 | |
| | | | Valk | | ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001 | |
| | | | Sahharoos (tavaline sisaldus) | | ISO 2911:2004IDF 35:2004 | |
| | | | Sahharoos (väike sisaldus) | | | Märkus 2 |
| | | | Vesi (hapukoorepetipulber) | | XIX lisa | |
| | | | Vesi (rõõsakoorepetipulber) | | ISO 5537:2004IDF26:2004 | |
| | | | Tahked ained (muud tooted) | | Pädeva asutuse poolt heakskiidetud meetodid | |
| | Vadak, kontsentreeritud või kontsentreerimata, suhkru- või muu magusainelisandiga või ilma; tooted naturaalsetest piimakomponentidest | 0404 | Rasv | | ISO 1736:2000IDF 9C:1987<br>ISO 2450:1999IDF 16C:1987<br>ISO 7208:1999IDF 22B:1987 | |
| | | | Valk | | ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001 | |
| | | | Sahharoos (tavaline sisaldus) | | ISO 2911:2004IDF 35:2004 | |
| | | | Sahharoos (väike sisaldus) | | | Märkus 2 |
| | | 0404 90 | Valk | | ISO 8968 1/2 2001IDF 20–1/2:2001 | |
| | | | Vesi | | IDF 21B:1987 | |
| | | | Tahked ained | | ISO 6734:1989IDF 15B:1991 | |

▼B

| Komisjoni määrus | Toode | CN-kood | Parameeter | Piirnorm | Standardmeetod | Märkus |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | (Kontsentreeritud tooted) | | ISO 6731:1989IDF 21B:1987 | |
| | Või ja muud piimarasvad; piimarasvavõided | 0405 | Rasv, kui rasvasisaldus on ≤ 85 massiprotsenti | | ISO 17189:2003IDF 194:2003 | |
| | | Või | Vesi | | ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001 | |
| | | | SNF | | ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001 | |
| | | | NaCl | | ISO 15648:2004IDF 179:2004 | |
| | | | Rasv, kui rasvasisaldus on > 99 massiprotsenti | | IDF 24:1964 | |
| | Võiõli | | Vesi, kui rasvasisaldus on < 99 massiprotsenti | | ISO 5536:2002IDF 23:2002 | |
| | Juust ja kohupiim | 0406 | Rasv | | ISO 1735:2004IDF 5:2004 | |
| | | | Tahked ained | | ISO 5534:2004IDF 4:2004 | |
| | | | Tahked ained (Ricotta) | | ISO 2920:2004IDF 58:2004 | |
| | | | NaCl | | ISO 5943:2006IDF 88:2006 | |
| | | | Laktoos | | ISO 5765–1/2:2002IDF 79–1/2:2002 | |
| Määrus (EMÜ) nr 2658/87 | Segasöödad | 2309 | Laktoos | | XI lisa | |

Euroopa Liidu standardmeetodite loetelus sisalduvad märkused.

Märkus 1: Piimarasv eraldatakse ISO standardi 1740:1991 kohaselt (töökohta tuleb kaitsta valguse eest).

Märkus 2: Standardmeetodeid ei ole kindlaks määratud. Pädeva asutuse poolt heaks kiidetud meetodid.

Märkus 3: Proovid tuleb ette valmistada vastavalt standardile ISO 8261:2001IDF 122:2001.

Märkus 4: Inkubeeritakse 55 °C juures 48 tundi, tuleb hoolikalt jälgida, et sööde ära ei kuivaks.

Märkus 5: SNFi massiprotsent = tahke aine massiprotsent — rasva massiprotsent.

Märkus 6: Komisjoni direktiiv 84/4/EMÜ.

Märkus 7: Komisjoni määrus (EÜ) nr 2799/1999 (EÜT L 340, 31.12.1999, lk 3–27).

Märkus 8: Komisjoni direktiiv 78/633/EMÜ.

▼B

*II LISA*

**(Artikkel 3)**

**TOOTEPARTII PIIRNORMILE VASTAVUSE HINDAMINE**

1. PÕHIMÕTE

Kui proovi võtmise meetodit on asjakohastes õigusaktides üksikasjalikult kirjeldatud, järgitakse neid juhiseid. Kõikidel muudel juhtudel kontrollitakse esitatud tootepartiid vähemalt 3 juhuslikult valitud prooviühikust koosneva prooviga. Võib teha liitproovi. Saadud tulemuse võrdlemiseks sätestatud piirnormidega arvutatakse 95 % usaldusvahemik välja kahekordse standardhälbena, kusjuures asjakohane standardhälve sõltub sellest, kas 1) meetod on väärtuste $\sigma_r$ ja $\sigma_R$ osas rahvusvaheliselt valideeritud või 2) on laborisisesel valideerimisel välja arvutatud sisemine reprodutseeritavus. See usaldusvahemik võrdsustatakse tulemuse mõõtemääramatusega.

2. MEETOD ON RAHVUSVAHELISELT VALIDEERITUD

Sel juhul on korratavuse standardhälve $\sigma_r$ ja reprodutseeritavuse standardhälve $\sigma_R$ kindlaks määratud ning labor saab tõendada vastavust valideeritud meetodi sobivuskriteeriumidele.

Arvutatakse korratud mõõtmiste arvu *n* aritmeetiline keskmine $\overline{x}$.

$\overline{x}$ laiendmääramatus ($k = 2$) arvutatakse järgmiselt:

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

Kui mõõtmise lõpptulemuse *x* arvutamiseks kasutatakse ühte järgmistest valemitest: $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ või $x = y_1 / y_2$, tuleb standardhälbed ühendada tavapäraste meetoditega.

Tootepartii loetakse sätestatud ülemisele piirnormile *UL* mittevastavaks, kui

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

muudel juhtudel loetakse see *UL*-ile vastavaks.

Tootepartii loetakse sätestatud alumisele piirnormile *LL* mittevastavaks, kui

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

muudel juhtudel loetakse see *LL*-ile vastavaks.

3. LABORISISENE VALIDEERIMINE KOOS REPRODUTSEERITAVUSE SISESTANDARDHÄLBE VÄLJAARVUTAMISEGA

Kui kasutatakse käesolevas määruses määratlemata meetodeid ja täpsuspiirid ei ole kindlaks määratud, tuleb läbi viia laborisisene valideerimine. Selleks tuleb laiendmääramatuse *U* arvutamise valemis kasutada $\sigma_r$ ja $\sigma_R$ asemel korratavuse sisestandardhälvet $s_{ir}$ ja reprodutseeritavuse sisestandardhälvet $s_{iR}$.

Juhised otsuse tegemiseks on esitatud punktis 1. Kui leitakse, et tootepartii ei vasta sätestatud piirnormile, tuleb mõõtmist korrata käesolevas määruses kirjeldatud meetodi abil ning teha seejärel otsus vastavalt punktile 1.

▼B

*III LISA*

**(Artikkel 4)**

**HINDAJATE HINDAMINE JA ORGANOLEPTILISTE ANALÜÜSIDE TULEMUSTE USALDUSVÄÄRSUS**

Hindamisviiside kasutamise suhtes kohaldatakse järgmisi meetodeid (IDFi standard 99C/1997).

A. KORRATAVUSINDEKSI MÄÄRAMINE

Hindaja analüüsib 12 kuu jooksul vähemalt kümmet pimedat kordusproovi. Tavaliselt toimub see mitme eri hindamisvooru ajal. Üksiktoodete omadustega seotud tulemusi hinnatakse järgmise valemi abil:

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

kus:

$w_1$: korratavusindeks

$x_{i1}$: proovi $x_i$ esimese hindamise tulemused

$x_{i2}$: proovi $x_i$ teise hindamise tulemused

N: proovide arv

Hinnatavad proovid peaksid olema küllalt erineva kvaliteediga. $w_I$ ei tohiks olla suurem kui 1,5 (viiepallisüsteemis).

B. HÄLBEINDEKSI MÄÄRAMINE

Seda indeksit tuleb kasutada, et kontrollida, kas hindaja kasutab kvaliteedi hindamiseks sama skaalat kui kogenud hindajate rühm. Hindaja antud punkte võrreldakse hindajate rühma antud keskmiste punktidega.

Tulemuste hindamiseks kasutatakse järgmist valemit:

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

kus:

$x_{i1}$; $x_{i2}$: vt jaotis A

$\overline{x}_{i1}$; $\overline{x}_{i2}$: hindajate rühma keskmised tulemused vastavalt proovi $x_i$ esimesel ja teisel hindamisel

n: proovide arv (vähemalt kümme 12 kuu jooksul)

Hinnatavad proovid peaksid olema üsna erineva kvaliteediga. $D_I$ ei tohiks olla suurem kui 1,5 (viiepallisüsteemis).

Liikmesriigid peavad teatama kõikidest kõnealuse meetodi kohaldamisega kaasnenud raskustest.

Kui leitakse, et üksikhindajad on ületanud hälbe- või korratavusindeksite piirväärtuse 1,5, peab ametiasutus või ekspert tegema järgnevatel nädalatel nimetatud isikute poolt hinnatud proovile ühe või mitu pistelist järelkontrolli või viima koos nimetatud hindajatega läbi ühe või mitu ühiskontrollimist. Hoolikas järelevalve on vajalik selleks, et otsustada, kas jätkata nende hindajate pakutud teenuse kasutamist. Tulemused tuleb dokumenteerida ja säilitada tõendusmaterjalina järelmeetmete kohta.

▼B

C. LIIKMESRIIGI ERI PIIRKONDADES JA ERI LIIKMESRIIKIDES SAADUD TULEMUSTE VÕRDLEMINE

Vajaduse korral tuleb vähemalt kord aastas teha test eri piirkondade hindajate saadud tulemuste võrdlemiseks. Märkimisväärsete erinevuste ilmnemisel tuleb võtta vajalikud meetmed põhjuste kindlakstegemiseks ning võrreldavate tulemuste saamiseks.

Liikmesriigid võivad korraldada teste oma hindajate ja naaberliikmesriikide hindajate saadud tulemuste võrdlemiseks. Märkimisväärsete erinevuste korral peab läbi viima põhjaliku uurimise, mille eesmärk on võrreldavate tulemuste saamine.

Liikmesriik peab komisjoni teavitama nende võrdlemiste tulemustest.

▼B

*IV LISA*

**(Artikkel 4)**

**VÕI ORGANOLEPTILINE HINDAMINE**

1. KOHALDAMISALA

Käesolev või organoleptilise hindamise menetlus kujutab endast ühtset meetodit, mis on kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Üksikasjalikum teave organoleptilise hindamise kohta on esitatud Rahvusvahelise Piimandusföderatsiooni praegu kehtivas rahvusvahelises standardis piima ja piimatoodete kohta (IDFi standardi 99 osad 1, 2 ja 3).

2. MÕISTED

„Organoleptiline hindamine" — toote omaduste hindamine meeleorganitega.

„Hindamiskomisjon" — rühm valitud hindajaid, kes hindamise ajal ei suhtle omavahel ega mõjuta üksteist.

„Hindaja" — isik, kes on valitud seetõttu, et ta on suuteline organoleptilist testi läbi viima. Sellist tüüpi hindajate kogemused võivad olla piiratud.

„Eksperthindaja" — isik, kel on kõrgelt arenenud organoleptiline tundlikkus ja suured kogemused organoleptiliste meetodite kasutamise alal ning kes on suuteline andma omavahel kooskõlas olevaid ja usaldusväärseid organoleptilisi hinnanguid mitmesuguste toodete kohta. Sellist tüüpi hindajal peab olema hea pikaaegne organoleptiline mälu.

„Hinde panemine" — organoleptiline hindamine, mille puhul hindamiskomisjon rakendab arvskaalat. Seejuures kasutatakse puuduste nomenklatuuri.

„Kvaliteediastme määramine" — liigitamine kvaliteedi järgi hinnete alusel.

„Hindelehed" — vormid, millele märgitakse igale tootele üksikomaduste eest antud hinded ja kvaliteediaste. (Hindelehele võib märkida ka toote keemilise koostise.)

3. TÖÖRUUM

Üksikasjalikum teave on esitatud standardis ISO 8589 ja standardi ISO/DIS 22935–2IDF 99–2 punktis 7.

Tuleb võtta tarvitusele abinõud, et tööruumis ei mõjutaks hindajaid välised tegurid.

Tööruumis ei tohi olla kõrvalisi lõhnu ja seda peab olema kerge hoida puhtana. Seinad peavad olema heledad ja ei tohi läikida.

Tööruum ja selle valgustus ei tohi mõjutada hinnatava toote omadusi.

Tööruumi temperatuuri kontrollimiseks peavad selles olema asjakohased seadmed, mis võimaldavad säilitada või püsivat temperatuuri. Hindamise ajal peab või temperatuur olema 12 ± 2 °C.

4. HINDAJATE VALIMINE

Hindaja peab tundma võitooteid ja olema organoleptilise hindamise alal pädev. Pädev asutus peab hindaja pädevust korrapäraselt (vähemalt kord aastas) kontrollima.

4.1. Standardi ISO/DIS 22935–1IDF 99–1 jaotistes 4 (värbamine) ja 5.1 on esitatud teave üldiste nõuete ja lausteimimise kohta, millega tuleb tutvuda enne uue hindaja ametlikku kasutamist.

Oluline on pidev koolitus ja üldised kokkutulekud, mida tuleb korraldada korrapäraste ajavahemike järel. Hindamiskomisjoni koolitamist on käsitletud standardis ISO 8586–1.

▼B

4.2. Esialgne koolitus peab hõlmama järgmist:

— organoleptilise hindamise üldteooria ja praktiline tähtsus;

— meetodid, skaalad ja organoleptiliste muljete kirjeldused;

— organoleptiliste omaduste avastamine ja äratundmine ning organoleptilise hindamise erimõisted;

— või tootmise kohta taustteadmisi andev koolitus;

— valideeritud võrdlusained ja proovid, mis aitavad hindajal toote spetsiifilisi maitseid ja maitse tugevust kindlaks teha.

5. HINDAMISKOMISJONILE ESITATAVAD NÕUDED

Hindamiskomisjonis peab olema paaritu arv hindajaid (mitte vähem kui kolm). Enamiku peavad moodustama pädeva asutuse töötajad või volitatud isikud, kes ei tööta piimatööstuses.

Hindamiskomisjoni esimees vastutab kogu menetluse eest ning ta võib hindamiskomisjoni töös osaleda.

Enne hindamist tuleb arvesse võtta rida tegureid, et hindajate töö tulemus oleks võimalikult hea:

— hindajad ei tohi põdeda haigusi, mis võiksid nende tegevust mõjutada. Sellisel juhul asendatakse hindaja komisjonis kellegi teisega;

— hindajad peavad õigeks ajaks kohale tulema ja tagama, et neil on hindamise läbiviimiseks piisavalt aega;

— hindajad ei tohi kasutada tugevalõhnalisi aineid (näiteks lõhnaõli, habemeajamisvedelikku, desodorante jne) ja võiksid vältida tugevasti maitsestatud (nt väga vürtsist) toitu jne;

— hindajad ei tohi pool tundi enne hindamist suitsetada ega süüa või juua midagi peale vee.

6. TÖÖ TULEMUSLIKKUSE TAGAMINE

Oma pädevuse säilitamiseks peavad kõik hindajad korrapäraselt osalema organoleptilise hindamise komisjoni töös. Osalemise sagedus sõltub või kogusest ja komisjoni jõudlusest, võimaluse korral peab hindamiskomisjon hindamiseks kokku tulema vähemalt üks kord kuus.

Ühtlasi peavad ka vanemhindajad igal aastal osalema teatavas arvus hindamistes ja võimaluse korral vähemalt ühes hindamises igas kvartalis.

7. PROOVI VÕTMINE JA ETTEVALMISTAMINE

Võimaliku erapoolikuse vältimiseks on soovitav hoida proovide päritolu hindamise ajal salajas. Proovid peavad olema tähistatud koodiga.

See tuleb korraldada enne hindamist. Või temperatuur transportimisel proovi võtmise ruumi peab olema kindlaks määratud (6 ± 2 °C).

Kui organoleptiline hindamine toimub külmhoones, võetakse proov võipuuriga. Kui organoleptiline hindamine toimub mujal kui külmruumis, tuleb võtta vähemalt 500 g suurune proov. Hindamise ajal peab või temperatuur olema 12 ± 2 °C (standardi ISO/DISi 22935–2IDF 99–2 kohaselt on või hindamisel temperatuur 14 ± 2 °C). Suuri kõrvalekaldumisi tuleb igal juhul vältida.

8. ÜKSIKOMADUSTE HINDAMINE

8.1. Organoleptiliselt hinnatakse kolme järgmist omadust: välimus, konsistents ning maitse.

„*Välimus*” hõlmab järgmisi tunnusjooni: värvus, nähtav puhtusemäär, füüsilise saastatuse puudumine, hallituse puudumine ning vee jaotumise ühtlus. Vee jaotumist määratakse standardi IDF 112A/1989 kohaselt.

▼B

„*Konsistents*” hõlmab järgmisi tunnusjooni: tihkus, tekstuur ja kõvadus. Tarbijate nõuete rahuldamiseks võib üksikliikmesriik, kui ta seda soovib, kasutada füüsilisi vahendeid, et määrata võietavust. Tulevikus võib komisjon teha otsuse meetodite ühtlustamise kohta.

„*Tihkus*” on mõiste, mis viitab toote nidususele selle tarbimisel. Tavaliselt on see seotud kõvaduse ja võietavusega ning peab olema ühetaoline kogu tootes. See on tihedalt seotud tekstuuriga ning toote omadusega säilitada oma kuju oma raskuse juures. Tihkust näitab lõikamisel tekkiv takistus ning seda saab mõõta nii mehhaaniliselt kui ka suu või sõrme abil.

„*Maitse*” on suuga, peamiselt keele maitsmisnäsadega tunnetatud omadus.

„*Lõhn*” on nina ning haistmismeele abil tunnetatud omadus.

Oluline kõrvalekaldumine ettenähtud temperatuurist raskendab konsistentsi ning maitse usaldusväärset hindamist. On väga tähtis, et temperatuur oleks õige.

Kui temperatuur on väljaspool soovitatud vahemikku, tuleb või hindamine edasi lükata.

8.2. Iga omadust hinnatakse eraldi. Hinnatakse vastavalt tabelile 1.

8.3. Ühtluse saavutamiseks on soovitatav, et enne hindamise alustamist paneksid hindajad üheskoos hinded välimuse, konsistentsi ning maitse ja lõhna eest ühele või mitmele standardproovile.

8.4. Hinded, millega või vastu võetakse, on järgmised.

Hinnete panemist käsitletakse 7. osas — „Nomenklatuur ja hinnete suhtes kohaldatavate kriteeriumide kirjeldus”.

| | Maksimaalne | Nõutav |
|---|---|---|
| Välimus | 5 | 4 |
| Konsistents | 5 | 4 |
| Maitse ja lõhn | 5 | 4 |

— Kui pannakse nõutavast madalam hinne, tuleb esitada puuduse kirjeldus.

— Iga hindaja hinne iga omaduse eest tuleb märkida hindelehele.

— Toode võetakse vastu või jäetakse vastu võtmata enamuse otsuse alusel.

— Juhtumeid, mil üksikhindajate hinded iga omaduse eest erinevad rohkem kui ühe punkti võrra, ei tohi esineda sageli (mitte sagedamini kui üks kord 20 proovi kohta). Vastasel korral tuleb komisjoni esimehel kontrollida komisjoni pädevust.

9. JÄRELEVALVE

Hindamiskomisjoni esimees, kes peab olema pädeva asutuse ametnik ja võib olla hindamiskomisjoni liige, vastutab kogu menetluse eest tervikuna. Ta märgib hindelehele iga hindaja hinde iga omaduse eest ja tõendab toote vastuvõtmist või tagasilükkamist.

10. NOMENKLATUUR

Vt lisatud tabel 2.

11. VIITED

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

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

▼B

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.

*Tabel 1*

**Või hindamine**

| Välimus | | | Konsistents | | | Lõhn ja maitse | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Punktid | Nr (1) | Märkused | Punktid (kvaliteediklass) | Nr (1) | Märkused | Punktid (kvaliteediklass) | Nr (1) | Märkused |
| 5 | | *Väga hea*<br>ideaalne tüüp<br>parim kvaliteet<br>(ühtlaselt kuiv) | 5 | | *Väga hea*<br>ideaalne tüüp<br>parim kvaliteet<br>(hästi võietav) | 5 | | *Väga hea*<br>ideaalne tüüp<br>parim kvaliteet<br>(täiesti puhas õrn aroom) |
| 4 | | *Hea* (2)<br>nähtavate puudusteta | 4 | <br>17<br>18 | *Hea* (2)<br>kõva<br>pehme | 4 | | *Hea* (2)<br>nähtavate puudusteta |
| 3 | <br>1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6<br>7<br>8 | *Rahuldav (kerged puudused)*<br>vaba vesi, niiskus<br>ebaühtlane, kahevärviline<br>vöödiline<br>laiguline, marmorjas<br>täpiline<br>eraldunud õli<br>liialt värvunud<br>kohev, mittekompaktne | 3 | <br>14<br>15<br>16<br>17<br>18 | *Rahuldav (kerged puudused)*<br>rabe, murenev<br>taignane, nätske, rasvane<br>kleepuv<br>kõva<br>pehme | 3 | <br>21<br>22<br>25<br>27<br>33<br>34<br>35 | *Rahuldav (kerged puudused)*<br>ebapuhas<br>võõrmaitse<br>hapu<br>keedumaitse, kõrbemaitse<br>söödamaitse<br>mõrkjas, kibe maitse<br>ülesoolatud |
| 2 | <br>1<br>3<br>4<br>5<br>6<br>10<br>11<br>12 | *Halb (märgatavad puudused)*<br>vaba vesi, niiskus<br>vöödiline<br>laiguline, marmorjas<br>täpiline<br>eraldunud õli<br>võõrlisandid<br>hallitanud<br>lahustumata sool | 2 | <br>14<br>15<br>16<br>17<br>18 | *Halb (märgatavad puudused)*<br>rabe, murenev<br>taignane, nätske, rasvane<br>kleepuv<br>kõva<br>pehme | 2 | <br>21<br>22<br>23<br>25<br>32<br>33<br>34<br>35<br>36<br>38 | *Halb (märgatavad puudused)*<br>ebapuhas<br>võõrmaitse<br>vanamaitse<br>hapu<br>oksüdeerunud, metallimaitse<br>söödamaitse<br>mõrkjas, kibe maitse<br>ülesoolatud<br>läppunud, roisumaitse<br>kemikaalide maitse |
| 1 | <br>1<br>3<br>4<br>5<br>6<br>7<br>9<br>10<br>11<br>12 | *Väga halb (tugevad puudused)*<br>vaba vesi, niiskus<br>vöödiline<br>laiguline, marmorjas<br>täpiline<br>eraldunud õli<br>liialt värvunud<br>teraline<br>võõrlisandid<br>hallitanud<br>lahustumata sool | 1 | <br>14<br>15<br>16<br>17<br>18 | *Väga halb (tugevad puudused)*<br>rabe, murenev<br>taignane, nätske, rasvane<br>kleepuv<br>kõva<br>pehme | 1 | <br>22<br>24<br>25<br>26<br>28<br>29<br>30<br>31<br>32<br>34<br>35<br>36<br>37<br>38 | *Väga halb (tugevad puudused)*<br>võõrmaitse<br>juustumaitse, juustuhapu<br>hapu<br>pärmimaitse<br>hallitusmaitse<br>rääsunud<br>õli-, kalamaitse<br>rasvamaitse<br>oksüdeerunud, metallimaitse<br>mõrkjas, kibe maitse<br>ülesoolatud<br>läppunud, roisumaitse<br>linnasemaitse<br>kemikaalide maitse |

(1) Tabel 2.
(2) Hinde „hea” puhul nimetatud puudused on vaid väikesed kõrvalekalded ideaalsest tüübist.

▼B

*Tabel 2*

**Või puudused**

| | |
|---|---|
| I. | Välimus |
| 1. | vaba vesi, niiskus |
| 2. | ebaühtlane, kahevärviline |
| 3. | vöödiline |
| 4. | laiguline, marmorjas |
| 5. | täpiline |
| 6. | eraldunud õli |
| 7. | liialt värvunud |
| 8. | kohev, mittekompaktne |
| 9. | teraline |
| 10. | võõrlisandid |
| 11. | hallitanud |
| 12. | lahustumata sool |
| II. | Konsistents |
| 14. | rabe, murenev |
| 15. | taignane, nätske, rasvane |
| 16. | kleepuv |
| 17. | kõva |
| 18. | pehme |
| III. | Lõhn ja maitse |
| 20. | maitsetu |
| 21. | ebapuhas ([1]) |
| 22. | võõrmaitse |
| 23. | vanamaitse |
| 24. | juustumaitse, juustuhapu |
| 25. | hapu |
| 26. | pärmimaitseline |
| 27. | a) keedumaitse |
| | b) kõrbemaitse |
| 28. | hallitusmaitse |
| 29. | rääsunud |
| 30. | õli-, kalamaitse |
| 31. | rasvamaitse |
| 32. | a) oksüdeerunud maitse |
| | b) metallimaitse |
| 33. | söödamaitse |
| 34. | mõrkjas, kibe maitse |
| 35. | ülesoolatud |
| 36. | läppunud, roisumaitse |
| 37. | linnasemaitse |
| 38. | kemikaalide maitse |

([1]) Seda määratlust tuleks kasutada võimalikult harva ja üksnes siis, kui puudust ei ole võimalik täpsemalt kirjeldada.

▼B

*V LISA*

**(Artikkel 5)**

**ENANTHAPPE TRIGLÜTSERIIDI SISALDUSE MÄÄRAMINE VÕIS, VÕIÕLIS JA KOORES TRIGLÜTSERIIDIDE GAASIKROMATOGRAAFILISE ANALÜÜSI ABIL**

1. RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga määratakse enanthappe triglütseriidi sisaldust võiõlis, võis ja koores.

2. MÕISTED JA MÄÄRATLUSED

Enanthappesisaldus: enanthappe triglütseriidi sisaldus, mis on määratud kindlaks käesolevas meetodis kirjeldatud menetluse abil.

*Märkus:* Enanthappesisaldust väljendatakse kilogrammides võiõli ja või ühe tonni kohta ning kilogrammides koore piimarasva ühe tonni kohta.

3. PÕHIMÕTE

Piimarasv eraldatakse eri toodetest vastavalt standardile ISO 14156 IDF 172:2001. Enanthappe triglütseriidi sisalduse kvantitatiivne määramine eraldatud rasvas toimub kapillaargaasikromatograafia abil. Proovi jaoks saadud tulemuse hindamisel kasutatakse sisestandardina kapronhappe triglütseriidi.

*Märkus:* Rahuldavaks sisestandardiks peetakse ka tributüriini.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad.

4.1. n-heksaan.

4.2. Standardaine kapronhappe triglütseriid, puhtusega vähemalt 99 %.

4.3. Standardaine enanthappe triglütseriid, puhtusega vähemalt 99 %.

4.4. Veevaba naatriumsulfaat ($Na_2SO_4$).

5. SEADMED

Tavalised laboriseadmed, eelkõige järgmised seadmed.

5.1. Analüütilised kaalud mõõtetäpsusega 1 mg.

5.2. Mõõtekolvid mahuga 10 ml ja 20 ml.

5.3. Tsentrifuugitopsid mahuga 30 ml.

5.4. Pöördauruti.

5.5. Kuivatuskapp, mida on võimalik hoida temperatuuril 50 ± 5 °C.

5.6. Keskmisepooriline filterpaber, läbimõõduga umbes 15 cm.

5.7. Gaasikromatograafia seadmed.

5.7.1. Jaotatud/jaotamata vooluga või kolonnile paigaldatud injektoriga ja leekionisatsioondetektoriga (*flame ionization detector* — FID) varustatud gaasikromatograaf.

5.7.2. Gaasikromatograafi kolonn, mille statsionaarse faasi abil saab hästi lahutada triglütseriide (100 % dimetüülpolüsiloksaan või 5 % fenüül-95 % metüülpolüsiloksaan). Valitakse statsionaarne faas, kolonni pikkus (4–15 m), siseläbimõõt (0,22–0,50 mm) ja kile paksus (0,12 µm ja rohkem), võttes arvesse labori varasemaid kogemusi ja kasutatavat sisestussüsteemi. Igal juhul peab valitud kolonn täielikult eraldama lahusti piigi kapronhappe triglütseriidi piigist ja ka eraldama kapronhappe ja enanthappe piigid kuni nulljooneni. Järgnevas osas on esitatud näiteid kohaldatavate tingimuste kohta.

▼B

5.7.2.1. Näide kohaldatavate tingimuste kohta, kui kasutatakse jaotatud vooluga injektorit:

— kandegaas: heelium

— kolonnipea rõhk: 100 kPa

— kolonn: kvartsklaasist kolonn pikkusega 12 m, sisediameetriga 0,5 mm, kile paksusega 0,1 μm

— statsionaarne faas: 100 % dimetüülpolüsiloksaan või 5 % fenüül-95 % dimetüülpolüsiloksaan (nt HT5)

— kolonni temperatuur: algtemperatuur 130 °C, seda hoitakse 1 minut, siis tõstetakse temperatuur kiirusega 20 °C minutis 260 °C juurde ja seejärel kiirusega 30 °C minutis 360 °C juurde, hoitakse temperatuuril 360 °C 10 minutit

— detektori temperatuur: 370 °C

— injektori temperatuur: 350 °C

— jaotussuhe 1:30

— sisestatava proovi suurus: 1 μl.

5.7.2.2. Näide kohaldatavate tingimuste kohta, kui kasutatakse kolonnile paigaldatud injektorit:

— kandegaas: vesinik (pideva voo süsteem)

— kolonnipea rõhk: 89 kPa

— kolonn: kvartsklaasist kolonn pikkusega 4 m, sisediameetriga 0,32 mm, kile paksusega 0,25 μm

— statsionaarne faas: 5 % fenüül95 % dimetüülpolüsiloksaan

— kolonni temperatuur: algtemperatuur 60 °C, mida hoitakse 2 minutit, seejärel tõstetakse temperatuur kiirusega 35 °C minutis 340 °C juurde ja hoitakse 5 minutit

— detektori temperatuur: 350 °C

— sisestatava proovi suurus: 1 μl.

5.8. Süstal mahutavusega 5 μl.

6. PROOVI VÕTMINE

On oluline, et labor saaks proovi, mis on tõeliselt esindav ja mida transportimine ega laos hoidmine ei ole kahjustanud ega muutnud.

Käesolevas rahvusvahelises standardis esitatud meetodis ei täpsustata proovi võtmist. Soovitatav proovi võtmise meetod on esitatud standardis IDF 50C:1995 ISO 707–1997 — Piim ja piimatooted — Proovivõtumeetodid.

7. MÄÄRAMISE KÄIK

7.1. **Uuritava proovi ja katsekoguse ettevalmistamine.**

Järgitakse standardit ISO 14156 IDF 172:2001.

7.1.1. *Võiõli, või*

7.1.1.1. Sulatada 50–100 g uuritavat proovi kuivatuskapis (5.5).

7.1.1.2. Panna 0,5–1,0 g veevaba naatriumsulfaati (5.4) kurdfilterpaberile.

7.1.1.3. Filtrida rasv läbi veevaba naatriumsulfaadiga filterpaberi ning koguda filtraat kuivatuskapis (5.5) hoitavasse keeduklaasi. Sulatatud või dekanteerimisel filterpaberile tuleb hoolitseda selle eest, et sinna ei satuks vadakut.

7.1.2. *Koor*

7.1.2.1. Proov soojendada temperatuurini 20 ± 2 °C.

7.1.2.2. Segada või loksutada proovi hoolikalt.

7.1.2.3. Lahjendada sobiv kogus uuritavat proovi, et saada katsekogus 100 ml, milles rasva massiosa on umbes 4 %.

▼B

7.1.2.4. Jätkata nagu toor- ja homogeniseeritud piima puhul (vt standardi ISO 14156 IDF 172:2001 lõike 8 punkt 3), et eraldada rasv koorest.

7.1.2.5. Kaaluda 10 ml mõõtekolbi (5.2) 1 g eraldatud rasva 1 mg täpsusega. Lisada 1 ml punktis 7.2.2 määratletud lahust. Täiendada *n*-heksaaniga (4.1) 10 ml-ni ja homogeniseerida.

7.1.2.6. Panna 10milliliitrisesse mõõtekolbi (5.2) 1 ml punktis 7.1.1.2 määratletud lahust ja lahjendada see *n*-heksaaniga (4.1) 10 milliliitrini.

7.2. **Kalibreerimislahuste valmistamine**

7.2.1. Lahustada 100 mg enanthappe triglütseriidi (4.3) 10 ml n-heksaanis (4.1).

7.2.2. Lahustada 100 mg kapronhappe triglütseriidi (4.2) 10 ml n-heksaanis (4.1).

7.2.3. Panna 10 ml mõõtekolbi (5.2) 1 ml punktis 7.2.2 määratletud lahust. Täiendada n-heksaaniga (4.1) 10 ml-ni.

7.2.4. Panna 10 ml mõõtekolbi (5.2) 1 ml punktis 7.2.1 määratletud lahust ja 1 ml punktis 7.2.2 määratletud lahust. Täiendada n-heksaaniga (4.1) 10 ml-ni.

7.2.5. Panna 10 ml mõõtekolbi (5.2) 1 ml punktis 7.2.4 määratletud lahust ja täiendada n-heksaaniga (4.1) 10 ml-ni.

7.3. **Kromatograafiline määramine**

7.3.1. Süstida kolonni kaks korda 1 µl punktis 7.2.5 määratletud standardlahust.

7.3.2. Süstida kolonni 1 µl iga proovi lahust.

*Märkus:* Kui kasutatakse kolonnile paigaldatud injektorit, tuleb nii standard- kui ka proovilahuseid täiendavalt lahjendada.

7.3.3. Korrata punktis 7.3.1 kirjeldatud tegevust iga kolme proovi süstimise eel ja järel, nii et nimetatud proovid jäävad standardlahuse kahekordsete süstide vahele. Tulemused saadakse standardkromatogrammide kalibreerimistegurite aritmeetiliste keskmiste põhjal.

8. TULEMUSTE ARVUTAMINE

Iga kromatogrammi puhul integreeritakse enanthappe ja kapronhappe triglütseriididele vastavate piikide pindala.

Neid juhtnööre tuleb järgida iga järjestatud rühmituse (s.t rühmaks ühendatud proovide kogumi) puhul, millele on vahetult eelnenud kaks standardlahuse süsti ($STD_1$) ja vahetult järgnenud samuti kaks standardsüsti ($STD_2$).

8.1. **Kalibreerimine**

8.1.1. Arvutada $STD_1$ standardlahuse süstide kalibreerimistegurid $Rf_1(a)$ ja $Rf_1(b)$.

$Rf_1$ (a) või (b) = (kapronhappe triglütseriidi piigi pindala/enanthappe triglütseriidi piigi pindala) × 100

Arvutada välja nende kalibreerimistegurite aritmeetiline keskmine $Rf_1$:

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

8.1.2. Samal viisil arvutada välja $STD_2$ kalibreerimistegurite aritmeetiline keskmine $Rf_2$.

8.1.3. Seejärel arvutada välja kalibreerimistegurite aritmeetiline keskmine Rf.

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

8.2. **Uuritavad proovid**

Iga proovi kromatogrammi puhul, mis on saadud $STD_1$ ja $STD_2$ vahel, arvutatakse välja enanthappesisaldus C (kilogrammides ühe tonni kohta):

C = (enanthappe triglütseriidi piigi pindala × Rf × 100)/(kapronhappe triglütseriidi piigi pindala × Wt × 1 000)

kus:

— Wt = võetud rasva kaal (g),

— 100 = proovi lahuse maht,

— 1 000 = ümberarvutuskoefitsient (µg/g — kg/t).

