Šis dokumentas yra skirtas tik informacijai, ir institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį

►**B**

KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 273/2008

2008 m. kovo 5 d.

nustatantis išsamias Tarybos reglamento (EB) Nr. 1255/1999 taikymo taisykles, susijusias su pieno ir pieno produktų analizės bei kokybės vertinimo metodais

(OL L 88, 2008 3 29, p. 1)

iš dalies keičiamas:

		Oficialusis leidinys		
		Nr.	puslapis	data
►**M1**	2013 m. birželio 18 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) Nr. 565/2013	L 167	26	2013 6 19

▼B

KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 273/2008

2008 m. kovo 5 d.

nustatantis išsamias Tarybos reglamento (EB) Nr. 1255/1999 taikymo taisykles, susijusias su pieno ir pieno produktų analizės bei kokybės vertinimo metodais

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1999 m. gegužės 17 d. Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1255/1999 dėl bendro pieno ir pieno produktų rinkos organizavimo ([1]), ypač į jo 10 ir 15 straipsnius, 26 straipsnio 3 dalį, 29 straipsnio 1 dalį ir 31 straipsnio 4 dalį,

kadangi:

(1) Komisijos reglamente (EB) Nr. 213/2001 ([2]) nustatomos išsamios Tarybos reglamento (EB) Nr. 1255/1999 taikymo taisyklės, susijusios su pieno ir pieno produktų analizės bei kokybės vertinimo metodais. Atsižvelgiant į technines naujoves analizės metodų srityje, būtina atlikti papildomus esminius pakeitimus. Todėl siekiant aiškumo bei veiksmingumo ir atsižvelgiant į pakeitimų skaičių bei techninį pobūdį, Reglamentas (EB) Nr. 213/2001 turėtų būti panaikintas ir pakeistas nauju reglamentu.

(2) Siekiant užtikrinti, kad būtų griežtai laikomasi pieno ir pieno produktų sudėties bei kokybės reikalavimų, nustatytų taikant Reglamente (EB) Nr. 1255/1999 numatytas priemones, juos būtina tikrinti.

(3) Pamatiniai tokių tikrinimų metodai dažnai yra tarptautinių organizacijų, pvz., Europos standartizacijos komiteto (CEN), Tarptautinės pieninkystės federacijos (IDF), Tarptautinės standartizacijos organizacijos (ISO) ir Tarptautinės analitikų bendrijų asociacijos (AOAC International) paskelbti metodai, kuriuos tos organizacijos reguliariai atnaujina. Bendrijos taisyklėse Bendrijos pamatinis metodas vienais atvejais nurodomas, kitais – nenurodomas. Siekiant užtikrinti, kad pamatiniai metodai būtų taikomi vienodai, kasmet turėtų būti sudaromas pamatinių metodų sąrašas, ir turėtų būti priimta nuostata, kad prireikus Komisija galėtų sąrašą peržiūrėti.

(4) Neturėtų būti atsisakyta įprastinių metodų taikymo. Todėl reikėtų nurodyti jų taikymo būtiniausias sąlygas.

(5) Be to, turėtų būti nustatytos bendros procedūros, užtikrinančios vienodą analizės rezultatų vertinimo, aptariamų produktų juslinio vertinimo ir ginčytinų rezultatų pakartotinio nagrinėjimo praktiką.

([1]) OL L 160, 1999 6 26, p. 48. Reglamentas su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 1152/2007 (OL L 258, 2007 10 4, p. 3). Reglamentas (EB) Nr. 1255/1999 bus pakeistas Reglamentu (EB) Nr. 1234/2007 (OL L 299, 2007 11 16, p. 1) nuo 2008 m. liepos 1 d.

([2]) OL L 37, 2001 2 7, p. 1.

▼B

(6) Kai kurioms analizėms atlikti šiuo metu nėra tarptautiniu mastu priimtų ir patvirtintų pamatinių metodų, todėl nėra informacijos apie tarplaboratorinių analizės rezultatų sklaidą. Dėl šios priežasties reikėtų nustatyti Bendrijos metodus, kurie būtų patvirtinti pagal tarptautines taisykles ir būtų taikomi kaip pamatiniai metodai.

(7) Komisijos reglamente (EB) Nr. 1898/2005 ([1]) nustatomos išsamios Tarybos reglamento (EB) Nr. 1255/1999 įgyvendinimo taisykles, taikomos grietinėlės, sviesto ir koncentruoto sviesto realizavimo Bendrijos rinkoje priemonėms, ir numatoma tam tikromis aplinkybėmis atsekti grietinėlės, sviesto ir koncentruoto sviesto tapatumą, kad būtų galima užtikrinti tinkamą galutinį šių produktų naudojimą. Atsekimas yra svarbi tinkamo schemos funkcionavimo priemonė. Siekiant užtikrinti, kad joje dalyvaujantiems operatoriams būtų taikomos vienodos sąlygos, reikėtų nustatyti bendrus atsekamųjų medžiagų nustatymo metodus.

(8) Remiantis Reglamento (EB) Nr. 1255/1999 9 straipsnio nuostatomis, gali būti suteikta pagalba iš avių pieno pagamintam sūriui privačiai saugoti. Remiantis to reglamento 31 straipsnio nuostatomis, šiems produktams gali būti suteikiama speciali grąžinamoji išmoka. Sūriai, pagaminti iš avių, ožkų, buivolių pieno ir avių, ožkų bei buivolių pieno mišinio, gali būti įvežami į Bendriją iš tam tikrų trečiųjų šalių taikant lengvatines priemones. Atsižvelgiant į tai būtina atlikti reikiamus patikrinimus, siekiant užtikrinti, kad į minėtus produktus nebūtų įmaišyta karvių pieno. Todėl reikėtų nustatyti Bendrijos pamatinį metodą karvių pienui aptikti, neatmetant ir įprastinių metodų, jei šie atitinka tam tikrus kriterijus.

(9) Remiantis 1990 m. spalio 10 d. Komisijos reglamentu (EEB) Nr. 2921/90 dėl pagalbos už kazeino ir kazeinatų gamybai naudojamą nugriebtą pieną ([2]), turi būti nustatyta, kad koliforminių bakterijų nėra. Tarptautiniai pamatiniai metodai koliforminėms bakterijoms aptikti piene ir pieno produktuose yra pateikti ISO 4831. Bendrijos pamatinis metodas koliforminėms bakterijoms aptikti buvo parengtas pagal šį standartą.

(10) 1987 m. liepos 23 d. Tarybos reglamente (EEB) Nr. 2658/87 dėl tarifų ir statistinės nomenklatūros bei dėl Bendrojo muitų tarifo ([3]) yra numatytos skirtingos 2309 pozicijoje klasifikuojamų kombinuotųjų pašarų muitų normos atsižvelgiant į juose esančio pieno produktų kiekį. Siekiant užtikrinti, kad šios taisyklės būtų taikomos vienodai, turėtų būti nustatytas visuotinai pripažintas laktozės kiekio analizes metodas, privalomas taikyti visose valstybėse narėse.

([1]) OL L 308, 2005 11 25, p. 1. Reglamentas su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 1546/2007 (OL L 337, 2007 12 21, p. 68).
([2]) OL L 279, 1990 10 11, p. 22. Reglamentas su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 1487/2006 (OL L 278, 2006 10 10, p. 8).
([3]) OL L 256, 1987 9 7, p. 1. Reglamentas su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 1352/2007 (OL L 303, 2007 11 21, p. 3).

▼B

(11) Remiantis Reglamento (EB) Nr. 1255/1999 nuostatomis, intervencijai skirtas sviestas ir nugriebto pieno milteliai arba pašarams skirti nugriebto pieno milteliai turi atitikti tam tikrus kokybės reikalavimus. Turi būti nustatyti pamatiniai metodai, kuriais būtų galima patikrinti, ar šių reikalavimų laikomasi.

(12) Kai kurie metodai įtraukti į šį reglamentą pirmą kartą. Turėtų būti numatytas pakankamos trukmės laikotarpis nuo šio reglamento įsigaliojimo datos, kad laboratorijoms būtų sudarytos sąlygos tinkamai įdiegti ir taikyti šiuos naujus metodus. Kai standartų rengimo organizacija peržiūri I priede nurodytą pamatinį metodą ir jį paskelbia, laboratorijoms turėtų būti skirti šeši mėnesiai analizės procedūroms atnaujinti pagal naują standartą.

(13) Šiame reglamente numatytos priemonės atitinka Pieno ir pieno produktų verslo vadybos komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

I SKYRIUS

BENDROSIOS NUOSTATOS

1 straipsnis

Taikymo sritis

1. Šiame reglamente nustatomi tam tikri pieno ir pieno produktų cheminės, fizikinės bei mikrobiologinės analizės ir juslinio vertinimo metodai, kurie turi būti taikomi įgyvendinant Reglamente (EB) Nr. 1255/1999 nustatytas bendro pieno ir pieno produktų rinkos organizavimo priemones, ir šių metodų taikymo taisyklės.

2. Analizei taikytinų pamatinių metodų, kaip nurodyta pirmoje dalyje, sąrašas yra pateiktas šio reglamento I priede.

3. Ne rečiau kaip kartą per metus Komisija šį sąrašą atnaujina Reglamento (EB) Nr. 1255/1999 42 straipsnyje nustatyta tvarka.

2 straipsnis

Įprastiniai metodai

Atliekant Bendrijos taisyklėmis numatytą analizę, galima taikyti įprastinius metodus, jei jie yra tinkamai suderinami ir nuolat tikrinami pagal pamatinį metodą. Rezultatai turi būti lyginami įvertinant pastoviąją sistemingąją paklaidą, pakartojamumą ir atkuriamumą.

Ginčytinais atvejais lemia pamatiniu metodu gautas rezultatas.

Valstybės narės praneša Komisijai apie įprastinių metodų taikymą atliekant 1 straipsnyje nurodytą analizę.

▼B

II SKYRIUS

ANALIZĖS METODAI

3 straipsnis

Siuntos atitikties teisės aktais nustatytai ribinei vertei įvertinimas

Išskyrus atsekamųjų medžiagų analizę, siekiant apibrėžti atitiktį teisės aktais nustatytiems sudėties reikalavimams taikomas šio reglamento II priedas.

4 straipsnis

Juslinis vertinimas

1. Valstybės narės, atlikdamos juslinį pieno ir pieno produktų, išskyrus sviestą, vertinimą, privalo taikyti IDF standarte 99C/1997 nurodytą pamatinį metodą arba kitus panašius metodus, apie kuriuos jos praneša Komisijai.

Vertintojų darbas ir juslinės analizės rezultatų patikimumas tikrinami taikant III priede aprašytas procedūras.

2. Jei sviestas skirtas viešajam saugojimui, vertintojų darbas ir juslinės analizės rezultatų patikimumas tikrinami taikant III priede aprašytas procedūras.

Kaip pamatinis juslinio vertinimo metodas taikoma IV priede aprašyta procedūra.

5 straipsnis

Atsekamosios medžiagos

1. V priede aprašytas analizės metodas yra taikomas kaip pamatinis metodas enanto rūgšties triglicerido kiekiui svieste, lydytame svieste ir grietinėlėje nustatyti.

2. VI priede aprašytas metodas yra taikomas kaip pamatinis metodas vanilinui koncentruotame svieste, svieste ir grietinėlėje nustatyti.

3. VII priede aprašytas metodas yra taikomas kaip pamatinis metodas β-apo-8'-karotino rūgšties etilesterio kiekiui koncentruotame svieste ir svieste nustatyti.

4. VIII priede aprašytas metodas yra taikomas kaip pamatinis β-sitosterolio arba stigmasterolio kiekiui svieste ir koncentruotame svieste nustatyti.

5. Laikoma, kad koncentruotas sviestas, sviestas ir grietinėlė yra atsekami pagal atitinkamas Bendrijos taisykles, jei gauti rezultatai atitinka V priedo 10 bei 11 punktuose ir VI, VII bei VIII priedų 8 punkte pateiktas specifikacijas.

6 straipsnis

Karvių pieno kazeino aptikimas

1. IX priede aprašytas pamatinis analizes metodas yra taikomas siekiant užtikrinti, kad tik iš avių, ožkų ar buivolių pieno arba iš avių, ožkų ar buivolių pieno mišinio pagamintas sūris neturėtų karvių pieno kazeino.

▼B

Laikoma, kad yra karvių pieno kazeino, jei jo kiekis analizuojamame mėginyje yra lygus arba didesnis nei IX priede aprašytame pamatiniame mėginyje, kuris turi 1 % karvių pieno.

2. Įprastiniai karvių pieno kazeino aptikimo 1 dalyje nurodytuose sūriuose metodai gali būti taikomi tada, kai:

a) aptikimo riba yra ne didesnė kaip 0,5 %;

b) nėra klaidingų teigiamų rezultatų;

c) karvių pieno kazeinas aptinkamas esant reikiamam jautrumui netgi po ilgų brandinimo laikotarpių, kaip gali pasitaikyti įprastinėmis prekybos sąlygomis.

Jei kuris nors vienas iš pirmiau išvardytų reikalavimų nevykdomas, taikomi IX priede nurodyti pamatiniai metodai.

7 straipsnis

Koliforminių bakterijų aptikimas

Koliforminės bakterijos svieste, nugriebto pieno milteliuose, kazeine ir kazeinatuose aptinkamos taikant X priede aprašytą pamatinį metodą.

8 straipsnis

Laktozės kiekio nustatymas

Laktozės kiekis pagal KN 2309 kodą klasifikuojamuose produktuose nustatomas taikant XI priede aprašytą pamatinį metodą.

9 straipsnis

Fermentinių išrūgų nustatymas

1. Fermentinės išrūgos viešajam saugojimui skirtuose nugriebto pieno milteliuose aptinkamos taikant XII priede aprašytą pamatinį metodą.

2. Fermentinės išrūgos nugriebto pieno milteliuose ir mišiniuose, skirtuose naudoti gyvūnų pašaruose, aptinkamos taikant XII priede aprašytą metodą. Aptikus fermentinių išrūgų, turėtų būti įgyvendintos XIII priedo nuostatos.

10 straipsnis

Pasukų aptikimas

Pasukos nugriebto pieno milteliuose aptinkamos taikant XIV priede aprašytą pamatinį metodą.

11 straipsnis

Antimikrobinių priemonių likučių aptikimas

Antimikrobinių priemonių likučiai nugriebto pieno milteliuose aptinkami taikant XV priede aprašytą pamatinį metodą.

▼B

12 straipsnis

Nugriebto pieno miltelių kiekio nustatymas

Nugriebto pieno miltelių kiekis kombinuotuosiuose pašaruose nustatomas taikant XVI priede aprašytą pamatinį metodą.

13 straipsnis

Krakmolo aptikimas

Krakmolas nugriebto pieno milteliuose, denatūruotuose pieno milteliuose ir kombinuotuosiuose pašaruose aptinkamas taikant XVII priede aprašytą pamatinį metodą.

14 straipsnis

Drėgmės kiekio grietinėlės milteliuose nustatymas

Drėgmės kiekis grietinėlės milteliuose nustatomas taikant XVIII priede aprašytą pamatinį metodą.

15 straipsnis

Drėgmės kiekio rūgščiųjų pasukų milteliuose nustatymas

Drėgmės kiekis pašarams skirtuose rūgščiųjų pasukų milteliuose nustatomas taikant XIX priede aprašytą pamatinį metodą.

16 straipsnis

Pieno riebalų grynumo nustatymas

Pieno riebalų grynumas nustatomas taikant XX priede aprašytą pamatinį metodą.

III SKYRIUS

BENDROSIOS IR BAIGIAMOSIOS NUOSTATOS

17 straipsnis

Kokybės užtikrinimas

Analizė atliekama laboratorijose, kurios turi analizės kokybės užtikrinimo sistemą, įskaitant vidines kokybės valdymo procedūras. Neakredituotos laboratorijos ne rečiau kaip vieną kartą per metus dalyvauja kvalifikacijos tikrinimo programose, o jų rezultatai nenukrypsta daugiau kaip $2\sigma_R$ (pamatinio metodo atkuriamumo standartinis nuokrypis) nuo sutartosios vertės. Laboratorijoje laikomas konsultacijoms skirtas naudojamų sistemų išsamus aprašymas.

Laboratorijos, akredituotos pagal 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 882/2004 dėl oficialios kontrolės, kuri atliekama siekiant užtikrinti, kad būtų įvertinama, ar

▼B

laikomasi pašarus ir maistą reglamentuojančių teisės aktų, gyvūnų sveikatos ir gerovės taisyklių ([1]) 12 straipsnyje nurodytus standartus, turi būti atleistos nuo įpareigojimo pasitikrinti kvalifikaciją.

18 straipsnis

Mėginių ėmimas ir ginčai dėl analizės rezultatų

1. Mėginiai imami pagal atitinkamą nagrinėjamo produkto reglamentą. Nesant mėginių ėmimo nuostatų, taikomos nuostatos, pateiktos ISO 707IDF 50 *Pienas ir pieno produktai. Mėginių ėmimo taisyklės*.

2. Laboratorijos analizės rezultatų ataskaitose turi pakakti informacijos rezultatams pagal II ir XXI priedus įvertinti.

3. Pagal Bendrijos taisykles atliekant analizę turi būti imama po du mėginius.

4. Kai gamintojas nesutinka su analizės rezultatais, taikoma XXI priede aprašyta procedūra.

5. Jei per penkias darbo dienas nuo mėginių paėmimo gamintojas gali įrodyti, kad mėginiai buvo netinkamai paimti, jie turi būti paimti iš naujo, jei tai įmanoma. Jei mėginių neįmanoma paimti pakartotinai, partija turi būti priimta.

▼M1

———

19a straipsnis

Pranešimai

2 straipsnyje, 4 straipsnio 1 dalyje ir III priedo C dalyje numatyti pranešimai teikiami remiantis Komisijos reglamentu (EB) Nr. 792/2009 ([2]).

▼B

20 straipsnis

Panaikinimas

Reglamentas (EB) Nr. 213/2001 panaikinamas.

Nuorodos į panaikintą reglamentą laikomos nuorodomis į šį reglamentą ir aiškinamos pagal XXII priede pateiktą koreliacijos lentelę.

21 straipsnis

Įsigaliojimas

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Jis taikomas nuo 2008 m. kovo 31 d.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

([1]) OL L 165, 2004 4 30, p. 1.
([2]) OL L 228, 2009 9 1, p. 3.

▼B

I PRIEDAS

(1 straipsnis)

PAMATINIŲ METODŲ SĄRAŠAS

Indeksas Priedas – nurodyto reglamento priedas, SNM – sausosios neriebalinės medžiagos, PS – peroksidų skaičius, I – išvaizda, S – skonis, K – konsistencija, SBS – suminis bakterijų skaičius, Term – termofilinių bakterijų skaičius, VN – valstybė narė, TPF – Tarptautinė pieninkystės federacija, ISO – Tarptautinė standartizacijos organizacija, IUPAC – Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga, ADPI – Amerikos pieninkystės institutas, SSP – saldintas sutirštintas pienas, SPG – sutirštintas pienas arba grietinėlė.

A DALIS

Komisijos reglamentas	Produktas	Parametras	Ribinė vertė ([1])	Pamatinis metodas	Pastaba
Reglamentas (EB) Nr. 2771/1999. Viešasis saugojimas	Nesūdytas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 82 % masės	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 16 % masės	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		SNM	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Riebalų rūgštingumas	1,2 mmol/100g riebalų	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PS (ne daugiau)	0,3 mekv deguonies/ 1 000 g riebalų	ISO 3976:2006IDF 74:2006	1 pastaba
		Koliforminės bakterijos	Neaptinkamos 1 g	X priedas	3 pastaba
		Ne pieno riebalai	Neaptinkami atliekant trigliceridų analizę	XX priedas	
		Sterolių atsekamosios medžiagos	Neaptinkamos, β-sitosterolio ≤ 40 mg/kg	VIII priedas	
		Kitos atsekamosios medžiagos:			
		— vanilinas	Neaptinkamas	VI priedas	
		— β-apo-8'-karotino rūgšties etilesteris	≤ 6 mg/kg	VII priedas	
		— enanto rūgšties trigliceridai	Neaptinkami	V priedas	
		Juslinės charakteristikos	Ne mažiau kaip 4 balai iš penkių už I, S ir K	IV priedas	
		Vandens dispersija	Ne mažiau kaip 4 balai	ISO 7586:1985 – IDF 112A:1989	
Reglamentas (EB) Nr. 2771/1999. Privatusis saugojimas	Nesūdytas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 82 % masės	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 16 % masės	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	Parametras	Ribinė vertė (1)	Pamatinis metodas	Pastaba
		SNM	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
Reglamentas (EB) Nr. 2771/1999. Privatusis saugojimas	Sūdytas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 80 % masės	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 16 % masės	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		SNM (išskyrus druską)	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Druska	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
Reglamentas (EB) Nr. 1898/2005. II skyrius	Nesūdytas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 82 % masės	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ne pieno riebalai		XX priedas	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 16 % masės	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		SNM	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Atsekamosios medžiagos: — steroliai — vanilinas — karotino rūgšties etilesteris — enanto rūgšties trigliceridai	 Žr. VIII priedą Žr. VI priedą Žr. VII priedą Žr. V priedą	 VIII priedas VI priedas VII priedas V priedas	
Reglamentas (EB) Nr. 1898/2005 II skyrius	Sūdytas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 80 % masės	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ne pieno riebalai		XX priedas	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 16 % masės	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		SNM (išskyrus druską)	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Druska	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Atsekamosios medžiagos: — steroliai — vanilinas — karotino rūgšties etilesteris — enanto rūgšties trigliceridai	 Žr. VIII priedą Žr. VI priedą Žr. VII priedą Žr. V priedą	 VIII priedas VI priedas VII priedas V priedas	
Reglamentas (EB) Nr. 1898/2005. II skyrius	Koncentruotas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 99,8 % masės	IDF 24:1964	