▼B

Võiproovide puhul võtta arvesse või rasvasisaldust ja arvutada korrigeeritud kontsentratsiooni väärtus $C_{või}$ (kilogrammides ühe tonni või kohta)

$$C_{või} = C_{rasv} \times F,$$

kus F on või rasvasisaldus.

9. TÄPSUS

Või ISO standarditele 5725–1 ja 5725–2 vastava laboritevahelise määramise üksikasjad on esitatud punktis 12.

Korratavuse ja reprodutseeritavuse piirnormide väärtused on väljendatud 95 % usaldusnivoo jaoks ega pruugi olla kohaldatavad muude kontsentratsioonivahemike ja toodete suhtes.

9.1. **Korratavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud lühikese ajavahemiku jooksul sama meetodiga, identse katsematerjaliga, samas laboris, sama katse läbiviija poolt, samu katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi olla rohkem kui 5 %-l juhtudel suurem kui 0,35 kg/t.

9.2. **Reprodutseeritavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud sama meetodiga, identse katsematerjaliga, erinevates laborites, erinevate katse läbiviijate poolt, erinevaid katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi olla rohkem kui 5 %-l juhtudel suurem kui 0,66 kg/t.

10. LUBATUD HÄLBED: ALAMMÄÄRAD (MITTEPIISAVA KOGUSE PUHUL)

10.1. **Toote nõuetekohase märgistamise kontrollimiseks võetakse märgistatud tootest kolm proovi.**

10.2. **Või ja kontsentreeritud või**

10.2.1. Lisatakse 11 kg vähemalt 95 % puhtusastmega enanthappe triglütseriidi ühe tonni või kohta (s.t 10,45 kg/t).

10.2.2. Toote analüüsil kasutatakse kolmest proovist saadud tulemusi lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 9,51 kg/t (95 % lisandi alammäärast 95 % puhtusastmega enanthappe triglütseriidi puhul, ühekordne määramine);

— 6,89 kg/t (70 % lisandi alammäärast 95 % puhtusastmega enanthappe triglütseriidide puhul, ühekordne määramine);

— kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 9,51 kg/t ja 6,89 kg/t vahel.

10.3. **Koor**

10.3.1. Lisatakse 10 kg vähemalt 95 % puhtusastmega enanthappe triglütseriidi ühe tonni piimarasva kohta (s.t 9,50 kg ühe tonni märgistatava piimarasva kohta).

10.3.2. Toote analüüsil kasutatakse kolmest proovist saadud tulemusi lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 8,60 kg/t (95 % lisamise alammäärast 95 % puhtusastmega enanthappe triglütseriidi puhul, ühekordne määramine);

— 6,23 kg/t (70 % lisamise alammäärast 95 % puhtusastmega enanthappe triglütseriidide puhul, ühekordne määramine);

▼B

— kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 8,60 kg/t ja 6,23 kg/t vahel.

11. LUBATUD HÄLBED: ÜLEMMÄÄRAD (KOGUSE ÜLETAMISEL ROHKEM KUI 20 %)

11.1. **Toote nõuetekohase märgistamise kontrollimiseks võetakse märgistatud tootest kolm proovi.**

11.2. **Või ja kontsentreeritud või**

11.2.1. Toote analüüsimisel saadud kolme proovi tulemusi kasutatakse lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning nimetatud tulemuste keskmist võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— ülemmäär on 12,96 kg/t.

11.3. **Koor**

11.3.1. Toote analüüsimisel saadud kolme proovi tulemusi kasutatakse lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning nimetatud tulemuste keskmist võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— ülemmäär on 11,82 kg/t.

12. TÄIENDAV TEAVE: TRIGLÜTSERIIDIDE ANALÜÜSI ABIL VÕIRASVAS TRIENANTOAADI MÄÄRAMISE TULEMUSTE STATISTILINE ANALÜÜS

Märgistatud või trienantoaadisisalduse määramiseks on läbi viidud neli ühisuuringut.

Esimeses ringtestis osales üheksa laborit ning kasutatavate analüütiliste meetodite spetsifikatsioone ei määratletud.

Teises ringtestis osales kümme laborit ja kohaldati nelja eri meetodit:

— metüülheptanoaadi kvantitatiivne määramine, kasutades sisestandardina *n*-nonaani või metüülnonanoaati;

— trienantoaadi kvantitatiivne määramine, kasutades sisestandardina trikaproaati;

— metüülheptanoaadi kvantitatiivne määramine, kasutades kalibreerimisproovi/segu;

— metüülheptanoaadi kvantitatiivne määramine, kasutades kalibreerimissegu.

Lisaks kasutati FAME analüüsimisel kahte erinevat metüülimismeetodit (De Francesco ning Christopherson ja Glass).

Saadud tulemuste põhjal valiti kolmanda ringtesti jaoks välja kaks meetodit:

— metüülheptanoaadi kvantitatiivne määramine, kasutades sisestandardina *n*-nonaani või metüülnonanoaati;

— trienantoaadi kvantitatiivne määramine, kasutades sisestandardina trikaproaati.

Seitsme labori tulemused näitasid, et FAME meetodi puhul oli varieeruvus suurem, ja seepärast otsustati triglütseriidi analüüsil kasutada üksnes trienantoaadi määramist meetodi q kohaselt (trienantoaadi kvantitatiivne määramine, kasutades sisestandardina trikaproaati). Lisaks tuleb läbi viia triglütseriidide analüüs kapillaarkolonni abil.

Neljandas ringtestis pandi ringlema neli proovi (A, B, C, D), mille kohta esitasid tulemused üheksa laborit (tabelid 1–2).

▼B

Kaks laborit (DE ja UE) analüüsisid proove FAME meetodiga.

Laborite väiksema arvu tõttu tehti statistiline analüüs nii andmete koguhulga (joonised 1–2) (sealhulgas FAME tulemused) kui ka triglütseriidide analüüsi andmete põhjal.

*Võõrväärtuste testid*

— Proov A: Dixoni, Cochrani ja Grubbsi testidega tunnistati 1 % ja 5 % tasemel võõrväärtuseks ühe labori tulemus.

— Proov B: Grubbsi testiga tunnistati 5 % tasemel võõrväärtuseks ühe labori tulemus.

— Proov C: Dixoni ja Grubbsi testidega tunnistati 1 % ja 5 % tasemel võõrväärtuseks ühe labori tulemus.

— Proov D: Dixoni ja Grubbsi testidega tunnistati 1 % ja 5 % tasemel võõrväärtuseks ühe labori tulemus.

Võõrväärtust ei võetud arvutustes arvesse.

Tuleb märkida, et FAME meetodi kasutamisel saadud tulemusi ei tunnistatud kohaldatud testidega ühtegi korda võõrväärtusteks.

*Täpsusparameetrid*

Tabelites 1 ja 2 on esitatud kõikide laborite tulemused ja tulemuste täpsuse parameetrid, mis on välja arvutatud piisava laborite arvu põhjal (8), kuid kahjuks ei ole nende saamiseks kasutatud ühte ja sama analüüsimeetodit.

Tabelites 3 ja 4 on esitatud üksnes triglütseriidi analüüsimise meetodi abil saadud tulemused ning vastavad täpsuse näitajad. Nende parameetrite vastuvõetavus sõltub sellest, kas pidada laborite väikest arvu (6) piisavaks.

Joonistel 2 ja 3 on näidatud Sr ja SR arengutendents, mis on välja arvutatud kahe eespool kirjeldatud andmekogumi nelja proovi põhjal.

Tabelis 5 on esitatud Sr ja SR väärtused koos vastavate koondväärtustega ning koondparameetrid r ja R.

Lisaks on välja arvutatud kriitiline erinevus usaldusnivool 95 %.

*Tabel 1*

**Triglütseriidide analüüsi meetodi + FAME* meetodi statistilised tulemused**

| Proov A | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RENNES | FR1 | 11,0 | 11,1 | 11,1 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 11,2 | 11,2 | 11,2 | Võõrväärtused | DK |
| ZPLA | DE* | 11,6 | 11,8 | 11,7 | Keskväärtus | 11,3 |
| ADAS | GB | 11,4 | 11,2 | 11,3 | Tegelik väärtus | 11,0 |
| CNEVA | FR2 | 11,4 | 11,4 | 11,4 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,09 |
| LODI | IT | 11,1 | 11,3 | 11,2 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 0,80 |
| EELA | FI | 11,3 | 11,2 | 11,3 | Korratavus r (95 %) | 0,26 |
| ISPRA | UE* | 11,0 | 11,0 | 11,0 | Suhteline korratavus r % | 2,24 |
| D.V.F.A. | DK | 13,3 | 11,8 | 12,6 | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,23 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR %) | 2,04 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,84 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 5,71 |

▼B

| Proov B | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RENNES | FR1 | 12,7 | 12,8 | 12,8 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 13,5 | 13,3 | 13,4 | Võõrväärtused | DK |
| ZPLA | DE* | 14,0 | 13,8 | 13,9 | Keskväärtus | 13,4 |
| ADAS | GB | 13,4 | 13,5 | 13,5 | Tegelik väärtus | 13,5 |
| CNEVA | FR2 | 13,3 | 13,4 | 13,4 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,14 |
| LODI | IT | 13,9 | 13,5 | 13,7 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 1,04 |
| EELA | FI | 13,4 | 13,2 | 13,3 | Korratavuse r (95 %) | 0,40 |
| ISPRA | UE* | 13,2 | 13,3 | 13,3 | Suhteline korratavuse r % | 2,91 |
| D.V.F.A. | DK | 14,1 | 14,8 | 14,5 | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,35 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR %) | 2,61 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,99 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 7,31 |

*Tabel 2*

**Triglütseriidide analüüsi meetodi + FAME* meetodi statistilised tulemused**

| Proov C | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RENNES | FR1 | 8,9 | 9,2 | 9,1 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 9,2 | 9,3 | 9,3 | Võõrväärtused | DK |
| ZPLA | DE* | 9,2 | 9,4 | 9,3 | Keskväärtus | 9,3 |
| ADAS | GB | 9,5 | 9,3 | 9,4 | Tegelik väärtus | 9,3 |
| CNEVA | FR2 | 9,4 | 9,4 | 9,4 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,14 |
| LODI | IT | 9,2 | 9,5 | 9,4 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 1,50 |
| EELA | FI | 9,4 | 9,6 | 9,5 | Korratavuse r (95 %) | 0,40 |
| ISPRA | UE* | 9,4 | 9,3 | 9,4 | Suhteline korratavuse r % | 4,20 |
| D.V.F.A. | DK | 10,7 | 10,9 | 10,8 | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,17 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR %) | 1,82 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,47 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 5,10 |
| Proov D | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 8 |
| RENNES | R1 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 2,1 | 2,1 | 2,1 | Võõrväärtused | DK |
| ZPLA | DE* | 2,3 | 2,3 | 2,3 | Keskväärtus | 2,1 |
| ADAS | GB | 2,1 | 2,2 | 2,2 | Tegelik väärtus | 2,1 |
| CNEVA | FR2 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,08 |
| LODI | IT | 2,2 | 1,9 | 2,1 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 3,81 |
| EELA | FI | 2,3 | 2,3 | 2,3 | Korratavus r (95 %) | 0,22 |
| ISPRA | UE* | 2,3 | 2,3 | 2,3 | Suhteline korratavus r % | 10,67 |
| D.V.F.A. | DK | 3,4 | 2,9 | 3,2 | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,24 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR %) | 11,43 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,67 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 32,00 |

▼B

*Tabel 3*

**Triglütseriidide analüüsi meetodi + FAME* meetodi statistilised tulemused**

| Proov A | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RENNES | FR1 | 11,0 | 11,1 | 11,1 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 11,2 | 11,2 | 11,2 | Võõrväärtused | DK |
| ADAS | GB | 11,4 | 11,2 | 11,3 | Keskväärtus | 11,2 |
| CNEVA | FR2 | 11,4 | 11,4 | 11,4 | Tegelik väärtus | 11,0 |
| LODI | IT | 11,1 | 11,3 | 11,2 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,09 |
| EELA | FI | 11,3 | 11,2 | 11,3 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 0,80 |
| D.V.F.A. | DK | 13,3 | 11,8 | 12,6 | Korratavus r (95 %) | 0,25 |
| | | | | | Suhteline korratavus r % | 2,24 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,13 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR %) | 1,16 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,36 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 3,25 |
| Proov B | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 6 |
| RENNES | FR1 | 12,7 | 12,8 | 12,8 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 13,5 | 13,3 | 13,4 | Võõrväärtused | DK |
| ADAS | GB | 13,4 | 13,5 | 13,5 | Keskväärtus | 13,3 |
| CNEVA | FR2 | 13,3 | 13,4 | 13,4 | Tegelik väärtus | 13,5 |
| LODI | IT | 13,9 | 13,5 | 13,7 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,15 |
| EELA | FI | 13,4 | 13,2 | 13,3 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 1,13 |
| D.V.F.A. | DK | 14,1 | 14,8 | 14,5 | Korratavus r (95 %) | 0,42 |
| | | | | | Suhteline korratavus r % | 3,16 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,33 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR%) | 2,48 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,93 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 6,94 |

*Tabel 4*

**Triglütseriidide analüüsi meetodi + FAME* meetodi statistilised tulemused**

| Proov C | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RENNES | FR1 | 8,9 | 9,2 | 9,1 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 9,2 | 9,3 | 9,3 | Võõrväärtused | DK |
| ADAS | GB | 9,5 | 9,3 | 9,4 | Keskväärtus | 9,3 |
| CNEVA | FR2 | 9,4 | 9,4 | 9,4 | Tegelik väärtus | 9,3 |
| LODI | IT | 9,2 | 9,5 | 9,4 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,15 |
| EELA | FI | 9,4 | 9,6 | 9,5 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 1,61 |
| D.V.F.A. | DK | 10,7 | 10,9 | 10,8 | Korratavus r (95 %) | 0,42 |
| | | | | | Suhteline korratavus r % | 4,51 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,19 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR %) | 2,04 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,53 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 5,71 |

▼B

| Proov D | | $R_1$ | $R_2$ | Keskmine | Laborite arv pärast võõrväärtuste väljajätmist | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RENNES | FR1 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | Võõrväärtuste arv | 1 |
| RIKILT | NL | 2,1 | 2,1 | 2,1 | Võõrväärtused<br>Keskmine | DK |
| | | | | | Keskväärtus | 2,1 |
| ADAS | GB | 2,1 | 2,2 | 2,2 | Tegelik väärtus | 2,1 |
| CNEVA | FR2 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | Korratavuse standardhälve (Sr) | 0,09 |
| LODI | IT | 2,2 | 1,9 | 2,1 | Korratavuse suhteline standardhälve (RSDr %) | 4,29 |
| EELA | FI | 2,3 | 2,3 | 2,3 | Korratavus r (95 %) | 0,26 |
| D.V.F.A. | DK | 3,4 | 2,9 | 3,2 | Suhteline korratavus r % | 12,01 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse standardhälve (SR) | 0,25 |
| | | | | | Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSDR %) | 11,90 |
| | | | | | Reprodutseeritavus R (95 %) | 0,69 |
| | | | | | Suhteline reprodutseeritavus R % | 33,32 |

*Tabel 5*

**Korratavus ja reprodutseeritavus (kaasa arvatud FAME)**

| | Laborite arv | Võõrväärtusi | Korratavus Sr (95 %) | Reprodutseeritavus SR (95 %) |
|---|---|---|---|---|
| Proov A | 8 | 1 | 0,09 | 0,23 |
| Proov B | 8 | 1 | 0,14 | 0,35 |
| Proov C | 8 | 1 | 0,14 | 0,17 |
| Proov D | 8 | 1 | 0,08 | 0,24 |
| Koondväärtus | | | 0,116 | 0,256 |
| | | | **R** | **R** |
| **Koondväärtus* 2,8** | | | **0,324** | **0,716** |

Kriitiline erinevus usaldusnivool 95 % on 0,40
Trienantoaadi minimaalne puhtusaste = 95 %
Trienantoaadi alammäär võirasvas = 11 kg/t
Arvestades kriitilise erinevuse väärtust usaldusnivool 95 %, ei tohi kahe tulemuse keskväärtus olla väiksem kui:

95 %lise puhtusega trienantoaadi lisamisel 10,05 kg/t.

**Korratavus ja reprodutseeritavus (välja arvatud FAME)**

| | Laborite arv | Võõrväärtusi | Korratavus Sr (95 %) | Reprodutseeritavus SR (95 %) |
|---|---|---|---|---|
| Proov A | 6 | 1 | 0,09 | 0,13 |
| Poov B | 6 | 1 | 0,15 | 0,33 |
| Proov C | 6 | 1 | 0,15 | 0,19 |
| Proov D | 6 | 1 | 0,09 | 0,25 |
| Koondväärtus | | | 0,124 | 0,237 |
| | | | **R** | **R** |
| **Koondväärtus * 2,8** | | | **0,347** | **0,663** |

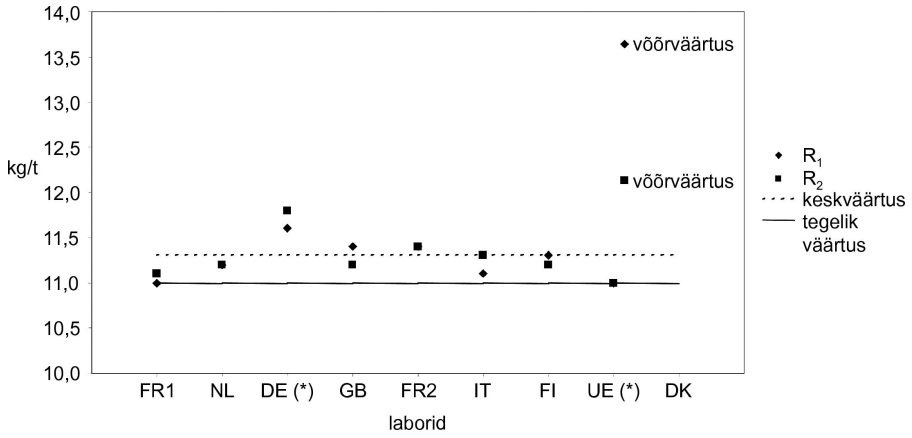
Kriitiline erinevus usaldusnivool 95 % on 0,36
Trienantoaadi minimaalne puhtusaste = 95 %
Trienantoaadi alammäär võirasvas = 11 kg/t
Arvestades kriitilise erinevuse väärtust usaldusnivool 95 %, ei tohi kahe tulemuse keskväärtus olla väiksem kui:

95 %lise puhtusega trienantoaadi lisamisel 10,09 kg/t.

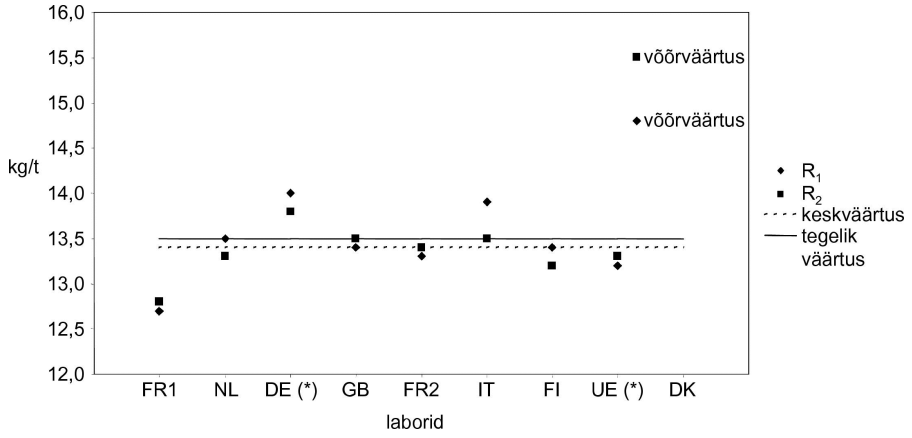
▼B

*Joonis 1* (*)

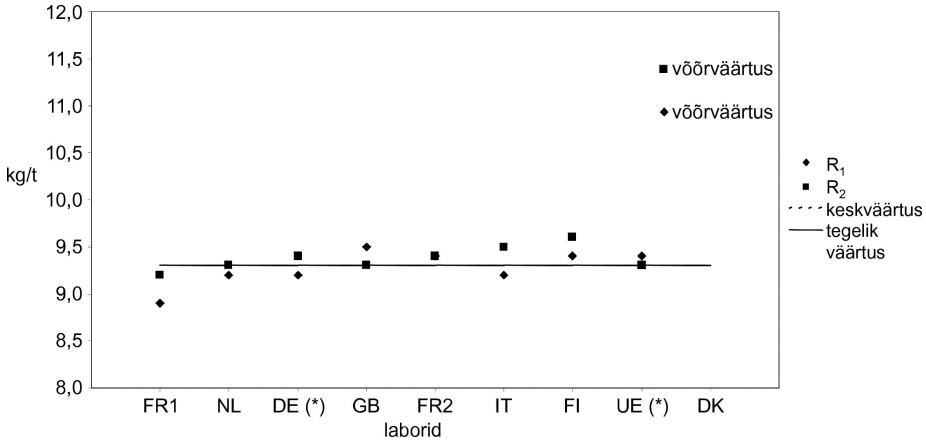
**Määramise tulemused: proov A**




**Määramise tulemused: proov B**



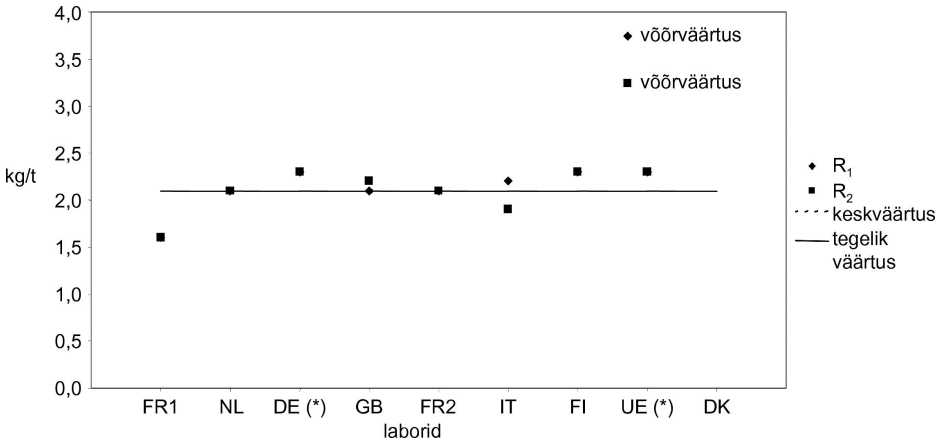

**Määramise tulemused: proov C**




(*) = FAME meetod.

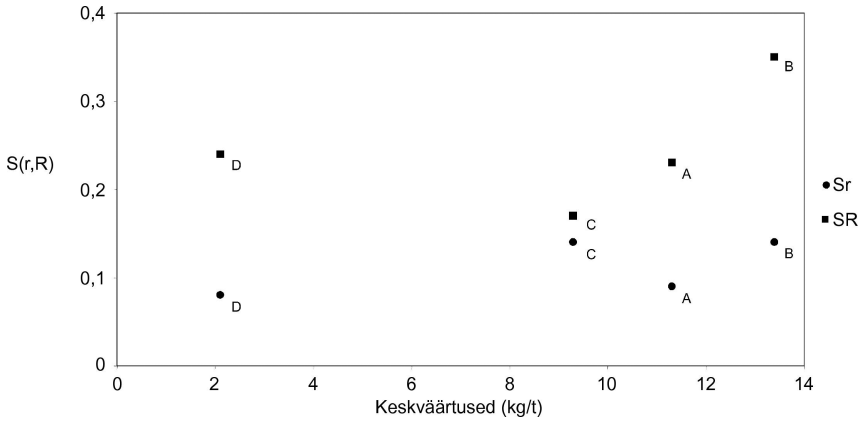
▼B

**Määramise tulemused: proov D**



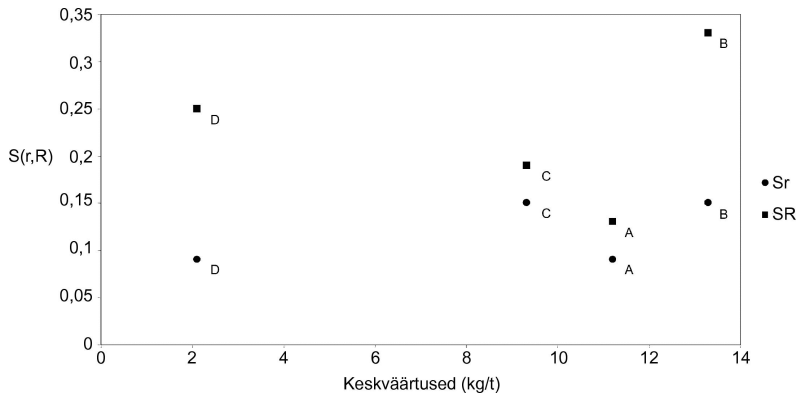

*Joonis 2*

**Korratavuse ja reprodutseeritavuse standardhälve mitmesugustel kontsentratsioonidel (triglütseriidide analüüs + FAME)**




*Joonis 3*

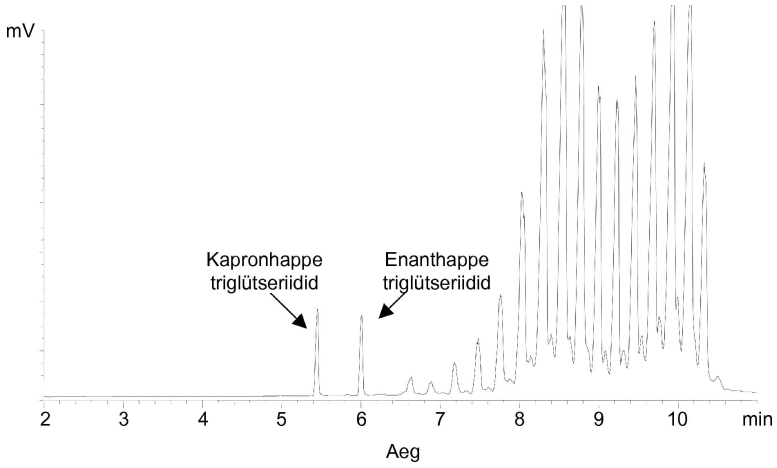
**Korratavuse ja reprodutseeritavuse standardhälve mitmesugustel kontsentratsioonidel (triglütseriidide analüüs)**



▼B

*Joonis 4*

**Näide kolonnile paigaldatud injektori kasutamise kohta**



▼B

*VI LISA*

**(Artikkel 5)**

**KONTSENTREERITUD VÕI, VÕI JA RÕÕSA KOORE VANILLIINISISALDUSE MÄÄRAMINE KÕRGSURVEVEDELIKKROMATOGRAAFIA ABIL**

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolevas meetodis kirjeldatakse vanilliini kvantitatiivset määramist kontsentreeritud võis, võis ja rõõsas koores.

2. PÕHIMÕTE

Teatav kogus proovi ekstraheeritakse isopropanooli/etanooli/atsetonitriili seguga (1:1:2). Suurem osa rasvast sadestatakse, jahutades proovi temperatuurini – 15 °C kuni – 20 °C, seejärel proov tsentrifuugitakse.

Pärast veega lahjendamist määratakse kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil vanilliinisisaldus.

3. SEADMED

Tavalised laboriseadmed, eeskätt järgmised;

3.1. sügavkülmik, töötab temperatuurivahemikus –15 °C kuni – 20 °C;

3.2. 2 ml mahuga ühekordsed süstlad;

3.3. membraanmikrofiltrid poori suurusega 0,45 μm, mis peavad vastu 5 % ekstraheerimislahust (4.4) sisaldavale lahusele;

3.4. vedelikkromatograaf, mis koosneb pumbast (läbivool 1,0 ml/min), injektorist (sisestatav maht 20 μl, sisestamine käsitsi või automaatselt), UV detektorist (lainepikkus 306 nm, täisskaala ulatus 0,01 Å), isekirjutajast või integraatorist ja 25 °C juures töötavast termostaadiga kolonnist;

3.5. analüütiline kolonn (250 mm × 4,6 mm (siseläbimõõt)), mis on täidetud LiChrospher RP 18ga (Merck, 5 μm) või samaväärse materjaliga;

3.6. kaitsekolonn (umbes 20 mm × 3 mm (siseläbimõõt)), mis on täidetud kuivalt LiChrospher RP 18ga (5–10 μm) või samaväärse materjaliga;

3.7. tsentrifuug, töökiirus 2 000 pööret minutis.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad.

4.1. Isopropanool.

4.2. 96mahuprotsendiline etanool.

4.3. Atsetonitriil.

4.4. Ekstraheerimislahus.

Segada isopropanool (4.1), etanool (4.2) ja atsetonitriil (4.3) vahekorras 1:1:2 (mahuosad).

4.5. Vanilliin (4-hüdroksü-3-metoksübensaldehüüd) ≥ 98 %.

4.5.1. *Vanilliini põhilahus (= 500 μg/ml).*

Kaaluda 100 ml mõõtekolbi 0,1 mg täpsusega umbes 50 mg (CM mg) vanilliini (4,5), lisada 25 ml ekstraheerimislahust (4,4) ja täiendada kolb veega kriipsuni.

4.5.2. *Vanilliini standardlahus (= 10 μg/ml).*

Pipettida 250 ml mõõtekolbi 5 ml vanilliini põhilahust (4.5.1) ja täiendada kolb veega kriipsuni.

4.5.3. *Metanool, HPLC-puhas.*

4.5.4. *Jää-äädikhape.*

4.5.5. *Vesi, HPLC-puhas.*

▼B

4.5.6. *HPLC liikuv faas.*

Segada 1 000 ml mõõtekolvis 300 ml metanooli (4.5.3), umbes 500 ml vett (4.5.5) ja 20 ml äädikhapet (4.5.4) ja täiendada mõõtekolb veega (4.5.5) kriipsuni. Filtritakse läbi 0,45 μm filtri (3.3).

5. MÄÄRAMISE KÄIK

5.1. **Uuritava proovi ettevalmistamine**

5.1.1. *Või*

Kuumutada proovi kuni sulamise alguseni. Vältida temperatuuri paikset tõusmist üle 30 °C. Või ei pruugi kaheks faasiks eralduda. Kui proov muutub piisavalt plastiliseks, homogeniseerida see raputamisega. Segada võid enne proovi võtmist 15 sekundit. Kaaluda 1 mg täpsusega umbes 5 g (uuritava proovi mass grammides) võid 100 ml mõõtekolbi.

5.1.2. *Kontsentreeritud või*

Vahetult enne proovi võtmist panna kontsentreeritud võid sisaldav anum kuivatuskappi, kus temperatuur on 40–50 °C, ja hoida seal kuni või täieliku sulamiseni. Segada proovi ringliigutuste või segajaga, vältides õhumullide tekkimist liiga tugeva segamise tulemusel. Kaaluda 1 mg täpsusega umbes 4 g (uuritava proovi mass grammides) kontsentreeritud võid 100 ml mõõtekolbi.

5.1.3. *Koor*

Soojendada proovi vesivannis või kuivatuskapis temperatuuril 35–40 °C. Ringliigutustega või vajaduse korral segaja abiga saavutada rasva ühtlane jaotumine. Jahutada proov kiiresti temperatuurini 20 ± 2 °C. Proov peaks välja nägema homogeensena, vastasel juhul tuleb toimingut korrata. Kaaluda 1 mg täpsusega umbes 10 g (uuritava proovi mass grammides) rõõska koort 100 ml mõõtekolbi.

5.2. **Katselahuse ettevalmistamine**

Lisada uuritavale proovile (5.1.1, 5.1.2 või 5.1.3) umbes 75 ml ekstraheerimislahust (4,4), loksutada või raputada tugevasti umbes 15 minutit ja täiendada anum ekstraheerimislahusega (4,4) kriipsuni. Sellest ekstraktist võtta umbes 10 ml ja panna korgiga katseklaasi. Panna katseklaas sügavkülmikusse (3,1) ja hoida seal umbes 30 minutit. Tsentrifuugida külma ekstrakti umbes 5 minutit kiirusel umbes 2 000 pööret minutis ja dekanteerida viivitamatult. Lasta dekanteeritud lahusel jahtuda toatemperatuurini. Pipettida 5 ml dekanteeritud lahust 100 ml mõõtekolbi ja täiendada kolb veega kriipsuni. Filtrida alikvoot läbi membraanmikrofiltri (3.3), kasutades süstalt (3.2). Filtraat on HPLC määramiseks valmis.

5.3. **Kalibreerimine**

Pipettida 100 ml mõõtekolbi 5 ml vanilliini standardlahust (4.5.2). Lisada 5 ml ekstraheerimislahust (4.4) ja täiendada veega kuni märgini. See lahus sisaldab 0,5 μg/ml vanilliini.

5.4. **Määramine kõrgsurvevedelikkromatograafia abil**

Lasta kromatograafiaseadmel umbes 30 minutit stabiliseeruda. Süstida standardlahust (5.3). Korrata seda seni, kuni kahe järjestikuse süstimise piigipindalade või piigikõrguste erinevus on väiksem kui 2 %. Kirjeldatud tingimustes on vanilliini retentsiooniaeg umbes 9 minutit. Analüüsida standardlahust (5.3) kaks korda, süstides 20 μl. Süstida 20 μl uuritavat lahust(5,2). Määrata saadud vanilliinipiigi pindala või kõrgus. Süstida 3)(5.standardlahust uuesti kaks korda pärast seda, kui uuritavat 2)(5.proovi on süstitud 10 korda.

6. TULEMUSTE ARVUTAMINE

Arvutada kahekordsete süstimiste vahel iga uuritavate proovide seeria vanilliinipiikide keskmine pindala (või kõrgus) (AC) (kokku neli pindala või kõrgust).

▼B

Arvutada kalibreerimistegur (R):

$$R = AC/CM,$$

kus CM on vanilliini mass milligrammides (4.5.1).

Uuritava proovi vanilliinisisaldus (C mg/kg) saadakse järgmise valemi abi:

$$C = [(AS \times 20 \times 0,96)/(SM \times R)]$$

kus:

AS = uuritava proovi vanilliinipiigi pindala või kõrgus

SM = uuritava proovi mass grammides (5.1.1, 5.1.2 või 5.1.3)

*Märkus.* Kui vanilliini määratakse rõõsas koores, tuleb märgistusaine kontsentratsioon väljendada märgistusaine milligrammides piimarasva kilogrammi kohta. Selleks korrutatakse C teguriga 100/f, kus f on koore rasvasisaldus massiprotsentides.

20 = tegur, millega võetakse arvesse standardproovi ja uuritava proovi lahjendamist

0,96 = paranduskoefitsient uuritava proovi esimese lahjendamise rasvasisalduse jaoks

*Märkus.* Piigipindala asemel võib kasutada piigikõrgusi 3)8.(vt.

7. MEETODI TÄPSUS

7.1. **Korratavus (r)**

Ühe töötaja poolt samade seadmete ja katsematerjalidega läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva määramise tulemused ei tohi erineda rohkem kui 16 mg/kg.

7.2. **Reprodutseeritavus (R)**

Kaks üksiktulemust, mis on saadud kahes eri laboris eri seadmetega, kuid sama katsematerjaliga, ei tohi erineda rohkem kui 27 mg/kg.

8. LUBATUD HÄLBED

8.1. Märgistusaine ühtlase jaotumise kontrollimiseks tuleb märgistatud tootest võtta kolm proovi.

8.2. Vanillist või sünteetilisest vanilliinist saadud märgistusaine

8.2.1. *4-hüdroksü-3-metoksübensaldehüüdi lisatakse 250 g ühe tonni või ja kontsentreeritud või kohta. Kui märgistatakse koort, lisatakse märgistusainet 250 g piimarasva tonni kohta.*

8.2.2. *Toote kolme proovi analüüsimisel saadud tulemusi kasutatakse lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:*

— 220,8 mg/kg (95 % lisamise alammäärast);

— 158,3 mg/kg (70 % lisamise alammäärast).