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	Parametras	Ribinė vertė (1)	Pamatinis metodas	Pastaba
		Vanduo ir SNM	Ne daugiau kaip 0,2 % masės	ISO 5536:2002IDF 23:2002 (drėgmė) IDF 24:1964 (SNM)	
		Riebalų rūgštingumas	1,2 mmol/100g riebalų	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PS (ne daugiau)	0,5 mekv deguonies/ 1 000 g riebalų	ISO 3976:2006IDF 74:2006	1 pastaba
		Ne pieno riebalai	Turi nebūti	XX priedas	
		Skonis	Grynas		
		Kvapas	Turi nebūti pašalinių kvapų		
		Kita	Turi nebūti neutralizuojančių medžiagų, antioksidantų ir konservantų		
		Atsekamosios medžiagos:			
		— steroliai	Žr. VIII priedą	VIII priedas	
		— vanilinas	Žr. VI priedą	VI priedas	
		— karotino rūgšties etilesteris	Žr. VII priedą	VII priedas	
		— enanto rūgšties trigliceridai	Žr. V priedą	V priedas	
Reglamentas (EB) Nr. 1898/2005. II skyrius	Grietinėlė	Riebalai	Ne mažiau kaip 35 % masės	ISO 2450:1999IDF 16 C:1987	
		Ne pieno riebalai		XX priedas	
		Atsekamosios medžiagos:			
		— steroliai	Žr. VIII priedą		2 pastaba
		— vanilinas	Žr. VI priedą	VI priedas	
		— karotino rūgšties etilesteris	Žr. VII priedą		2 pastaba
		— enanto rūgšties trigliceridai	Žr. V priedą	V priedas	
Reglamentas (EB) Nr. 1898/2005. III skyrius	Koncentruotas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 96 % masės		2 pastaba
		Ne pieno riebalai		XX priedas	
		SNM	Ne daugiau kaip 2 % masės		2 pastaba

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	Parametras	Ribinė vertė ([1])	Pamatinis metodas	Pastaba
		Atsekamosios medžiagos:			
		— stigmasterolis (95 % masės)	15 g/100 kg koncentruoto sviesto	VIII priedas	
		— stigmasterolis (85 % masės)	17 g/100 kg koncentruoto sviesto	VIII priedas	
		— enanto rūgšties trigliceridai	10,34 kg/t koncentruoto sviesto	V priedas	
		— sviesto rūgšties etilesteris ir stigmasterolis		— sviesto rūgšties etilesteris — stigmasterolis: VIII priedas	2 pastaba
		— sviesto rūgšties etilesteris ir enanto rūgšties trigliceridai		— sviesto rūgšties etilesteris — enanto rūgšties trigliceridai: V priedas	2 pastaba
		lecitinas (E 322)	Ne daugiau kaip 0,5 % masės		2 pastaba
		NaC1	Ne daugiau kaip 0,75 % masės	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Riebalų rūgštingumas	1,2 mmol/100 g riebalų	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PS (ne daugiau)	Ne daugiau kaip 0,5 mekv deguonies/1 000 g riebalų	ISO 3976:2006IDF 74:2006	1 pastaba
		Skonis	Grynas		
		Kvapas	Turi nebūti pašalinių kvapų		
		Kita	Turi nebūti neutralizuojančių medžiagų, antioksidantų ir konservantų		
Reglamentas (EB) Nr. 1898/2005. IV skyrius	Nesūdytas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 82 % masės	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 16 % masės	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		SNM	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
Reglamentas (EB) Nr. 1898/2005. IV skyrius	Sūdytas sviestas	Riebalai	Ne mažiau kaip 80 % masės	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 16 % masės	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		SNM (išskyrus druską)	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Druska	Ne daugiau kaip 2 % masės	ISO 15648:2004IDF 179:2004	

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	Parametras	Ribinė vertė ([1])	Pamatinis metodas	Pastaba
Reglamento (EB) Nr. 1255/1999 9 straipsnis ir II antraštinė dalis	Sūris, pagamintas iš avių ir (arba) ožkų pieno	Karvių pienas	< 1 % masės	IX priedas	
Reglamentas (EEB) Nr. 2921/90	I priedas – rūgštusis kazeinas	Vanduo	Ne daugiau kaip 12,00 % masės	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Riebalai	Ne daugiau kaip 1,75 % masės	ISO 5543:2004IDF127:2004	
		Laisvasis rūgštingumas	Ne daugiau kaip 0,30 ml 0,1 mol/l NaOH tirpalo/g	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
Reglamentas (EEB) Nr. 2921/90	I priedas – fermentinis kazeinas	Vanduo	Ne daugiau kaip 12,00 % masės	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Riebalai	Ne daugiau kaip 1,00 % masės	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Pelenai	Ne mažiau kaip 7,50 % masės	ISO 5545:1978IDF 90:1979	
Reglamentas (EEB) Nr. 2921/90	I priedas – kazeinatai	Vanduo	Ne daugiau kaip 6,00 % masės	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Pieno baltymai	Ne mažiau kaip 88,00 % masės	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Riebalai ir pelenai	Ne daugiau kaip 6,00 % masės	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Surištieji pelenai		ISO 5544:1978IDF 89:1979	
		Pelenai		ISO 5545:1978IDF 90:1979	
Reglamentas (EEB) Nr. 2921/90	II priedas – rūgštusis kazeinas	Vanduo	Ne daugiau kaip 10,00 % masės	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Riebalai	Ne daugiau kaip 1,50 % masės	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Laisvasis rūgštingumas	Ne daugiau kaip 0,20 ml 0,1 mol/l NaOH tirpalo/g	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
		SBS (ne daugiau)	30 000/ g	ISO 4833:2003	3 pastaba
		Koliforminės bakterijos	Turi nebūti 0,1 g	X priedas	3 pastaba
		Term. (ne daugiau)	5 000/ g	ISO 4833:2003	3 ir 4 pastabos
Reglamentas (EEB) Nr. 2921/90	II priedas – fermentinis kazeinas	Vanduo	Ne daugiau kaip 8,00 % masės	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Riebalai	Ne daugiau kaip 1,00 % masės	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Pelenai	Ne mažiau kaip 7,50 % masės	ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		SBS (ne daugiau)	30 000/ g	ISO 4833:2003	3 pastaba
		Koliforminės bakterijos	Turi nebūti 0,1 g	X priedas	3 pastaba
		Term. (ne daugiau)	5 000/ g	ISO 4833:2003	3 ir 4 pastabos

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	Parametras	Ribinė vertė ([1])	Pamatinis metodas	Pastaba
Reglamentas (EEB) Nr. 2921/90	II priedas – kazeinatai	Vanduo	Ne daugiau kaip 6,00 % masės	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Pieno baltymai	Ne mažiau kaip 88,00 % masės	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Riebalai ir pelenai	Ne daugiau kaip 6,00 % masės	ISO 5543:2004IDF 127:2004 ISO 5544:1978IDF 89:1979 arba ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		SBS (ne daugiau)	30 000/ g	ISO 4833:2003	3 pastaba
		Koliforminės bakterijos	Turi nebūti 0,1 g	X priedas	3 pastaba
		Term. (ne daugiau)	5 000/ g	ISO 4833:2003	3 ir 4 pastabos
Reglamentas (EEB) Nr. 2921/90	III priedas – kazeinatai	Vanduo	Ne daugiau kaip 6,00 % masės	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Pieno baltymai	Ne mažiau kaip 85,00 % masės	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Riebalai	Ne daugiau kaip 1,50 % masės	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Laktozė	Ne daugiau kaip 1,00 % masės	ISO 5548:2004IDF 106:2004	
		Pelenai	Ne daugiau kaip 6,50 % masės	ISO 5544:1978IDF 89:1979 arba ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
		SBS (ne daugiau)	30 000/g	ISO 4833:2003	3 pastaba
		Koliforminės bakterijos	Turi nebūti 0.1 g	X priedas	3 pastaba
		Term. (ne daugiau)	5 000/ g	ISO 4833:2003	3 ir 4 pastabos
Reglamentas (EB) Nr. 2799/1999	Kombinuotieji pašarai ir nugriebto pieno milteliai (NPM) (skirti naudoti pašaruose)	Vanduo (rūgščiųjų pasukų milteliai)	Ne daugiau kaip 5 % masės	XIX priedas	
		Baltymai	31,4 % masės (ne mažiau) neriebalinių sausųjų medžiagų	ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
		Vanduo (NPM)	Ne daugiau kaip 5 % masės	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Riebalai (NPM)	Ne daugiau kaip 11 % masės	ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
		Fermentinės išrūgos (NPM)	Turi nebūti	XIII priedas	6 pastaba
		Krakmolas (NPM)	Turi nebūti	XVII priedas	
		Vanduo (mišiniai)	Ne daugiau kaip 5 % masės neriebalinių sausųjų medžiagų	ISO 5537:2004IDF 26:2004	