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 220,8 mg/kg ja 158,3 mg/kg vahel.

8.3. Üksnes vanillikupardest või nende täisekstraktidest saadud märgistusaine

8.3.1. *4-hüdroksü-3-metoksübensaldehüüdi lisatakse 100 g ühe tonni või ja kontsentreeritud või kohta. Kui märgistatakse koort, lisatakse märgistusainet 100 g piimarasva tonni kohta.*

▼B

8.3.2. *Toote kolme proovi analüüsimisel saadud tulemusi kasutatakse lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:*

— 78,3 mg/kg (95 % lisamise alammäärast);

— 53,3 mg/kg (70 % lisamise alammäärast).

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 78,3 mg/kg ja 53,3 mg/kg vahel.

9. MÄRKUSED

9.1. Kui vanilliini on lisatud 250 mg ühe kg võiõli kohta, leitakse vanilliini määramisel 97,0–103,8 % lisatud vanilliinikogusest. Keskmiselt leiti 99,9 % lisatud kogusest ja selle standardhälve 2,7 %.

9.2. Standardlahus sisaldab 5 % ekstraheerimislahust, et kompenseerida piigi laienemist uuritavas proovis sisalduva 5 % ekstraheerimislahuse tõttu. See võimaldab kvantitatiivset määramist piigi kõrguse põhjal.

9.3. Analüüs põhineb lineaarsel kalibreerimissirgel, mis läbib nullpunkti.

9.4. Esimesel analüüsimisel tuleb seda lineaarsust kontrollida standardlahuse (4.5.2) sobivate lahjenduste abil; seejärel kontrollitakse seda korrapäraste ajavahemike järel ning pärast HPLC seadme muutmist või parandamist. Pastöriseerimata koores või sellest valmistatud toodetes võib vanilliin laguneda vanilliinhappeks, divanilliiniks ja muudeks ühenditeks.

▼B

*VII LISA*

**(Artikkel 5)**

**BEETA-APO-8'-KAROTEENHAPPE ETÜÜLESTRI SPEKTROFOTOMEETRILINE MÄÄRAMINE VÕIS JA KONTSENTREERITUD VÕIS**

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolev meetod on ette nähtud β-apo-8'-karoteenhappe etüülestri (apokaroteenestri) kvantitatiivseks määramiseks võis ja kontsentreeritud võis. Apokaroteenestriks loetakse kõiki neid aineid kokku, mis esinevad käesolevas meetodis kirjeldatud tingimuste kohaselt eraldatud proovide ekstraktis ja neelavad valgust lainepikkusega 440 nm.

2. PÕHIMÕTE

Piimarasv lahustatakse petrooleetris ja mõõdetakse valguse neeldumine lahuses 440 nm juures. Apokaroteenestrisisaldus määratakse välise etaloni alusel.

3. SEADMED

3.1. Pipetid — gradueeritud, maht 0,25, 0,50, 0,75 ja 1,0 ml.

3.2. Spektrofotomeeter — võimaldab töötada 440 nm (ja 447–449 nm) juures, on varustatud küvettidega, mille optilise tee pikkus on 1 cm.

3.3. Mõõtekolvid, 20 ml ja 100 ml.

3.4. Analüütilised kaalud, tundlikkus 0,1 mg, mõõtetäpsus 1 mg, jaotise väärtus 0,1 mg.

3.5. Kuivatuskapp, 45 ± 1 °C.

3.6. Tuhavabad kiirfiltrid.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad.

4.1. Apokaroteenestri suspensioon (ligikaudu 20protsendiline).

4.1.1. Suspensiooni kontsentratsioon määratakse järgmiselt.

Soojendada suspensioon temperatuurini 45–50 °C ja homogeniseerida avamata originaalpakendis. Kaaluda mõõtekolbi (100 ml) umbes 400 mg ainet, lahustada 20 ml kloroformiga (4.4) ja täiendada tsükloheksaaniga (4.5) märgini. Lahjendada 5 ml saadud lahust tsükloheksaaniga 100 milliliitrini (lahus A). Lahjendada 5 ml lahust A tsükloheksaaniga 100 milliliitrini. Mõõta neeldumine 447–449 nm juures (1 cm küvetid, võrdlusküvetis tsükloheksaan, mõõta lainepikkusel, mille puhul neeldumine on suurim).

Apokaroteenestrisisaldus P (%) = $(Abs_{maks} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **ehk** teisiti kirjutatult: $(Abs_{maks} / 2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

$Abs_{maks}$ = mõõdetava lahuse neeldumine neeldumismaksimumis

$M_{susp}$ = suspensiooni mass (g)

2 550 = standardaine Abs (1 %, 1 cm)

P = suspensiooni puhtus (sisaldus) protsentides

▼B

*Märkus*. Apokaroteenestri suspensioon on tundlik õhu, soojuse ja valguse suhtes. Avamata originaalpakendis (mis on suletud lämmastiku atmosfääris) ja jahedas võib seda säilitada ligikaudu 12 kuud. Pärast avamist tuleb sisu lühikese aja jooksul ära kasutada.

4.1.2. Apokaroteenestri standardlahus kontsentratsiooniga ligikaudu 0,2 mg/ml

Kaaluda täpsusega 1 mg ligikaudu 0,100 g apokaroteenestri suspensiooni (4.1.1) (W), lahustada see petrooleetris(4,2), kanda kvantitatiivselt üle 100 ml mõõtkolbi ja täiendada petrooleetriga märgini.

Saadud lahus sisaldab (W × P)/10 mg/ml apokaroteenestrit.

*Märkus*. Lahust tuleb säilitada jahedas ja pimedas. Lahuse säilimisaeg on 1 kuu.

4.2. Petrooleeter (40–60 °C).

4.3. Naatriumsulfaat, veevaba, granuleeritud, enne kasutamist kuivatatud 102 °C juures kaks tundi.

4.4. Kloroform.

4.5. Tsükloheksaan.

5. MÄÄRAMISE KÄIK

5.1. **Uuritava proovi ettevalmistamine**

5.1.1. *Kontsentreeritud või*

Proov sulatatakse kuivatuskapis ligikaudu 45 °C juures.

5.1.2. *Või*

Sulatada proov kuivatuskapis ligikaudu 45 °C juures ja filtrida esindav osa sellest 45 °C juures läbi filtri, millel on ligikaudu 10 g veevaba naatriumsulfaati(4,3); töökoha temperatuur hoida 45 °C juures ning varjata seda tugeva päeva- ja tehisvalguse eest. Koguda sobiv kogus piimarasva.

5.2. **Määramine**

Kaaluda 1 mg täpsusega ligikaudu 1 g kontsentreeritud või (või punkti 5.1.2 kohaselt eraldatud piimarasva) kaalutis (M). Kanda see petrooleetri(4,2) abil kvantitatiivselt üle 20 ml mõõtekolbi (V), täiendada märgini ja segada hoolikalt.

Panna 1 cm küvetti alikvoot ja mõõta valguse neeldumine lainepikkusel 440 nm võrdlusküveti suhtes, milles on puhas petrooleeter. Leida kalibreerimisgraafiku abil (C µg/ml) apokaroteenestri kontsentratsioon uuritavas lahuses.

5.3. **Kalibreerimine**

Pipettida viide 100 ml mahuga mõõtkolbi 0, 0,25, 0,5, 0,75 ja 1,0 ml apokaroteenestri standardlahust (4.1.2). Lahjendada petrooleetriga(4,2) märgini ja segada.

Saadud lahuste kontsentratsioonid on vahemikus 0–2 µg/ml; need arvutatakse täpselt välja, lähtudes standardlahuse (4.1.2) kontsentratsioonist (W × P)/10 mg/ml. Mõõta valguse neeldumine nendes lahustes lainepikkusel 440 nm võrdlusküveti suhtes, milles on puhas petrooleeter(4,2).

Koostada kalibreerimisgraafik, mille y-teljel on neeldumise ja x-teljel apokaroteenestri kontsentratsiooni väärtused. Arvutatakse kalibreerimisgraafiku võrrand.

▼B

6. TULEMUSTE ARVUTAMINE

6.1. Apokaroteenestrisisaldus (milligrammides ühe kilogrammi toote kohta) leitakse järgmiselt:

kontsentreeritud või: (C × V)/M;

või: 0,82 (C × V)M,

kus:

C = kalibreerimisgraafiku(5,3) abil leitud apokaroteenestrisisaldus (μg/ml)

V = uuritava lahuse(5,2) maht milliliitrites

M = uuritava proovikoguse(5,2) mass grammides

0,82 = parandustegur, mis võtab arvesse piimarasvasisaldust võis

7. MEETODI TÄPSUS

7.1. **Korratavus**

7.1.1. *Või analüüs*

Ühe töötaja poolt samade seadmete ja katsematerjalidega läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva määramise tulemuste erinevus ei tohi olla suurem kui 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Kontsentreeritud või analüüs*

Ühe töötaja poolt samade seadmete ja katsematerjalidega läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva määramise tulemuste erinevus ei tohi olla suurem kui 1,6 mg/kg.

7.2. **Reprodutseeritavus**

7.2.1. *Või analüüs*

Kaks üksiktulemust, mis on saadud kahes eri laboris eri seadmetega, kuid sama katsematerjaliga, ei tohi erineda rohkem kui 4,7 mg/kg.

7.2.2. ***Kontsentreeritud või analüüs***

Kaks üksiktulemust, mis on saadud kahes eri laboris eri seadmetega, kuid sama katsematerjaliga, ei tohi erineda rohkem kui 5,3 mg/kg.

7.3. **Täpsust iseloomustavate andmete päritolu**

Täpsust iseloomustavad andmed on saadud katsega, mis tehti 1995. aastal 11 laboris 12 märgistatud võiprooviga (kuus pimekatset) ja 12 märgistatud kontsentreeritud või prooviga (kuus pimekatset).

8. LUBATUD HÄLBED

8.1. Märgistusaine ühtlase jaotumise kontrollimiseks tuleb märgistatud tootest võtta kolm proovi.

8.2. **Või**

8.2.1. Apokaroteenestri lisamise määr (arvestades taustneeldumist) on 22 mg/kg.

8.2.2. Toote analüüsil kasutatakse kolmest proovist saadud tulemusi lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 17,7 mg/kg (95 % lisamise alammäärast);

— 12,2 mg/kg (70 % lisamise alammäärast).

▼B

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 17,7 mg/kg ja 12,2 mg/kg vahel.

8.3. **Kontsentreeritud või**

8.3.1. Apokaroteenestri lisamise määr (arvestades taustneeldumist) on kontsentreeritud või puhul 24 mg/kg.

Toote analüüsil kasutatakse kolmest proovist saadud tulemusi lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 19,2 mg/kg (95 % lisamise alammäärast);

— 13,2 mg/kg (70 % lisamise alammäärast).

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 19,2 mg/kg ja 13,2 mg/kg vahel.

▼B

*VIII LISA*

**(Artikkel 5)**

**SITOSTEROOLI VÕI STIGMASTEROOLI MÄÄRAMINE KAPILLAARGAASIKROMATOGRAAFIA ABIL VÕIS VÕI KONTSENTREERITUD VÕIS**

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga määratakse sitosterooli või stigmasterooli kogus võis ja kontsentreeritud võis. Sitosteroolisisalduse all peetakse silmas β-sitosterooli- ja 22-dihüdro-β-sitosteroolisisalduse summat võis; muude sitosteroolide sisaldust peetakse tähtsusetuks.

2. PÕHIMÕTE

Või või kontsentreeritud või seebistatakse etanoolilahuses kaaliumhüdroksiidiga ja mitteseebistuvad komponendid ekstraheeritakse dietüüleetriga.

Steroolid viiakse üle trimetüülsilüüleetriteks ja määratakse kapillaarkolonn-gaasikromatograafia abil, kasutades sisestandardina betuliini.

3. SEADMED

3.1. Püstjahutiga varustatud lihvklaasühendustega 150 ml seebistamiskolb.

3.2. 500 ml jaotuslehtrid.

3.3. 250 ml kolvid.

3.4. Ülerõhu kõrvaldamise süsteemiga ligikaudu 250 ml lehtrid dietüüleetri jääkide kogumiseks.

3.5. Klaasfilterpõhjaga 350 mm × 20 mm klaaskolonn.

3.6. Vesivann või soojendusümbris.

3.7. 2 ml reaktsiooninõud.

3.8. Gaasikromatograaf, millel saab töötada kapillaarkolonniga ja mis on varustatud järgmistest seadistest koosneva jaotussüsteemiga:

3.8.1. termostateeritud kolonnikamber, mis hoiab nõutavat temperatuuri täpsusega ± 1 °C;

3.8.2. reguleeritava temperatuuriga aurustamisseadis;

3.8.3. leekionisatsioondetektor ja muundurvõimendi;

3.8.4. integraator-isekirjutaja, mida saab kasutada koos muundurvõimendiga (3.8.3.).

3.9. Kvartsklaasist kapillaarkolonn, täielikult kaetud BP1 ühtlase paksusega (0,25 μm) kihiga või samaväärse materjaliga (või mis tahes muu vähemalt samaväärse lahutusvõimega kolonn); kolonn peab võimaldama lahutada lanosterooli ja sitosterooli trimetüül-silüülderivaate. Sobib kolonn pikkusega 12 m ja sisediameetriga 0,2 mm.

3.10. Karastatud nõelaga 1 μl mahuga gaasikromatograafias kasutatav mikrosüstal.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett.

4.1. Etanool, vähemalt 95 % puhtusega.

4.2. Kaaliumhüdroksiid, 60 % lahus: lahustada vees 600 g kaaliumhüdroksiidi (vähemalt 85protsendilist) ja täiendada veega ühe liitrini.

▼B

4.3. Betuliin, vähemalt 99 % puhtusastmega.

4.3.1. Betuliini lahused dietüüleetris (4.4.).

4.3.1.1. Sitosterooli määramisel peab betuliinilahuse kontsentratsioon olema 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. Stigmasterooli määramisel peab betuliinilahuse kontsentratsioon olema 0,4 mg/ml.

4.4. Dietüüleeter, analüütiliselt puhas (ei sisalda peroksiide ega peroksiidijääke).

4.5. Naatriumsulfaat, veevaba, granuleeritud, enne kasutamist kuivatatud 102 °C juures kaks tundi.

4.6. Silüüliv reaktiiv, näiteks TRI-SIL (Pierce Chemical Co, kataloogi nr 49001) või sellega samaväärne reaktiiv. (Hoiatus! On tuleohtlik, mürgine, söövitav ja tõenäoliselt kantserogeenne! Labori personal peab tundma TRI-SILi kasutamise ohutustingimusi ja võtma vajalikud meetmed.)

4.7. Lanosterool.

4.8. Sitosterool, vähemalt 90 % puhtusega (P).

*Märkus 1.* Kalibreerimiseks vajalike standardainete puhtuse määramisel tuleb kasutada normaliseerimismeetodit. Eeldatakse, et kromatogrammil ilmuvad kõik proovis olevad steroolid, piikide kogupindala vastab 100 %le steroolkomponentidele ja detektor reageerib kõikidele steroolidele ühte moodi. Tuleb kontrollida, et määratavate kontsentratsioonide vahemikus on süsteem lineaarne.

4.8.1. Sitosterooli standardlahus: valmistada sitosterooli (4.8.) lahus dietüüleetris (4.4.) kontsentratsiooniga ligikaudu 0,5 mg/ml ($W_1$) täpsusega 0,001 mg/ml.

4.9. Stigmasterool, vähemalt 90 % puhtusastmega (P).

4.9.1. Stigmasterooli standardlahus: valmistada stigmasterooli (4.9.) lahus dietüüleetris (4.4.) kontsentratsiooniga ligikaudu 0,2 mg/ml ($W_1$) täpsusega 0,001 mg/ml.

4.10. Lahutusvõime kontrollimise segu. Valmistada lahus, mis sisaldab 0,05 mg/ml lanosterooli (4.7.) ja 0,5 mg/ml sitosterooli (4.8.) dietüüleetris (4.4.).

5. MEETOD

5.1. **Kromatograafia standardlahuste valmistamine**

Uuritava sterooli standardlahusele tuleb lisada sisestandardi lahus (4.3.1.) samal ajal, kui see lisatakse seebistatud proovile (vt 5.2.2.).

5.1.1. Sitosterooli standardlahus kromatograafiliseks määramiseks: kummassegi reaktsiooninõusse (3.7.) kanda 1 ml sitosterooli standardlahust (4.8.1.) ja kõrvaldada sellest dietüüleeter lämmastikuvoolu abil. Lisada 1 ml sisestandardi lahust (4.3.1.1.) ja kõrvaldada uuesti dietüüleeter lämmastikuvoolu abil.

5.1.2. Stigmasterooli standardlahus kromatograafiliseks määramiseks: kummassegi reaktsioonipudelisse (3.7.) kanda 1 ml stigmasterooli standardlahust (4.9.1.) ja kõrvaldada sellest dietüüleeter lämmastikuvoolu abil. Lisada 1 ml sisestandardi lahust (4.3.1.2.) ja kõrvaldada uuesti dietüüleeter lämmastikuvoolu abil.

5.2. **Mitteseebistuvate komponentide ettevalmistamine**

5.2.1. Võiproov sulatatakse temperatuuril kuni 35 °C ja segatakse põhjalikult läbi.

Kaaluda 150 ml kolbi (3.1.) 1 mg täpsusega ligikaudu 1 g võid ($W_2$) või kontsentreeritud võid ($W_2$). Lisada 50 ml etanooli (4.1.) ja 10 ml kaaliumhüdroksiidi lahust (4.2.). Kolb ühendada püstjahutiga ja soojendada 30 minutit ligikaudu 75 °C juures. Eemaldada püstjahuti ja jahutada kolb ligikaudu toatemperatuurini.

▼B

5.2.2. Lisada kolbi 1,0 ml standardlahust (4.3.1.1. või 4.3.1.2.) vastavalt sellele, kas määratakse sitosterooli või stigmasterooli. Segada hoolikalt. Kolvi sisu viia kvantitatiivselt üle 500 ml jaotuslehtrisse (3.2.), pestes kolbi kõigepealt 50 ml veega ja siis 250 ml dietüüleetriga (4.4.). Jaotuslehtrit loksutada energiliselt kaks minutit ja lasta faasidel eralduda. Seejärel lasta alumine veekiht välja ja pesta eetrikihti, loksutades seda järjest neli korda 100 milliliitriste veekogustega.

*Märkus 2.* Emulsiooni tekkimise vältimiseks tuleb esimesel kahel veega pesemisel olla ettevaatlik, pöörates jaotuslehtrit ettevaatlikult 10 korda tagurpidi ja tagasi. Kolmandal pesemisel võib jaotuslehtri sisu 30 sekundit energiliselt loksutada. Kui tekib emulsioon, võib selle lõhkuda 5–10 ml etanooli lisamisega. Pärast etanooli lisamist tuleb kindlasti teha veel kaks energilist lisapesemist veega.

5.2.3. Lasta selge seebivaba eetrikiht läbi 30 g veevaba naatriumsulfaadiga (4.5.) täidetud klaaskolonni (3.5.). Koguda eeter 250 ml kolbi (3.3.). Lisada üks graanul tormilise keemise vältimiseks ja aurustada vesivannis või soojendusümbrises peaaegu kuivaks, kogudes lenduvad lahustijäägid.

*Märkus 3.* Kui proovi ekstrakti kuivaks aurustamine toimub liiga kõrgel temperatuuril, võib osa steroole minna kaotsi.

5.3. **Trimetüülsilüüleetrite valmistamine**

5.3.1. Kanda kolbi jäänud eetrilahus 2 ml dietüüleetri abil 2 ml reaktsiooninõusse (3.7.) ja kõrvaldada eeter lämmastikuvoolu abil. Pesta kolbi veel kaks korda 2 ml dietüüleetriga, kandes iga kord pesemiseks kasutatud lahustikoguse reaktsiooninõusse ja kõrvaldades eetri lämmastikuvooluga.

5.3.2. Silüülida proov 1 ml TRI-SILi (4.6.) lisamise abil. Sulgeda nõu ja lahustamiseks loksutada proovi energiliselt. Kui lahustumine ei ole täielik, soojendada proov temperatuurini 65–70 °C. Enne süstimist gaasikromatograafi lasta seista vähemalt viis minutit. Silüülida standardid samuti nagu proovid. Silüülida ka lahutusvõime kontrollimise segu (4.10.) samuti nagu proovid.

*Märkus 4:* Silüülimine peab toimuma veevabas keskkonnas. Betuliini ebatäieliku silüülimise tunnuseks on teise piigi ilmumine betuliini piigi lähedal.

Silüülimist segab etanooli olemasolu keskkonnas. See võib olla põhjustatud ebatäielikust pesemisest ekstraheerimisel. Sel juhul võib ekstraheerimisel kasutada veel lisaks viiendat pesemist, loksutades energiliselt 30 sekundit.

5.4. **Gaasikromatograafiline analüüs**

5.4.1. *Töötingimuste valimine*

Gaasikromatograaf seatakse töökorda tootja juhendite kohaselt.

Töö põhitingimused on järgmised:

— kolonni temperatuur: 265 °C;

— injektori temperatuur: 265 °C;

— detektori temperatuur: 300 °C;

— kandegaasi voolu kiirus: 0,6 ml/min;

— vesiniku rõhk: 84 kPa;

— õhurõhk: 155 kPa;

▼B

— proovi jaotussuhe: 10:1–50:1; jaotussuhe optimeeritakse tootja juhendite kohaselt ja seejärel kontrollitakse kontsentratsiooni määramise vahemikus detektori näitude lineaarsust.

*Märkus 5:* On väga oluline, et aurustamiskambrit puhastataks regulaarselt.

— sissesüstitav ainekogus: 1 µl TMSE lahust.

Enne analüüside alustamist lasta süsteemil tasakaalustuda, kuni saavutatakse rahuldavalt püsivad näidud.

Kolonni ja gaasikromatograafi omadusi arvestades võib neid tingimusi muuta, nii et kromatogrammid vastaksid järgmistele nõuetele:

— sitosterooli piik peab olema lanosterooli piigist piisavalt eraldunud. Joonisel 1 on esitatud näidiskromatogramm, mille peab andma silüülitud lahutusvõime testimise segu (4.10.) analüüs;

— steroolide suhtelised retentsiooniajad peavad olema järgmised:

kolesterool: 1,0

stigmasterool: 1,3

sitosterool: 1,5

betuliin: 2,5;

— betuliini retentsiooniaeg peab olema ligikaudu 24 minutit.

5.4.2. *Analüüsi käik*

Süstida 1 µl stigmasterooli või sitosterooli silüülitud standardlahust ja reguleerida välja integraatori kalibreerimisparameetrid.

Süstida veel kord 1 µl silüülitud standardlahust, et määrata retentsiooniajad betuliini suhtes.

Süstida 1 µl silüülitud proovi lahust ja mõõta piikide pindalad. Iga kromatograafilise analüüsi eel ja järel tuleb süstida standardid.

Tavaliselt tehakse kahe standardisüsti vahel kuus proovisüsti.

*Märkus 6:* Stigmasterooli piigi integreerimisel tuleb arvesse võtta ka kõiki joonise 2b punktidega 1, 2 ja 3 piiritletud „sabasid".

Kui hinnatakse kogu sitosteroolisisaldust, tuleb sitosterooli piigi integreerimisel arvesse võtta ka 22-dihüdro-β-sitosterooli (stigmastanooli) piiki, mis elueerub vahetult pärast sitosterooli (vt joonis 3b).

6. TULEMUSTE ARVUTAMINE

6.1. Määrata kummaski enne ja pärast proove süstitud standardis sisalduva sterooli piigi ja betuliini piigi pindala ning arvutada $R_1$:

$R_1$ = (standardi steroolipiigi keskmine pindala)/(standardi betuliinipiigi keskmine pindala).

Määrata proovis sisalduva sterooli (stigmasterooli ja sitosterooli) piigi ja betuliini piigi pindala ning arvutada $R_2$:

$R_2$ = (proovi steroolipiigi pindala)/(proovi betuliinipiigi pindala).

$W_1$ = standardi steroolisisaldus milligrammides 1 ml standardlahuses (4.8.1. või 4.9.1.)

$W_2$ = proovi mass grammides (5.2.1.)

P = standardsterooli (4.8. või 4.9.) puhtusaste

▼B

Proovi steroolisisaldus (mg/kg) = $((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$.

7. MEETODI TÄPSUS

7.1. **Või**

7.1.1. *Korratavus*

7.1.1.1. Stigmasterool

Ühe töötaja poolt samade seadmete ja katsematerjalidega läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva määramise tulemused ei tohi erineda rohkem kui 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterool

Ühe töötaja poolt samade seadmete ja katsematerjalidega läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva määramise tulemused ei tohi erineda rohkem kui 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Reprodutseeritavus*

7.1.2.1. Stigmasterool

Kaks üksiktulemust, mis on saadud kahes eri laboris eri seadmetega, kuid sama katsematerjaliga, ei tohi erineda rohkem kui 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterool

Kaks üksiktulemust, mis on saadud kahes eri laboris eri seadmetega, kuid sama katsematerjaliga, ei tohi mõõdetud väärtuste keskväärtusest erineda rohkem kui 8,7 %.

7.1.3. *Täpsust iseloomustavate andmete päritolu*

Täpsust iseloomustavad andmed on saadud katsetes, mis tehti 1992. aastal kaheksas laboris kuue stigmasterooli prooviga (kolm pimekatset) ja kuue sitosterooli prooviga (kolm pimekatset).

7.2. **Kontsentreeritud või**

7.2.1. *Korratavus*

7.2.1.1. Stigmasterool

Ühe töötaja poolt samade seadmete ja katsematerjalidega läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva määramise tulemused ei tohi erineda rohkem kui 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterool

Ühe töötaja poolt samade seadmete ja katsematerjalidega läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva määramise tulemused ei tohi keskväärtusest erineda rohkem kui 3,6 %.

7.2.2. *Reprodutseeritavus*

7.2.2.1. Stigmasterool

Kaks üksiktulemust, mis on saadud kahes eri laboris eri seadmetega, kuid sama katsematerjaliga, ei tohi erineda rohkem kui 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterool

Kaks üksiktulemust, mis on saadud kahes eri laboris eri seadmetega, kuid sama katsematerjaliga, ei tohi mõõdetud väärtuste keskväärtusest erineda rohkem kui 8,9 %.

▼B

7.2.3. *Täpsust iseloomustavate andmete päritolu*

Täpsust iseloomustavad andmed on saadud katsetes, mis tehti 1991. aastal üheksas laboris kuue stigmasterooli prooviga (kolm pimekatset) ja kuue sitosterooli prooviga (kolm pimekatset).

8. LUBATUD HÄLBED

8.1. Selleks et kindlaks teha, kas toode on korrektselt märgistatud, tuleb märgistatud tootest võtta kolm proovi.

8.2. **Või**

8.2.1. *Stigmasterool*

8.2.1.1. Stigmasterooli lisamise määraks on 150 g vähemalt 95 % puhtusastmega stigmasterooli ühe tonni või kohta (s.t 142,5 mg/kg) või 170 g vähemalt 85 % puhtusastmega stigmasterooli tonni või kohta (s.t 144,5 mg/kg).

8.2.1.2. Toote analüüsimisel saadud kolme proovi tulemusi kasutatakse lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 115,8 mg/kg (95 % lisamise alammäärast 95 % puhtusastmega stigmasterooli puhul);

— 117,7 mg/kg (95 % lisamise alammäärast 85 % puhtusastmega stigmasterooli puhul);

— 80,1 mg/kg (70 % lisamise alammäärast 95 % puhtusastmega stigmasterooli puhul);

— 81,5 mg/kg (70 % lisamise alammäärast 85 % puhtusastmega stigmasterooli puhul).

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 115,8 mg/kg ja 80,1 mg/kg või 117,7 mg/kg ja 81,5 mg/kg vahel.

8.2.2. *Sitosterool*

8.2.2.1. Sitostrerooli lisamise määr on 600 g vähemalt 90 % puhtusastmega stigmasterooli ühe tonni või kohta (s.t 540 mg/kg).

8.2.2.2. Toote analüüsimisel saadud kolme proovi tulemusi kasutatakse lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 482,6 mg/kg (95 % lisamise alammäärast 90 % puhtusastmega sitosterooli puhul);

— 347,6 mg/kg (70 % lisamise alammäärast 90 % puhtusastmega sitosterooli puhul).

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 482,6 mg/kg ja 347,6 mg/kg vahel.

8.3. **Kontsentreeritud või**

8.3.1. *Stigmasterool*

8.3.1.1. Stigmastrerooli lisamise määr on 150 g vähemalt 95 % puhtusastmega stigmasterooli ühe tonni või kohta (s.t 142,5 mg/kg) või 170 g vähemalt 85 % puhtusastmega stigmasterooli tonni või kohta (s.t 144,5 mg/kg).

▼B

8.3.1.2. Toote analüüsimisel saadud kolme proovi tulemusi kasutatakse lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 118,5 mg/kg (95 % lisamise alammäärast 95 % puhtusastmega stigmasterooli puhul);

— 120,4 mg/kg (95 % lisamise alammäärast 85 % puhtusastmega stigmasterooli puhul);

— 82,9 mg/kg (70 % lisamise alammäärast 95 % puhtusastmega stigmasterooli puhul);

— 84,3 mg/kg (70 % lisamise alammäärast 85 % puhtusastmega stigmasterooli puhul).

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 118,5 mg/kg ja 82,9 mg/kg või 120,4 mg/kg ja 84,3 mg/kg vahel.

8.3.2. *Sitosterool*

8.3.2.1. Sitostrerooli lisamise määr on 600 g vähemalt 90 % puhtusastmega stigmasterooli ühe tonni või kohta (s.t 540 mg/kg).

8.3.2.2. Toote analüüsil kasutatakse kolmest proovist saadud tulemusi lisatud märgistusaine määra ja ühtlase jaotumise kontrollimiseks ning madalaimat saadud tulemust võrreldakse järgmiste piirmääradega:

— 480,9 mg/kg (95 % lisamise alammäärast 90 % puhtusastmega sitosterooli puhul);

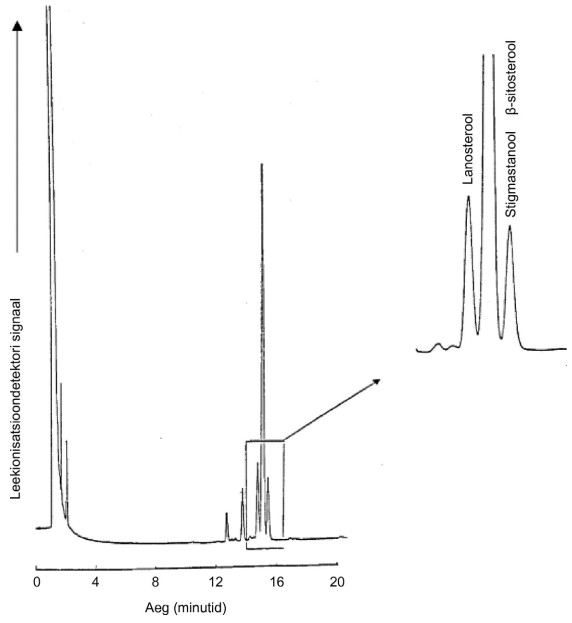
— 345,9 mg/kg (70 % lisamise alammäärast 90 % puhtusastmega sitosterooli puhul).

Kasutatakse märgistusaine kontsentratsiooni kõige madalama tulemuse andnud proovis ning interpoleerimist 480,9 mg/kg ja 345,9 mg/kg vahel.

*Joonis 1*

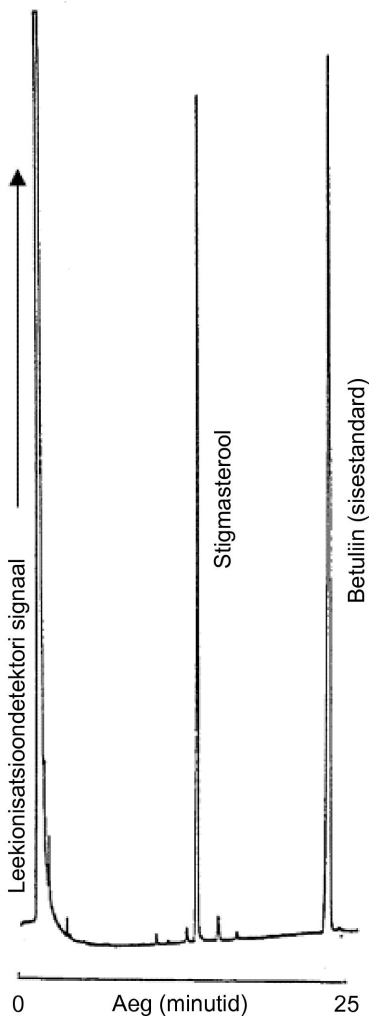
**Lahutusvõime kontrollimise segu kromatogramm**

Eelistatav on piikide täielik eraldumine, s.t lanosterooli piigi joon peaks jõudma enne sitosterooli piigi algust tagasi nulljooneni, kuid ka piikide mittetäielik eraldumine on lubatud.