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	Parametras	Ribinė vertė (1)	Pamatinis metodas	Pastaba
		Riebalai (mišiniai)		Komisijos direktyva 84/4/EEB (OL L 15, 1984 1 18, p. 29)	
		Fermentinės išrūgos (mišiniai)	Turi nebūti	XIII priedas	
		NPM kiekis (galutiniame produkte)	Ne mažiau kaip 50 % masės	XVI priedas	
		Riebalai (galutiniame produkte)	Ne mažiau kaip 2,5 % masės arba 5 % masės	Komisijos direktyva 84/4/EEB (OL L 15, 1984 1 18, p. 29)	7 pastaba
		Krakmolas (galutiniame produkte)	Ne mažiau kaip 2 % masės	XVII priedas	8 pastaba
		Varis (galutiniame produkte)	25 ppm	Komisijos direktyva 78/633/EEB (OL L 206, 1987 7 26, p. 43)	
Reglamentas (EB) Nr. 214/2001	NPM (purškiamojo džiovinimo)	Riebalai	Ne daugiau kaip 1,0 % masės	ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
		Baltymai	31,4 % (2)masės (ne mažiau) neriebalinių sausųjų medžiagų	ISO 8968–1/2:2001IDF 20–1/2:2001	
		Vanduo	Ne daugiau kaip 3,5 % masės	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Rūgštingumas	Ne daugiau kaip 19,5 ml 0,1 mol/l NaOH, 10 g sausųjų neriebalinių medžiagų	ISO 6091:1980IDF 86:1981	
		Laktatai	Ne daugiau kaip 150 mg/100 g sausųjų neriebalinių medžiagų	ISO 8069:2005IDF 69:2005	
		Fosfatazė	Neigiamas	ISO 11816–1:2006IDF 155–1:2006	
		Netirpumo indeksas	Ne daugiau kaip 0,5 ml esant 24 °C	ISO 8156:2005IDF 129:2005	
		Suskrudusios dalelės	Diskas A arba B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		SBS	40 000/ g	ISO 4833:2003	3 pastaba
		Koliforminės bakterijos	Neigiamas/0,1 g	X priedas	3 pastaba
		Pasukos	Neigiamas	XIV priedas	
		Fermentinės išrūgos	Neigiamas	XII priedas	
		Rūgščiosios išrūgos	Neigiamas		2 pastaba
		Antimikrobinės medžiagos		XV priedas	

(1) Nepažeidžiant atitinkamo reglamento reikalavimų.
(2) Nuo 2009 m. rugsėjo 1 d. mažiausias baltymų kiekis būtų 34 %.

▼B

B DALIS

B dalyje išvardyti pamatiniai metodai taikomi analizuoti produktus, kuriems taikomi 1 skiltyje nurodyti reglamentai.

Komisijos reglamentas	Produktas	KN kodas	Parametras	Ribinė vertė	Pamatinis metodas	Pastaba
Reglamentas (EEB) Nr. 2658/87 Reglamentas (EB) Nr. 2535/2001 Reglamentas (EB) Nr. 1282/2006	Nekoncentruotas pienas ir grietinėlė, į kuriuos nepridėta cukraus arba kitų saldiklių	0401	Riebalai (≤ 6 % masės)	Ribinės vertės atitinka vertes, nurodytas konkretaus produkto KN kodo aprašyme, papildomai nurodytos, jei taikytina, Komisijos reglamente (EEB) Nr. 3846/87 (OL L 366, 1987 12 24, p. 1), Eksporto nomenklatūros 9 dalyje arba Reglamente (EB) Nr. 2535/2001 (OL L 341, 2001 12 22, p. 29)	ISO 1211:2001IDF 1D:1996	
			Riebalai (> 6 % masės)		ISO 2450:1999IDF 16C:1987	
	Pienas ir grietinėlė, koncentruoti arba į kuriuos pridėta cukraus arba kitų saldiklių	0402	Riebalai (skysti)		ISO 1737:1999IDF 13C:1987	
			Riebalai (kieti)		ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
			Baltymai		ISO 8968–123:2001 DF 20–123:2001	
			Sacharozė (normalus kiekis)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacharozė (mažas kiekis)			2 pastaba
			Sausosios medžiagos (SSP)		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	
			Sausosios medžiagos (SPG)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
			Vanduo (pieno milteliai)		ISO 5537:2004IDF 26:2004	
			Vanduo (grietinėlės milteliai)		XVIII priedas	

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	KN kodas	Parametras	Ribinė vertė	Pamatinis metodas	Pastaba
	Pasukos, fermentuotas arba raugintas pienas ir grietinėlė, koncentruoti arba nekoncentruoti, į kuriuos pridėta arba nepridėta cukraus ar kitų saldiklių	0403	Riebalai		ISO 1211:2001IDF 1D:1996 ISO 1736:2000IDF 9C:1987 ISO 2450:1999IDF 16 C:1987 ISO 7208:1999IDF 22B:1987 ISO 8262–3:2005IDF 124–3:2005	
			Baltymai		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Sacharozė (normalus kiekis)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacharozė (mažas kiekis)			2 pastaba
			Vanduo (rūgščiųjų pasukų milteliai)		XIX priedas	
			Vanduo (saldžiųjų pasukų milteliai)		ISO 5537:2004IDF 26:2004	
			Sausosios medžiagos (kiti produktai)		Kompetentingos institucijos patvirtinti metodai	
	Išrūgos, koncentruotos arba nekoncentruotos, į kurias pridėta arba nepridėta cukraus ar kitų saldiklių; produktai iš natūralių pieno sudedamųjų dalių	0404	Riebalai		ISO 1736:2000IDF 9C:1987 ISO 2450:1999IDF 16C:1987 ISO 7208:1999IDF 22B:1987	
			Baltymai		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Sacharozė (normalus kiekis)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacharozė (mažas kiekis)			2 pastaba
		0404 90	Baltymai		ISO 8968 1/2 2001IDF 20–1/2:2001	
			Vanduo		IDF 21B:1987	
			Sausosios medžiagos		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	

▼B

Komisijos reglamentas	Produktas	KN kodas	Parametras	Ribinė vertė	Pamatinis metodas	Pastaba
			(Koncentruoti produktai)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
	Sviestas ir kiti pieno riebalai ir aliejai; pieno pastos	0405	Riebalai (jei ≤ 85 % masės)		ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Sviestas	Vanduo		ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
			SNM		ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
			NaCl		ISO 15648:2004IDF 179:2004	
			Riebalai (jei > 99 % masės)		IDF 24:1964	
	Lydytas sviestas		Vanduo (jei riebalų < 99 % masės)		ISO 5536:2002IDF 23:2002	
	Sūris ir varškė	0406	Riebalai		ISO 1735:2004IDF 5:2004	
			Sausosios medžiagos		ISO 5534:2004IDF 4:2004	
			Sausosios medžiagos (rikotos sūris)		ISO 2920:2004IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006IDF 88:2006	
			Laktozė		ISO 5765–1/2:2002IDF 79–1/2:2002	
Reglamentas (EEB) Nr. 2658/87	Kombinuotieji pašarai	2309	Laktozė		XI priedas	

Europos Sąjungos pamatinių metodų sąrašo pastabos

1 pastaba: Pieno riebalų atskyrimas, kaip aprašyta ISO 1740:1991 (apsauga nuo šviesos).

2 pastaba: Pamatiniai metodai neparengti. Kompetentingos institucijos patvirtinti metodai.

3 pastaba: Mėginys turi būti ruošiamas pagal ISO 8261:2001IDF 122:2001.

4 pastaba: Inkubuojama 48 h 55 °C temperatūroje ir žiūrima, kad neišdžiūtų kultūros terpė.

5 pastaba: SNM% masės = sausųjų medžiagų % masės – riebalų % masės.

6 pastaba: Komisijos direktyva 84/4/EEB.

7 pastaba: Komisijos reglamentas (EB) Nr. 2799/1999 (OL L 340, 1999 12 31, p. 3–27)

8 pastaba: Komisijos direktyva 78/633/EEB.

▼B

II PRIEDAS

(3 straipsnis)

SIUNTOS ATITIKTIES TEISĖS AKTAIS NUSTATYTAI RIBINEI VERTEI ĮVERTINIMAS

1. PRINCIPAS

Jei išsamios mėginių ėmimo procedūros yra nustatytos atitinkamais teisės aktais, šių procedūrų laikomasi. Visais kitais atvejais naudojamas mėginys, gautas iš 3 atsitiktinai paimtų kontrolei pateiktos siuntos mėginių. Galima paruošti sudėtinį mėginį. Gautas rezultatas lyginamas su teisės aktais nustatyta ribine verte, 95 % pasikliovimo intervalą apskaičiuojant kaip 2 × standartinis nuokrypis, kai atitinkamas standartinis nuokrypis priklauso nuo to, ar 1) metodas patvirtintas vykdant tarptautinį bendradarbiavimą, taikant σ_r ir σ_R vertes, ar 2) atliekant vidinį patvirtinimą buvo skaičiuojamas vidinis atkuriamumas. Šis pasikliovimo intervalas prilyginamas rezultato matavimo neapibrėžčiai.

2. METODO TINKAMUMO PATVIRTINAMAS VYKDANT TARPTAUTINĮ BENDRADARBIAVIMĄ

Šiuo atveju buvo nustatyti standartinis pakartojamumo nuokrypis σ_r ir standartinis atkuriamumo nuokrypis σ_R, ir laboratorija gali įrodyti, kad jos rezultatai atitinka patvirtinto metodo taikymo charakteristikas.

Apskaičiuojamas *n* kartotinių matavimų aritmetinis vidurkis $\bar{x}$ išplėstinė neapibrėžtis ($k = 2$) apskaičiuojama kaip:

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

Jei matavimo galutinis rezultatas *x* apskaičiuojamas taikant $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ arba $x = y_1 / y_2$ pavidalo formules, tokiais atvejais būtina laikytis standartinių nuokrypių jungimo procedūrų.

Laikoma, kad siunta neatitinka viršutinės teisės aktais nustatytos ribinės vertės *UL*, jei

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

kitaip laikoma, kad ji atitinka *UL*.

Laikoma, kad siunta neatitinka apatinės teisės aktais nustatytos ribinės vertės *LL*, jei

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

kitaip laikoma, kad ji atitinka *LL*.

3. VIDINIS TINKAMUMO PATVIRTINIMAS APSKAIČIUOJANT VIDINIO ATKURIAMUMO STANDARTINĮ NUOKRYPĮ

Jei taikomi šiame reglamente nenurodyti metodai ir preciziškumo matai nebuvo nustatyti, turi būti atliekamas vidinis metodo tinkamumo patvirtinimas. Išplėstinės neapibrėžties si_R apskaičiavimo formulėse vietoj σ_r ir σ_R, turi būti naudojami standartinis vidinio pakartojamumo nuokrypis s_ir standartinis vidinio atkuriamumo nuokrypis *U*.

Sprendimo priėmimo taisyklės atitinka 1) taisykles. Tačiau, jei nusprendžiama, kad siunta neatitinka teisės aktais nustatytos ribinės vertės, matavimai turi būti pakartoti taikant šiame reglamente nurodytą metodą ir sprendimas priimamas pagal 1).