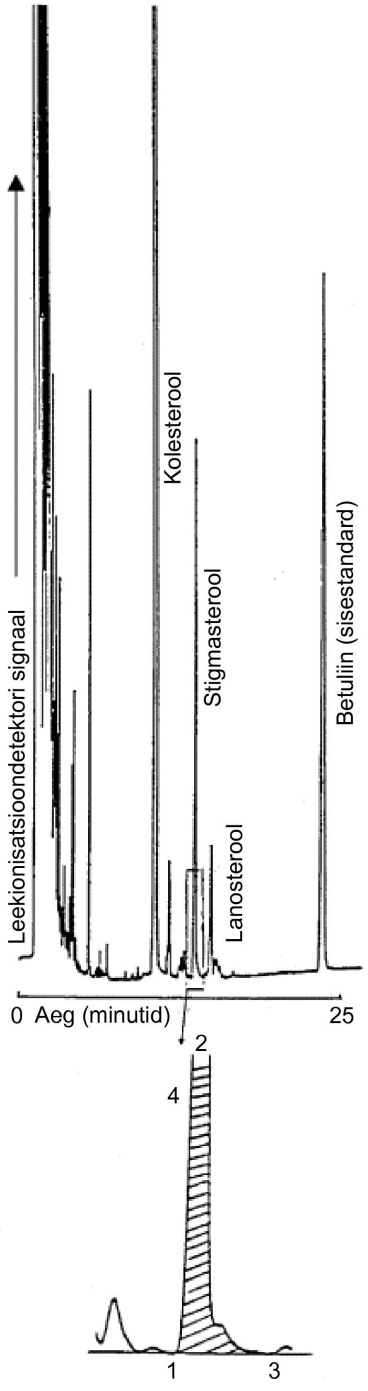


▼B

*Joonis 2a*
**Stigmasterooli standard**



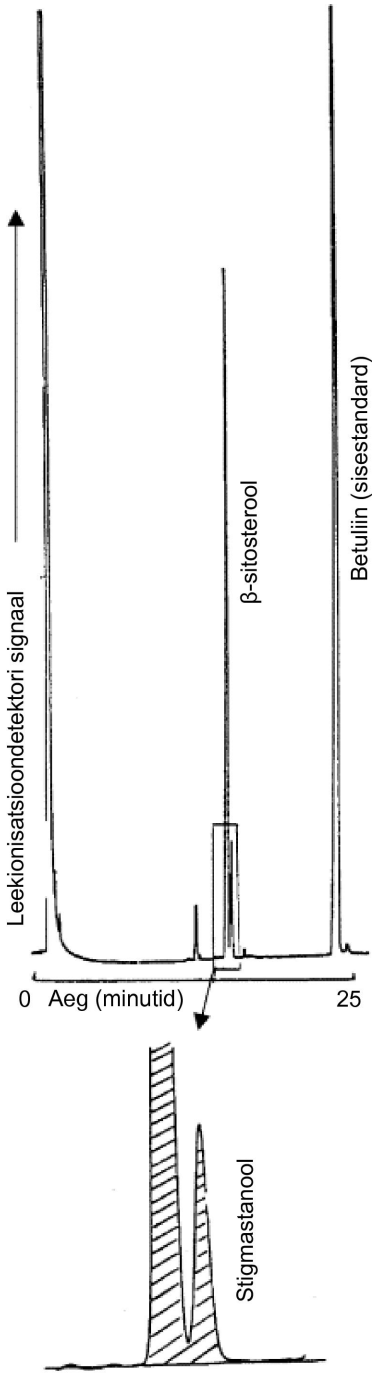

*Joonis 2b*
**Stigmasterooliga denatureeritud võiproov**



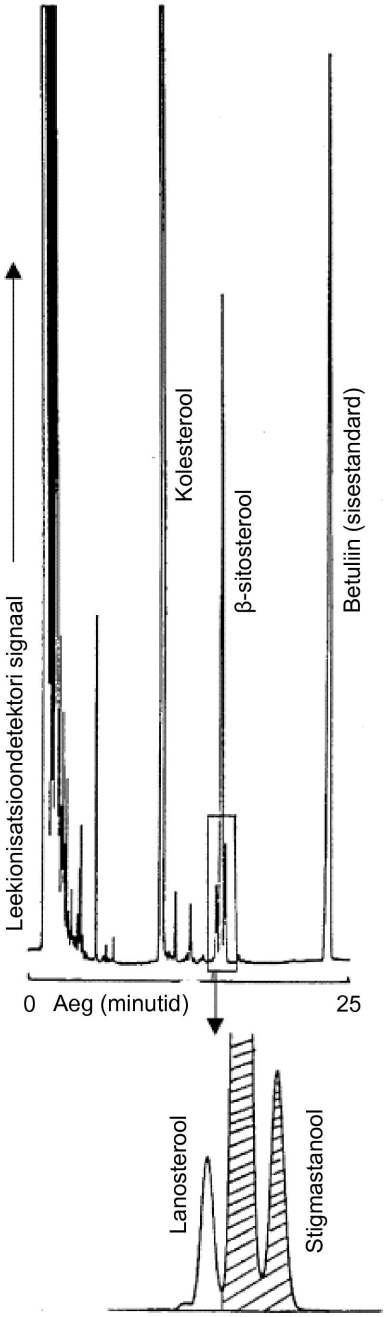

*Märkus.* Stigmasterooli piigi integreerimisel tuleb arvesse võtta kõiki punktides 1, 2 ja 3 piiritletud pindasid. Stigmasterooli piigi integreerimisel tuleb arvesse võtta ka kõiki punktidega 1, 2 ja 3 piiritletud „sabasid”.

▼B

*Joonis 3a*
**Sitosterooli standard**




*Joonis 3b*
**β-sitosterooliga denatureeritud võiproov**




*Märkus.* β-sitosterool sisaldab sageli lisandit (mis on tuvastatud kui stigmastanool), mis elueerub kohe pärast β-sitosterooli. Kogu β-sitosterooli sisalduse hindamiseks tuleb nende kahe piigi pindalad liita.

▼B

*IX LISA*

**(Artikkel 6)**

**STANDARDMEETOD LEHMAPIIMA JA LEHMAPIIMA KASEIINI MÄÄRAMISEKS JUUSTUS, MIS ON VALMISTATUD LAMBA-, KITSE- VÕI PÜHVLIPIIMAST VÕI LAMBA-, KITSE- JA PÜHVLIPIIMA SEGUST**

1. KOHALDAMISALA

Lehmapiima ja lehmapiima kaseiini määramine lamba-, kitse- või pühvlipiimast või lamba-, kitse- ja pühvlipiima segust valmistatud juustus γ-kaseiinide isoelektrilise fookustamise abil pärast lüüsimist plasmiiniga.

2. RAKENDUSALA

Käesolev meetod sobib töötlemata ja kuumtöödeldud lehmapiima ning lehmapiima kaseiini tuvastamiseks laagerdumata ja laagerdunud juustus, mis on valmistatud lamba-, kitse- või pühvlipiimast või lamba-, kitse- ja pühvlipiima segust. See meetod ei sobi võltsimise tuvastamiseks, kui piima või juustu on võltsitud lehmapiimast eraldatud kuumtöödeldud vadakuvalgu kontsentraadiga.

3. MEETODI PÕHIMÕTE

3.1. Kaseiinide eraldamine juustust ja etalonidest.

3.2. Eraldatud kaseiinide lahustamine ja lõhustamine plasmiiniga (EC.3.4.21.7).

3.3. Plasmiiniga töödeldud kaseiinide isoelektriline fookustamine karbamiidi juuresolekul ja valkude värvimine.

3.4. Värviga töödeldud $\gamma_3$- ja $\gamma_2$-kaseiini karbamiidi (lehmapiima lisandi tõend) võrdlemine ribadega, mis on saadud katsetes 0 % ja 1 % lehmapiima sisaldavate etalonidega samas geelis.

4. REAKTIIVID

Kui ei ole öeldud teisiti, tuleb kasutada analüütiliselt puhtaid kemikaale. Vesi peab olema kahekordselt destilleeritud või samaväärse puhtusastmega.

*Märkus.* Järgnev eeskiri kehtib laboris valmistatud karbamiidisisaldusega polüakrüülamiidgeelide puhul mõõtmetega 265 × 125 × 0,25 mm. Kui kasutatakse muud tüüpi ja teistsuguse suurusega geele, tuleb eraldamistingimusi vastavalt kohandada.

***Isoelektriline fookustamine***

4.1. **Reaktiivid karbamiidi sisaldavate polüakrüülamiidgeelide valmistamiseks**

4.1.1. *Geeli põhilahus*

Lahustada vees:

4,85 g akrüülamiidi,

0,15 g *N*,*N*'-metüleenbisakrüülamiidi (BIS),

48,05 g karbamiidi,

15,00 g 87massiprotsendilist glütserooli

ja täiendada maht 100 milliliitrini ning säilitada külmikus tumedas klaaspudelis.

▼B

*Märkus.* Neurotoksilise akrüülamiidi nimetatud kaalutiste asemel on parem kasutada müügil olevat akrüülamiidi ja BISi valmislahust. Kui valmislahus sisaldab 30 massi-/mahuprotsenti akrüülamiidi ja 0,8 massi-/mahuprotsenti BISi, tuleb eespool nimetatud segu valmistamiseks võtta nimetatud kaalutiste asemel 16,2 ml valmislahust. Põhilahuse säilimisaeg on 10 päeva; kui põhilahuse juhtivus on suurem kui 5 μS, tuleb see deioniseerida, segades seda 2 g ioonivahetajaga Amberlite MB-3 kolmekümne minuti jooksul ja filtrides seejärel läbi 0,45 μm membraani.

4.1.2. *Geeli lahus*

Segatakse geeli põhilahus (vt 4.1.1) lisandite ja amfolüütidega:

9,0 ml põhilahust;

24 mg β-alaniini;

500 μl amfolüüti, pH 3,5–9,5 ([1]);

250 μl amfolüüti, pH 5–7 ([1]);

250 μl amfolüüti, pH 6–8 ([1]).

Segada geeli lahust ning degaseerida see ultrahelivannis või vaakumis kahe kuni kolme minuti jooksul.

*Märkus.* Geeli lahus valmistada vahetult enne selle valamist kattekilele (vt 6.2).

4.1.3. *Katalüsaatori lahused*

4.1.3.1. *N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametüületüleendiamiin (TEMED).

4.1.3.2. 40massi-/mahu-protsendiline ammooniumpersulfaadi lahus (PER):

lahustada 800 mg PERi vees ja täiendada maht 2 milliliitrini.

*Märkus.* Alati tuleb kasutada värskelt valmistatud PERi lahust.

4.2. **Kontaktvedelik:**

petrool või vedel parafiin

4.3. **Anoodilahus**

Lahustada 5,77 g 85massiprotsendilist fosforhapet vees ja täiendada maht 100 milliliitrini.

4.4. **Katoodilahus**

Lahustada 2,00 g naatriumhüdroksiidi vees ja täiendada maht veega 100 milliliitrini.

***Proovi ettevalmistamine***

4.5. **Reaktiivid valgu eraldamiseks**

4.5.1. *Lahjendatud äädikhape (täiendada 25,0 ml jää-äädikhappe maht veega 100 milliliitrini)*

4.5.2. *Diklorometaan*

4.5.3. *Atsetoon*

4.6. **Valke lahustav puhver**

Lahustada vees:

5,75 g 87massiprotsendilist glütserooli,

24,03 g karbamiidi,

250 mg ditiotreitooli

ja täiendada maht 50 milliliitrini.

([1]) Tooted Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) ja Resolyte® pH 5–7 ja pH 6–8 (BDH, Merck) sobivad eriti hästi γ-kaseiinide nõutud eraldustaseme saamiseks.

▼B

*Märkus.* Säilitada külmikus; säilimisaeg üks nädal.

4.7. **Reaktiivid kaseiinide lõhustamiseks plasmiiniga**

4.7.1. *Ammooniumkarbonaatpuhver*

Tiitrida ammooniumvesinikkarbonaadi lahus (kontsentratsioon 0,2 mool/l ehk 1,58 g/100 ml $H_2O$, sisaldab 0,05 mool/l ehk 1,46 g/100 ml etüleendiamiintetraatsetaati (EDTAd)) ammooniumkarbonaadi lahusega (kontsentratsioon 0,2 mool/l ehk 1,92 g/100 ml $H_2O$, sisaldab 0,05 mool/l EDTAd) kuni pH-ni 8.

4.7.2. *Veise plasmiin (EC. 3.4.21.7) aktiivsusega vähemalt 5 U/ml*

4.7.3. *ε-aminokaproonhappe lahus ensüümi inhibeerimiseks*

Lahustada 2,624 g ε-aminokaproonhapet (6-amino-*n*-heksaanhapet) 100 milliliitris 40mahuprotsendilises etanoolis.

4.8. **Standardid**

4.8.1. *Laabiga kalgendatud lamba- ja kitsepiimalõssist saadud sertifitseeritud etalonsegusid (tugietalone), mis sisaldavad 0 % ja 1 % lehmapiima, on võimalik hankida Komisjoni Etalonainete ja Mõõtmiste Instituudist (B-2440 Geel, Belgia).*

4.8.2. *0 % ja 1 % lehmapiima sisaldavate laboratoorsete vaheetalonide valmistamine laabiga kalgendatud pühvlipiimalõssist.*

Lõssi saamiseks tsentrifuugitakse kas pühvli või veise toorpiimapartii proovi 37 °C ja 2 500 g juures 20 minutit. Pärast tsentrifuugitopsi ja selle sisu kiiret jahutamist temperatuurini 6–8 °C kõrvaldatakse ülemine rasvakiht täielikult. Üheprotsendilise etalonsegu valmistamiseks panna 1 l keeduklaasi 495 ml pühvlipiimalõssi, lisada 5,00 ml lehmapiimalõssi ja reguleerida 10massi-/mahuprotsendilise piimhappe lisamise abil pH-le 6,4. Temperatuur reguleerida väärtusele 35 °C, lisada 100 µl vasika laapi (aktiivsus 1: 10 000, ligikaudu 3 000 U/ml), segada üks minut ja jätta keeduklaas alumiiniumfooliumiga kaetuna 35 °C juures üheks tunniks seisma, et lõss kalgenduks. Kui kalgend on moodustunud, külmkuivatada kogu kalgendunud mass, seda eelnevalt homogeniseerimata ja vadakut eraldamata. Jahvatada külmkuivatatud mass peeneks ühtlaseks pulbriks. Nullprotsendiline etalon valmistatakse sama meetodi abil puhtast pühvlipiimalõssist. Etalone tuleb säilitada – 20 °C juures.

*Märkus.* Enne etalonide valmistamist on soovitatav pühvlipiimalõssi puhtust kontrollida plasmiiniga töödeldud kaseiinide isoelektrilise fookustamise abil.

***Reaktiivid valgu eraldamiseks***

4.9. **Kinnisti**

Lahustada 150 g trikloroäädikhapet vees ja täiendada maht 1 000 milliliitrini.

4.10. **Värvi väljapesemise lahus**

Täiendada 500 ml metanooli ja 200 ml jää-äädikhappe segu maht destilleeritud veega 2 000 milliliitrini.

*Märkus.* Iga päev tuleb valmistada värske värvi väljapesemise lahus. Selle valmistamiseks tuleb segada 50mahuprotsendilise metanooli ja 20mahuprotsendilise jää-äädikhappe põhilahuseid võrdsetes mahtudes.

4.11. **Värvimislahused**

4.11.1. *Värvimislahus (värvi põhilahus 1)*

Lahustada magnetsegaja abil 3,0 g Coomassie-briljantsinist G-250 (C.I. 42655) 1 000 ml 90mahuprotsendilises metanoolis umbes 45 minuti jooksul ja filtrida läbi kahe keskmise kiirusega toimiva kurdfiltri.

▼B

4.11.2. *Värvimislahus (värvi põhilahus 2)*

Lahustada 5,0 g vasksulfaatpentahüdraati 1 000 ml 20mahuprotsendilises äädikhappes.

4.11.3. *Värvimislahus (kasutusvalmis)*

Segada vahetult enne värvimist kokku 125 ml kumbagi värvi põhilahust (4.11.1 ja 4.11.2).

*Märkus.* Värvimislahus tuleb valmistada kasutamise päeval.

5. SEADMED

5.1. Klaasplaadid (265 × 125 × 4 mm), kummirull (laius 15 cm), nivelleerimislaud.

5.2. Geeli kandekile (265 × 125 mm).

5.3. Kattekile (280 × 125 mm). Pikematele servadele panna riba kleeplinti (280 × 6 × 0,25 mm) (vt joonis 1).

5.4. Elektrofookustamiskamber jahutusplaadiga (nt 265 × 125 mm) ja sobiva pingeallikaga (≥ 2,5 kV) või automaatne elektroforeesiseade.

5.5. Tsirkulatsioonkrüostaat, mis võimaldab hoida temperatuuri 12 ± 0,5 °C.

5.6. Tsentrifuug, mis võimaldab töötada 3 000 g juures.

5.7. Elektroodribad (≥ 265 mm pikkused).

5.8. Plastikust pudelid anoodi- ja katoodilahustele.

5.9. Proovi aplikaatorid (10 × 5 mm, viskoosist või valke väheadsorbeerivast filterpaberist).

5.10. Roostevabast terasest käärid, skalpellid, pintsetid.

5.11. Roostevabast terasest või klaasist anumad värvimiseks ja värvi väljapesemiseks (nt 280 × 150 mm topsid).

5.12. Reguleeritav varrashomogenisaator (varda diameeter 10 mm, 8 000–20 000 pööret minutis).

5.13. Magnetsegaja.

5.14. Ultrahelivann.

5.15. Kilekeevitusaparaat.

5.16. 25 µl mikropipetid.

5.17. Vaakumtsentrifuug või külmkuivati.

5.18. Temperatuuridele 35 ja 40 ± 1 °C reguleeritav loksutajaga termostateeritud vesivann.

5.19. Densitomeeter, mis võimaldab töötada lainepikkusel $\lambda$ = 634 nm.

6. MÄÄRAMISE KÄIK

6.1. **Proovi ettevalmistamine**

6.1.1. *Kaseiinide eraldamine*

Kaaluda 100 ml tsentrifuugitopsi juustu või etaloni kogus, mis on ekvivalentne 5 g kuivmassiga, lisada 60 ml destilleeritud vett ja homogeniseerida varrashomogenisaatori abil ( 8 000–10 000 pööret minutis). pH reguleerida lahjendatud äädikhappega (4.5.1) väärtusele 4,6 ja tsentrifuugida

▼B

(5 minutit, 3 000 g). Rasv ja vadak dekanteerida, jääk suspendeerida 40 ml destilleeritud vees, reguleerida lahjendatud äädikhappega (4.5.1) pH-le 4,5 ja homogeniseerida ( 20 000 pööret minutis); lisada 20 ml diklorometaani (4.5.2), homogeniseerida uuesti ja tsentrifuugida (5 minutit, 3 000 g). Kaseiinikiht, mis jääb vee- ja orgaanilise faasi vahele (vt joonis 2), eraldada spaatliga ning mõlemad faasid kõrvaldada dekanteerimise abil. Kaseiin homogeniseerida uuesti 40 ml destilleeritud vees (vt eespool) ja 20 ml diklorometaanis (4.5.2) ning tsentrifuugida. Seda protseduuri korrata seni (kaks või kolm korda), kuni mõlemad ekstraheerimisfaasid jäävad värvusetuks. Valgujääk homogeniseeritakse 50 ml atsetoonis (4.5.3) ja filtritakse läbi keskmise kiirusega toimiva kurdpaberfiltri. Filtrile kogutud jääki pesta kahe eraldi 25 ml atsetoonikogusega, kuivatada õhu käes või lämmastikuvoolus ja hõõruda uhmris peeneks.

*Märkus.* Kuivi kaseiinipreparaate tuleb säilitada – 20 °C juures.

6.1.2. *β-kaseiinide lõhustamine plasmiini abil γ-kaseiinide intensiivistamiseks*

25 mg kaseiinipreparaati (6.1.1) suspendeerida 0,5 ml ammooniumkarbonaatpuhvris (4.7.1) ja homogeniseerida 20 minutit näiteks ultraheliga töötlemise abil. Soojendada temperatuurini 40 °C, lisada 10 µl plasmiini (4.7.2), segada ja inkubeerida 40 °C juures ühe tunni jooksul pidevalt loksutades. Ensüümi inhibeerimiseks lisada 20 µl ε-aminokaproonhappe lahust (4.7.3), seejärel lisada 200 mg tahket karbamiidi ja 2 mg ditiotreitooli.

*Märkus.* Selleks et fookustatud kaseiiniribad tuleksid sümmeetrilisemad, on soovitatav pärast ε-aminokaproonhappe lisamist lahus külmkuivatada ja kuivjääk lahustada 0,5 ml valkusid lahustavas puhvris (4.6).

6.2. **Karbamiidi sisaldavate polüakrüülamiidgeelide valmistamine**

Geeli kandekilet (5.2) niisutada mõne tilga veega ja rullida see klaasplaadile (5.1), kõrvaldades eralduva vee pabersalvrätiku või lapiga. Vaheribadega (0,25 mm) kattekile (5.3) rullida teisele klaasplaadile samal viisil. Asetada plaat nivelleerimislauale horisontaalasendisse.

Ettevalmistatud deaereeritud geelilahusele (4.1.2) lisada 10 µl TEMEDi (4.1.3.1), segada, lisada 10 µl PERi lahust (4.1.3.2), segada hoolikalt ja valada kohe kattekile keskele ühtlaselt laiali. Geeli kandeplaadi üks serv asetada, kilepind allpool, kattekilega plaadile ja kandeplaat lasta aeglaselt alla, nii et kahe kile vahel moodustub ühtlane mullideta geeli kile (joonis 3). Lasta geeli kandeplaat õhukese spaatli abil ettevaatlikult lõpuni alla ja asetada selle peale raskuseks veel kolm klaasplaati. Umbes 60 minuti pärast, kui polümerisatsioon on lõppenud, eemaldada kergelt klaasplaate kallutades kandekilele polümeriseerunud geel koos kattekilega. Kandekile väline pind puhastada hoolikalt geelijääkidest ja karbamiidist. Kande- ja kattekile vahel olev geel keevitada kiletorusse ja säilitada külmikus (säilimisaeg 6 nädalat).

*Märkus.* Vaheribadega kattekilet võib kasutada korduvalt. Kui proove on vähe või kasutatakse automaatset elektroforeesiseadet, võib polüakrüülamiidgeeli lõigata väiksemateks tükkideks (kaks geeli 4,5 × 5 cm).

6.3. **Isoelektriline fookustamine**

Jahutustermostaat reguleerida temperatuurile 12 °C. Geeli kandekile väline pind puhastada petrooliga, lasta jahutusbloki keskele mõned tilgad petrooli (4.2). Seejärel rullida geel selle peal lahti nii, et kandekile jääks allapoole ega tekiks mulle. Pühkida liigne petrool ära ja kõrvaldada kattekile. Elektroodribad niisutada elektroodilahustega (4.3, 4.4), lõigata geeliga ühepikkuseks ja asetada kohale (elektroodide vahemaa 9,5 cm).

▼B

**Isoelektrilise fookustamise tingimused**

6.3.1. *Geeli suurus 265 × 125 × 0,25 mm.*

| Etapp | Aeg (min) | Pinge (V) | Voolutugevus (mA) | Võimsus (W) | Volttunnid (Vh) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Eelfookustamine | 30 | maks. 2 500 | maks. 15 | konstant 4 | c. 300 |
| 2. Proovi fookustamine ([1]) | 60 | maks. 2 500 | maks. 15 | konstant 4 | c. 1 000 |
| 3. Lõppfookustamine | 60 | maks. 2 500 | maks. 5 | maks. 20 | c. 3 000 |
| | 40 | maks. 2 500 | maks. 6 | maks. 20 | c. 3 000 |
| | 30 | maks. 2 500 | maks. 7 | maks. 25 | c. 3 000 |

([1]) Proovi pealekandmine: pärast eelfookustamist (1. etapp) pipettida 18 µl proovi ja standardlahust proovi aplikaatoritele (10 × 5 mm), asetada need geelile vahedega 1 mm, pikisuunas 5 mm kaugusele anoodist, ja vajutada kergelt. Fookustamine toimub eespool nimetatud tingimustel ja proovi aplikaatorid eemaldatakse ettevaatlikult pärast 60minutilist proovi fookustamist.

*Märkus.* Kui geeli paksust või laiust on muudetud, tuleb voolutugevust ja võimsust reguleerida sellele vastavalt (nt 265 × 125 × 0,5 mm geeli puhul tuleb voolutugevust ja võimsust kahekordistada).

6.3.2. *Automaatse elektroforeesiseadme pingeprogrammi näide (kaks 5,0 × 4,5 cm geeli; elektroodid on geelile asetatud vahetult, ilma elektroodribadeta)*

| Etapp | Pinge | Voolutugevus | Võimsus | Temperatuur | Volttunnid |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Eelfookustamine | 1 000 V | 10,0 mA | 3,5 W | 8 °C | 85 Vh |
| 2. Proovi fookustamine | 250 V | 5,0 mA | 2,5 W | 8 °C | 30 Vh |
| 3. Fookustamine | 1 200 V | 10,0 mA | 3,5 W | 8 °C | 80 Vh |
| 4. Fookustamine | 1 500 V | 5,0 mA | 7,0 W | 8 °C | 570 Vh |

Proovi aplikaator asetada kohale 2. etapil, kui protsess on kestnud 0 volttundi.

Eemaldada proovi aplikaator 2. etapil, kui protsess on kestnud 30 volttundi.

6.4. **Valkude värvimine**

6.4.1. *Valkude kinnistamine*

Pärast pinge väljalülitamist eemaldada viivitamatult elektroodribad ja asetada geel kohe värvimise/pesemise vanni, millesse on valatud 200 ml kinnistit (4.9); hoida geeli pidevalt loksutades kinnistis 15 minutit.

6.4.2. *Geeli pesemine ja värvimine*

Nõrutada kogu kinnisti välja ja pesta geeli kaks korda (mõlemal korral 30 sekundit) 100 ml värvi väljapesemise lahusega (4.10). Valada värvi väljapesemise lahus ära ja asendada 250 ml värvimislahusega (4.11.3); lasta geelil 45 minutit värvuda, lahust ettevaatlikult loksutades.

6.4.3. *Värvi väljapesemine geelist*

Valada värvimislahus välja, pesta geeli kaks korda 100 ml värvi väljapesemise lahusega (4.10), seejärel loksutada 200 ml värvi väljapesemise lahusega 15 minutit, värvi väljapesemise etappi korrata vähemalt 2–3 korda, kuni saadakse selge värvusetu foon. Seejärel loputada geeli destilleeritud vees (2 × 2 minutit) ja lasta sellel õhu käes kuivada (2–3 tundi) või kuivatada föööniga (10–15 minutit).

▼B

*Märkus 1.* Kinnistada, pesta, värvida ja värvi välja pesta tuleb 20 °C juures. Mitte kasutada kõrgemat temperatuuri.

*Märkus 2.* Juhul kui eelistatakse värvimist hõbedaga kui tundlikuma meetodiga (nt Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, kood nr 17–1150–01), tuleb plasmiiniga töödeldud kaseiiniproove lahjendada kuni kontsentratsioonini 5 mg/ml.

7. HINDAMINE

Hindamiseks võrreldakse uuritava proovi valguribasid etalonide ribadega samal geelil. Lehmapiimalisand juustus, mis on valmistatud lamba-, kitse- või pühvlipiimast või lamba-, kitse- ja pühvlipiima segust, tehakse kindlaks $\gamma_3$- ja $\gamma_2$-kaseiini järgi, mille isoelektrilised punktid on pH 6,5 ja pH 7,5 vahel (joonised 4a, 4b ja 5). Avastamiskünnis on madalam kui 0,5 %.

7.1. **Visuaalne hindamine**

Lehmapiima koguse visuaalseks hindamiseks on soovitav reguleerida proovide ja etalonide kontsentratsioonid selliseks, et lamba-, kitse- ja/või pühvlipiima $\gamma_2$- ja $\gamma_3$-kaseiini ribade intensiivsus oleks ühesugune (vt $\gamma_2$ E, G, B ja $\gamma_3$ E, G, B joonistel 4a, 4b ja 5). Sellisel juhtumil saab uuritava proovi lehmapiimasisaldust (mis võib olla suurem või väiksem kui 1 % või võrdne 1 %ga) hinnata otse, võrreldes lehmapiima $\gamma_3$- ja $\gamma_2$-kaseiini ribade intensiivsusi (vt $\gamma_3$ C ja $\gamma_2$ C joonistel 4a, 4b ja 5) nullprotsendilise ja üheprotsendilise tugietaloni (lammas, kits) või laboratoorse vaheetaloni (pühvel) vastavate intensiivsustega.

7.2. **Densitomeetriline määramine**

Võimaluse korral tuleks lehmapiima $\gamma_2$- ja $\gamma_3$-kaseiinile vastavate piikide pindalade suhted lamba-, kitse- ja pühvlipiima vastavate piikide pindaladesse (joonis 5) määrata densitomeetriliselt (5.19). Neid suhteid võrreldakse $\gamma_2$- ja $\gamma_3$-kaseiinile vastavate piikide pindalade suhetega samal geelil analüüsitud üheprotsendilise tugietaloni (lammas, kits) või laboratoorse vaheetaloni (pühvel) puhul.

*Märkus.* Meetodi kasutamine on rahuldav, kui üheprotsendilise etaloni puhul saadakse nii lehmapiima $\gamma_2$- kui ka $\gamma_3$-kaseiini lisandi kohta selge kinnitus, kuid nullprotsendilise etaloni puhul seda ei saada. Kui selliseid tulemusi ei saada, tuleb määramisprotseduuri optimeerida, pidades täpselt kinni meetodi tingimustest kõigis üksikasjades.

Proov loetakse positiivseks, kui nii lehmapiima $\gamma_2$- kui ka $\gamma_3$-kaseiini ribade intensiivsused või piikide pindalad on võrdsed või suuremad kui üheprotsendilise etaloni vastavad tasemed.

8. VIITED

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 $\gamma_2$-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).*

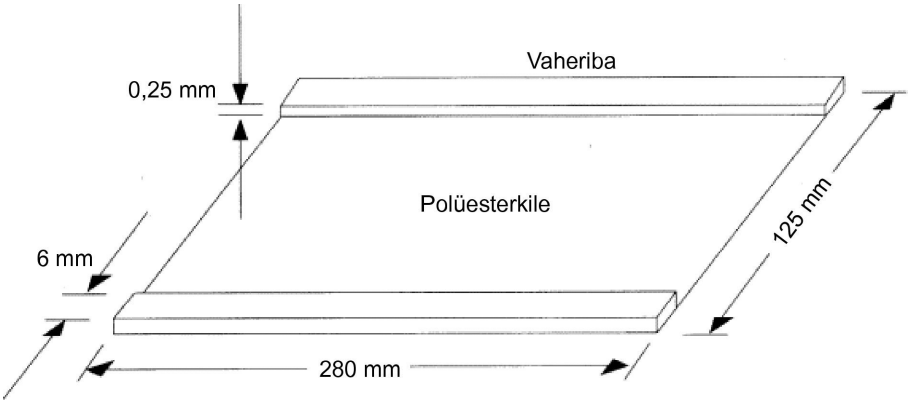
4. *Krause I., Belitz H.–D., Kaiser K.–P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195–199 (1982).*

▼B

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).*

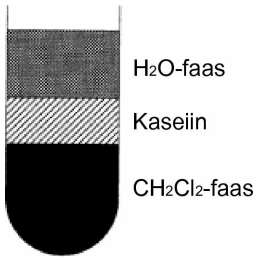
*Joonis 1*

**Kattekile skeem**



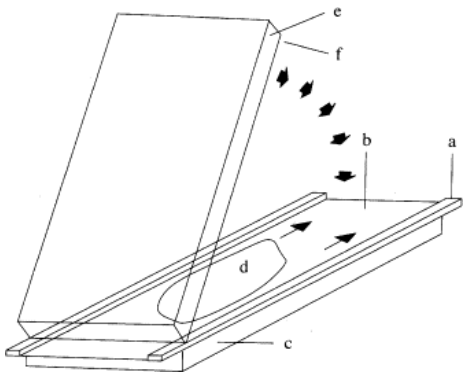

*Joonis 2*

**Kaseiinikiht, mis jääb pärast tsentrifuugimist ujuma vee- ja orgaanilise faasi vahele**




*Joonis 3*

**Üliõhukese polüakrüülamiidgeeli valmistamine pressimismeetodil**

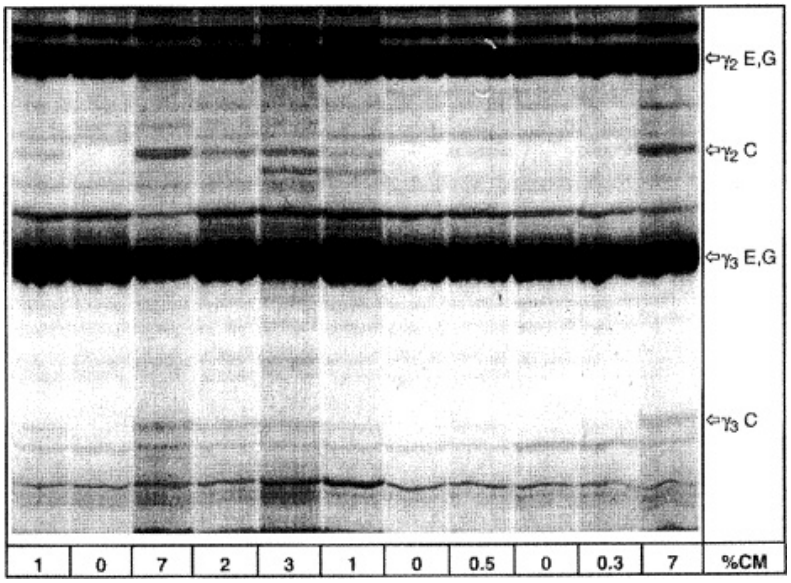



a = vaheriba (0,25 mm); b = kattekile (5.3); c, e = klaasplaadid (5.1); d = geelilahus (4.1.2); f = geeli kandekile (5.2)

▼B

*Joonis 4a*

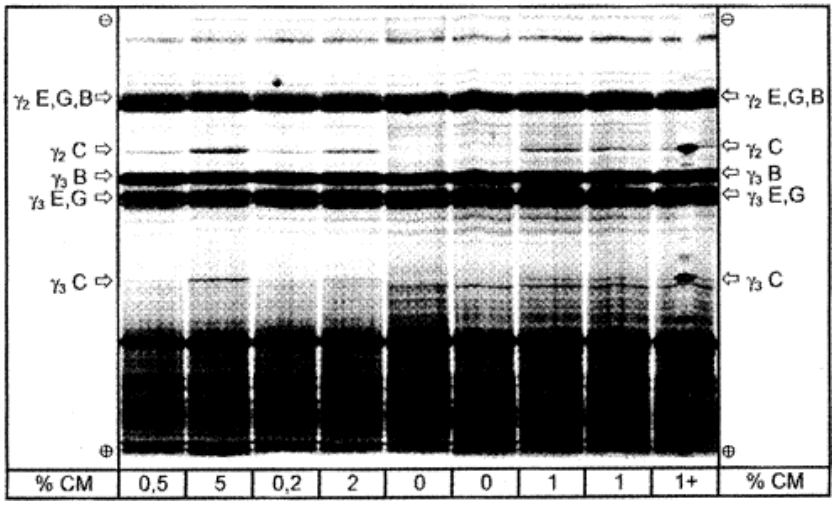
**Erineva lehmapiimasisaldusega lamba- ja kitsepiimajuustust eraldatud ja plasmiiniga töödeldud kaseiinide isoelektriline fookustamine**




% CM = lehmapiima protsent, C = lehm, E = lammas, G = kits
Kujutatud on isoelektriliselt fookustatud geeli ülemist poolt.

*Joonis 4b*

**Erineva lehmapiimasisaldusega lamba-, kitse- ja pühvlipiimasegu juustust eraldatud ja plasmiiniga töödeldud kaseiinide isoelektriline fookustamine**

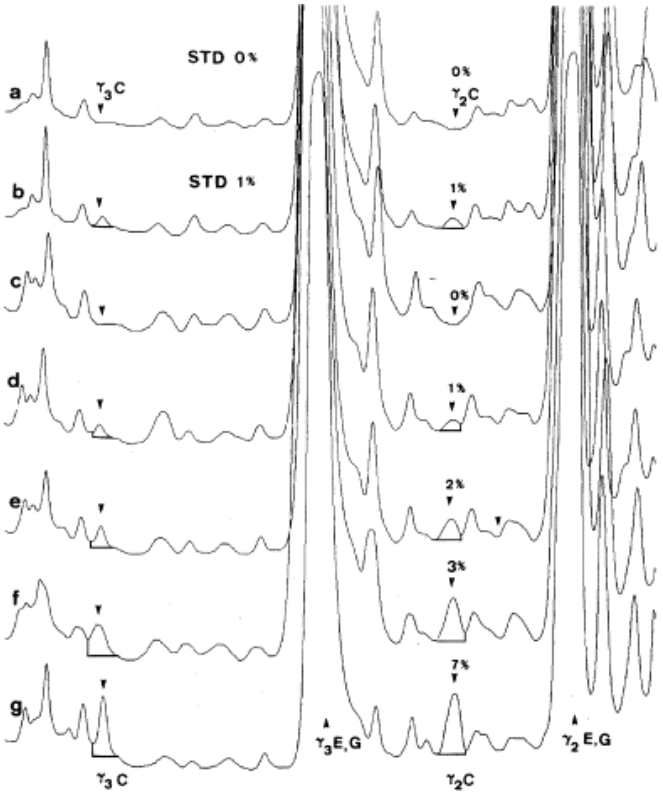



% CM = lehmapiima protsent; 1 + = proov, mis sisaldab 1 % lehmapiima ja millele on raja keskele lisatud puhast veise kaseiini, C = lehm, E = lammas, G = kits, B = pühvel.
Kujutatud on isoelektriliselt fookustatud geel kogu lahutusala ulatuses.

▼B

*Joonis 5*

**Etalonide (STD) ning lamba- ja kitsepiima segust valmistatud juustu proovide isoelektrilise fookustamisega saadud densitogrammide võrdlus**




a, b = etalonid, mis sisaldavad 0 % ja 1 % lehmapiima; c–g = juustuproovid, mis sisaldavad 0 %, 1 %, 2 %, 3 % ja 7 % lehmapiima, C = lehm, E = lammas, G = kits.
Skaneeritud on isoelektriliselt fookustatud geeli ülemist poolt lainepikkusel λ = 634 nm.

▼B

*X LISA*

**(Artikkel 7)**

**STANDARDMEETOD KOLIBAKTERITE AVASTAMISEKS VÕIS, LÕSSIPULBRIS NING KASEIINIS JA KASEINAATIDES**

1. PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE

   ISO standard 8261.

2. MÄÄRAMISE KÄIK

   ISO standard 4831.

   Proovid, mis vastavad 1 g võile või 0,1 g lõssipulbrile või kaseiinile/kaseinaatidele, inokuleeritakse söötmesse.

   Iga proov inokuleeritakse kolme topsi.

3. TULEMUSED

   Kui 3 topsi annavad 3 negatiivset vastust, on tulemus „nõuetele vastav".

   Kui 3 topsi annavad 2 või 3 positiivset vastust, on tulemus „nõuetele mittevastav".

   Kui 3 topsi annavad 2 negatiivset vastust, tuleb analüüsi kaks korda korrata (kahe topsiga).

   — Kui 2 tulemust on negatiivsed, on tulemus „nõuetele vastav".

   — Kui vähemalt 1 tulemus on positiivne, on tulemus „nõuetele mittevastav".

▼B

*XI LISA*

**(Artikkel 8)**

**LAKTOOSISISALDUSE MÄÄRAMINE SEGASÖÖTADES**

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Laktoosisisalduse määramine segasöötades.

2. VIIDE

Laktoosisisaldus määratletakse massiprotsendina, mis määratakse kindlaks kirjeldatud meetodi abil.

3. MÄÄRATLUS

Veevaba laktoosi sisaldus väljendatakse grammides 100g kohta.

4. PÕHIMÕTE

Segasööt taastatakse veega. Rasva ja valgukomponendi fraktsioonide väljasadestamiseks segasöödast lisatakse lahjendatud alikvoodi kaalutisele Biggsi lahust. Proov filtritakse (või tsentrifuugitakse) ja filtraat (või supernatant) süstitakse plii vormis katioonivahetuse HPLC-kolonni, kasutades liikuva faasina HPLC-puhast vett. Elueeritud laktoosi avastamiseks kasutatakse diferentsiaalrefraktomeetrit ([i]).

5. REAKTIIVID

5.1. **Üldised märkused**

Kasutada üksnes tunnustatult analüütilise puhtusega reaktiive (kui ei ole öeldud teisiti) ja degaseeritud HPLC-puhast vett.

5.2. **Laktoos**

D-laktoosi monohüdraat ($(C_{12}H_{22})O_{11}H_2O$) võib imada täiendavat niiskust. Enne kasutamist mõõta ära vee tegelik kogus Karl-Fisheri meetodil või panna laktoos liigse niiskuse eemaldamiseks 8 tunniks kuivatuskappi, mille temperatuur on 105 °C (laktoosi kristallvett see töötlus ei kaota).

5.3. **Kontsentreeritud Biggsi/Szijarto lahus** ([ii])

100 ml mõõtekolvis lahustatakse 9,10g tsinkatsetaatdihüdraati ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) ja 5,46g fosfovolframhappe monohüdraati ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) umbes 70 ml HPLC-puhtas vees (6.8).

Lisada 5,81 ml jää-äädikhapet ($CH_3COOH$). Lahjendada 100 ml märgini HPLC-puhta veega (6.8) ja segada. Lahust võib hoida toatemperatuuril 1 aasta.

5.4. **Lahjendatud Biggsi/Szijarto lahus**

Lahjendada 25 ml kontsentreeritud Biggs/Szijarto lahust (5.3) mõõtekolvis veega kuni 500 ml märgini. Lahust võib hoida toatemperatuuril 1 kuu.

5.5. **HPLC-puhta vee valmistamine**

Ultrapuhas vesi filtrida (6.8) vaakumsüsteemi (6.9) abil. Pumba tõhususe suurendamiseks ja stabiilse nulljoone saamiseks degaseerida liikuv faas iga päev, kasutades selleks kättesaadavat tehnikat, nagu heeliumiga läbipuhumine, ultrahelitöötlus, vaakum või vooldegaseerimisseade.

*Märkus.* Kolonni tööaja pikendamiseks peaks eluendi süsinikdioksiidisisaldus olema võimalikult väike; tuleks vältida võimalust, et eluent neelab õhust taas süsinikdioksiidi.

▼B

6. SEADMED

Tavalised laboriseadmed, eeskätt järgmised.

6.1. **HPLC ioonivahetuspolümeeri kolonn**

Kolonni täitmine: 8 % ristsidemetega polüstüreen-divinüülbenseeni kopolümeer, millesse on viidud katioonivahetusrühmad, mis on pliivormis.

Kolonni mõõtmed: pikkus 300 mm, siseläbimõõt umbes 8 mm.

Kui kasutatakse muu läbimõõduga kolonni, tuleb voolukiirust vastavalt reguleerida.

6.2. **Kaitsekolonn**

Kaitsekolonn koosneb eraldi katioonivahetajast ($H^+$) ja anioonivahetajast ($CO_3$-), mis kumbki on pandud kolonnidesse mõõtmetega umbes 30 mm (pikkus) × 4,6 mm (siseläbimõõt) (nt mikrokaitsekolonnid mikrokaitseplokis) ja järjestikku ühendatud, või on selleks segakiht, mis sisaldab AG 50W–X4, sõelaava 400, ($H^+$) ja AG3-X4A, sõelaava 200–400 (OH-) vahekorras 35:65 (massiprotsentides), mis on käsitsi pandud kolonni mõõtmetega umbes 20 mm (pikkus) × 9 mm (siseläbimõõt).

6.3. **Kolonniahi**

Ahi püsiva temperatuuri 85 ± 1 °C hoidmiseks.

6.4. **HPLC-pump**

Pump, mis tagab püsiva voolukiiruse (kõikumine < 0,5 %) 0,2–1,0 m/min.

6.5. **HPLC-sisestusseade**

Automaatsüstija, süstimismaht 25 µl, korratavus < 0,5 %.

Selle asemel võib kasutada käsitsi süstimise seadet (nõuded on samad, mis automaatsüstija puhul).

6.6. **HPLC-detektor**

Ülitundlik murdumisnäitaja detektor, mille müratase on < $5{,}10^{-9}$ murdumisnäitaja ühikut.

6.7. **Integraator**

Arvutiprogramm või eriintegraator andmehõiveks, piigipindalade ja -kõrguste töötlemiseks ja arvutamiseks; piigipindalad või -kõrgused teisendatakse laktoosi kontsentratsiooniks.

6.8. **Veepuhastusüksus**

Süsteem ultrapuhta vee valmistamiseks (tüüp 1), mille eritakistus on > 14 MΩ.cm.

6.9. **Lahuse filtrimise seade**

Süsteem, mis võimaldab filtrida vett 0,45 µm poori suurusega membraanfiltri abil.

*Märkus.* Paljudel veepuhastusseadmetel (6.8) on sisseehitatud 0,45 või 0,2 µm filter. Täiendavat filtrimist ei ole vaja, kui vett kohe kasutatakse.

6.10. **Analüütilised kaalud**

Kaalud jaotise väärtusega 0,1 mg.

6.11. **Vesivann**

Vesivann, milles saab hoida püsivat temperatuuri 40 ± 0,5 °C.

6.12. **Tsentrifuug**

Võimaldab tsentrifuugida Eppendorfi topse või nendega samaväärseid või suuremaid topse vähemalt 3 000g juures.

▼B

6.13. **Mõõtekolb 50 ml**

Maht 50 ml, klass A.

*Märkus.* Võib kasutada teistsuguse mahuga pudeleid, kuid siis tuleb arvesse võtta mahutegurit.

6.14. **Mõõtekolb 100 ml**

Maht 100 ml, klass A.

6.15. **Mõõtepipett**

Mõõtepipett 10 ml.

*Märkus.* Alternatiivselt võib kasutada 5 ml mahuga käsipipetti, lisades kaks korda 5 ml reaktiivi (5.3).

7. PROOVI VÕTMINE

On oluline, et labor saaks tõeliselt esindava proovi, mis vastab standardile ISO 707IDF 50 ([iii]) ega ole saanud kahjustada transportimisel ega hoidmisel.

8. LAKTOOSI STANDARDLAHUSE VALMISTAMINE

8.1. **Standardlahus 1**

Lahustada täpselt kaalutud (jaotise väärtus 0,1 mg) umbes 50milligrammine laktoosi monohüdraadi (5.2) kaalutis 100 ml mõõtekolvis (6.14) ja täiendada veega kuni märgini.

8.2. **Standardlahus 2**

Lahustada täpselt kaalutud (jaotise väärtus 0,1 mg) umbes 100milligrammine laktoosi monohüdraadi (5.2) kaalutis 100 ml mõõtekolvis (6.14) ja täiendada veega kuni märgini.

*Märkus.* Standardlahuseid võib hoida kuni 1 nädal temperatuuril umbes 5 °C.

9. ANALÜÜSITAVA PROOVI ETTEVALMISTAMINE

9.1. **Proovi taastamine**

Kaaluda umbes 5g pulbrit 50 ml pudelisse (6.13) 1 mg täpsusega ($W_1$, (11)). Lisada 50 ml vett ja märkida kaalu suurenemine ($W_2$ (11)) 0,01g täpsusega. Suletud pudel asetada 30 minutiks vesivanni (6.11) ja pöörata selle ajavahemiku jooksul mõned korrad ümber. Seejärel jahutada pudel toatemperatuurini.

9.2. **Proovi käsitlemine**

Võtta umbes 1g kõnealust lahust ja panna 50 ml mõõtekolbi (6.13), kaaluda 1 mg täpsusega ($W_3$ (11)), lisada 20 ml vett ja seejärel veel 10 ml lahjendatud Biggs/Szijarto reaktiivi (5.4), täiendada veega kuni märgini. Esimese 30 minuti jooksul pöörata pudelit ettevaatlikult 5 korda ümber.

1 tunni pärast võtta alikvoot ja tsentrifuugida (6.12) 3 000g juures 10 minutit (võib ka suurema g väärtusega vastavalt lühema aja jooksul). HPLC-analüüsi jaoks kasutada supernatandi alikvooti.

10. HPLC MÄÄRAMINE

10.1. **HPLC eelnev ettevalmistamine**

10.1.1. *Kolonni ja eelkolonni paigaldamine*

Eelkolonn (6.2) paigutatakse väljapoole kolonniahju (6.3) ja kolonn (6.1) paigutatakse ahju.

*Märkus.* Kui ahjul ei ole eluendi eelsoojendamise torustikku, peab eluent minema ahjus läbi umbes 15 cm roostevabast terasest toru enne kolonni sisenemist (eluent peab enne kolonni sisenemist olema kindlasti soojendatud, muidu läheb piik laiaks).

▼B

10.1.2. *Detektor ja esialgne voolukiirus*

Stabiilse nulljoone saavutamiseks lülitada detektor (6.6) sisse vähemalt 24 tundi enne analüüsimist. Detektori sisetemperatuur reguleerida väärtusele 35 °C. Kui kolonniahi (6.3) on seatud toatemperatuurile, reguleerida voolukiirus vähemalt 20 minutiks 0,2 milliliitrile minutis (6.4).

10.1.3. *Kolonniahi ja lõppvoolukiirus*

Kolonniahi (6.3) reguleerida temperatuurile 85 °C. Kui see temperatuur on saavutatud, suurendada 30 minuti pärast pikkamööda voolukiirus 0,2 milliliitrilt minutis 0,6 milliliitrile minutis (6.4). Lasta süsteemil sellel voolukiirusel tasakaalustuda ning hoida seejärel temperatuuri 85 °C 2 tundi või seni, kuni saadakse stabiilne nulljoon.

10.1.4. *Integreerimine*

Valida hoolikalt selliseid andmehõive ja integreerimise parameetreid (6.7) nagu andmeedastuskiirus, tundlikkus, ajakonstant, piigi laius ja künnis.

Laktoosi retentsiooniaeg on umbes 11 minutit.

*Märkus.* Paljud andmehõiveprogrammid (6.7) võimaldavad lihtsal viisil mõõta teoreetiliste taldrikute arvu. Mõõta regulaarselt standardi 1 (8.1) teoreetiliste taldrikute arvu ja asendada kolonn (6.1) siis, kui taldrikute arv on 25 % madalam uue kolonni vastavast algväärtusest.

10.1.5. *Kaitsekolonni testimine*

Kontrollida 25 µl 0,05 % naatriumkloriidi lahuse süstimise abil regulaarselt (vähemalt üks kord iga seeria jooksul) kaitsekolonni (6.2) suutlikkust kõrvaldada proovist soolad. Kui tekivad piigid, tuleb kaitsekolonn asendada.

10.2. **Töös kasutatavad standardlahused**

Süstida iga analüüsiseeria alguses 25 µl (6.5) standardlahust 1 (8.1) ja seejärel standardlahust 2 (8.2). Seda korratakse pärast iga 10–20 proovi süsti ja ka seeria lõpus.

10.3. **Töö proovidega**

Süstida 25 µl proovi supernatanti (9.2).

11. TULEMUSTE ARVUTAMINE JA ESITAMINE

11.1. **Kalibreerimine**

Tavaliselt kasutatakse tulemuste arvutamiseks piikide kõrgusi, ent kui signaal sisaldab liiga palju müra, võib kasutada piigi pindala (madala kontsentratsiooni puhul mõjutavad komponentide piigid vähem piigi kvantitatiivset määramist tema kõrguse järgi, kui need on osaliselt, kuid mitte piisavalt lahutatud laktoosi piigist).

Arvutiprogrammi (6.7) abil peab saama välja arvutada lineaarse kalibreerimisgraafiku, mis läheb läbi lähtepunkti. Kontrollida graafiku lineaarsust (selgesti nähtava mittelineaarsuse kõige tõenäolisemaks põhjuseks on vead standardi 1 (8.1) või standardi 2 (8.2) valmistamisel, halb integreerimine ja (vähem tõenäoliselt) halvasti toimiv injektor).

Sisendina kasutada standardite 1 (8.1) ja 2 (8.2) kohaselt välja arvutatud veevaba laktoosi kontsentratsioone (ühik: mg/ml).

Kalibreerimisjoone tõus (RF) on määratud pindalaga kontsentratsiooni kohta, mõõteühik on mg/ml.

11.2. **Proovid**

Analüüsi tulemus saadakse grammides 100 g kohta ja arvutatakse välja arvutiprogrammi (6.7) või järgmise valemi abil:

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

▼B

kus:

C: laktoosi kontsentratsioon grammides 100 g pulbris;

H: proovi laktoosipiigi kõrgus;

RF: kalibreerimistegur (või kalibreerimissirge tõus) ühikutes mV/mg/ml;

$W_1$: pulbriproovi pulbri kaal grammides (9.1);

$W_2$: pulbriproovile (9.1) lisatud vee kaal;

$W_3$: pulbrist taastatud lahuseproovi kaal grammides (9.2);

50: kasutatud mõõtekolvi (9.2) maht;

0,1: tulemuse ümberarvestamine grammideks 100 g kohta.

12. TÄPSUS

Laboritevahelise katse põhjal saadud näitajaid tohib kohaldada üksnes esitatud kontsentratsioonivahemike ja põhiainete suhtes. Korratavuse ja reprodutseeritavuse väärtused saadakse laboritevahelisest katsest, mis viiakse läbi ISO standardi 5725 ([iv]) kohaselt.

12.1. **Korratavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud lühikese ajavahemiku jooksul sama meetodiga, identse katsematerjaliga, samas laboris, sama katse läbiviija poolt, samu katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi rohkem kui 5 %-l juhtudest olla suurem kui xxx (määratakse kindlaks ühisuuringuga) ([v]).

12.2. **Reprodutseeritavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud sama meetodiga, identse katsematerjaliga, erinevates laborites, erinevate katse läbiviijate poolt, erinevaid katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi rohkem kui 5 %-l juhtudest olla suurem kui 0,5g/100 g (määratakse kindlaks ühisuuringuga).

13. VIITED

([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.

▼B

*XII LISA*

**(Artikkel 9)**

**RIIKLIKUKS LADUSTAMISEKS ETTE NÄHTUD LÕSSIPULBRIS ESINEVA LAABIVADAKU TUVASTAMINE KASEIINI MAKROPEPTIIDIDE MÄÄRAMISE TEEL KÕRGSURVEVEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) ABIL**

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga on võimalik kaseiini makropeptiidide määramise teel tuvastada laabivadaku lisand riiklikuks ladustamiseks ette nähtud lõssipulbris.

2. VIIDE

Lähtutakse rahvusvahelise standardi ISO 707 — Piim ja piimatooted — Proovivõtu meetodid I lisa lõike 2 punkti c viimases lõigus antud juhistest.

3. MÄÄRATLUS

Tahke laabivadaku sisaldus massiprotsentides leitakse kaseiini makropeptiidide sisalduse abil järgnevalt kirjeldatud meetodit kasutades.

4. PÕHIMÕTE

— Lõssipulbrist taastatakse lõss, trikloroäädikhappe lisamise abil eraldatakse rasv ja valgud ning seejärel tsentrifuugitakse või filtritakse.

— Supernatandis määratakse kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil kaseiini makropeptiidide (GMPde) kogus.

— Proovide tulemusi võrreldakse lõssipulbri standardproovidega, millele kas on lisatud teadaolev protsent vadakupulbrit või ei ole seda tehtud.

5. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett.

5.1. **Trikloroäädikhappe lahus**

Lahustada 240 g trikloroäädikhapet ($CCl_3COOH$) vees ja täiendada maht 1 000 milliliitrini. Lahus peab olema selge ja värvusetu.

5.2. **Eluentlahus, pH 6,0**

Lahustada 1,74 g dikaaliumvesinikfosfaati ($K_2HPO_4$), 12,37 g kaaliumdivesinikfosfaati ($KH_2PO_4$) ja 21,41 g naatriumsulfaati ($Na_2SO_4$) umbes 700 ml vees. Vajaduse korral reguleerida pH 6,0-le, kasutades fosforhappe või kaaliumhüdroksiidi lahust.

Täiendada veega 1 000 ml märgini ja homogeniseerida.

*Märkus.* Eluendi koostist võib ajakohastada, et see vastaks etalonide sertifikaadile või kolonni täitematerjali tootja soovitustele.

Filtrida eluentlahus enne kasutamist läbi membraanfiltri, mille pooride läbimõõt on 0,45 μm.

5.3. **Loputuslahus**

Segada üks mahuosa atsetonitriili ($CH_3CN$) üheksa mahuosa veega. Filtrida segu enne kasutamist läbi membraanfiltri, mille pooride läbimõõt on 0,45 μm.

▼B

*Märkus.* Võib kasutada mõnda muud baktereid tapva toimega pesemislahust, mis ei vähenda kolonnide lahutusvõimet.

5.4. **Standardproovid**

5.4.1. *Lõssipulber, mis vastab käesoleva määruse nõuetele (s.t [0])*

5.4.2. *Sama lõssipulber, millele on lisatud 5 massiprotsenti standardkoostisega laabivadakupulbrit (s.t [5])*

6. SEADMED

6.1. Analüütilised kaalud.

6.2. Tsentrifuug, mis võimaldab saavutada tsentrifugaalkiirenduse 2 200 g ja on varustatud suletavate umbes 50 ml topsidega.

6.3. Mehhaaniline loksutaja.

6.4. Magnetsegaja.

6.5. Umbes 7 cm läbimõõduga klaaslehtrid.

6.6. Umbes 12,5 cm läbimõõduga keskmise tihedusega paberfiltrid.

6.7. Klaasist filtrimisseade, mille membraanfiltri pooride läbimõõt on 0,45 μm.

6.8. Mõõtepipetid, mis võimaldavad mõõta 10 ml (ISO 648, klass A või ISO/R 835), või doseerimisseade, millega saab mõõta 10,0 ml kahe minuti jooksul.

6.9. Doseerimisseade, mis võimaldab mõõta 20,0 ml vett umbes 50 °C juures.

6.10. Termostateeritud vesivann, reguleeritud temperatuurile 25 ± 0,5 °C.

6.11. HPLC-seade, mille komplekti kuulub:

6.11.1. pump;

6.11.2. injektor mahtude 15–30 μl käsitsi või automaatseks sisestamiseks;

6.11.3. kaks järjestikust TSK 2 000-SW kolonni (pikkus 30 cm, sisediameeter 0,75 cm) või samaväärsed kolonnid (nt üks TSK 2 000-SWxl, üks Agilent Technologies Zorbax GF 250) ja üks eelkolonn (3 cm × 0,3 cm), täidetud I 125ga või samaväärse tõhususega materjaliga;

6.11.4. termostateeritud kolonniahi, reguleeritud temperatuurile 35 ± 1 °C;

6.11.5. muudetava lainepikkusega UV-detektor, mis võimaldab teha mõõtmisi 205 nm juures tundlikkusega 0,008 A;

6.11.6. integraator, mis võimaldab integreerida miinimumist miinimumini.

*Märkus.* Võib töötada ka toatemperatuuril hoitavate kolonnidega, kuid siis on nende lahutusvõime pisut madalam. Sellisel juhul ei tohi temperatuur ühe analüüside seeria jooksul muutuda rohkem kui ± 5 °C.

7. PROOVI VÕTMINE

7.1. Proove tuleb võtta vastavalt rahvusvahelise standardiga ISO 707 sätestatud korrale. Liikmesriigid võivad kasutada muud proovide võtmise meetodit, kui see on kooskõlas nimetatud standardi põhimõtetega.

7.2. Proovi hoitakse tingimustes, mis välistavad selle riknemise või koostise muutumise.

8. MÄÄRAMISE KÄIK

▼B

8.1. **Analüüsitava proovi ettevalmistamine**

Panna lõssipulber õhukindla kaanega anumasse, mille maht on lõssipulbri mahust umbes kaks korda suurem. Sulgeda anum kohe. Segada lõssipulber hästi läbi, anumat korduvalt ümber pöörates.

8.2. **Katsekogus**

Kaaluda tsentrifuugitopsi (6.2) või sobivasse suletavasse anumasse (50 ml) 2,000 ± 0,001 g uuritavat proovi.

8.3. **Rasva ja valkude eemaldamine**

8.3.1. Lisada uuritavale kogusele 20,0 ml kuuma vett (50 °C). Lahustada pulber, loksutades segu mehaanilisel loksutajal (6.3) viis minutit. Asetada tops vesivanni (6.10) ja tasakaalustada 25 °C juures.

8.3.2. Magnetsegajaga (6.4) tugevasti segades lisada kahe minuti jooksul ühtlase kiirusega 10,0 ml trikloroäädikhapet (5.1), mille temperatuur on 25 °C. Seejärel asetada tops 60 minutiks vesivanni (6.10).

8.3.3. Tsentrifuugida (6.2) 10 minutit 2 200 g juures või filtrida läbi paberi (6.6), visates filtraadist ära esimesed 5 ml.

8.4. **Kromatograafiline määramine**

8.4.1. Süstida HPLC-seadmesse (6.11), milles eluentlahuse (5.2) voolukiirus on 1,0 ml lahust minutis, täpselt mõõdetud 15–30 µl supernatanti või filtraati (8.3.3).

*Märkus 1:* Võib kasutada muud voolukiirust sõltuvalt kasutatava kolonni sisediameetrist või kolonni tootja soovitustest.

*Märkus 2:* Selleks et säilitada eluenti gaasivabana ja ära hoida bakterite kasvu, tuleb eluentlahust (5.2) hoida kogu kromatograafilise analüüsi vältel temperatuuril 85 °C. Võib kasutada ka muid samalaadse toimega ettevaatusabinõusid.

*Märkus 3:* Igal analüüsi vaheajal tuleb kolonnid pesta veega. Kolonnidesse ei tohi jätta eluentlahust (5.2).

Enne töö katkestamist enam kui 24 tunniks tuleb kolonnid veega läbi pesta ja seejärel pesta vähemalt kolme tunni vältel lahusega (5.3) voolukiirusel 0,2 ml minutis.

8.4.2. Uuritava proovi [E] kromatograafilise analüüsi tulemused saadakse kromatogrammina, millel iga piik identifitseeritakse selle retentsiooniaja (RT) järgi järgmiselt:

| | |
|---|---|
| II piik: | kromatogrammi teine piik, mille RT on umbes 12,5 minutit; |
| III piik: | kromatogrammi kolmas piik, mis vastab kaseiini makropeptiidile ja mille RT on 15,5 minutit. |

Kolonni(de) kvaliteet võib oluliselt mõjutada üksikpiikide retentsiooniaega.

Integraator (6.11.6) arvutab automaatselt välja iga piigi pindala A:

| | |
|---|---|
| $A_{II}$: | II piigi pindala |
| $A_{III}$: | III piigi pindala |

Enne kvantitatiivset tõlgendamist tuleb kontrollida iga kromatogrammi kuju, et avastada võimalikud kõrvalekalded, mis on tingitud seadme või kolonnide puudulikust tööst või analüüsitava proovi päritolust ja iseloomust.

Kahtluse korral tuleb analüüsi korrata.

▼B

8.5. **Kalibreerimine**

8.5.1. Rakendatakse täpselt sama meetodit, mida on kirjeldatud standardproovide (5.4) puhul punktides 8.2–8.4.2.

Kasutada värskelt valmistatud lahuseid, sest kaseiini makropeptiidid lagunevad 8 % trikloroäädikhappe keskkonnas. Hinnanguline kadu 30 °C juures on 0,2 % tunnis.

8.5.2. Enne proovide kromatograafilist määramist tuleb kolonnid tasakaalustada, süstides korduvalt standardproovi (5.4.2) lahust (8.5.1), kuni kaseiini makropeptiidile vastava piigi pindala ja retentsiooniaeg jääb konstantseks.

8.5.3. Määrata kalibreerimistegurid R, süstides sama palju filtraate (8.5.1) nagu uuritavate proovide puhul.

9. TULEMUSTE ESITAMINE

9.1. **Arvutamismeetod ja valemid**

9.1.1. *Kalibreerimisteguri R arvutamine*

| | |
|---|---|
| II piik: | $R_{II} = 100/(A_{II}[0])$ |

kus:

$R_{II}$ = II piikide kalibreerimistegurid;

$A_{II}$ [0] = punktis 8.5.3 saadud standardproovi [0] II piikide pindalad

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

kus:

$R_{III}$ = III piigi kalibreerimistegur;

$A_{III}$ [0] ja $A_{III}$ [5] = punktis 8.5.3 saadud standardproovide [0] ja [5] III piigi pindalad;

W = standardproovi [5] vadakusisaldus, s.t 5.

9.1.2. *Proovi [E] piikide suhtelise pindala arvutamine*

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

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

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

kus:

$S_{II}$ [E], $S_{III}$ [E], $S_{IV}$ [E] = proovi [E] piikide II, III ja IV suhtelised pindalad;

$A_{II}$ [E], $A_{III}$ [E] = punktile 8.4.2 vastavalt saadud proovi [E] piikide II ja III pindalad;

$R_{II}$, $R_{III}$ = punktis 9.1.1 arvutatud kalibreerimistegurid.

9.1.3. *Proovi [E] III piigi suhtelise retentsiooniaja arvutamine: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

kus:

$RRT_{III}$ [E] = proovi [E] III piigi suhteline retentsiooniaeg;

$RT_{III}$ [E] = punktis 8.4.2 saadud proovi [E] III piigi suhteline retentsiooniaeg;

▼B

$RT_{III}$ [5] = punktis 8.5.3 saadud kontrollproovi [5] III piigi suhteline retentsiooniaeg.

9.1.4. Katsed on näidanud lineaarse seose olemasolu III piigi suhtelise retentsiooniaja (s.t $RRT_{III}$ [E]) ja lisatud vadakupulbri sisalduse vahel kuni 10 % sisalduseni.

— $RRT_{III}$ [E] on < 1,000, kui vadakusisaldus on > 5 %;

— $RRT_{III}$ [E] on ≥ 1,000, kui vadakusisaldus on ≤ 5 %.

$RRT_{III}$ väärtuste lubatud kõikumine on ± 0,002.

Tavaliselt ei erine $RRT_{III}$ [0] väärtus palju 1,034st. Sõltuvalt kolonnide olukorrast võib väärtus läheneda väärtusele 1,000, kuid peab alati olema sellest suurem.

9.2. Proovis sisalduva laabivadakupulbri protsendi arvutamine

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

kus:

W = proovis [E] sisalduva laabivadaku massiprotsent;

$S_{III}$ [E] = punktis 9.1.2 saadud uuritava proovi [E] III piigi suhteline pindala;

1,3 = on III piigi suhteline keskmine pindala, väljendatud laabivadaku grammides 100 g kohta ning määratud erineva päritoluga lõssipulbris, mida ei ole võltsitud. See väärtus on saadud katseliselt;

$S_{III}$ [0] = on III piigi suhteline pindala, mis võrdub $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Need väärtused on saadud vastavalt punktidele 9.1.1 ja 8.5.3;

($S_{III}$ [0] – 0,9) = on parandus, mis tuleb teha keskmisele suhtelisele pindalale 1,3, kui $S_{III}$ [0] ei ole võrdne 0,9ga. Katseliselt saadud kontrollproovi [0] III piigi suhteline keskmine pindala on 0,9.

9.3. **Meetodi täpsus**

9.3.1. *Korratavus*

Ühel ja samal ajal või kohe üksteise järel samade seadmetega ühe ja sama analüüsija poolt identse materjaliga läbi viidud kahe määramise tulemuste erinevus ei tohi olla suurem kui 0,2 massiprotsenti.

9.3.2. *Reprodutseeritavus*

Erinevus kahe üksiktulemuse vahel, mis on saadud kahes eri laboris sama katsematerjaliga, ei tohi olla suurem kui 0,4 massiprotsenti.

9.4. **Tõlgendamine**

9.4.1. Vadak puudub, kui III piigi suhteline pindala ($S_{III}$ [E]), väljendatuna laabivadaku grammides 100 g toote kohta, ≤ 2,0 + ($S_{III}$[0] – 0,9), kus:

2,0 = III piigi suhtelise pindala jaoks lubatud maksimaalne väärtus (s.t 1,3), määramatus on tingitud lõssipulbri koostise kõikumistest ja meetodi reprodutseeritavusest (9.3.2);

($S_{III}$ [0] – 0,9) = parandus, mis tuleb teha, kui pindala $S_{III}$ [0] on erinev 0,9st (vt punkt 9.2).

9.4.2. Kui III piigi suhteline pindala $S_{III}$[E] > 2,0 + ($S_{III}$[0] – 0,9) ja II piigi suhteline pindala $S_{II}$ [E] ≤ 160, määrata laabivadakusisaldus vastavalt punktis 9.2 osutatule.

▼B

9.4.3. Kui III piigi suhteline pindala $S_{III}$ [E] > 2,0 + ($S_{III}$[0] – 0,9) ja II piigi suhteline pindala $S_{II}$ [E] ≤160, määrata üldine valgusisaldus (P %). Seejärel hinnatakse jooniseid 1 ja 2.

9.4.3.1. Suure valgusisaldusega võltsimata koostisega lõssipulbri proovide analüüsimisel saadud teave on kokku võetud joonistel 1 ja 2.

Pidev joon kujutab lineaarset regressiooni, mille koefitsiendid arvutatakse vähimruutude meetodil.

Sirge katkendjoon fikseerib III piigi suhtelise pindala ülemmäära, kusjuures on tõenäoline, et 90 % juhtudest seda ei ületata.

Jooniste 1 ja 2 katkendjoonte võrrandid on järgmised:

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

kus:

$S_{III}$ = III piigi suhteline pindala, arvutatud kas kogu valgusisalduse või $S_{II}$ [E] suhtelise piigipindala põhjal;

P % = kogu valgusisaldus, väljendatud kaaluprotsentides;

($S_{II}$ [E] = on punktis 9.1.2 arvutatud proovi suhteline pindala.

Need võrrandid on võrdsed punktis 9.2 nimetatud arvuga 1,3.

Erinevus ($T_1$ ja $T_2$) leitud suhtelise pindala $S_{III}$ [E] ja suhtelise pindala $S_{III}$ vahel saadakse järgmiselt: $T_1$ = $S_{III}$[E] – [(0,376 P % – 10,7) + ($S_{III}$[0] – 0,9)] ja $T_2$ = $S_{III}$[E] – [(0,0123 $S_{II}$[E] + 0,93) + ($S_{III}$[0] – 0,9)].

9.4.3.2.

Kui $T_1$ ja/või $T_2$ on null või väiksem, ei saa laabivadaku lisandit määrata.

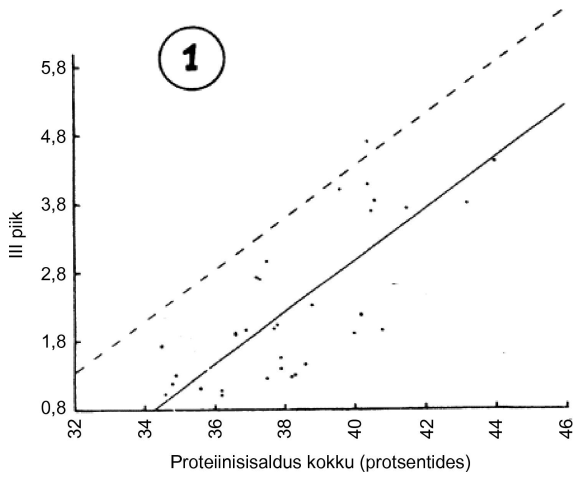
Kui $T_1$ ja $T_2$ on suuremad kui null, on lisatud laabivadakut.

Laabivadakusisaldus arvutatakse vastavalt järgmisele võrrandile: W = $T_2$ + 0,91

kus:

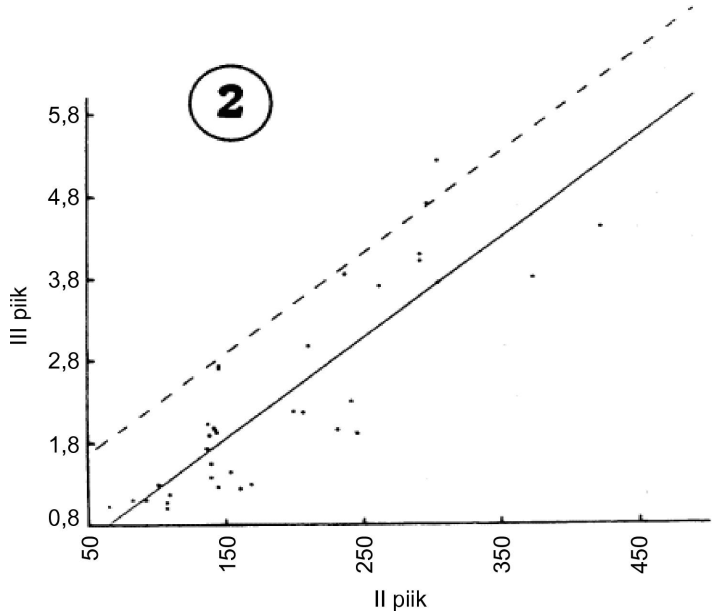
0,91 on pidevjoone ja katkendjoone vaheline kaugus vertikaalteljel.