▼B

III PRIEDAS

(4 straipsnis)

JUSLINĖS ANALIZĖS VERTINTOJŲ IR JUSLINĖS ANALIZĖS REZULTATŲ PATIKIMUMO VERTINIMAS

Šios procedūros taikomos, kai naudojami vertinimo balais metodai (IDF standartas 99C/1997).

A. PAKARTOJAMUMO INDEKSO NUSTATYMAS

Vertintojas per 12 mėnesių turėtų analizuoti mažiausiai dešimt mėginių, pateikiamų kaip kontrolinių mėginių poros. Tai paprastai atliekama per keletą kartų. Atskiro produkto charakteristikos rezultatai yra įvertinami pagal šią formulę:

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

čia:

w_I: pakartojamumo indeksas

x_{i1}: x_i mėginio pirmo įvertinimo rezultatas

x_{i2}: x_i mėginio antro įvertinimo rezultatas

n: mėginių skaičius

Vertinimui atrinkti mėginiai turėtų atitikti plačią kokybės skalę. w_I turėtų būti ne didesnis kaip 1,5 (taikant 5 balų skalę).

B. NUOKRYPIO INDEKSO NUSTATYMAS

Šis indeksas turėtų būti naudojamas patikrinti, ar vertintojas naudoja tą pačią kokybės vertinimo skalę kaip ir patyrusių vertintojų grupė. Vertintojo gauti rezultatai lyginami su vertintojų grupės nustatytu rezultatų vidurkiu.

Rezultatams įvertinti naudojama ši formulė:

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

čia:

x_{i1}; x_{i2}: žr. A skirsnį

$\overline{x}_{i1}$; $\overline{x}_{i2}$: vidutinis vertintojų grupės rezultatas, gautas atliekant pirmą ir antrą x_i mėginio vertinimą

n: mėginių skaičius (mažiausiai dešimt per 12 mėnesių)

Vertinimui atrinkti mėginiai turėtų atitikti plačią kokybės skalę. D_I turėtų būti ne didesnis kaip 1,5 (taikant 5 balų skalę).

Valstybės narės privalo pranešti apie visus sunkumus, pasitaikančius taikant šią procedūrą.

Jei nustatoma, kad atskirų vertintojų nuokrypio arba pakartojamumo indeksai yra didesni kaip 1,5, oficialiosios institucijos ekspertas (-ai) per kelias sekančias savaites turi atlikti vieną arba daugiau atsitiktinių pakartotinių tų vertintojų patikrinimų, naudojant pačių ekspertų įvertintus mėginius, arba atlikti vieną arba daugiau „lydimųjų“ tikrinimų. Būtina atidžiai stebėti norint nuspręsti, ar toliau juos samdyti. Rezultatai turėtų būti patvirtinti dokumentais ir saugomi kaip paskesnių priemonių įrodymas.

▼B

C. SKIRTINGUOSE VALSTYBĖS NARĖS REGIONUOSE IR SKIRTINGOSE VALSTYBĖSE NARĖSE GAUTŲ REZULTATŲ PALYGINIMAS

Jei įmanoma, ne rečiau kaip kartą per metus turi būti parengtas tyrimas skirtingų regionų vertintojų gautiems rezultatams palyginti. Jei stebimi dideli skirtumai, reikėtų imtis priemonių šių skirtumų priežastims nustatyti ir palyginamiems rezultatams gauti.

Valstybės narės gali surengti tyrimus jų ir kaimyninių valstybių narių vertintojų gautiems rezultatams palyginti. Esant dideliems skirtumams, reikėtų atlikti išsamesnį tyrimą, kurio tikslas būtų gauti palyginamus rezultatus.

Valstybės narės turėtų pranešti Komisijai šių palyginamųjų tyrimų rezultatus.

▼B

IV PRIEDAS

(4 straipsnis)

JUSLINIS SVIESTO VERTINIMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Šios sviesto juslinio vertinimo procedūros tikslas – nustatyti vienodą metodą, taikomą visose valstybės narėse.

Papildomos detalės pateiktos galiojančio tarptautinio IDF pieno ir pieno produktų standarto IDF 99 1, 2 ir 3 dalyse.

2. APIBRĖŽTYS

Juslinis vertinimas (vertinimas) – produkto savybių tikrinimas jutimo organais.

Vertinimo komisija – grupė atrinktų vertintojų, kurie vertinimo metu nebendrauja ir nedaro įtakos vienas kitam.

Vertintojas – asmuo, pasirinktas dėl jo (jos) sugebėjimo atlikti juslinį tyrimą. Šio tipo vertintojo patyrimas gali būti ribotas.

Vertintojas ekspertas – apibrėžiamas kaip jusliškai labai jautrus asmuo, įsisavinęs juslinio vertinimo metodus, sugebantis nuosekliai ir patikimai jusliškai vertinti įvairius produktus. Šio tipo vertintojas turės ilgalaikę juslinę atmintį.

Vertinimas balais – vertinimo komisijos atliekamas juslinis vertinimas taikant skaitmeninė skalę. Turi būti naudojama defektų nomenklatūra.

Rūšiavimas – vertinimu balais pagrįsta kokybės klasifikacija.

Kontrolės dokumentai – dokumentai, kuriuose registruojami atskiri kiekvienos produkto savybės įvertinimo balai ir galutinė produkto rūšis. (Be to, šis dokumentas gali būti naudojamas produkto cheminei sudėčiai įrašyti).

3. LABORATORIJA

Daugiau informacijos pateikta ISO 8589 ir ISO/DIS 22935–2 IDF 99–2 7 dalyje.

Būtina imtis priemonių, kad vertintojai laboratorijoje nebūtų veikiami išorės veiksnių.

Laboratorijoje turi nebūti pašalinių kvapų, ir ji turi būti lengvai valoma. Jos sienos turi būti šviesios spalvos ir neatspindėti šviesos.

Laboratorija ir jos apšvietimas neturi daryti įtakos produkto vertinimui.

Patalpoje turi būti temperatūros reguliavimo priemonės, kad būtų galima užtikrinti pastovią sviesto temperatūrą. Rūšiavimo metu sviesto temperatūra turėtų būti 12 °C (±2 °C).

4. VERTINTOJŲ ATRANKA

Vertintojas turi nusimanyti apie sviesto produktus ir gebėti atlikti juslinį sviesto rūšiavimą. Jo (jos) kompetenciją turi reguliariai (ne rečiau kaip kartą per metus) tikrinti kompetentinga institucija.

4.1. Reikėtų susipažinti su bendraisiais reikalavimais ir atrankos testų, kurie gali būti naudojami prieš oficialiąją naujo vertintojo darbo pradžią, reikalavimais, pateiktais ISO/DIS 22935–1IDF 99–1 4 dalyje (komplektavimas) ir 5.1 dalyje.

Svarbu, kad mokymas būtų tęstinis; reguliariai turėtų būti rengiamos bendrosios sesijos. Informacija apie vertinimo komisijos mokymą pateikta ISO 8586–1.

▼B

4.2. Pradinį mokymą turėtų sudaryti šie dalykai:

— juslinio vertinimo bendroji teorija ir praktinė svarba,

— metodai, skalės ir juslinių pojūčių aprašymas,

— juslinių savybių aptikimas bei atpažinimas ir specifiniai jusliniai terminai,

— sviesto gamybos pagrindų mokymas,

— patvirtinti etalonai ir pavyzdžiai, kurie padėtų vertintojui identifikuoti produkto specifinius skonius ir skonio intensyvumą.

5. REIKALAVIMAI KOMISIJAI

Vertintojų skaičius komisijoje turi būti nelyginis ir ne mažesnis kaip trys. Dauguma jų turi būti kompetentingos institucijos darbuotojai arba įgaliotieji asmenys, nedirbantys pieno pramonėje.

Vertintųjų komisijos vadovas yra atsakingas už visą procedūrą ir gali dalyvauti komisijoje.

Siekiant užtikrinti optimalų vertintojų atliekamą vertinimą, būtina atsižvelgti į keletą veiksnių:

— vertintojai turi nesirgti ligomis, kurios galėtų turėti įtakos jų darbui. Tokiu atveju sergantis vertintojas turi būti pakeistas kitu,

— vertintojai turi laiku pradėti vertinimą ir turėti pakankamai laiko vertinimui atlikti,

— vertintojai turi nenaudoti stipriai kvepiančių medžiagų, pvz., kvepalų, losjonų po skutimosi, dezodorantų ir kt., nevalgyti aštraus (pvz., daug prieskonių turinčio) maisto ir kt.,

— likus pusvalandžiui iki vertinimo pradžios, vertintojai turi nerūkyti, nevalgyti ir negerti nieko, išskyrus vandenį.

6. VERTINIMAS

Visi vertintojai turėtų dalyvauti reguliarių juslinio vertinimo komisijų darbe kompetencijai patvirtinti. Dažnumas priklausys nuo sviesto kiekio bei gamybos apimčių; jei įmanoma, komisija turėtų rinktis kartą per mėnesį.

Vyresnieji vertintojai turėtų dar dalyvauti keliose komisijose kasmet ir, jei įmanoma, kartą per ketvirtį.

7. MĖGINIŲ ĖMIMAS IR MĖGINIŲ RUOŠIMAS

Svarbu, kad mėginio tapatumas būtų nežinomas atliekant vertinimą ir tokiu būdu būtų išvengta galimo šališkumo. Mėginiai turėtų būti koduoti.

Tai turėtų būti atliekama prieš vertinimo pradžią. Reikalaujama, kad būtų nustatyta į laboratoriją transportuojamo sviesto temperatūra (6 °C ±2 °C).

Kai juslinis vertinimas atliekamas šaldomoje patalpoje, mėginys paimamas sviesto ėmikliu. Jei juslinis vertinimas atliekamas ne šaldomoje patalpoje, o kitoje vietoje, reikėtų paimti bent 500 g mėginį. Įvertinimo metu sviesto temperatūra turėtų būti 12 °C (±2 °C) (ISO/DIS 22935–2 IDF 99–2 sviesto temperatūra įvertinimo metu yra 14 °C ± 2 °C). Visais būdais reikėtų vengti didesnių nukrypimų.

8. KIEKVIENOS SAVYBĖS VERTINIMAS

8.1. Juslinis vertinimas turi būti atliekamas pagal šias tris savybes: išvaizdą, konsistenciją ir skonį.

Išvaizdai priskiriamos šios savybės: spalva, matomas grynumas, fizinių teršalų nebuvimas, pelėsių nebuvimas ir vandens dispersijos vienalytiškumas. Vandens dispersija tikrinama pagal IDF standartą 112A/1989.

▼B

Konsistencijai priskiriamos šios savybės: tirštis, tekstūra ir kietumas. Tepumas gali būti kontroliuojamas fizikinėmis priemonėmis, jei valstybė narė to pageidautų, siekdama patenkinti užsakovų reikalavimus. Komisija gali nuspręsti ateityje šiuos metodus suderinti.

Tirštis – terminas, kuris rodo produkto rišlumą jį valgant. Paprastai jis yra susijęs su kietumu bei tepumu; viso produkto tirštis turėtų būti vienodas. Jis yra labai susijęs su tekstūra ir rodo produkto gebą išlaikyti savo paties svorį. Jo požymis – atsparumas pjovimui; tirštis gali būti išmatuotas mechaniškai ir burnos bei pirštų pojūčiais.

Skonis – burna jaučiama savybė, daugiausia liežuvio skonio receptoriais.

Aromatas – nosimi ir uosle užuodžiama savybė.

Dideli nuokrypiai nuo rekomenduojamos temperatūros trukdo patikimai įvertinti konsistenciją ir aromatą. Temperatūra yra ypatingos svarbos sąlyga.

Sviesto rūšiavimas turi būti atidėtas, jei temperatūra neatitinka rekomenduojamo intervalo.

8.2. Kiekviena savybė turi būti vertinama atskirai. Balai skiriami pagal 1 lentelę.

8.3. Norėdami vertinti vienodai, prieš vertinimo pradžią vertintojai gali kartu įvertinti vieno ar kelių etaloninių mėginių išvaizdą, konsistenciją ir skonį.

8.4. Priėmimui būtinas vertinimas balais:

Žr. 7 dalį, kurioje pateikta nomenklatūra ir aprašyti kriterijai, kurie taikomi balams atliekant vertinimą.

	Didžiausias	Reikiamas
Išvaizda	5	4
Konsistencija	5	4
Skonis ir aromatas	5	4

— Kai reikiama balų skaičius negaunamas, turi būti pateiktas defekto apibūdinimas.

— Į kontrolės dokumentą įrašomi kiekvieno vertintojo už kiekvieną savybę skirti balai.

— Produktas yra priimamas arba atmetamas daugumos sprendimu.

— Atvejai, kai atskirų vertintojų skirtas kiekvienos produkto savybės vertinimas balais skiriasi daugiau kaip vienu balu, neturėtų būti dažni (ne dažniau kaip kartą per 20 mėginių). Priešingu atveju komisijos pirmininkas turėtų patikrinti komisijos kompetenciją.

9. PRIEŽIŪRA

Komisijos pirmininkas, kuris turi būti oficialus kompetentingos institucijos darbuotojas ir gali būti komisijos narys, paprastai turi atsakyti už visą procedūrą. Jis (ji) į kontrolinius dokumentus turi įrašyti atskirus kiekvienos savybės balus ir patvirtinti, ar produktas priimtas, ar atmestas.

10. NOMENKLATŪRA

Žr. pridedamą 2 lentelę.

11. NUORODOS

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

1 lentelė

Sviesto vertinimas balais

Išvaizda			Konsistencija			Skonis ir aromatas		
Balai	Nr. (1)	Pastabos	Balai (kokybės klasė)	Nr. (1)	Pastabos	Balai (kokybės klasė)	Nr. (1)	Pastabos
5		*Labai gera* puiki aukščiausios kokybės (vienodai sausa)	5		*Labai gera* puiki aukščiausios kokybės (gero tepumo)	5		*Labai geras* puikus aukščiausios kokybės (absoliučiai grynas, puikus aromatas)
4		*Gera* (2) nėra akivaizdžių defektų	4	 17 18	*Gera* (2) kieta minkšta	4		*Geras* (2) nėra akivaizdžių defektų
3	 1 2 3 4 5 6 7 8	*Patenkinama (nedideli defektai)* išsiskyrusi (laisva), drėgmė nevienoda, dvispalvė sluoksniuota, dryžuota marga, marmurinė dėmėta išsiskyrę skysti riebalai per daug dažų silpna, atvira tekstūra	3	 14 15 16 17 18	*Patenkinama (nedideli defektai)* trapi, puri panaši į tešlą, riebalinga tąsi, lipni kieta minkšta	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Patenkinamas (nedideli defektai)* negrynas pašalinis prieskonis rūgštus perpasterizuotos grietinėlės, svilėsių prieskonis pašarų prieskonis kartus persūdytas
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Bloga (akivaizdūs defektai)* išsiskyrusi (laisva) drėgmė sluoksniuota, dryžuota marga, marmurinė marga, dėmėta išsiskyrę skysti riebalai pašalinės medžiagos pelėsiai neištirpusi druska	2	 14 15 16 17 18	*Bloga (akivaizdūs defektai)* trapi, puri panaši į tešlą, riebalinga tąsi, lipni kieta minkšta	2	 21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Blogas (akivaizdūs defektai)* negrynas pašalinis prieskonis senstelėjusio sviesto rūgštus oksidacijos, metalo prieskonis pašarų prieskonis kartus persūdytas paduseęs, puvėsių prieskonis chemikalų prieskonis
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Labai bloga (dideli defektai)* išsiskyrusi (laisva) drėgmė sluoksniuota, dryžuota marga, marmurinė dėmėta išsiskyrę skysti riebalai per daug dažų grūdėta pašalinės medžiagos pelėsiai neištirpusi druska	1	 14 15 16 17 18	*Labai bloga (dideli defektai)* trapi, puri panaši į tešlą, riebalinga tąsi, lipni kieta minkšta	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Labai blogas (dideli defektai)* pašalinis prieskonis sūrio prieskonis rūgštus mielių prieskonis pelėsių prieskonis aitrus, apkartęs aliejaus, žuvies prieskonis lajaus prieskonis oksidacijos, metalo prieskonis kartus persūdytas paduseęs, puvėsių prieskonis salyklo prieskonis chemikalų prieskonis

(1) 2 lentelė.
(2) Defektai, nurodyti apibūdinant gerą kokybę, yra tik nedideli nukrypimai nuo labai geros kokybės.

▼B

2 lentelė

Sviesto defektų lentelė

I.	Išvaizda
1.	išsiskyrusi (laisva) drėgmė
2.	nevienoda, dvispalvė
3.	sluoksniuota, dryžuota
4.	marga, marmurinė
5.	marga, dėmėta
6.	išsiskyrę skysti riebalai
7.	per daug dažų
8.	silpnos (atviros tekstūros)
9.	grūdėta
10.	pašalinės medžiagos
11.	pelėsiai
12.	neištirpusi druska
II.	Konsistencija
14.	trapi, puri
15.	panaši į tešlą, riebalinga
16.	tąsi, lipni
17.	kieta
18.	minkšta
III.	Skonis ir aromatas
20.	be skonio
21.	negrynas ([1])
22.	pašalinis prieskonis
23.	senstelėjusio sviesto
24.	sūrio prieskonis
25.	rūgštus
26.	mielių prieskonis
27.	a) perpasterizuotos grietinėlės prieskonis
	b) svilėsių prieskonis
28.	pelėsių prieskonis
29.	aitrus, apkartęs
30.	aliejaus, žuvies prieskonis
31.	lajaus prieskonis
32.	a) oksidacijos prieskonis
	b) metalo prieskonis
33.	pašarų prieskonis
34.	kartus
35.	persūdytas
36.	paduseęs, puvėsių prieskonis
37.	salyklo prieskonis
38.	chemikalų prieskonis

([1]) Šis apibūdinimas turėtų būti vartojamas kaip galima rečiau, ir tik tais atvejais, kai defekto negalima apibūdinti tiksliau.

▼B

V PRIEDAS

(5 straipsnis)

ENANTO RŪGŠTIES TRIGLICERIDO KIEKIO SVIESTE, LYDYTAME SVIESTE IR GRIETINĖLĖJE NUSTATYMAS TAIKANT DUJŲ CHROMATOGRAFINĘ TRIGLICERIDŲ ANALIZĘ

1. TAIKYMO SRITIS

Šiame metode aprašyta enanto rūgšties trigliceridо kiekio lydytame svieste, svieste ir grietinėlėje nustatymo procedūra.

2. TERMINAS IR APIBRĖŽTIS

Enanto rūgšties kiekis – enanto rūgšties trigliceridо kiekis, nustatytas taikant šiame metode nurodytą procedūrą.

Pastaba: Enanto rūgšties kiekis yra išreikštas kg tonai lydyto sviesto arba sviesto ir kg tonai pieno riebalų, jei produktas yra grietinėlė.

3. METODO ESMĖ

Pieno riebalai ekstrahuojami iš įvairių produktų pagal ISO 14156 IDF 172:2001. Enanto rūgšties trigliceridо kiekis ekstrahuotuose riebaluose nustatomas kapiliarinės dujų chromatografijos (GC) metodu. Ėminiui gautas rezultatas įvertinamas pagal heksano rūgšties trigliceridą, kaip vidinį etaloną.

Pastaba: Buvo nustatyta, kad kaip vidinis etalonas dar tinka glicerolio tributanoatas.

4. REAGENTAI

Naudojami tik analitiškai gryni reagentai.

4.1. n-heksanas

4.2. Heksano rūgšties trigliceridо etalonas, ne mažesnio kaip 99 % grynumo

4.3. Enanto rūgšties trigliceridо etalonas, ne mažesnio kaip 99 % grynumo

4.4. Bevandenis natrio sulfatas (Na_2SO_4)

5. APARATŪRA

Įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

5.1. Analizės svarstyklės, kurių tikslumas 1 mg

5.2. Matavimo kolbos, 10 ml ir 20 ml talpos

5.3. Centrifugavimo mėgintuvėliai, 30 ml talpos

5.4. Sukamasis garintuvas

5.5. Krosnis, galinti veikti 50 °C ± 2 °C temperatūroje

5.6. Vidutinio tankumo filtravimo popierius, skersmuo apie 15 cm

5.7. Dujų chromatografinė įranga

5.7.1. Dujų chromatografas, kurio injektorius su dalijimu (be dalijimo) arba injektorius ant kolonėlės (on-column), ir liepsnos jonizacinis detektorius (FID)

5.7.2. GC kolonėlė, kurios nejudančioji fazė buvo sėkmingai naudojama trigliceridams atskirti (100 % dimetilpolisiloksanas arba 5 % fenil- ir 95 % metilpolisiloksano). Nejudančioji fazė, kolonėlės ilgis (nuo 4 m iki 15 m), vidinis skersmuo (nuo 0,22 mm iki 0,50 mm) ir plėvelės storis (0,12 μm arba didesnis) pasirenkami atsižvelgiant į laboratorijos patyrimą ir naudojamą įpurškimo sistemą. Bet kuriuo atveju pasirinkta kolonėlė turi visiškai atskirti tirpiklio smailę ir heksano rūgšties trigliceridо smailę ir iki bazinės linijos atskirti heksano ir enanto rūgščių smailes. Toliau pateikiami taikytinų sąlygų pavyzdžiai.