**Lõssipulber**



▼B

**Lõssipulber**



▼B

*XIII LISA*

**(Artikkel 9)**

**LAABIVADAKUPULBRI MÄÄRAMINE MÄÄRUSES (EÜ) NR 2799/1999 OSUTATUD LÕSSIPULBRIS JA SEGUDES**

1. EESMÄRK: LISATUD LAABIVADAKUPULBRI TUVASTAMINE:

a) määruse (EÜ) nr 2799/1999 artiklis 2 määratletud lõssipulbris ja

b) määruse (EÜ) nr 2799/1999 artiklis 4 määratletud segudes.

2. VIITED: RAHVUSVAHELINE STANDARD ISO 707

3. MÄÄRATLUS

Laabivadakupulbri sisalduse leidmiseks määratakse kaseiini makropeptiidide sisaldus massiprotsentides järgnevalt kirjeldatud meetodil.

4. PÕHIMÕTE

Kaseiini makropeptiidide sisaldus määratakse vastavalt XII lisale. Positiivseid proove analüüsitakse kaseiini makropeptiidi $_{A}$ tuvastamiseks pööratud faasi kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil. Proove võib ka kohe analüüsida pööratud faasi HPLC meetodi abil. Saadud tulemusi võrreldakse lõssipulbri standardproovidega, millest osale on lisatud teatav kogus vadakupulbrit. Kui tulemus on suurem kui 1 massiprotsent, näitab see, et proov sisaldab laabivadakupulbrit.

5. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett. Atsetonitriili kvaliteet peab vastama spektroskoopia või HPLC nõuetele.

Meetodi kasutamiseks vajalikke reaktiive on kirjeldatud käesoleva määruse XII lisas.

Pööratud faasi HPLC puhul kasutatavad reaktiivid.

5.1. **Trikloroäädikhappe lahus**

Lahustada vees 240 g trikloroäädikhapet ($CCl_3COOH$) ja täiendada maht 1 000 milliliitrini. Lahus peab olema täiesti selge ja värvusetu.

5.2. **Eluendid A ja B**

Eluent A: panna 150 ml atsetonitriili ($CH_3CN$), 20 ml isopropanooli ($CH_3CHOHCH_3$) ja 1,00 ml trifluoroäädikhapet (TFA, $CF_3COOH$) 1 000 ml mõõtekolbi. Mõõtekolb täiendada veega 1 000 milliliitrini.

Eluent B: panna 550 ml atsetonitriili, 20 ml isopropanooli ja 1,00 ml TFAd 1 000 ml mõõtekolbi. Mõõtekolb täiendada veega 1 000 milliliitrini. Filtrida eluentlahus enne kasutamist läbi membraanfiltri, mille pooride läbimõõt on 0,45 μm.

5.3. **Kolonni konserveerimine**

Pärast analüüse pesta kolonni eluendiga B, rakendades gradienti, ja seejärel 30 minuti jooksul atsetonitriiliga, rakendades samuti gradienti. Kolonni säilitatakse atsetonitriilis.

5.4. **Standardproovid**

5.4.1. Riikliku ladustamise nõuetele vastav lõssipulber (s.t [0]).

▼B

5.4.2. Sama lõssipulber, millele on lisatud 5 massiprotsenti standardkoostisega laabivadakupulbrit s.t [5]).

5.4.3. Sama lõssipulber, millele on lisatud 50 massiprotsenti standardkoostisega laabivadakupulbrit (s.t ([1])).

6. SEADMED

Meetodi kasutamiseks vajalikke seadmeid on kirjeldatud käesoleva määruse XII lisas.

6.1. Analüütilised kaalud.

6.2. Tsentrifuug, mis võimaldab saavutada tsentrifuugimiskiirenduse 2 200 g ja on varustatud umbes 50 ml suletavate topsidega.

6.3. Mehhaaniline loksutaja.

6.4. Magnetsegaja.

6.5. Umbes 7 cm läbimõõduga klaaslehtrid.

6.6. Umbes 12,5 cm läbimõõduga keskmise tihedusega paberfiltrid.

6.7. Klaasist filtrimisseade, mille membraanfiltri pooride läbimõõt on 0,45 µm.

6.8. Mõõtepipetid, mis võimaldavad mõõta 10 ml (ISO 648, klass A või ISO/R 835), või doseerimisseade, millega saab mõõta 10,0 ml kahe minuti jooksul.

6.9. Doseerimisseade, mis võimaldab mõõta 20,0 ml vett umbes 50 °C juures.

6.10. Termostateeritud vesivann, reguleeritud temperatuurile 25 ± 0,5 °C.

6.11. HPLC-seade, mille komplekti kuulub:

6.11.1. pumbasüsteem, mis võimaldab saada kahekomponendilist gradienti;

6.11.2. ruumala 100 µl süstimist võimaldav automaatne või mitteautomaatne injektor;

6.11.3. kolonn Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (pikkus 25 cm, siseläbimõõt 0,46 cm) või samaväärne suurepooriline silikageeliga täidetud pööratud faasi kolonn;

6.11.4. termostateeritud kolonniahi, reguleeritud temperatuurile 35 ± 1 °C;

6.11.5. muudetava lainepikkusega UV-detektor, mis võimaldab teha mõõtmisi 210 nm juures (vajaduse korral võib kasutada suuremat lainepikkust kuni 220 nm), tundlikkusega 0,02 Å;

6.11.6. integraator, mis võimaldab integreerida ühise nulljooneni või miinimumist miinimumini.

*Märkus.* Kolonniga saab töötada toatemperatuuril, kui see ei kõigu rohkem kui 1 °C, vastasel korral muutub kaseiini makropeptiidi $_{A}$ retentsiooniaeg liiga palju.

7. PROOVI VÕTMINE

7.1. Proove võetakse rahvusvahelise standardiga ISO 707 sätestatud korras. Liikmesriigid võivad kasutada muud proovide võtmise meetodit, kui see on kooskõlas eespool nimetatud standardi põhimõtetega.

7.2. Proovi hoitakse tingimustes, mis välistavad selle riknemise või koostise muutumise.

8. MÄÄRAMISE KÄIK

([1]) Standardkoostisega laabivadakupulber ja lisandeid sisaldav lõssipulber on kättesaadavad NIZOs (Kernhemseweg 2, PO Box 20 — NL-6710 BA Ede). Kasutada võib ka NIZO pulbritega samaväärse tulemuse andvaid pulbreid.

▼B

8.1. **Uuritava proovi ettevalmistamine**

Panna lõssipulber õhukindla kaanega anumasse, mille maht on lõssipulbri mahust umbes kaks korda suurem. Sulgeda anum kohe. Segada lõssipulber hästi läbi, anumat korduvalt ümber pöörates.

8.2. **Katsekogus**

Kaaluda tsentrifuugitopsi (6.2) või sobivasse suletavasse anumasse (50 ml) 2,00 ± 0,001 g uuritavat proovi.

*Märkus*. Segu puhul kasutatakse uuritava proovi kaalutist, mis pärast rasvast vabastamist vastab kogusele 2,00 grammi.

8.3. **Rasva ja valkude eemaldamine**

8.3.1. Lisada uuritavale kogusele 20,0ml kuuma vett (50 °C). Pulber lahustada, loksutades mehhaanilisel loksutajal (6.3) viis minutit, hapukoorepeti korral 30 minutit. Tops asetada vesivanni (6.10) ja tasakaalustada 25 °C juures.

8.3.2. Magnetsegajaga (5.1) tugevasti segades lisada kahe minuti jooksul ühtlase kiirusega 10,0 ml 25 °C trikloroäädikhapet (6.4). Seejärel asetada tops 60 minutiks vesivanni (6.10).

8.3.3. Tsentrifuugida (6.2) 10 minutit 2 200 g juures või filtrida läbi paberi (6.6), visates filtraadist ära esimesed 5 ml.

8.4. **Kromatograafiline määramine**

8.4.1. Teha XII lisas kirjeldatud HPLC-analüüs. Kui tulemus on negatiivne, ei sisalda analüüsitud proov märkimisväärses koguses laabivadakupulbrit. Kui tulemus on positiivne, tuleb kasutada järgmises osas kirjeldatud pööratud faasi HPLC meetodit. Proove võib pööratud faasi HPLC meetodi abil ka kohe analüüsida. Hapukoorepeti lisand võib XII lisas kirjeldatud meetodi kasutamisel anda valepositiivseid tulemusi. Pööratud faasi HPLC meetodi puhul on see aga välistatud.

8.4.2. Enne pööratud faasi HPLC analüüsi läbiviimist tuleb optimeerida gradiendi tingimused. Umbes 6 ml tühimahuga gradientsüsteemide puhul (maht lahuste ühinemispunktist kuni injektori silmuseni, viimane kaasa arvatud) on optimaalne kaseiini makropeptiidi $_{A}$ retentsiooniaeg 26 ± 2 minutit. Väiksema tühimahuga (näiteks 2 ml) gradientsüsteemide puhul on optimaalne retentsiooniaeg 22 minutit.

Võtta standardproovide (5.4) lahuseid, millest osa sisaldab 50 % laabivadakut.

HPLC-seadmesse süstida 100 µl supernatanti või filtraati (8.3.3) tabelis 1 esitatud proovigradiendi tingimustel.

*Tabel 1*

**Proovigradiendi tingimused kromatograafilise analüüsi optimeerimiseks.**

| Kellaaeg (min) | Voolukiirus (ml/min) | % A | % B | Graafik |
|---|---|---|---|---|
| Algus | 1,0 | 90 | 10 | * |
| 27 | 1,0 | 60 | 40 | lineaarne |
| 32 | 1,0 | 10 | 90 | lineaarne |
| 37 | 1,0 | 10 | 90 | lineaarne |
| 42 | 1,0 | 90 | 10 | lineaarne |

Kahe kromatogrammi võrdlus peab andma kaseiini makropeptiidi $_{A}$ piigi asukoha.

▼B

Järgmist valemit kasutades saab välja arvutada normaalse gradiendi puhul kasutatava esialgse lahuse koostise (vt 8.4.3): % B = 10–2,5 + (13,5 + ($RT_{cmpA}$ – 26) / 6) × 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + ($RT_{cmpA}$ – 26) / 6) × 1,11,

kus:

$RT_{cmpA}$: kaseiini makropeptiidi $_A$ retentsiooniaeg proovigradiendis;

10: % B proovigradiendi alguses;

2,5: % B normaalgradiendi keskel, millest lahutatakse % B normaalgradiendi alguses;

13,5: proovigradiendi keskpunkti saavutamise aeg;

26: kaseiini makropeptiidi $_A$ nõutav retentsiooniaeg;

6: proovi- ja normaalgradiendi tõusude suhe;

30: % B proovigradiendi alguses, millest lahutatakse % B 27 minuti pärast;

27: proovigradiendi läbijooksuaeg.

8.4.3. Võetakse analüüsitavate proovide lahused.

HPLC-seadmesse süstitakse täpselt mõõdetult 100 µl supernatanti või filtraati (8.3.3) voolukiirusel 1,0 ml eluentlahust (5.2) minutis.

Eluendi koostis analüüsi alguses saadakse punkti 8.4.2 kohaselt. Harilikult on see ligikaudu A:B = 76:24 (5.2). Kohe pärast süstimist alustatakse lineaargradienti, mille tulemuseks on B osa suurenemine 5 % võrra 27 minuti pärast. Seejärel alustatakse lineaargradienti, millega B osa eluendis tõuseb viie minuti pärast 90 %ni. Seda eluendi koostist hoitakse viis minutit ja pärast seda taastatakse lineaargradiendiga viie minuti jooksul esialgne koostis. Sõltuvalt pumbasüsteemi mahust võib järgmist analüüsi alustada 15 minutit pärast algtingimuste saavutamist.

*Märkus 1.* Kaseiini makropeptiidi $_A$ retentsiooniaeg peab olema 26 ± 2 minutit. Seda on võimalik saavutada, muutes esimese gradiendi alg- ja lõpptingimusi. % B erinevus esimese gradiendi alg- ja lõpptingimustel peab siiski olema 5 % B.

*Märkus 2.* Eluentidest tuleb õhk piisavalt hästi eemaldada ja need peavad sellisena püsima. See on oluline gradiendi pumbasüsteemi tõrgeteta toimimiseks. Kaseiini makropeptiidi $_A$ piigi retentsiooniaja standardhälve peab olema väiksem kui 0,1 minutit (n = 10).

*Märkus 3.* Iga viienda proovi järel tuleb süstida standardproov [5] ja arvutada selle alusel uus kalibreerimistegur R (9.1.1).

8.4.4. Analüüsitava proovi (E) kromatograafilise analüüsi tulemused saadakse kromatogrammina, millel kaseiini makropeptiidi $_A$ piik tehakse kindlaks 26minutilise retentsiooniaja alusel.

Integraator (6.11.6) arvutab automaatselt kaseiini makropeptiidi $_A$ piigi kõrguse H. Kontrollida tuleb iga kromatogrammi nulljoone asukohta. Kui nulljoone asukoht on vale, tuleb analüüsi või integreerimist korrata.

▼B

*Märkus.* Kui kaseiini makropeptiidi $_A$ piik on muudest piikidest piisavalt hästi eraldunud, tuleb kasutada nulljoone kindlaksmääramist miinimumist miinimumini, muudel juhtudel kasutatakse vertikaalide tõmbamist ühise nulljooneni, mille alguspunkt peab olema kaseiini makropeptiidi $_A$ piigi läheduses (seega mitte t = 0 min!). Standardi ja proovide puhul tuleb kasutada sama tüüpi integreerimist ning ühise nulljoone puhul tuleb kontrollida selle sobivust proovidele ja standardile.

Enne kvantitatiivset interpreteerimist tuleb kontrollida iga kromatogrammi kuju, et avastada võimalikud kõrvalekalded, mis on tingitud seadme või kolonni puudulikust tööst või analüüsitava proovi päritolust ja iseloomust. Kahtluse korral tuleb analüüsi korrata.

8.5. **Kalibreerimine**

8.5.1. Kasutada täpselt sama meetodit, mida on kirjeldatud standardproovide (5.4.1 ja 5.4.2) puhul punktides 8.2–8.4.4. Kasutatakse värskelt valmistatud lahuseid, sest kaseiini makropeptiid laguneb toatemperatuuril 8 % trikloroäädikhappe keskkonnas. Temperatuuril 4 °C püsib lahus stabiilsena 24 tundi. Pikkade analüüsiseeriate korral on automaatinjektori puhul soovitatav kasutada jahutatud proovialust.

*Märkus.* Punkti 8.4.2 võib ära jätta, kui eelmistest analüüsidest on teada algtingimustele vastav % B.

Standardproovi [5] kromatogramm peab vastama joonisele 1. Sellel joonisel eelneb kaseiini makropeptiidi $_A$ piigile kaks väikest piiki. Piigid peavad eristuma samal määral.

8.5.2. Enne proovide kromatograafilist määramist süstitakse 100 µl standardproovi, mis ei sisalda laabivadakut [0] (5.4.1).

Kromatogrammil ei tohi olla kaseiini makropeptiidi $_A$ retentsiooniajale vastavat piiki.

8.5.3. Määratakse kalibreerimistegurid R, süstides samas mahus filtraati (8.5.1) nagu analüüsitavate proovide puhul.

9. TULEMUSTE ESITAMINE

9.1. **Arvutamismeetod ja valemid**

9.1.1. *Kalibreerimisteguri R arvutamine*

Kaseiini makropeptiidi $_A$ piik: R = W/H,

kus:

R = kaseiini makropeptiidi $_A$ piigi kalibreerimistegur;

H = kaseiini makropeptiidi $_A$ piigi kõrgus;

W = standardproovi [5] vadakusisaldus.

9.2. **Proovis sisalduva laabivadakupulbri protsendi arvutamine**

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

kus:

W(E) = proovis (E) sisalduva laabivadaku massiprotsent;

R = kaseiini makropeptiidi $_A$ piigi kalibreerimistegur (9.1.1);

H(E) = proovi (E) kaseiini makropeptiidi $_A$ piigi kõrgus.

Kui W(E) on suurem kui 1 % ning kui retentsiooniaegade erinevus proovi ja standardproovi [5] puhul on väiksem kui 0,2 minutit, näitab see, et proov sisaldab laabivadakut.

9.3. **Meetodi täpsus**

9.3.1. *Korratavus*

Ühel ja samal ajal või kohe üksteise järel samade seadmetega ühe ja sama analüüsija poolt identse materjaliga läbi viidud kahe määramise tulemuste vaheline erinevus ei tohi olla suurem kui 0,2 massiprotsenti.

▼B

9.3.2. *Reprodutseeritavus*

Ei ole määratud.

9.3.3. *Lineaarsus*

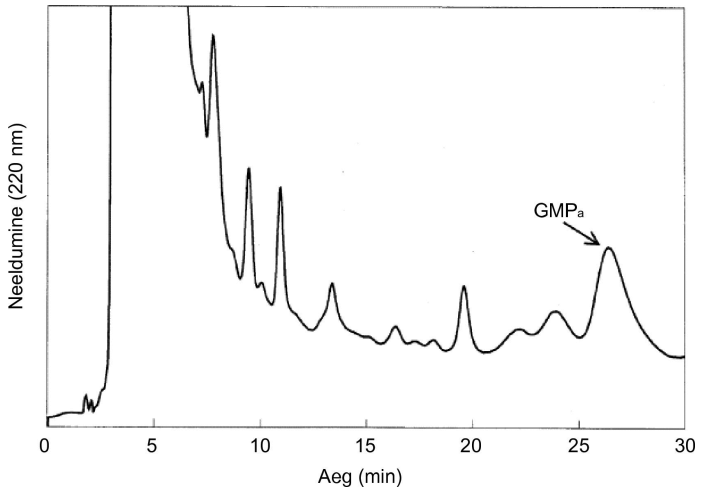
Laabivadaku kontsentratsioonide vahemikus 0–16 % peavad tulemused olema lineaarses seoses korrelatsioonikoefitsiendiga > 0,99.

9.4. **Tõlgendamine**

1 % piirmäär määratakse kindlaks määruse (EMÜ) nr 214/2001 XIX lisa punktide 9.2 ja 9.4.1 sätetega ja selles arvestatakse reprodutseeritavusest tulenevat ebatäpsust.

*Tabel 1*

**Ni–4.6 standard**



▼B

*XIV LISA*

**(Artikkel 10)**

**LÕSSIPULBER: FOSFATIDÜÜLSERIINI JA FOSFATIDÜÜLETANOOLAMIINI KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE**

*Meetod: pööratud faasi kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC).*

1. EESMÄRK JA RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga on võimalik määrata fosfatidüülseriini (PS) ja fosfatidüületanoolamiini (PE) kogus lõssipulbris ja sellega saab tuvastada petipiimapulbri lisandit lõssipulbris.

2. MÄÄRATLUS

PS + PE sisaldus: käesolevas lisas kirjeldatud meetodi abil määratud massiosa ainest. Tulemus väljendatakse dipalmitoüülfosfatidüületanoolamiini (PEDP) milligrammides 100 g pulbri kohta.

3. MEETODI PÕHIMÕTE

Taastatud piimapulbrist ekstraheeritakse metanooliga aminofosfolipiidid. PS ja PE määratakse *o*-ftaaldialdehüüdderivaatidena (OPA) pööratud faasi (RP) HPLC ja fluorestsentsdetektori abil. PS ja PE sisaldus uuritavas proovis väljendatakse kvantitatiivselt standardproovi suhtes, mis sisaldab teadaolevat kogust PEDPd.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett.

4.1. **Etalonmaterjal: PEDP, vähemalt 99 % puhtusastmega**

*Märkus*. Etalonmaterjali tuleb säilitada – 18 °C juures.

4.2. **Reaktiivid standardproovide ja uuritavate proovide valmistamiseks:**

4.2.1. HPLC-puhas metanool;

4.2.2. HPLC-puhas kloroform;

4.2.3. trüptamiinmonohüdrokloriid.

4.3. **Reaktiivid *o*-ftaaldialdehüüdi derivaatide valmistamiseks:**

4.3.1. naatriumhüdroksiidi vesilahus 12 M;

4.3.2. boorhappe vesilahus 0,4 M, pH viidud 10,0ni naatriumhüdroksiidiga (4.3.1);

4.3.3. 2-merkaptoetanool;

4.3.4. o-*ftaaldialdehüüd (OPA)*.

4.4. **HPLC-elueerimislahustid**

4.4.1. elueerimislahustid peavad olema valmistatud HPLC-puhastest reaktiividest;

4.4.2. HPLC-puhas vesi;

4.4.3. metanool, puhtus fluoromeetriliselt kontrollitud;

4.4.4. tetrahüdrofuraan;

4.4.5. naatriumdivesinikfosfaat;

4.4.6. naatriumatsetaat;

4.4.7. äädikhape.

5. SEADMED

5.1. Analüütilised kaalud mõõtetäpsusega 1 mg ja jaotise väärtusega 0,1 mg.

▼B

5.2. Keeduklaasid mahuga 25 ja 100 ml.

5.3. Pipetid, millega saab lisada 1 ja 10 ml.

5.4. Magnetsegaja.

5.5. Mõõtepipetid, millega saab lisada 0,2, 0,5 ja 5 ml.

5.6. Mõõtekolvid mahuga 10, 50 ja 100 ml.

5.7. Süstlad mahuga 20 ja 100 µl.

5.8. Ultrahelivann.

5.9. Tsentrifuug, mis võimaldab tagada 27 000 × g.

5.10. Väikesed klaaspudelid, ligikaudu 5 ml mahuga.

5.11. Mõõtesilinder mahuga 25 ml.

5.12. pH-meeter täpsusega kuni 0,1 pH ühikut.

5.13. HPLC-seade:

5.13.1. gradiendi pumbasüsteem, töökiirus 1,0 ml/min 200baarise rõhu juures;

5.13.2. automaatsüstimisseade, mille abil saab valmistada derivaate;

5.13.3. kolonnisoojendaja, millega saab hoida kolonni temperatuuri 30 ± 1 °C;

5.13.4. fluorestsentsidetektor, reguleeritud ergastuslainepikkusele 330 nm ja kiirguslainepikkusele 440 nm;

5.13.5. integraator või automaatse andmetöötluse arvutiprogramm, millega on võimalik mõõta piikide pindala;

5.13.6. Lichrosphere-100 kolonn (250 × 4,6 mm) või samaväärne kolonn, mis on täidetud oktadetsüülsilaaniga (C 18), osakeste suurus 5 µm.

6. PROOVI VÕTMINE

Proovid tulev võtta vastavalt ISO standardile 707.

7. MÄÄRAMISE KÄIK

7.1. **Sisestandardlahuse valmistamine**

7.1.1. Kaaluda 100 ml mõõtekolbi(5,6) 30,0 ± 0,1 mg trüptamiinmonohüdrokloriidi (4.2.3) kaalutis ning täita kolb metanooliga (4.2.1) kuni märgini.

7.1.2. Pipettida 10 ml mõõtekolbi(5,6) 1 ml(5,3) lahust ning täita kolb metanooliga (4.2.1) kuni märgini, et saavutada trüptamiini kontsentratsioon 0,15 mM.

7.2. **Uuritava proovi lahuse valmistamine**

7.2.1. Kaaluda 25 ml keeduklaasi(5,2) 1,000 ± 0,001 g lõssipulbri proovi. Lisada pipetiga(5,3) 10 ml destilleeritud vett temperatuuriga 40 ± 1 °C ja segada magnetsegajaga(5,4) 30 minutit, kuni kõik tükid on lahustunud.

7.2.2. Pipettida 10 ml mõõtekolbi(5,6) 0,2 ml(5,5) taastatud piima, lisada süstlaga(5,7) 100 µl 0,15 mM trüptamiini lahust(7,1) ja täiendada metanooliga (4.2.1) märgini. Segada kolbi hoolikalt, pöörates seda korduvalt ümber, ja töödelda ultraheliga(5,8) 15 minutit.

7.2.3. Tsentrifuugida(5,9) 27 000 × g juures 10 minutit ja koguda supernatant klaaspudelisse(5,10).

*Märkus.* Uuritava proovi lahust tuleb säilitada 4 °C juures, kuni HPLC-analüüs on lõpetatud.

7.3. **Välisstandardlahuse valmistamine**

▼B

7.3.1. Kaaluda 50 ml mõõtekolbi(5,6) 55,4 mg PEDPd(4,1) ning lisada mõõtesilindriga(5,11) ligikaudu 25 ml kloroformi (4.2.2). Kinnikorgitud kolb kuumutada temperatuurini 50 ± 1 °C ja segada hoolikalt, kuni PEDP on lahustunud. Kolb jahutada temperatuurini 20 °C, täiendada metanooliga (4.2.1) märgini ja segada kolbi ümber pöörates.

7.3.2. Pipettida 1 ml (5,3) nimetatud lahust 100 ml mõõtekolbi (5.6) ning täiendada metanooliga (4.2.1) märgini. Pipettida 1 ml (5.3) sama lahust 10 ml mõõtekolbi (5.6), lisada 100 µl (5.7) 0,15 mM trüptamiini lahust (7.1) ja täiendada metanooliga (4.2.1) märgini. Segada, pöörates kolbi korduvalt ümber.

*Märkus.* Standardproovi lahust tuleb säilitada 4 °C juures, kuni HPLC-analüüs on lõpetatud.

7.4. **Derivatiseerimisreaktiivi valmistamine**

Kaaluda 10 ml mõõtekolbi(5.6) 25,0 ± 0,1 mg OPAd (4.3.4), lisada 0,5 ml (5.5) metanooli (4.2.1) ja segada hoolikalt, et OPA lahustuks. Täiendada märgini boorhappe lahusega (4.3.2) ning lisada süstlaga (5.7) 20 µl 2-merkaptoetanooli (4.3.3).

*Märkus.* Derivatiseerimisreaktiivi tuleb säilitada tumedas pudelis 4 °C juures ning see säilib üks nädal.

7.5. **Määramine kõrgsurvevedelikkromatograafia abil**

7.5.1. *Elueerimislahustid (4.4)*

Lahusti A: 0,3 mM naatriumdivesinikfosfaadi ja 3 mM naatriumatsetaadi lahus (pH reguleeritud äädikhappega väärtuseni 6,5 ± 0,1): metanool: tetrahüdrofuraan = 558:440:2 (mahusuhe).

Lahusti B: metanool.

7.5.2. *Soovitatav elueerimisgradient*

| Aeg (min) | Lahusti A (%) | Lahusti B (%) | Voolukiirus (ml/min) |
|---|---|---|---|
| Alguses | 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 |

*Märkus.* Võib juhtuda, et joonisel 1 näidatud lahutusvõime saamiseks tuleb elueerimisgradienti natuke muuta.

Kolonni temperatuur: 30 °C.

7.5.3. *Sissesüstitav: 50 µl derivatiseerimisreaktiivi ja 50 µl proovilahust.*

▼B

7.5.4. *Kolonni tasakaalustamine*

Süsteemi tavalisel igapäevasel käivitamisel voolutada kolonni 15 minutit 100 % lahustiga B, seejärel segada A:B suhtes 40:60 ja tasakaalustada voolukiiruse 1 ml/min juures 15 minutit. Teha pimekatse, süstides metanooli (4.2.1).

*Märkus.* Enne pikaks ajaks hoiule panemist voolutada kolonni metanooli ja kloroformi seguga (80:20 mahuosa) 30 minutit.

7.5.5. *PS + PE sisalduse määramine uuritavas proovis*

7.5.6. *Teha järjestikused kromatograafilised analüüsid, hoides nende läbiviimise vahelise aja konstantsena, et saada konstantseid retentsiooniaegu. Kalibreerimisteguri hindamiseks lisada proovilahusele iga 5–10 proovi järel välisstandardlahust (7.3).*

*Märkus.* Pärast iga 20–25 käitamiskorda tuleb kolonni puhastada, voolutades seda vähemalt 30 minutit 100 %lise lahustiga B (7.5.1).

7.6. **Integreerimismeetod**

7.6.1. *PEDP piik*

PEDP elueeritakse ühe piigina. Piigi pindala määratakse miinimumist miinimumini integreerimisega.

7.6.2. *Trüptamiinipiik*

Trüptamiin elueeritakse ühe piigina (joonis 1). Piigi pindala määratakse miinimumist miinimumini integreerimisega.

7.6.3. *PS ja PE piigirühmad*

Kirjeldatud tingimustel (joonis 1) elueerub PS kahe peamise osaliselt lahknemata piigina, millele eelneb väiksem piik. PE elueerub kolme peamise osaliselt lahknemata piigina. Määrata kindlaks iga piigirühma kogupindala, reguleerides nulljoone joonisel 1 esitatud viisil.

8. TULEMUSTE ARVUTAMINE JA ESITAMINE

PS ja PE sisaldus uuritavas proovis arvutatakse järgmiselt: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$,

kus:

C = PS või PE sisaldus uuritavas proovis (mg/100 g pulbri kohta);

$A_1$ = standardproovi lahuse (7.3) PEDP piigi pindala;

$A_2$ = uuritava proovi lahuse (7.2) PS või PE piigi pindala;

$T_1$ = standardproovi lahuse (7.3) trüptamiini piigi pindala;

$T_2$ = uuritava proovi lahuse (7.2) trüptamiini piigi pindala.

9. MEETODI TÄPSUS

*Märkus.* Korratavuse väärtused on arvutatud IDFi rahvusvahelise standardi kohaselt ([1]). Korratavuse esialgne piir on arvutatud käesoleva määruse III lisa punktis b määratletud meetodi kohaselt.

([1]) Rahvusvaheline IDFi standard 135B/1991. Piim ja piimatooted. Analüütiliste meetodite täpsusnäitajad. Ühisuuringu läbiviimise meetod.

▼B

9.1. **Korratavus**

Korratavuse suhteline standardhälve, mis väljendab sõltumatute analüüsitulemuste varieeruvust ning mis on lühikese aja jooksul saadud ühe ja sama analüüsija poolt samades tingimustes sama seadme ja prooviga, ei tohi ületada 2 %. Kui nendes tingimustes on saadud kaks tulemust, ei tohi kahe tulemuse suhteline erinevus olla suurem kui 6 % tulemuste aritmeetilisest keskmisest.

9.2. **Reprodutseeritavus**

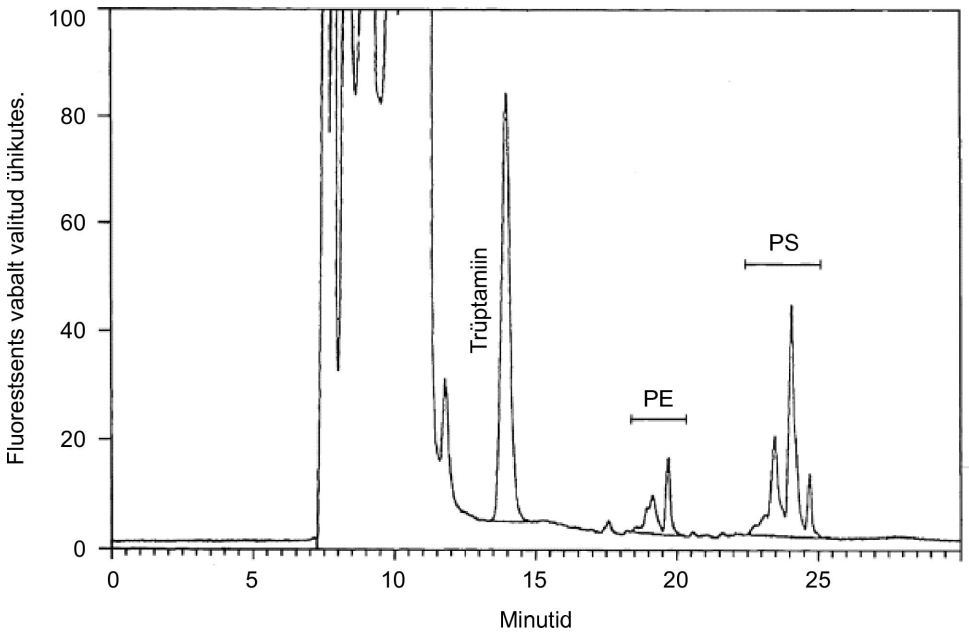
Kui eri laborite analüüsijad on ühe ja sama proovi analüüsimisel saanud kaks erinevat tulemust, kasutades eri seadmeid eri tingimustes, ei tohi kahe tulemuse suhteline erinevus olla suurem kui 11 % nende tulemuste aritmeetilisest keskmisest.

10. VIITED

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).*

*Joonis 1*

**Fosfatidüülseriini (PS) ja fosfatidüületanoolamiini (PE) OPA-derivaatide piigid pulbrist taastatud lõssi metanooliekstrakti HPLC-kromatogrammil. Näidatud on PS, PE ja trüptamiini (sisestandard) piikide integreerimine.**



▼B

*XV LISA*

**(Artikkel 11)**

**MIKROOBIVASTASTE AINETE TUVASTAMINE LÕSSIPULBRIS**

Kasutatakse mikroobiinhibiitorite sõelkatset mikroorganismil *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (on identne tüvega C953), mis on piisavalt tundlik selleks, et määrata 4 µg bensüülpenitsilliini ja 100 µg sulfadimidiini ühes liitris lõssis. Müügil olevaid katsekomplekte võib kasutada, kui nende tundlikkus bensüülpenitsilliini ja sulfadimidiini suhtes vastab nõuetele.

Testimisel kasutatakse pulbrilõssi (1 g pulbrit + 9 ml destilleeritud vett). Katse viiakse läbi standardi ISO/TS 26844:2006 (Piim ja piimatooted — Mikroobivastaste ainete jääkide määramine — Torudifusiooni katse) 1. jao 2. peatüki (IDFi bülletään nr 258/1991) kohaselt või vastavalt teimimiskomplekti valmistaja juhistele ([1]).

Positiivseid tulemusi tõlgendatakse järgmiselt:

1. β-laktaamide manulust saab kinnitada katse kordamisega, lisades katsesüsteemile penitsillinaasi ([2]):

   *negatiivne tulemus*: inhibeeriv aine on β-laktaam-antibiootikum;

   *positiivne tulemus jääb kehtima*: inhibeerivat ainet ei ole võimalik selle meetodiga tuvastada, jätkata punktiga 2;

2. sulfoonamiidide manulust saab kinnitada, korrates katset katsesüsteemile *p*-aminobensoehappe lisamisega:

   *negatiivne tulemus*: inhibeeriv aine on sulfoonamiid;

   *positiivne tulemus jääb kehtima*: inhibeerivat ainet ei ole võimalik selle meetodiga tuvastada, jätkata punktiga 3;

3. β-laktaami ja sulfoonamiidi kombinatsiooni manulust saab kinnitada katse kordamisega, lisades katsesüsteemile penitsilliini ja *p*-aminobensoehapet:

   *negatiivne tulemus*: inhibeerivad ained on β-laktaam-antibiootikum ja sulfoonamiid;

   *positiivne tulemus*: inhibeerivat ainet ei ole võimalik selle meetodiga tuvastada.

([1]) Oluline teave: lõssipulbri analüüsimisel võib saada valepositiivseid tulemusi. Seetõttu on vaja kontrollida, ega kasutatud katsesüsteem ei anna valepositiivseid tulemusi.

([2]) Teatavad β-laktaamid on vähem tundlikud β-laktamaasi suhtes. Sellise juhtumi puhul soovitatakse proovi täiendavat eeltöötlemist (1 ml uuritavat proovi koos 0,3 ml penitsillinaasi kontsentraadiga temperatuuril 37 °C kaks tundi).

▼B

*XVI LISA*

**(Artikkel 12)**

**SEGASÖÖDA LÕSSIPULBRISISALDUSE KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE PARAKASEIINI ENSÜMAATILISE KOAGULATSIOONI ABIL**

1. EESMÄRK

Segasööda lõssipulbrisisalduse kvantitatiivne määramine parakaseiini ensümaatilise koagulatsiooni abil.

2. KOHALDAMISALA

Kõnealust meetodit kohaldatakse segasööda suhtes, mis sisaldab vähemalt 10 % lõssipulbrit; petipiima ja/või teatavate mittepiimavalkude suured kogused võivad määramist segada.