▼B

5.7.2.1. Naudojant injektorių su dalijimu taikytinų reikalavimų pavyzdys:

— nešančiosios dujos – helis

— dujų tiekimo į kolonėlę slėgis – 100 kPa

— kolonėlė: ilgis 12 m, vidinis skersmuo 0,5 mm, plėvelės storis 0,1 μm, lydyto kvarco kolonėlė

— nejudančioji fazė: 100 % dimetilpolisiloksanas arba 5 % fenil- ir 95 % metilpolisiloksano (pvz., HT5)

— kolonėlės temperatūra: pradinė temperatūra 130 °C, išlaikoma 1 min, 20 °C/min sparta keliama iki 260 °C ir dar keliama 30 °C/min sparta iki 360 °C; 10 min išlaikoma 360 °C temperatūra

— detektoriaus temperatūra – 370 °C

— injektoriaus temperatūra – 350 °C

— dalijimo santykis – 1:30

— įpurškiamo mėginio tūris – 1 μl.

5.7.2.2. Naudojant injektorių ant kolonėlės taikytinų reikalavimų pavyzdys

— nešančiosios dujos – vandenilis (pastovaus srauto sistema)

— dujų tiekimo į kolonėlę slėgis – 89 kPa

— kolonėlė: ilgis 4 m, vidinis skersmuo 0,32 mm, plėvelės storis 0,25 μm, lydyto kvarco kolonėlė

— nejudančioji fazė: 5 % fenil- ir 95 % metilpolisiloksano

— kolonėlės temperatūra: pradinė temperatūra 60 °C, išlaikoma 2 min, keliama 35 °C/min sparta iki 340 °C, šie temperatūra išlaikoma 5 min

— detektoriaus temperatūra – 350 °C

— įpurškiamo mėginio tūris – 1 μl.

5.8. Įpurškiama švirkštu, kurio talpa 5 μl.

6. ĖMINIŲ ĖMIMAS

Svarbu, kad į laboratorija būtų siunčiamas tikrai reprezentatyvus ėminys ir jis neturi sugesti arba pakisti vežant arba laikant.

Ėminių ėmimas nėra šiame tarptautiniame standarte apibrėžto metodo sudėtinė dalis. Rekomenduojamas ėminių ėmimo metodas IDF standarte 50C arba ISO 707:1997 *Pienas ir pieno produktai. Mėginių ėmimo taisyklės*.

7. PROCEDŪRA

7.1. **Ėminio ir mėginio ruošimas**

Daroma pagal ISO 14156 IDF 172:2001.

7.1.1. *Lydytas sviestas ir sviestas*

7.1.1.1. Krosnyje išlydoma (5.5) 50–100 g bandinio.

7.1.1.2. Į sulankstyta filtravimo popierių (5.5) įdedama nuo 0,5 iki 1,0 g bevandenio natrio sulfato (5.4).

7.1.1.3. Riebalai filtruojami per filtravimo popierių ir bevandenį natrio sulfatą, filtratas surenkamas į krosnyje (5.5) laikomą stiklinę. Reikia žiūrėti, kad sulydytą sviestą dekantuojant ant filtravimo popieriaus, ant jo nepatektų išrūgos.

7.1.2. *Grietinėlė*

7.1.2.1. Nustatoma 20 °C ± 2 °C ėminio temperatūra.

7.1.2.2. Ėminys gerai sumaišomas arba supurtomas.

7.1.2.3. Reikiamas ėminio kiekis skiedžiamas, kad būtų gauta 100 ml mėginio, kuriame riebalų masės dalis būtų apie 4 %.

▼B

7.1.2.4. Grietinėlės riebalams ekstrahuoti reikia daryti taip, kaip daroma kaip su žaliu pienu ir homogenizuotu pienu (žr. ISO 14156 IDF 172:2001, 8.3 skirsnį).

7.1.2.5. Į 10 ml matavimo kolbą (5.2) 1 mg tikslumu pasveriama 1 g ekstrahuotų riebalų. Įpilama 1 ml 7.2.2 tirpalo. Skiedžiama iki 10 ml n-heksanu (4.1) ir sumaišoma.

7.1.2.6. 1 ml 7.1.2.5 tirpalo įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.2) ir skiedžiama iki 10 ml n-heksanu (4.1).

7.2. **Kalibravimo etalonų ruošimas**

7.2.1. 100 mg enanto rūgšties trigliceridо (4.3) ištirpinama 10 ml n-heksano (4.1).

7.2.2. 100 mg heksano rūgšties trigliceridо (4.2) ištirpinama 10 ml n-heksano (4.1).

7.2.3. 1 ml 7.2.2 tirpalo įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.2). Skiedžiama iki 10 ml n-heksanu (4.1).

7.2.4. 1 ml 7.2.1 tirpalo ir 1 ml 7.2.2 tirpalo įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.2). Skiedžiama iki 10 ml n-heksanu (4.1).

7.2.5. 1 ml 7.2.4 tirpalo įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.2) ir skiedžiama iki 10 ml n-heksanu (4.1).

7.3. **Chromatografinis nustatymas**

7.3.1. Du kartus įpurškiama po 1 µl etaloninio tirpalo 7.2.5.

7.3.2. Įpurškiama po 1 µl kiekvieno mėginio tirpalo.

Pastaba: Jei naudojama injektoriaus ant kolonėlės sistema, etaloniniai ir mėginių tirpalai turėtų būti skiedžiami labiau.

7.3.3. Įpurškus 3 mėginius, kartojamas 7.3.1 veiksmas, kad po du etalonų mėginius būtų įpurkšta prieš mėginių įpurškimą ir po jo. Rezultatai apskaičiuojami pagal chromatogramose gautą etalonų atsako faktorių vidurkį.

8. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Integruojami kiekvienos chromatogramos smailių, atitinkančių enanto ir heksano rūgščių trigliceridus, plotai.

Kiekvienai sekai laikomasi šių instrukcijų, t. y. mėginių rinkiniui: etalonas, kuris įpurškiamas du kartus prieš pat mėginius, yra pažymimas STD_1, o etalonas, įpurškiamas du kartus iš karto po mėginių, yra pažymimas STD_2.

8.1. **Kalibravimas**

8.1.1. Apskaičiuojamas kiekvienos STD_1 poros atsako faktorius Rf_1a irRf_1b:

Rf_1 a arba b = (heksano rūgšties trigliceridо smailės plotas/enanto rūgšties trigliceridо smailės plotas) × 100

Apskaičiuojamas vidutinis atsako faktorius Rf_1:

$$Rf_1 = (Rf_1a + Rf_1b) / 2$$

8.1.2. Panašiai apskaičiuojamas vidutinis STD_2 atsako faktorius Rf_2.

8.1.3. Apskaičiuojamas vidutinių atsako faktorių vidurkis Rf:

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

8.2. **Mėginiai**

Pagal kiekvieno mėginio chromatogramą, gautą tarp STD_1 ir STD_2, apskaičiuojamas enanto rūgšties kiekis C (kg/t):

C = (enanto rūgšties trigliceridо smailės plotas × Rf × 100)/(heksano rūgšties trigliceridо smailės plotas × Wt × 1 000),

čia:

— Wt – paimtų riebalų masė (g),

— 100 – mėginio skiedimo tūris,

— 1 000 – perskaičiavimo faktorius (µg/g į kg/t).

▼B

Jei tai sviesto mėginiai, atsižvelgiama į riebalų kiekį svieste ir apskaičiuojama pataisytoji koncentracijos vertė C_{butter} (kg/t sviesto)

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

čia F yra riebalų kiekis svieste.

9. TIKSLUMAS

Informacija apie sviesto tarplaboratorinį tyrimą ir tikslumo nustatymo metodą pagal ISO 5725–1 ir ISO 5725–2 yra pateikta 12 skyriuje.

Pakartojamumo ir atkuriamumo ribinės vertės atitinka 95 % pasikliovimo lygį ir gali netikti kitam nei nurodytas koncentracijos verčių intervalui ir kitoms matricoms.

9.1. **Pakartojamumas**

Dviejų atskirų analizių rezultatų, kuriuos vienas analitikas per trumpą laiką gavo toje pačioje laboratorijoje ir ta pačia įranga tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 0,35 kg/t.

9.2. **Atkuriamumas**

Dviejų atskirų analizių rezultatų, kuriuos skirtingi analitikai gavo skirtingose laboratorijose, dirbdami su skirtinga įranga ir tai pačiai bandomajai medžiagai taikydami tą patį metodą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 0,66 kg/t.

10. LEIDŽIAMŲJŲ NUOKRYPŲ RIBOS. APATINĖS RIBOS (NEPAKANKAMŲ KIEKIŲ ATVEJIS)

10.1. **Žymėjimo vienalytiškumui tikrinti turi būti imami trys atsekamąją medžiagą turinčio produkto ėminiai.**

10.2. **Sviestas ir koncentruotas sviestas**

10.2.1. Pridėjimo norma yra 11 kg ne mažesnio kaip 95 % grynumo enanto rūgšties triglicerido vienai tonai sviesto, t. y. 10,45 kg/t.

10.2.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 9,51 kg/t (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai enanto rūgšties triglicerido grynumas 95 %, atskiras nustatymas),

— 6,89 kg/t (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai enanto rūgšties triglicerido grynumas 95 %, atskiras nustatymas),

— mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 9,51 kg/t ir 6,89 kg/t.

10.3. **Grietinėlė**

10.3.1. Pridėjimo norma yra 10 kg ne mažesnio kaip 95 % grynumo enanto rūgšties triglicerido vienai tonai pieno riebalų, t. y. 9,50 kg/t pažymėtų pieno riebalų.

10.3.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 8,60 kg/t (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai enanto rūgšties triglicerido grynumas 95 %, atskiras nustatymas),

— 6,23 kg/t (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai enanto rūgšties triglicerido grynumas 95 %, atskiras nustatymas),

▼B

— mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 8,60 kg/t ir 6,23 kg/t.