3. MEETODI PÕHIMÕTE

3.1. Segasöödas sisalduva kaseiini ekstraheerimine naatriumtsitraadilahuse abil.

3.2. Kaltsiumioonide sisalduse reguleerimine parakaseiini sadestamiseks nõutavale tasemele laabi lisamisega.

3.3. Parakaseiini sademe lämmastikusisaldus määratakse standardis ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001 kirjeldatud Kjeldahli meetodiga; lõssipulbri kogus arvutatakse kaseiini minimaalselt 27,5protsendilise sisalduse põhjal (vaata punkt 8.1).

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett. Reaktiivid ja lahused, välja arvatud laap(4,5), ei tohi sisaldada lämmastikuühendeid.

4.1. Trinaatriumtsitraatdihüdraat (ühemassi-/mahuprotsendiline lahus)

4.2. Kaltsiumkloriid (umbes 5 M lahus)

Lahustada 100 ml destilleeritud vees loksutamisega 75 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (ettevaatust, reaktsioon on eksotermiline). Lahus jätta järgmise päevani seisma ning seejärel filtrida. Lahust säilitatakse külmikus.

4.3. 0,1 N naatriumhüdroksiid.

4.4. 0,1 N soolhape.

4.5. Vedel vasikalaap (sisaldab umbes 100 IMCU/ml vastavalt ISO standardile 11815IDF 157). Säilitada külmikus temperatuuril 4–6 °C.

4.6. Reaktiivid lämmastikusisalduse kvantitatiivseks määramiseks Kjeldahli meetodil vastavalt standardile ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001.

5. SEADMED

Tavalised laboriseadmed, sealhulgas:

5.1. uhmer või homogenisaator;

5.2. analüütilised kaalud, mõõtetäpsus 1 mg, jaotise väärtus 0,1 mg;

5.3. 50 ml topsidega ja 2 000 g lauatsentrifuug (500 g või 2 000–3 000 pööret minutis);

5.4. 10–15 mm pikkuste magnetpulkadega magnetsegaja;

5.5. 150–200 ml keeduklaasid;

5.6. 250 ja 500 ml kolvid;

▼B

5.7. 60–80 mm läbimõõduga klaaslehtrid;

5.8. 150 mm läbimõõduga tuhavabad kiirfiltrid (Whatman nr 41 või samaväärsed);

5.9. mitmesuguse nimimahuga pipetid;

5.10. termostateeritud vesivann, mis on reguleeritud temperatuurile 37 ± 1 °C;

5.11. pH-meeter, täpsusega kuni 0,1 pH ühikut;

5.12. termomeetrid, täpsusega kuni 1 °C.

6. MÄÄRAMISE KÄIK

6.1. **Uuritava proovi ettevalmistamine.**

Homogeense segu saamiseks jahvatada uhmris või homogeniseerida veskis 10–20 g proovi.

6.2. **Lõssipulbri lahustamine ja lahustumatu jäägi eraldamine**

6.2.1. Kaaluda 1,000 ± 0,002 g hästi homogeniseeritud segasööta(6,1) otse 50 ml tsentrifuugitopsi. Lisada 30 ml eelnevalt temperatuurini 45 ± 2 °C soojendatud trinaatriumtsitraadi lahust(4,1). Segada magnetsegajaga või tugevasti käes raputades vähemalt 5 minutit.

6.2.2. Tsentrifuugida 500 g juures ( 2 000–3 000 pööret minutis) 10 minutit ja kallata läbipaistev supernatant 150–200 ml keeduklaasi, jälgides, et põhjast ei tuleks kaasa sadet.

6.2.3. Jääki ekstraheerida veel kaks korda samal viisil ja ühendada saadud ekstraktid esimesega.

6.2.4. Kui pinnale moodustub õlikiht, jahutada külmikus, kuni rasv on tahkunud, ning eemaldada see spaatliga.

6.3. **Kaseiini koaguleerimine laabiensüümide abil**

6.3.1. Saadud vesilahusele (umbes 100 ml) lisada pidevalt segades tilkhaaval 2 ml kaltsiumkloriidi(4,2). Reguleerida NaOH(4,3) ja HCl(4,4) lahustega pH vahemikku 6,4–6,5. Lahus asetada 15–20 minutiks 37 ± 1 °C juures termostateeritud vesivanni soolade tasakaalu saabumiseni. Sellest annab märku lahuse kerge hägustumine.

6.3.2. Vedelik kanda ühte tsentrifuugitopsi ja tsentrifuugida 2 000 g juures 10 minutit, et eemaldada sadestunud materjal. Supernatant viia teise tsentrifuugitopsi ilma sadet pesemata.

6.3.3. Supernatandi temperatuur reguleerida temperatuurile 37 ± 1 °C. Ekstrakti segades lisada tilkhaaval 0,5 ml vedelat laapi(4,5). Koagulatsioon toimub 2 minuti jooksul.

6.3.4. Asetada proov uuesti vesivanni ja jätta 15 minutiks seisma temperatuuril 37 ± 1 °C. Võtta proov vannist välja ning lõhkuda kalgend segamise teel. Tsentrifuugida 10 minutit 2 000 g juures. Supernatant filtrida läbi sobiva paberfiltri(5,8) ning filter säilitada. Pesta sadet, segades seda tsentrifuugitopsis 50 ml veega temperatuuril umbes 35 °C.

Tsentrifuugida 10 minutit 2 000 g juures. Supernatant filtrida läbi varem kasutatud paberfiltri.

6.4. **Kaseiinis sisalduva lämmastiku määramine**

6.4.1. Kanda sade pärast pesemist kvantitatiivselt destilleeritud veega varem kasutatud (punkt 6.3.4) paberfiltrile. Kuivatatud paberfilter paigutada Kjeldahli kolbi. Määrata lämmastik Kjeldahli meetodil standardi ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001 kohaselt.

▼B

7. PIMEKATSE

7.1. Korrapäraselt on vaja teha mineraliseerimise pimekatset vastavalt standardis ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001 kirjeldatud Kjeldahli meetodile. Tuhavaba filterpaber(5,8) niisutatakse 90 ml(4,1) naatriumtsitraadi lahusega, 2 ml kaltsiumkloriidi lahusega(4,2), 0,5 ml vedela laabi(4,5) seguga ja pestakse 3 × 15 ml destilleeritud veega.

7.2. Pimekatsel kulunud happe maht tuleb lahutada proovi tiitrimisel kulunud happe(4,4) mahust.

8. TULEMUSTE ESITAMINE

8.1. Segasöödas sisalduva lõssipulbri (SMP) protsent arvutatakse järgmise valemi abil:

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

kus:

N on parakaseiini lämmastiku protsendiline sisaldus;

27,5 on konstant, mille abil arvutatakse kindlaks määratud kaseiinisisaldus ümber lõssipulbri protsendiks;

2,81 ja 0,908 on regressioonanalüüsiga saadud parandustegurid.

9. MEETODI TÄPSUS

9.1. **Korratavus**

Vähemalt 95 % uuritud juhtudest ei tohi ühe ja sama töötaja poolt ühes ja samas laboris ühe ja sama proovi analüüsitulemuste erinevus olla suurem kui 2,3 grammi lõssipulbrit 100 grammi segasööda kohta.

9.2. **Reprodutseeritavus**

Vähemalt 95 % uuritud juhtudest ei tohi kahes laboris ühe ja sama proovi analüüsi tulemuste erinevus olla suurem kui 6,5 grammi lõssipulbrit 100 grammi segasööda kohta.

10. MÄRKUSED

10.1. Teatavate mittepiimavalkude, eriti sojavalkude suure koguse lisamine lõssipulbrile, kui neid kuumutatakse koos lõssipulbriga, võib anda liiga kõrge protsendi, mis on tingitud nende sadestumisest koos piimas sisalduva parakaseiiniga.

10.2. Petipiima lisamine võib anda mõnevõrra madalama protsendi, mis on tingitud sellest, et määratakse ainult rasvavaba osa. Teatava hapukoorepeti lisamine võib anda oluliselt madalama protsendi, sest lahustumine tsitraadilahuses ei ole täielik.

10.3. 0,5 % või suurema koguse letsitiini lisamine võib samuti protsenti vähendada.

10.4. Kõrgkuumutatud lõssipulbri lisamine võib anda liiga kõrge protsendi, mis on tingitud teatavate vadakuvalkude sadestumisest koos piimas sisalduva parakaseiiniga.

▼B

*XVII LISA*

**(Artikkel 13)**

**TÄRKLISE TUVASTAMINE LÕSSIPULBRIS, DENATUREERITUD PIIMAPULBRIS JA SEGASÖÖTADES**

1. KOHALDAMISALA

Kõnealust meetodit kasutatakse selle tärklise avastamiseks, mida kasutatakse märgistusainena denatureeritud piimapulbris.

Meetodi avastamispiir on ligikaudu 0,05 g tärklist 100 grammi proovi kohta.

2. PÕHIMÕTE

Reaktsioon põhineb jodomeetrias kasutataval reaktsioonil:

— vesilahuses olevad kolloidid seovad vaba joodi;

— tärklise mitsellid seovad joodi ning tekib värvus.

3. REAKTIIVID

3.1. Joodilahus:

— jood: 1,0 g;

— kaaliumjodiid: 2,0 g;

— destilleeritud vesi: 100 ml.

— Lahustada 100 ml ühe märgiga mõõtekolvis vees 1,0 g joodi ja 2,0 g kaaliumjodiidi. Lahjendada veega 100 ml märgini ja segada.

4. SEADMED

4.1. Analüütilised kaalud.

4.2. Keev vesivann.

4.3. Katseklaasid 25 mm × 200 mm.

5. MÄÄRAMISE KÄIK

Kaaluda 1,0 grammi proovi 0,1 g täpsusega ja viia kaalutis üle katseklaasi (4,3).

Lisada 20 ml destilleeritud vett ja loksutada, et proov jaotuks ühtlaselt.

Seejärel asetada 5 minutiks keeva veega vesivanni (4,2).

Eemaldada vannist ning jahutada toatemperatuurini.

Lisada 0,5 ml joodilahust (3,1), loksutada ning jälgida värvuse tekkimist.

6. TULEMUSTE ESITAMINE

Siniseks värvumine näitab loodusliku tärklise esinemist proovis.

Kui proov sisaldab modifitseeritud tärklist, ei pea värvus olema sinine.

7. MÄRKUSED

Värvus, selle intensiivsus ning tärklise mikrostruktuur erinevad olenevalt loodusliku tärklise päritolust (nt mais või kartul) ning proovis esineva modifitseeritud tärklise liigist.

Modifitseeritud tärklise esinemisel proovis võib lahus värvuda violetseks, punaseks või pruuniks vastavalt loodusliku tärklise kristallistruktuuri modifitseerimise astmele.

▼B

*XVIII LISA*

**(Artikkel 14)**

**KOOREPULBRI NIISKUSESISALDUSE MÄÄRAMINE**

1. KOHALDAMISALA

Käesolevas lisas on kirjeldatud koorepulbri niiskusesisalduse määramise meetodit.

2. MÕISTED JA MÄÄRATLUSED

Käesolevas lisas kasutatakse järgmist määratlust:

niiskusesisaldus on massi kaotus, mis määratakse kindlaks käesolevas rahvusvahelises standardis kirjeldatud meetodi abil.

Seda väljendatakse massiprotsendina.

3. PÕHIMÕTE

Uuritava proovi kuivatamine temperatuuril 102 ±2 °C konstantse massini ja kaalumine massikao kindlaksmääramiseks.

4. SEADMED

Tavalised laboriseadmed, eeskätt järgmised:

4.1. analüütilised kaalud, mõõtetäpsus 1 mg, jaotise väärtus 0,1 mg;

4.2. kuivatuskapp, hästi ventileeritud, võimaldab hoida temperatuuri 102 ± 2 °C kogu tööala ulatuses;

4.3. eksikaator, milles on hiljuti kuivatatud silikageel hügroskoopsuse indikaatoriga või muu tõhus kuivatusaine;

4.4. lamedapõhjalised anumad sügavusega umbes 25 mm, mille läbimõõt on umbes 50 mm ja mis on valmistatud sobivast materjalist (nt klaasist, roostevabast terasest, niklist või alumiiniumist) ning millel on tihedalt sulguvad kergesti eemaldatavad kaaned;

4.5. tihedalt suletavate korkidega pudelid laboriproovide segamiseks.

5. PROOVI VÕTMINE

On oluline, et labor saaks proovi, mis on tõeliselt esindav ja mida transportimine ega laos hoidmine ei ole kahjustanud ega muutnud.

Kõnealuses rahvusvahelises standardis ei täpsustata proovi võtmist. Soovitatav proovivõtmise meetod on esitatud standardis ISO 707IDF 50.

Hoida proovi tingimustes, mis välistavad selle riknemise või koostise muutumise.

6. UURITAVA PROOVI ETTEVALMISTAMINE

Segada uuritav proov korralikult läbi raputamise ja anuma ümberpööramisega (vajaduse korral võib selleks paigutada kõik uuritavad proovid piisava mahuga hermeetiliselt suletavasse konteinerisse).

Kui see meetod ei taga täielikku homogeensust, võtta katsekogused (kahe üksikmääramise jaoks) kahest teineteisest võimalikult kaugel asuvast ettevalmistatud proovi punktist.

7. MÄÄRAMISE KÄIK

7.1. **Anuma ettevalmistamine**

7.1.1. Soojendada avatud anumat ja selle kaant(4,4) vähemalt üks tund kuivatuskapis(4,2), mis on reguleeritud temperatuurile 102± 2 °C.

7.1.2. Katta anum kaanega, tõsta suletult eksikaatorisse(4,3), lasta jahtuda kaaluruumi temperatuurini ja kaaluda 1 mg täpsusega, märkides näidu üles 0,1 mg täpsusega.

▼B

7.2. **Katsekogus**

Panna umbes 1–3 g ettevalmistatud proovi (6) anumasse, katta kaanega ja kaaluda 1 mg täpsusega, märkides näidu üles 0,1 mg täpsusega.

7.3. **Määramine**

7.3.1. Eemaldada anumalt kaas ning asetada anum koos kaanega 2 tunniks kuivatuskappi(4,2), mis on reguleeritud temperatuurile 102 ± 2 °C.

7.3.2. Katta anum kaanega, tõsta suletud anum eksikaatorisse, lasta jahtuda kaaluruumi temperatuurini ja kaaluda 0,1 mg täpsusega, märkides näidu üles 1 mg täpsusega.

7.3.3. Eemaldada anumalt kaas ning kuumutada anumat koos kaanega kuivatuskapis 1 tund. Seejärel korrata punktis 7.3.2 kirjeldatud tegevust.

7.3.4. Korrata kuumutamist ja kaalumist seni, kuni mass väheneb 1 mg võrra või vähem või suureneb kahe järjestikuse kaalumise vahel.

Arvutamisel kasutada kõige väiksemat määratud massi väärtust.

8. TULEMUSTE ARVUTAMINE JA ESITAMINE

8.1. **Arvutamine**

Niiskusesisaldus, väljendatud grammides 100 g kohta, on võrdne järgmisega:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

kus:

$m_0$ = anuma ja kaane (7.1.2) mass grammides;

$m_1$ = anuma, kaane ja uuritava proovi mass grammides enne kuivatamist(7,2);

$m_2$ = anuma, kaane ja uuritava proovi mass grammides pärast kuivatamist (7.3.4).

Tulemus esitatakse kahe kümnendkoha täpsusega.

9. TÄPSUS

*Märkus.* Korratavuse ja reprodutseeritavuse väärtused on saadud laboritevahelisest katsest (vt Steiger, G., IDFi bülletään nr 285/1993, lk 21–28), mille läbiviimisel järgiti standardit IDF 135B:1991 Piim ja piimatooted — Analüütiliste meetodite täpsusnäitajad — Ühisuuringu läbiviimise kirjeldus.

9.1. **Korratavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud lühikese ajavahemiku jooksul sama meetodiga, identse katsematerjaliga, samas laboris, sama katse läbiviija poolt, samu katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi olla rohkem kui 5 % juhtudest suurem kui 0,20 g niiskust 100 g toote kohta.

9.2. **Reprodutseeritavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud sama meetodiga, identse katsematerjaliga, eri laborites, erinevate katse läbiviijate poolt, erinevaid katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi olla rohkem kui 5 % juhtudest suurem kui 0,40 g niiskust 100 g toote kohta.

10. KATSEPROTOKOLL

Katseprotokollis esitatakse:

— proovi täielikuks tuvastamiseks vajalik teave;

— kasutatud proovivõtmismeetod, kui see on teada;

— kasutatud katsemeetod koos viitega käesolevale rahvusvahelisele standardile;

▼B

— kõik töö üksikasjad, mida ei ole nimetatud käesolevas rahvusvahelises standardis või mis on valikulised, samuti üksikasjad katsetulemust (-tulemusi) mõjutada võinud vahejuhtumite kohta;

saadud katsetulemus (-tulemused) ja kui on kontrollitud korratavust, siis ka lõpptulemus.

▼B

*XIX LISA*

**(Artikkel 15)**

**HAPUKOOREPETIPULBRI NIISKUSESISALDUSE MÄÄRAMINE**

1. KOHALDAMISALA

Loomasöödaks ette nähtud hapukoorepetipulbri niiskusesisalduse määramine.

2. PÕHIMÕTE

Proov kuivatatakse vaakumis. Massi kadu määratakse kaalumisega.

3. SEADMED

3.1. Analüütilised kaalud, mõõtetäpsus 1 mg, jaotise väärtus 0,1 mg.

3.2. Õhukindlalt suletava kaanega klaasist või roostevabast metallist anumad põhjaga, millele saab analüüsitavat proovi laotada tihedusega 0,3 g/cm$^2$.

3.3. Reguleeritav elektriline vaakumkuivatuskapp õlipumba ja seadmega, mille abil saab kappi juhtida kuuma õhku, mis on kuivatatud tornis, mis on täidetud näiteks niiskuse indikaatorit sisaldava kaltsiumoksiidi või kaltsiumsulfaadiga.

3.4. Tõhusat kuivatusainet sisaldav eksikaator.

3.5. Ventileeritav ja termostateeritud kuivatuskapp, reguleeritud temperatuurile 102 ± 2 °C.

4. MÄÄRAMISE KÄIK

Kuumutada kaanega anumat (3.2) kuivatuskapis (3.5) vähemalt üks tund. Katta anum kaanega ja asetada kohe eksikaatorisse (3.4), lasta jahtuda toatemperatuurini ja kaaluda 1 mg täpsusega, märkides näidu üles 0,1 mg täpsusega.

Võtta anumalt kaas, panna anumasse umbes 5g proovi ning kaaluda 1 mg täpsusega, märkides massi üles 0,1 mg täpsusega. Anum koos kaanega panna eelnevalt temperatuurile 83 °C soojendatud vaakumkuivatuskappi (3.3). Asetada anum kuivatuskappi võimalikult kiiresti, et vältida kuivatuskapi jahtumist.

Tõsta rõhk 100 torrini (13,3 kPa) ja jätta samal rõhul kuuma kuiva õhu voolus kuivama püsiva kaalu saamiseni (umbes 4 tundi).

Kuivamisaega arvutada ajahetkest, mil kuivatuskapp saavutab temperatuuri 83 °C. Langetada rõhk kuivatuskapis ettevaatlikult atmosfäärirõhuni. Avada kuivatuskapp, panna anumale kohe kaas peale, võtta anum kuivatuskapist välja, lasta jahtuda 30–45 minutit eksikaatoris (3.4) ja kaaluda 1 mg täpsusega, märkides näidu üles 0,1 mg täpsusega. Kuivatada veel 30 minutit vaakumkuivatuskapis (3.3) temperatuuril 83 °C ning kaaluda uuesti. Korrata kuumutamist ja kaalumist, kuni kahe üksteisele järgneva kaalumise vahel kaanega anuma kaal väheneb 1 mg võrra või vähem või suureneb. Arvutamisel kasutada kõige väiksemat määratud massi väärtust.

5. ARVUTAMINE

% niiskus = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %,

kus:

$m_0$ on anuma ja selle kaane mass;

$m_1$ on anuma, kaane ja uuritava proovi mass grammides enne kuivatamist;

$m_2$ on anuma, kaane ja uuritava proovi mass grammides pärast kuivatamist.

Tulemus märgitakse üles 0,1 g täpsusega 100 g kohta.

▼B

6. TÄPSUS

6.1. **Korratavuse piirnorm**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud lühikese ajavahemiku jooksul sama meetodiga, identse katsematerjaliga, samas laboris, sama katse läbiviija poolt, samu katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi olla rohkem kui 5 % juhtudest suurem kui 0,4 g vett 100 g hapukoorepetipulbri kohta.

6.2. **Reprodutseeritavuse piirnorm**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud sama meetodiga, identse katsematerjaliga, eri laborites, erinevate katse läbiviijate poolt, erinevaid katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei tohi olla rohkem kui 5 % juhtudest suurem kui 0,6 g vett 100 g hapupiimapetipulbri kohta.

6.3. **Täpsust iseloomustavate andmete päritolu**

Täpsusandmed on kindlaks määratud 1995. aastal kaheksas laboris 12 prooviga läbi viidud katsete põhjal (6 kahekordset pimekatset).

▼B

*XX LISA*

**(Artikkel 16)**

**STANDARDMEETOD PIIMARASVA PUHTUSE MÄÄRAMISEKS TRIGLÜTSERIIDIDE GAASKROMATOGRAAFIA ABIL — VERSIOON 2**

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesoleva standardiga kehtestatakse standardmeetod piimarasva puhtuse määramiseks triglütseriidide gaaskromatograafilise analüüsi abil. Sellega saab avastada nii loomseid kui ka taimseid rasvu, näiteks looma- ja searasva.

Teatavaid triglütseriidivalemeid kasutades kontrollitakse piimarasvade koostise rikkumatust. Seda meetodit kohaldatakse peamiselt lahtise lehmapiima ja sellest valmistatud toodete suhtes olenemata söötmis- ja laktatsioonitingimustest ja tõust. Üksnes puhta taimeõli (nt rapsiseemneõli) ebatavaliselt rohke söötmine võib põhjustada valepositiivsete vastuste saamist. Üksiklehmade piimast valmistatud piimatooted võivad samuti anda valepositiivseid tulemusi.

Meetodit kohaldatakse eeskätt rasva suhtes, mis on ekstraheeritud sellistest piimatoodetest nagu või, koor, piim ja piimapulber, mille kohta võib eeldada, et need sisaldavad puhast muutmata koostisega piimarasva. Piimarasva tehnoloogiline töötlemine (nt kolesterooli eemaldamine või fraktsioneerimine) võib anda valepositiivseid tulemusi. See kehtib ka lõssist või petipiimast saadud piimarasva kohta. Meetodit ei saa alati kohaldada juustust ekstraheeritud rasva suhtes, sest laagerdusprotsess võib mõjutada rasva koostist nii tugevasti, et saadakse valepositiivne tulemus.

*Märkus 1.* Võihape (*n*-butaanhape ($C_4$)) esineb üksnes piimarasvas ja võimaldab kvantitatiivselt hinnata väikseid ja keskmisi piimarasvakoguseid taimsetes ja loomsetes rasvades. Kuid siiski on $C_4$ suure varieeruvuse tõttu umbes 3,1 ja 3,8 massiprotsendi vahemikus selle järgi keeruline kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt kindlaks teha kuni 20 massiprotsendi sisaldusega võõraid rasvu puhtas piimarasvas[1].

*Märkus 2.* Taimerasvade steroolide sisalduse põhjal ei ole praktiliselt võimalik saada kvantitatiivseid tulemusi, sest need muutuvad olenevalt tootmis- ja töötlemistingimustest. Võõraste rasvade kvalitatiivne määramine steroolide abil on veelgi ebakindlam.

2. MÄÄRATLUS

Piimarasva puhtus: käesolevas standardis määratletud meetodi abil kindlaks tehtavate taimsete ja loomsete rasvade puudumine.

*Märkus:* Puhtuse määramisel kasutatakse *S*-väärtusi, mis arvutatakse välja triglütseriidide sisalduse põhjal. Triglütseriidi massiosi väljendatakse protsendina.

3. MEETODI PÕHIMÕTE

Piimast ja piimatoodetest eraldatud piimarasva analüüsitakse gaasikromatograafiliselt, kasutades täidisega kolonni või lühikest kapillaarkolonni, et määrata triglütseriide, mis erinevad üksteisest molekulis olevate süsinikuaatomite üldarvu poolest. *S*-väärtuste arvutamiseks sisestatakse vastavatesse triglütseriidivalemitesse eri suurusega rasvamolekulide ($C_{24}$–$C_{54}$, kus C arvud on üksnes paarisarvulised) massiprotsendid. Kui saadud *S*-väärtused ületavad puhtale piimarasvale ette nähtud piirnormi, loetakse võõra rasva lisand tuvastatuks.

▼B

*Märkus 1.* Täidisega ja kapillaarkolonnide sobivust ja samaväärsust on tõestatud juba varem [2–4].

*Märkus 2. S*-väärtus on vastavate määratud teguritega korrutatud triglütseriidide massiosade summa.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad.

4.1. Kandegaas (lämmastik, heelium või vesinik) peab olema vähemalt 99,995 % puhtusastmega.

4.2. Rasvastandardid piimarasvastandardi standardimiseks vastavalt punktile 7.3.3.

4.2.1. Küllastatud **triglütseriidi standardid**, sobivad tooted on kaubanduslikult kättesaadavad.

4.2.2. Kolesterooli standard.

4.3. Metanool ($CH_3OH$), veevaba.

4.4. *n*-heksaan ($CH_3(CH_2)4CH_3$).

4.5. *n*-heptaan ($CH_3(CH_2)5CH_3$).

4.6. Muud gaasid, vesinik, puhtusaste vähemalt 99,995 %, vaba orgaanilistest lisanditest ($C_nH_m$ < 1 µl/l); sünteetiline õhk, vaba orgaanilistest lisanditest ($C_nH_m$ < 1 µl/l).

4.7. Veevaba naatriumsulfaat ($Na_2SO_4$).

5. SEADMED

Tavalised laboriseadmed, eeskätt järgmised.

5.1. **Kõrgtemperatuurigaasikromatograaf**

Kõrgtemperatuurigaasikromatograaf on kohandatud tööks vähemalt 400 °C juures ning varustatud leekionisatsioondetektoriga; injektori vaheseinad peavad suutma taluda kõrgeid temperatuure ja olema lekkekindlad. Kapillaargaasikromatograafias kasutatakse kolonnile paigaldatud injektorit. Kolonni ja vajaduse korral injektori ja/või detektori vahedetailide ühendamisel tuleb alati kasutada grafiittihendeid.

5.2. **Kromatograafia kolonn**

5.2.1. *Täidisega kolonn*

Kasutada klaaskolonni sisediameetriga 2 mm ja pikkusega 500 mm, mille statsionaarne faas on 125–150 µm (sõelaava 100–120) Gas ChromQ, millele on kantud 3 % OV-1 ([1]). Ettevalmistamist, silaanimist, täitmist ja täidetud kolonni tasakaalustamist on kirjeldatud A lisas.

Alternatiivina võib kasutada kapillaarkolonni (5.2.2).

5.2.2. *Kapillaarkolonn.*

Kasutada lühikest kapillaarkolonni, näiteks pikkusega 5 m, mille mittepolaarne statsionaarne faas talub temperatuuri kuni 400 °C või enam ([2]). Tasakaalustada kolonn, tehes 20 piimarasvalahuse analüüsi (7.2) 2–3 päeva jooksul punkti 7.3.4.2 seadistusi järgides. Pärast seda peaksid kalibreerimistegurid (7.3.3) olema 1 lähedal ja väiksemad kui 1,20.

*Märkus.* Muude mõõtmetega ja teistsuguse mittepolaarse kõrgtemperatuurikindla faasiga kolonne võib kasutada, kui nende tõhusus vastab käesolevale standardile. Vt ka 7.3.4.2.

([1]) Näitena kasutatud toode on kaubanduslikult kättesaadav. Siin esitatud teave on ette nähtud üksnes käesoleva rahvusvahelise standardi kasutajate abistamiseks ja seda ei saa pidada kõnesoleva toote soovitamiseks.

([2]) Näiteks on CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) kaubanduslikult kättesaadav ja sobiv toode. Siin esitatud teave on ette nähtud üksnes käesoleva rahvusvahelise standardi kasutajate abistamiseks ja seda ei saa pidada kõnesoleva toote soovitamiseks.

▼B

5.3. Silikageeliga täidetud Extrelut-kolonn, maht 1–3 ml, on vajalik üksnes piimarasva eraldamiseks vastavalt punktile 7.1.3.

5.4. Grafiittihendid, mis taluvad temperatuuri vähemalt 400 °C, kasutatakse gaasikromatograafiakolonni ning injektori ja/või detektori vahedetailide ühendamiseks.

5.5. Vesivann temperatuuri 50 ± 2 °C hoidmiseks.

5.6. Kuivatuskapp, mida saab kasutada temperatuuridel 50 ± 2 °C ja 100 ± 2 °C.

5.7. Mikropipett.

5.8. 5 ml gradueeritud pipett.

5.9. 50 ml ümarkolb.

5.10. 250 ml nominaalmahtuvusega Erlenmeyeri kolb.

5.11. Lehter.

5.12. Peenepooriline filterpaber.

5.13. Pöördauruti.

5.14. 1 ml nominaalmahuga ampullid, suletakse polütetrafluoroetüleenvoodriga alumiiniumist presskorgiga või keermestatud korgiga.

5.15. Sisestussüstal, mille kolb ei ulatu nõela tipuni (täidisega gaasikromatograafia kolonn).

*Märkus.* Sellised süstlad parandavad tulemuste korratavust.

5.16. Analüütilised kaalud, mõõtetäpsus 1 mg, jaotise väärtus 0,1 mg.

6. PROOVI VÕTMINE

Laborisse tuleb saata esinduslik proov. See ei tohi olla saanud kahjustada transportimisel ega laos hoidmisel.

Proovi võtmine ei ole käesolevas rahvusvahelises standardis määratletud meetodi osa. Soovitatav proovi võtmise meetod on esitatud standardis ISO 707IDF 50[5].

7. MÄÄRAMISE KÄIK

7.1. **Uuritavate proovide ettevalmistamine**

Uuritavate proovide ettevalmistamiseks kasutatakse ühte kolmest järgnevalt käsitletud piimarasvade ekstraheerimise meetodist.

7.1.1. *Piimarasvade eraldamine võist või võiõlist*

Sulatada 50–100 g uuritavat proovi temperatuuril 50 °C, kasutades selleks vesivanni (5.5) või kuivatuskappi (5.6). Panna 0,5–1,0 g naatriumsulfaati (4.7) kurdfilterpaberile (5.12). Eelsoojendada 250milliliitrine Erlenmeyeri kolb (5.10) ja lehter (5.11) koos sissepandud filterpaberiga kuivatuskapis (5.6) temperatuurini 50 °C. Hoides eelsoojendatud kolbi, lehtrit ja sissepandud filterseadet kuivatuskapis, filtrida sulatatud proovi rasvakiht. Tuleb jälgida, et filtraati ei satuks seerumit.

Ainult siis, kui proovi kogus on piiratud, võib kasutada väiksemat proovikogust, kohandades sellele vastavalt analüüsimeetodit. Väiksema proovikoguse kasutamine suurendab mitteesindava proovi saamise ohtu.

*Märkus 1.* Koorest saab võid vispeldamise ja saadud võiterade põhjaliku läbipesemise abil.

*Märkus 2.* Punkti 7.1.1 kohaselt saadud piimarasv on peaaegu fosfolipiidivaba.

▼B

7.1.2. *Ekstraheerimine Röse–Gottliebi gravimeetrilisel meetodil*

Uuritavast proovist eraldatakse rasv gravimeetrilise meetodi abil, mida on kirjeldatud järgmistes standardites: ISO 1211 IDF 001D, ISO 2450IDF 016C või ISO 7328IDF 116A.

*Märkus.* Kui saadud piimarasvas on fosfolipiide, saadakse umbes 0,1 % võrra suurenenud kolesteroolipiik. See mõjutab koos kolesterooliga 100 protsendile normitud triglütseriidide spektrit vaid tühisel määral.

7.1.3. *Piimast eraldamine silikageelkolonnide abil*

Lisada 1–3 ml Extrelut-kolonnile (5.3) mikropipetiga (5.7) 0,7 ml uuritavat proovi temperatuuril 20 °C. Lasta sellel silikageelis ligikaudu 5 minuti jooksul ühtlaselt jaotuda.

Valkude ja lipiidide komplekside denatureerimiseks kanda Extrelut-kolonni gradueeritud pipetiga (5.8) 1,5 ml metanooli (4.3). Seejärel ekstraheerida rasvafraktsioon uuritavast proovist 20 ml *n*-heksaani abil (4.4). Lisada *n*-heksaan aeglaselt väikeste portsjonite haaval. Väljavoolav lahusti koguda eelnevalt konstantse, teadaoleva kaaluni kuivatatud 50 ml ümarkolbi (5.9), mis on kaalutud 1 mg täpsusega, märkides massi üles 0,1 mg täpsusega.

Pärast ekstraheerimist lasta kolonn tühjaks nõrguda. Destilleerida lahustid eluaadist välja pöördkuivati abil (5.13) vesivannis temperatuuriga 40–50 °C. Pärast lahustite väljadestilleerimist kuivatada ümarkolb ja kaaluda selle sisu 1 mg täpsusega, märkides näidu üles 0,1 mg täpsusega. Määrata kindlaks rasvamassi saagis, lahutades saadud massist tühja ümarkolvi mass.

*Märkus.* Rasva eraldamine Gerberi, Weibull-Berntropi või Schmid-Bondzynski-Ratzlaffi meetodil või detergentide abil (BDI-meetod) ei sobi triglütseriidide analüüsimiseks, sest nende meetodite kasutamisel võivad rasvafaasi sattuda suuremad kogused mittetäielikult esterdunud glütseriide ja fosfolipiide. Järelikult on käesoleva rahvusvahelise standardi kohaldamine teatud toodete, eeskätt juustu suhtes piiratud.

7.2. **Proovilahuse valmistamine**

Gaasikromatograafilise analüüsi läbiviimiseks täidisega kolonnis valmistada ette viiemahuprotsendiline rasvalahus (saadud punkti 7.1 kohaselt) *n*-heksaanis (4.4) või *n*-heptaanis (4.5). Olenevalt kolonni mõõtmetest kasutada 1 % (suurem valendik, siseläbimõõt 0,53 mm) või madalamat kontsentratsiooni, kui kasutatakse kolonnile paigaldatud injektorit koos kapillaarkolonniga.

Kasutatava kolonni tüübile ja punktile 7.1.3 vastava rasva massi põhjal määratakse uuritavale proovimaterjalile kolbi lisatava lahusti kogus (4.4 või 4.5), mis kaalutakse 1 mg täpsusega, märkides massi üles 0,1 mg täpsusega. Jääk lahustatakse täielikult.

Ligikaudu 1 ml proovilahust suletakse ampulli (5.14).

7.3. **Triglütseriidide kromatograafiline määramine**

7.3.1. *Nulljoone triiv*

Nulljoone tõusu vältimiseks tuleb kolonn punkti 5.2.2 (kapillaarkolonn) või A.4 lisa (täidisega kolonn) kohaselt tasakaalustada.

*Märkus.* Kolonni kõrge temperatuuri tõttu tõuseb triglütseriidi analüüsil nulljoon eriti kiiresti kõrge süsinikuaatomite üldarvuga vahemikus.

7.3.2. *Sisestustehnika*

▼B

7.3.2.1. Täidisega kolonn

Et ära hoida diskriminatsiooniefekte ja saavutada kõrge keemistemperatuuriga triglütseriidkomponentide lahutamisel paremaid kvantitatiivseid tulemusi, tuleb kasutada kuumsisestuse meetodit. Tõmmata rasvalahus süstlasse ja täita süstlanõel õhuga. Nõel sisestatakse injektorisse. Soojendada nõela seal enne süstimist umbes 3 sek. Siis süstitakse kiiresti süstla sisu.

7.3.2.2. Kapillaarkolonn

Kui kasutatakse kolonnile paigaldatud injektorit külmsisestuse (7.3.4.2) meetodil, sisestada süstla nõel ja süstida kohe. Nõela aurustis olemise aeg peaks olema selline, et see ei mõjuta oluliselt lahustipiiki.

*Märkus.* Tavaliselt on optimaalne aurustis olemise aeg umbes 3 sekundit.

7.3.3. *Kalibreerimine*

7.3.3.1. Üldine teave

Uuritavate proovide kalibreerimiseks teha iga päeva alguses kaks kuni kolm standarditud piimarasva analüüsi. Standarditud piimarasva viimaseid analüüse kasutada kalibreerimistegurite, triglütseriidide ja kolesterooli $Rf_{si}$ (massiosa/pindalaosa) määramiseks ning kohaldada neid seejärel uuritavate proovide suhtes (vt 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1),$$

kus:

$w_{si}$ iga triglütseriidi või kolesterooli massiosa standarditud piimarasvas, väljendatud protsentides;

$A_{si}$ iga triglütseriidi või kolesterooli piigipindala arvväärtus standarditud piimarasvas.

Teadaoleva triglütseriidide sisaldusega standarditud piimarasva saamisel järgida kas punkti 7.3.3.2 või 7.3.3.3.

7.3.3.2. Kaubanduslikult kättesaadav piimarasvastandard

Uuritava proovi iga koostisosa kalibreerimisteguri määramiseks on kõige parem kasutada sertifitseeritud triglütseriidide sisaldusega standarditud piimarasva.

*Märkus.* Sobiv etalon on CRM 519 (veevaba piimarasv), mida saab Komisjoni Etalonainete ja Mõõtmiste Instituudist (IRMM) Geelist, Belgiast ([1]).

7.3.3.3. Laboratoorne piimarasvastandard

Suhteliselt piimarasvaga sarnaneva triglütseriidide sisalduse saamiseks valmistada umbes 1 g rasvastandardite segu (vt 4.2, kohustuslik on $C_{24}$, $C_{30}$, $C_{36}$, $C_{42}$, $C_{48}$ ja $C_{54}$ küllastatud triglütseriidide ning kolesterooli kasutamine; soovitav on kasutada ka $C_{50}$ ja $C_{52}$), mis kaalutakse 1 mg täpsusega, märkides näidu üles 0,1 mg täpsusega.

Rasvastandardite segu lahust *n*-heksaanis (4.4) või *n*-heptaanis (4.5) analüüsida korduvalt vastavalt punktile 7.3.4. Samas järjekorras analüüsida korduvalt tavapärase koostisega piimarasva.

Määrata rasvastandardite segu põhjal triglütseriidide kalibreerimistegurid. Segus mitteesindatud triglütseriidide vahepealsed kalibreerimistegurid on

([1]) Näitena kasutatud toode on kaubanduslikult kättesaadav. Siin esitatud teave on ette nähtud üksnes käesoleva rahvusvahelise standardi kasutajate abistamiseks ja seda ei saa pidada kõnesoleva toote soovitamiseks.

▼B

leitavad matemaatilise interpoleerimise teel. Standardkoostise määramiseks kohaldada saadud kalibreerimistegureid piimarasva suhtes. Sel viisil saadud standarditud piimarasv säilib lämmastiku atmosfääris maksimaalselt -18 °C juures mitu aastat.

7.3.4. *Kromatograafiatingimused*

*Märkus.* Joonisel 1 näidatud lahutuse saamiseks kasutada kas täidisega või kapillaarkolonne. Paarisarvuliste triglütseriidide lõhustumist tavaliselt ei esine ning seda tuleb vältida.

7.3.4.1. Täidisega kolonn

a) Temperatuurirežiim: reguleerida alguses ahi temperatuurile 210 °C. Hoida sel temperatuuril 1 minut. Siis tõsta temperatuuri 6 °C minutis, kuni saavutatakse temperatuur 350 °C. Hoida sellel (lõpp)-temperatuuril 5 minutit.

b) Detektori ja injektori temperatuur: mõlemad on reguleeritud temperatuurile 370 °C.

c) Kandegaas: kasutada lämmastikku püsiva voolukiirusega umbes 40 ml/min. Kandegaasi tegelik voolukiirus reguleerida selliselt, et $C_{54}$ elueerub 341 °C juures.

d) Analüüsi kestus: 29,3 min.

e) Sisestatav maht: süstida 0,5 µl viiemahuprotsendilist proovilahust.

Kui triglütseriide ei analüüsita, hoida kuivatuskapi algtemperatuur nagu punktis a, detektori ja injektori temperatuur vastavalt punktile b ja kandegaasi voolukiirus vastavalt punktile c püsivana ka öösel, nädalalõppudel ja pühade ajal. See tagab kolonni parima töö.

7.3.4.2. Kapillaarkolonn

a) Temperatuuri reguleerimine: reguleerida ahi alguses temperatuurile 80 °C. Seda temperatuuri hoida 0,5 minutit. Siis tõsta temperatuur kiirusega 50 °C minutis 190 °C juurde ja seejärel kiirusega 6 °C minutis 350 °C juurde. Hoida nimetatud (lõpp)temperatuuril 5 minutit.

b) Detektori temperatuur: hoida temperatuuril 370 °C.

c) Kandegaas: kasutada lämmastikku püsiva voolukiirusega umbes 3 ml/min.

d) Analüüsi kestus: 34,4 min.

e) Sisestatav maht: süstida 0,5 µl ühemahuprotsendilist proovilahust.

Parima tulemuse saavutamiseks hoida neid seadeid ka siis, kui kolonniga ei töötata (vt 7.3.4.1).

Punktis 7.3.4.2 kirjeldatud seadeid saab kasutada siis, kui analüüsimisel kasutatakse punktis 5.2.2 määratletud suurema valendikuga kolonni (siseläbimõõt 0,53 mm). Muude kolonni mõõtmete ja faaside puhul võib kasutada teisi analüüsitingimusi.

8. INTEGREERIMINE, MÄÄRAMINE JA MÄÄRAMISTINGIMUSTE KONTROLLIMINE

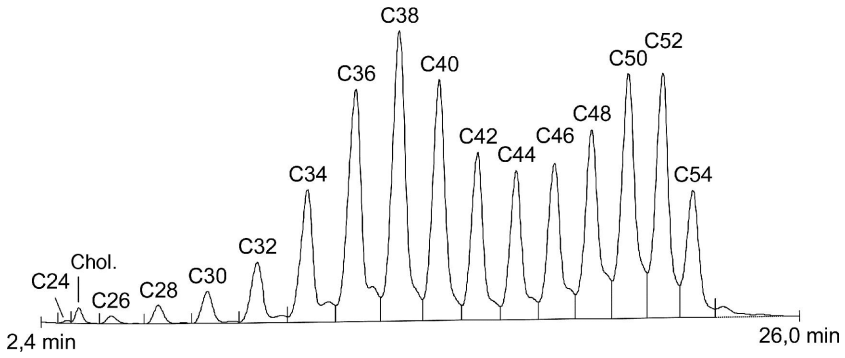
Kromatogrammi piike hinnatakse integreerimissüsteemiga, millega saab nulljoont tõmmata ja integreerimist korrata. Joonisel 1 on näidatud nõuetekohaselt integreeritud kromatogramm, joonisel 2 on aga näidatud juhuslik viga nulljoone lõpus pärast $C_{54}$, mis mõjutab kõikide triglütseriidide protsenti. Pärast $C_{54}$ elueeruvad piigid jäetakse hindamisest igal juhul välja.

Paarituarvulise atsüül-C arvuga ($2n$ + 1) triglütseriidid liidetakse eelneva paarisarvulise atsüül-C arvuga ($2n$) triglütseriididega. Väikest $C_{56}$ sisaldust ei võeta arvesse. Kromatogrammi muude triglütseriidide (sealhulgas kolesterooli) piigipindalade protsendid korrutatakse standarditud piimarasva vastavate kalibreerimisteguritega (viimasest kalibreerimisest) ja kõik koos normitakse 100 %le vastavalt punktile 9.1.

▼B

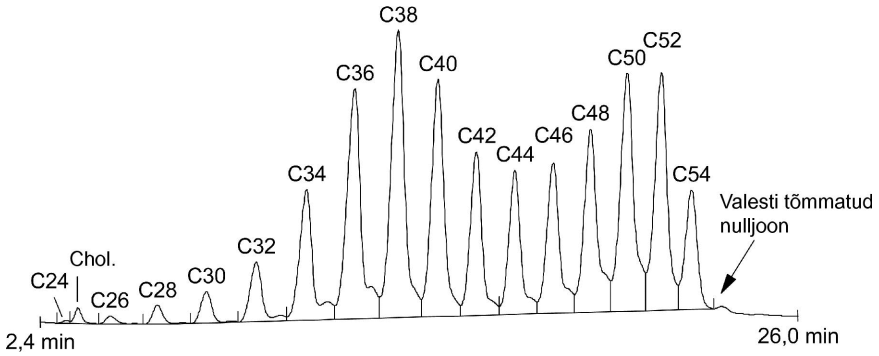
*Joonis 1*

**Näide piimarasva triglütseriidide kromatogrammi kohta, mille nulljoon on tõmmatud õigesti**




*Joonis 2*

**Näide piimarasva triglütseriidide kromatogrammi kohta, mille nulljoon on tõmmatud valesti**




Mõõtmistingimuste kontrollimiseks võrrelda variatsioonikordajaid (CV), mida väljendatakse tabelis 1 esitatud eri triglütseriidide protsendina, mis on välja arvutatud sama piimarasvaproovi 19 järjestikuse analüüsi põhjal.

Kui variatsioonikordajad on tabelis 1 esitatud väärtustest oluliselt suuremad, ei ole kromatograafilised tingimused sobivad.

*Märkus.* Tabelis 1 esitatud väärtused ei ole kohustuslikud, kuid on kvaliteedikontrolli otstarbel soovitatavad.

Juhul kui suuremad variatsioonikordaja väärtused on vastuvõetavad, tuleb siiski järgida punktis 10 esitatud korratavuse ja reprodutseeritavuse piirnorme.

*Tabel 1*

**Triglütseriidide sisalduse variatsioonikordajad (19 järjestikust analüüsi)**

| Triglütseriid | Variatsioonikordaja % |
|---|---|
| $C_{24}$ | 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 |

▼B

| Triglütseriid | Variatsioonikordaja % |
|---|---|
| $C_{40}$ | 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. Tulemuste arvutamine ja esitamine

9.1. **Triglütseriidide sisaldus**

9.1.1. *Arvutamine*

Arvutada iga triglütseriidi (kus $i$ = $C_{24}$, $C_{26}$, $C_{28}$, $C_{30}$, $C_{32}$, $C_{34}$, $C_{36}$, $C_{38}$, $C_{40}$, $C_{42}$, $C_{44}$, $C_{46}$, $C_{48}$, $C_{50}$, $C_{52}$ ja $C_{54}$) ning kolesterooli massiosa $w_i$ protsentides uuritava proovi triglütseriidide kogusisaldusest, kasutades järgmist võrrandit:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left( A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2),$$

kus:

$A_i$ iga triglütseriidi piigipindala arvväärtus uuritavas proovis;

$RF_{si}$ iga triglütseriidi kalibreerimisel määratud kalibreerimistegur (7.3.3).

9.1.2. *Katsetulemuste esitamine*

Tulemus esitada kahe kümnendkoha täpsusega.

9.2. ***S*-väärtused**

9.2.1. *Arvutamine*

9.2.1.1. Arvutada *S*-väärtused protsentides, sisestades asjakohase triglütseriidi protsendi põhjal välja arvutatud $w_i$ (9.1.1) valemitesse 3–7. Kasutada kõiki valemeid olenemata arvatava võõra rasva liigist.

9.2.1.2. Valem soja-, päevalille-, oliivi-, rapsiseemne-, linaseemne-, nisuidu-, maisiidu- ja puuvillaseemneõli ning kalarasva kindlakstegemiseks.

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Valem kookosrasva ja palmisäsiõli kindlakstegemiseks.

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Valem palmiõli ja loomarasva kindlakstegemiseks.

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Valem searasva kindlakstegemiseks.

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6. Universaalvalem.

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Katsetulemuste esitamine*

Tulemus esitada kahe kümnendkoha täpsusega.

9.3. **Võõraste rasvade tuvastamine**

Võrrelda punkti 9.1.2 kohaselt saadud *S*-väärtusi tabeli 2 vastavate *S*-piirnormidega.

Kui kõik viis *S*-väärtust jäävad tabelis 2 esitatud piirnormide piiridesse, võib uuritavat proovi pidada puhtaks piimarasvaks. Kui mõni *S*-väärtus jääb piirnormidest väljapoole, loetakse proov võõraid rasvu sisaldavaks.

Kuigi üksikvalemid 3–6 on teatavate võõraste rasvade suhtes tundlikumad kui universaalvalem 7 (vt tabel B.1), ei saa valemite 3–6 ühe positiivse tulemuse põhjal teha järeldusi lisatud võõra rasva liigi suhtes.

B lisas on kirjeldatud taimse või loomse rasva sisalduse arvutamist võltsitud piimarasvas. See meetod ei ole valideeritud ja on üksnes informatiivne.

*Tabel 2*

***Puhaste piimarasvade* S-*piirnormid***

| Võõras rasv | Valem | *S*-piirnormid [a] |
|---|---|---|
| Soja-, päevalille-, oliivi-, rapsiseemne-, linaseemne-, nisuidu-, maisiidu- ja puuvillaseemneõli ning kalarasv | (3) | 98,05–101,95 |
| Kookosrasv ja palmisäsiõli | (4) | 99,42–100,58 |
| Palmiõli ja veiserasv | (5) | 95,90–104,10 |
| Searasv | (6) | 97,96–102,04 |
| Universaalvalem | (7) | 95,68–104,32 |

[a] Välja arvutatud 99 % usaldustasemel; võõra rasva lisamist võib oletada üksnes siis, kui asjakohase valemi tõendamispiir on ületatud (vt tabel B.1).

10. TÄPSUS

10.1. **Laboritevaheline katse**

Korratavuse ja reprodutseeritavuse väärtuste määramiseks valemite 3–7 põhjal kasutatakse puhast piimarasva ja need ei pruugi olla kohaldatavad muude põhiainete puhul.

10.2. **Korratavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud lühikese ajavahemiku jooksul sama meetodiga, identse katsematerjaliga, samas laboris, sama katse läbiviija poolt, samu katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei ületa tabelis 3 loetletud piirnorme rohkem kui 5 % juhtudest.

▼B

*Tabel 3*

**Korratavuse piirnormid (r) valemite 3–7 jaoks**

| Võõras rasv | Valem | r % |
|---|---|---|
| Soja-, päevalille-, oliivi-, rapsiseemne-, linaseemne-, nisuidu-, maisiidu- ja puuvillaseemneõli ning kalarasv | (3) | 0,67 |
| Kookosrasv ja palmisäsiõli | (4) | 0,12 |
| Palmiõli ja veiserasv | (5) | 1,20 |
| Searasv | (6) | 0,58 |
| Universaalvalem | (7) | 1,49 |

10.3. **Reprodutseeritavus**

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (mis on tehtud sama meetodiga, identse katsematerjaliga, erinevates laborites, erinevate katse läbiviijate poolt, erinevaid katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel ei ületa tabelis 4 loetletud piirnorme rohkem kui 5 % juhtudest.

*Tabel 4*

**Reprodutseeritavuse piirnormid (R) valemite 3–7 jaoks**

| Võõras rasv | Valem | R% |
|---|---|---|
| Soja-, päevalille-, oliivi-, rapsiseemne-, linaseemne-, nisuidu-, maisiidu- ja puuvillaseemneõli ning kalarasv | (3) | 1,08 |
| Kookosrasv ja palmisäsiõli | (4) | 0,40 |
| Palmiõli ja veiserasv | (5) | 1,81 |
| Searasv | (6) | 0,60 |
| Universaalvalem | (7) | 2,07 |

11. MÕÕTEMÄÄRAMATUS

Korratavuse *r* ja reprodutseeritavuse *R* abil saab välja arvutada *S*-väärtuse laiendmääramatuse.

Laiendmääramatuse (põhineb paralleelproovide analüüsil) arvestamine tabelis 2 esitatud *S*-väärtustes annab laiendatud *S*-väärtused, mis on esitatud tabelis 5.

*Tabel 5*

**Puhaste piimarasvade laiendatud S-piirnormid, mis sisaldavad laiendmääramatust**

| Võõras rasv | Valem | Laiendatud *S*-piirnormid |
|---|---|---|
| Soja-, päevalille-, oliivi-, rapsiseemne-, linaseemne-, nisuidu-, maisiidu- ja puuvillaseemneõli ning kalarasv | (3) | 97,36–102,64 |
| Kookosrasv ja palmisäsiõli | (4) | 99,14–100,86 |
| Palmiõli ja veiserasv | (5) | 94,77–105,23 |
| Searasv | (6) | 97,65–102,35 |
| Universaalvalem | (7) | 94,42–105,58 |

▼B

12. KATSEPROTOKOLL

Aruannetes esitatakse:

— kogu proovi täielikuks määratlemiseks vajalik teave;

— kasutatud proovi võtmise meetod, kui see on teada;

— kasutatud katsemeetod koos viitega käesolevale rahvusvahelisele standardile;

— kõik töö üksikasjad, mida ei ole nimetatud käesolevas rahvusvahelises standardis või mis on valikulised, samuti üksikasjad katsetulemust (-tulemusi) mõjutada võinud vahejuhtumite kohta.

— saadud katsetulemus (-tulemused) ja kui on kontrollitud korratavust, siis ka lõpptulemus.

▼B

*A LISA*

**(normatiivne)**

**TÄIDISEGA KOLONNI ETTEVALMISTAMINE**

A.1 REAKTIIVID JA SEADMED

A.1.1 **Tolueen** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2 **Dimetüüldiklorosilaani** [$Si(CH_3)2Cl_2$] lahus.

Lahustada 50 ml dimetüüldiklorosilaani 283 ml tolueenis (A.1.1).

A.1.3 **Kakaovõi** lahus, viiemassiprotsendiline kakaovõi lahus *n*-heksaanis(4,4) või *n*-heptaanis(4,5).

A.1.4 **Statsionaarne faas**: 125–150 μm (sõelaava 100–120) Gas ChromQ, millele on kantud 3 % OV-1 ([1]).

*Märkus.* Terasuurus on teisendatud mikromeetritesse vastavalt BS 410-le (kõik osad)[6].

A.1.5 **Klaaskolonn**, sisediameeter 2 mm ja pikkus 500 mm, U-kujuline.

A.1.6 Täidisega kolonni **täitmisseade**.

A.1.6.1 **Täitmiskolonn** pealekeeratavate korkidega; kolonnil on statsionaarse faasi nõutavat taset näitav märk.

A.1.6.2 Keermestatud kaanega **peen sõel** (avad ligikaudu 100 μm) klaaskolonni sulgemiseks, nagu on näidatud joonisel A.3.

A.1.6.3 **Silaanitud klaasvill**, desaktiviseeritud.

A.1.6.4 **Vibraator** statsionaarse faasi ühtlaseks jaotamiseks kolonni täitmisel.

A.1.6.5 **Silaanimisseade**, kolonni klaasipinna silaanimiseks.

A.1.6.6 *Woulffi pudel.*

A.1.6.7 *Veejoapump.*

A.2 SILAANIMINE (KLAASIPINNA DESAKTIVEERIMINE).

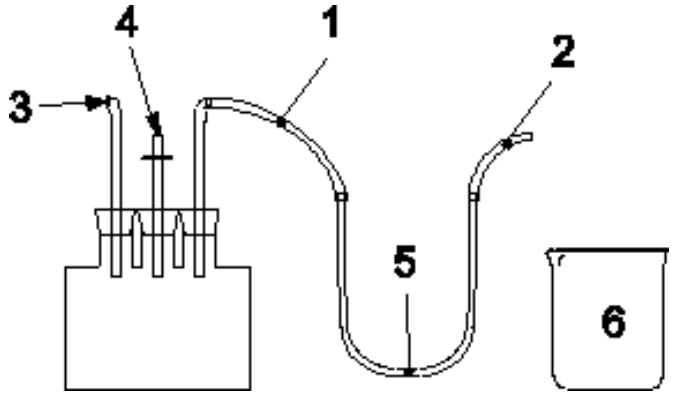
Pärast Woulffi pudeli (A.1.6.6) ühendamist veejoapumbaga (A.1.6.7) viia vooliku 2 (vt joonis A.1) ots dimetüüldiklorosilaani lahusesse (A.1.2). Korkkraani sulgemisel täitub kolonn (A.1.5) lahusega. Avada korkkraan uuesti ja eemaldada mõlemad voolikud. Kinnitada kolonn statiivi külge. Täita kolonn pipeti abil dimetüüldiklorosilaani lahusega (A.1.2) ääreni.

([1]) Näitena kasutatud toode on kaubanduslikult kättesaadav. Siin esitatud teave on ette nähtud üksnes käesoleva rahvusvahelise standardi kasutajate abistamiseks ja seda ei saa pidada soovituseks kasutada kõnesolevat toodet ISO või IDFi standardile vastavuse tagamiseks.

▼B

*Joonis A.1*

**Silaanimisseade**




**Selgitus**

1 voolik 1

2 voolik 2

3 veejoapump

4 korkkraan

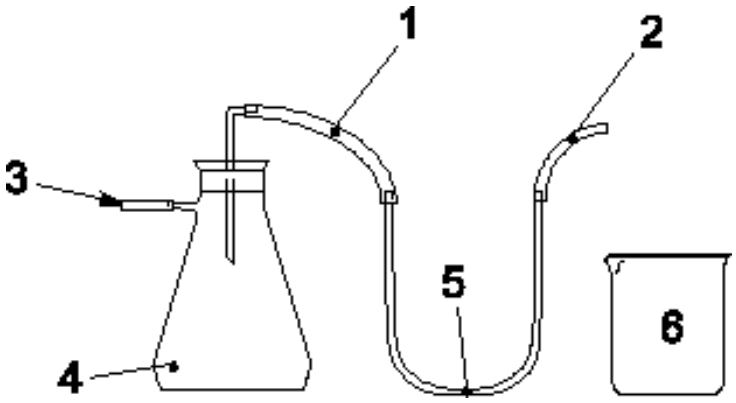
5 klaaskolonn

6 dimetüüldiklorosilaan ja tolueen

Lasta kolonnil 20–30 minutit seista. Seejärel asendada Woulffi pudel filtrimiskolviga. Kolonn tühjendada sellega ühendatud veejoapumba (A.1.6.7) abil (vt joonis A.2). Loputada tühjendatud kolonn, voolutades sellest läbi 75 ml tolueeni (A.1.1) ja 50 ml metanooli(4,3), pistes vooliku 2 otsa lahustisse. Loputatud kolonni kuivatada kuivatuskapis(5,6) temperatuuril 100 °C umbes 30 minutit.

*Joonis A.2*

**Loputusseade**




**Selgitus**

1 voolik 1

2 voolik 2

3 veejoapump

4 filtrimiskolb

5 klaaskolonn

6 loputusaine

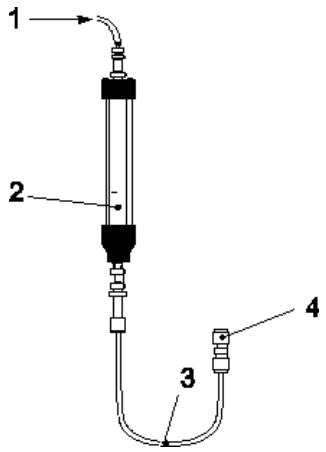
▼B

A.3 TÄITMINE

Täita kolonn joonisel A.3 oleva seadme abil. Statsionaarse faasi (A.1.4) sisseviimiseks täita täitmiskolonn (A.1.6.1) kuni märgini. Täidetava klaaskolonni alumisse otsa lükata umbes 1 cm pikkune tihe silaanitud klaasvatist tropp (A.1.6.3). Seejärel sulgeda kolonni ots peeneavalise sõelaga (A.1.6.2).

*Joonis A.3*

**Klaaskolonni täitmine**




**Selgitus**

1 lämmastiku sisestus

2 täitekolonn, mis peab olema täidetud OV-1ga kuni märgini

3 täidetav klaaskolonn

4 keermestatud kork filtriga, mille vastu surutakse klaaskiud ja statsionaarne faas

Täita kolonn rõhu all (300 kPa ja lämmastiku vool) statsionaarse faasiga. Ühtlase, pideva ja kõva täidise saamiseks liigutada vibraatorit täitmise ajal piki kolonni edasi-tagasi. Pärast täitmist suruda tihe silaanitud klaasvatist (A.1.6.3) tropp ka täidetud kolonni teise otsa. Väljaulatuvad otsad lõigata maha. Suruda tropp spaatliga mõne millimeetri võrra sissepoole.

A.4 TASAKAALUSTAMINE

Saastumise vältimiseks ei ühendata kolonni tagumist otsa detektoriga etappide a–c ajal. Täidetud kolonn (A.3) tasakaalustada järgmiselt:

a) voolutada kolonni 15 min lämmastikuga, voolutamiskiirus on 40 ml/min ja gaasikromatograafi ahi on reguleeritud temperatuurile 50 °C;

b) tõsta kolonni temperatuur kiirusega 1 °C minutis temperatuurile 355 °C, reguleerides lämmastiku voolukiiruse väärtusele 10 ml/min;

c) hoida kolonni temperatuuril 355 °C 12–15 tundi;

d) süstida kaks korda 1 µl kakaovõilahust (A.1.3), kasutades punktis 7.3.4.1 ette nähtud temperatuurirežiimi;

*Märkus.* Kakaovõi koosneb peaaegu täielikult kõrge keemistemperatuuriga triglütseriididest $C_{50}$–$C_{54}$, mis kergendab kolonni tasakaalustamist vastavate kalibreerimistegurite arvestamiseks.

▼B

e) süstida kolonni 20 korda 0,5 µl piimarasvalahust punkti7,2 kohaselt 2–3 päeva jooksul, kasutades täidisega kolonni seadeid, mis on esitatud punktis 7.3.4.1.

— Uuritavate proovide analüüsimiseks kasutada üksnes selliseid kolonne, mille kalibreerimistegurid on lähedased 1-le. Kalibreerimistegurid ei tohi olla kõrgemad kui 1,20.

▼B

*B LISA*

**(informatiivne)**

## VÕÕRA RASVA SISALDUSE KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE

### B.1 ÜLDINE TEAVE

Tabelis B.1 on esitatud erinevate võõraste rasvade avastamispiirid, arvutatuna usaldustasemel 99 %. Keskmine veerg näitab üksikvalemitest 3–6 parima avastamispiire.

Universaalvalemi 7 avastamispiirid on esitatud kõige parempoolsemas veerus ning need on mõnevõrra suuremad. Põhimõtteliselt on universaalvalemit 7 vaja üksnes võõraste rasvade kvantitatiivseks määramiseks.

Kõikide valemite abil on võimalik avastada ka erinevate võõraste rasvade kombinatsioone. Üht liiki võõra rasva triglütseriidide sisalduse varieerumisel üksikproovides ei ole olulist mõju avastamispiiridele.

Kui kasutatakse nii üksikvalemeid kui ka universaalvalemit, kohaldatakse üksikvalemite avastamispiire. Teatavatel juhtudel on kvantitatiivseks määramiseks vaja universaalvalemi *S*-väärtust (B.2).

*Tabel B.1*

**Piimarasvale lisatud võõra rasva protsent 99 % avastamispiiri puhul**

| Võõras rasv | Üksikvalem % | Universaalvalem % |
|---|---|---|
| Sojaõli | 2,1 | 4,4 |
| Päevalilleõli | 2,3 | 4,8 |
| Oliiviõli | 2,4 | 4,7 |
| Kookosrasv | 3,5 | 4,3 |
| Palmiõli | 4,4 | 4,7 |
| Palmisäsirasv | 4,6 | 5,9 |
| Rapsiseemneõli | 2,0 | 4,4 |
| Linaseemneõli | 2,0 | 4,0 |
| Nisuiduõli | 2,7 | 6,4 |
| Maisiiduõli | 2,2 | 4,5 |
| Puuvillaseemneõli | 3,3 | 4,4 |
| Searasv | 2,7 | 4,7 |
| Loomarasv | 5,2 | 5,4 |
| Hüdrogeenitud kalaõli | 5,4 | 6,1 |

### B.2 ARVUTAMINE

Võõra rasva kvantitatiivne määramine on vajalik üksnes siis, kui vähemalt üks *S*-piirnormidest (tabel 2 või tabel 5) on ületatud. Kvantitatiivse teabe saamiseks arvutada protsentides välja uuritava proovi võõra rasva massiosa või võõraste rasvade segu massiosa $w_f$, kasutades järgmist valemit:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(B. 1)}$$

▼B

kus:

$S$ tulemus, mis on saadud, kui ühte valemitest 3–7 on sisestatud triglütseriidiandmed piimarasva kohta, millele on lisatud võõrast rasva või võõraste rasvade segu;

$S_f$ konstant, mis oleneb lisatud võõra rasva liigist.

Kui piimarasvale lisatud võõra rasva liik ei ole teada, kasutatakse üldist $S_f$-väärtust 7,46 (tabel B.2). Valemiga 7 saadud $S$-väärtust kasutatakse alati, ka siis, kui selle valemi $S$-piirnormid ei ole ületatud, kuid mõne teise valemi piirnormid on ületatud.

Kui võõraste rasvade liik on teada, sisestatakse nende individuaalsed $S_f$-väärtused (tabel B.2) valemisse (B.1). Valemite 3–6 seast valitakse $S$-väärtuse arvutamiseks asjakohane võõra rasva valem.

*Tabel B.2*

**Erinevate võõraste rasvade $S_f$-väärtused**

| Võõras rasv | $S_f$ |
|---|---|
| Ei ole teada | 7,46 |
| Sojaõli | 8,18 |
| Päevalilleõli | 9,43 |
| Oliiviõli | 12,75 |
| Kookosrasv | 118,13 |
| Palmiõli | 7,55 |
| Palmisäsiõli | 112,32 |
| Rapsiseemneõli | 3,30 |
| Linaseemneõli | 4,44 |
| Nisuiduõli | 27,45 |
| Maisiiduõli | 9,29 |
| Puuvillaseemneõli | 41,18 |
| Searasv | 177,55 |
| Loomarasv | 17,56 |
| Kalaõli | 64,12 |

B.3 KATSETULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Tulemus esitatakse kahe kümnendkoha täpsusega.

**Kirjandus**

1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82–85

2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16–17

3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265–270

4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791–797

5) ISO 707IDF 50, Milk and milk products — Guidance on sampling

▼B

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, pp. 219–242

8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol*., 93, 1991, pp. 538–544

9) DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [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, pp. 505–510

▼B

*XXI LISA*

**(Artikkel 18)**

**MEETOD TOIMIMISEKS, KUI (KEEMILISE ANALÜÜSI) TULEMUSED VAIDLUSTATAKSE**

1. Käitleja nõudmisel tehakse asjakohast meetodit kasutades lisaanalüüs teises laboris, mis on pädeva asutuse poolt heaks kiidetud, kui on olemas toote pitseeritud kordusproovid ja need on pädevas asutuses asjakohaselt hoiul. Taotlus esitatakse seitsme päeva jooksul alates esimese analüüsi tulemuste teatamisest. Analüüs tehakse 21 päeva jooksul pärast taotluse saamist. Pädev asutus saadab kõnealused proovid käitleja taotlusel ja kulul teise laborisse. Nimetatud labor peab olema ametlike analüüside tegemiseks heaks kiidetud ning selle pädevus kõnealuste analüüside tegemiseks peab olema tõendatud.

2. Kui laboris 1 viidi läbi $n_1$ määramist ja saadud tulemuste aritmeetiline keskmine on $\overline{y}_1$ ning laboris 2 viidi läbi $n_2$ määramist ja saadud tulemuste aritmeetiline keskmine on $\overline{y}_2$, siis nende aritmeetiliste keskmiste laiendmääramatused ($k = 2$) on vastavalt järgmised:

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ ja $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$, kus $\sigma_r$ on korratavuse standardhälve ja $\sigma_R$ on reprodutseeritavuse standardhälve kõnealuse meetodi puhul. Kui laborimõõtmiste lõpptulemuse $y$ arvutamiseks kasutatakse valemit $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ või $y = x_1/x_2$, ühendatakse standardhälbed määramatuse arvutamisel tavameetoditega.

4. Et kontrollida kahe labori tulemuste vastavust meetodi reprodutseeritavuse standardhälbele $\sigma_R$, arvutatakse välja vahe $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$ laiendmääramatus:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Kui laborite tulemuste keskväärtuste vahe absoluutväärtus $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ ei ole suurem selle määramatusest $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$$

on kahe labori tulemused vastavuses reprodutseeritavuse standardhälbega $\sigma_R$ ja kahe labori keskmiste aritmeetiline keskmine

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2},$$

esitatakse lõpptulemusena. Selle laiendmääramatus on

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Tootepartii tunnistatakse kõlbmatuks sätestatud ülemmäärale *UL* mittevastavuse tõttu, kui

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL;$$

muudel juhtudel loetakse see *UL*-ile vastavaks.

Tootepartii tunnistatakse kõlbmatuks sätestatud alammäärale *LL* mittevastavuse tõttu, kui

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL;$$

muudel juhtudel loetakse see *LL*-ile vastavaks.

Kui laborite tulemuste aritmeetiliste keskmiste vahe absoluutväärtus $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ on suurem selle määramatusest $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

Ei vasta kahe labori tulemused reprodutseeritavuse standardhälbele.

Sel juhul tunnistatakse tootepartii mittevastavuse tõttu kõlbmatuks, kui teine analüüs kinnitab esimest. Muudel juhtudel peetakse tootepartiid nõuetele vastavaks ja see tunnistatakse kõlblikuks.

Pädev asutus peab lõpptulemuse teatama ettevõtjale võimalikult kiiresti. Ettevõtja kannab teise analüüsi kulud juhul, kui tootepartiid ei tunnistatud kõlblikuks.

▼B

*XXII LISA*

**VASTAVUSTABEL**

| Määrus (EÜ) nr 213/2001 | Käesolev määrus |
|---|---|
| Artikkel 1 | Artikkel 1 |
| Artikkel 2 | Artikkel 1 |
| Artikkel 3 | Artikkel 2 |
| — | Artikkel 3 |
| Artikkel 4 | — |
| Artikkel 5 | — |
| Artikkel 6 | Artikkel 4 |
| Artikkel 7 | Artikkel 18 |
| Artikkel 8 | — |
| Artikkel 9 | Artikkel 5 |
| Artikkel 10 | Artikkel 6 |
| Artikkel 11 | Artikkel 7 |
| Artikkel 12 | Artikkel 8 |
| Artikkel 13 | Artikkel 9 |
| Artikkel 14 | Artikkel 10 |
| Artikkel 15 | Artikkel 11 |
| Artikkel 16 | Artikkel 12 |
| Artikkel 17 | Artikkel 13 |
| — | Artikkel 14 |
| Artikkel 18 | Artikkel 15 |
| Artikkel 19 | Artikkel 16 |
| | Artikkel 17 |
| | Artikkel 19 |
| Artikkel 20 | — |
| Artikkel 21 | — |
| Artikkel 22 | Artikkel 20 |
| Artikkel 23 | Artikkel 21 |