11. LEIDŽIAMŲJŲ NUOKRYPŲ RIBOS. VIRŠUTINĖS RIBOS (ATVEJIS, KAI PRIDĖJIMO NORMA VIRŠYTA DAUGIAU KAIP 20 %)

11.1. **Žymėjimo vienalytiškumui tikrinti turi būti imami trys atsekamąją medžiagą turinčio produkto ėminiai.**

11.2. **Sviestas ir koncentruotas sviestas**

11.2.1. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— viršutinė riba 12,96 kg/t.

11.3. **Grietinėlė**

11.3.1. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— viršutinė riba 11,82 kg/t.

12. PAPILDOMA INFORMACIJA. REZULTATŲ, GAUTŲ TRIGLICERIDŲ ANALIZĖS BŪDU NUSTATANT TRIENANTOATO KIEKĮ SVIESTO RIEBALUOSE, STATISTINĖ ANALIZĖ

Buvo atlikti keturi tarplaboratoriniai tyrimai trienantoato kiekiui žymėtame svieste nustatyti.

Devynios laboratorijos dalyvavo atliekant 1-ąjį tarplaboratorinį tyrimą ir nebuvo pateikta jokių specifikacijų dėl taikytinų analizės metodų.

Dešimt laboratorijų dalyvavo atliekant 2-ąjį tarplaboratorinį tyrimą ir buvo taikomi 4 skirtingi metodai:

— metilheptanoato kiekybinis nustatymas naudojant n-nonaną arba metilnonanoatą kaip vidinį etaloną,

— trienantoato kiekybinis nustatymas naudojant triheksanoatą kaip vidinį etaloną,

— metilheptanoato kiekybinis nustatymas naudojant kalibravimo mėginį (mišinį),

— metilheptanoato kiekybinis nustatymas naudojant kalibravimo mišinį.

Be to, jei buvo analizuojamas riebalų rūgščių metilesteris (FAME), buvo taikomos dvi skirtingos metilinimo procedūros (*De Francesco* ir *Christopherson & Glass*).

Atsižvelgiant į gautus rezultatus, 3-ajam tarplaboratoriniam tyrimui buvo pasirinkti du metodai:

— metilheptanoato kiekybinis nustatymas naudojant n-nonaną arba metilnonanoatą kaip vidinį etaloną,

— trienantoato kiekybinis nustatymas naudojant triheksanoatą kaip vidinį etaloną.

7 laboratorijų rezultatai parodė, kad taikant FAME metodą kintamumas buvo didesnis, todėl buvo nuspręsta taikyti tik trienantoato kaip triglicerido nustatymą, jam kiekybiškai nustatyti naudojant triheksanoatą kaip vidinį etaloną. Be to, trigliceridо analizė turi būti atliekama naudojant kapiliarinę kolonėlę.

Atliekant 4-ąjį tarplaboratorinį tyrimą, buvo išdalinti keturi ėminiai (A, B, C, D), o rezultatus pateikė devynios laboratorijos (1 ir 2 lentelės).

▼B

Dvi laboratorijos (DE ir UE) analizavo ėminius, taikydamos FAME metodą.

Dėl mažesnio laboratorijų skaičiaus buvo atliktas viso duomenų rinkinio (1 ir 2 paveikslai), įskaitant FAME rezultatus, ir duomenų, gautų atliekant TG analizę, statistinis apskaičiavimas.

Riktų kriterijai:

— A ėminys. Dixon, Cochran ir Grubbs kriterijai, esant 1 ir 5 % reikšmingumo lygiams, parodė, kad riktas yra vienos laboratorijos rezultatas.

— B ėminys. Grubbs kriterijus, esant 5 % reikšmingumo lygiui, parodė, kad riktas yra vienos laboratorijos rezultatas.

— C ėminys. Dixon ir Grubbs kriterijai, esant 1 ir 5 % reikšmingumo lygiams, parodė, kad riktas yra vienos laboratorijos rezultatas.

— D ėminys. Dixon ir Grubbs kriterijai, esant 1 ir 5 % reikšmingumo lygiams, parodė, kad riktas yra vienos laboratorijos rezultatas.

Riktas nebuvo įtrauktas į apskaičiavimą.

Verta pastebėti, kad pagal taikytus kriterijus FAME metodu gauti rezultatai niekuomet nebuvo priskirti riktams.

Tikslumo parametrai

1 ir 2 lentelėse pateikti visų laboratorijų rezultatai ir tikslumo parametrai, apskaičiuoti priimtinam laboratorijų skaičiui (8), deja, gauti ne tuo pačiu analizės metodu.

3 ir 4 lentelėse pateikti TG metodu gauti rezultatai ir atitinkami tikslumo parametrai. Šių parametrų priimtinumas yra gautas mažam laboratorijų (6) skaičiui.

2 ir 3 paveiksluose pateiktas Sr ir SR, apskaičiuotų pagal pirmiau aprašytų 4 ėminių 2 duomenų rinkinius, kitimo vaizdas.

5 lentelėje pateiktos Sr bei SR vertės, atitinkamos visuminės vertės ir visuminiai r ir R parametrai.

Galiausiai buvo apskaičiuotas kritinis skirtumas, esant 95 % pasikliovimo lygiui.

1 lentelė

TG + FAME* metodų statistiniai rezultatai

A ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Riktai	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Vidutinė vertė	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Faktinė vertė	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	0,80
ËÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	Pakartojamumas r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Santykinis pakartojamumas r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,23
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %)	2,04
					Atkuriamumas R (95 %)	0,84
					Santykinis atkuriamumas R %	5,71

▼B

B ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Riktai	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Vidutinė vertė	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Faktinė vertė	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Pakartojamumas r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Santykinis pakartojamumas r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,35
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %)	2,61
					Atkuriamumas R (95 %)	0,99
					Santykinis atkuriamumas R %	7,31

2 lentelė

TG + FAME* metodų statistiniai rezultatai

C ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Riktai	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Vidutinė vertė	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Faktinė vertė	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Pakartojamumas r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Santykinis pakartojamumas r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,17
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %)	1,82
					Atkuriamumas R (95 %)	0,47
					Santykinis atkuriamumas R %	5,10
D ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Riktai	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Vidutinė vertė	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Faktinė vertė	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Pakartojamumas r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Santykinis pakartojamumas r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,24
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %)	11,43
					Atkuriamumas R (95 %)	0,67
					Santykinis atkuriamumas R %	32,00

▼B

3 lentelė

TG metodo statistiniai rezultatai

A ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Riktai	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Vidutinė vertė	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Faktinė vertė	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,09
ËÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Pakartojamumas r (95 %)	0,25
					Santykinis pakartojamumas r %	2,24
					Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,13
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %)	1,16
					Atkuriamumas R (95 %)	0,36
					Santykinis atkuriamumas R %	3,25
B ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Riktai	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Vidutinė vertė	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Faktinė vertė	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Pakartojamumas r (95 %)	0,42
					Santykinis pakartojamumas r %	3,16
					Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,33
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %)	2,48
					Atkuriamumas R (95 %)	0,93
					Santykinis atkuriamumas R %	6,94

4 lentelė

TG metodo statistiniai rezultatai

C ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Riktai	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Vidutinė vertė	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Faktinė vertė	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,15
ËÈLA	FI	9,4	9,6	9,5	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Pakartojamumas r (95 %)	0,42
					Santykinis pakartojamumas r %	4,51
					Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,19
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %)	2,04
					Atkuriamumas R (95 %)	0,53
					Santykinis atkuriamumas R %	5,71

▼B

D ėminys		R_1	R_2	Vidurkis	Laboratorijų, likusių pašalinus riktus, skaičius	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Riktų skaičius	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Riktai	DK
					Vidutinė vertė	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Faktinė vertė	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Pakartojamumo standartinis nuokrypis (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Santykinis pakartojamumo sn (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Pakartojamumas r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Santykinis pakartojamumas r %	12,01
					Atkuriamumo standartinis nuokrypis (SR)	0,25
					Santykinis atkuriamumo sn (RSDR %]	11,90
					Atkuriamumas R (95 %)	0,69
					Santykinis atkuriamumas R %	33,32

5 lentelė

Pakartojamumas ir atkuriamumas (taikant FAME*)

	Laboratorijų skaičius	Riktas	Pakartojamumas Sr (95 %)	Atkuriamumas SR (95 %)
A ėminys	8	1	0,09	0,23
B ėminys	8	1	0,14	0,35
C ėminys	8	1	0,14	0,17
D ėminys	8	1	0,08	0,24
Visuminė vertė			0,116	0,256
			R	**R**
Visuminė vertė* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Mažiausias nurodytas trienantoato grynumas – 95 %
Mažiausia nurodyta trienantoato norma sviesto riebaluose – 11 kg/t
Atsižvelgiant į kritinį skirtumą, kai pasikliovimo lygis 95 %, dviejų rezultatų vidurkis turi būti ne mažesnis kaip:

10,05 kg/t, jei pridedamas 95 % grynumo trienantoatas.

Pakartojamumas ir atkuriamumas (netaikant FAME)

	Laboratorijų skaičius	Riktas	Pakartojamumas Sr (95 %)	Atkuriamumas SR (95 %)
A ėminys	6	1	0,09	0,13
B ėminys	6	1	0,15	0,33
C ėminys	6	1	0,15	0,19
D ėminys	6	1	0,09	0,25
Visuminė vertė			0,124	0,237
			r	**R**
Visuminė vertė* 2,8			**0,347**	**0,663**

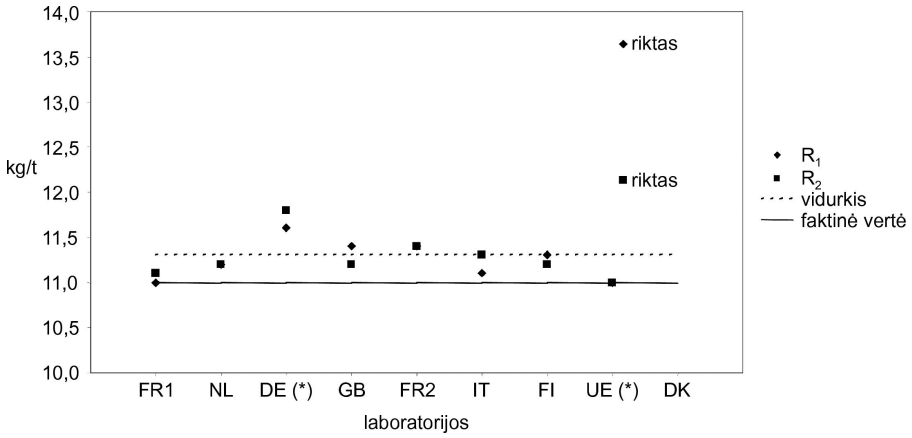
CrD95 = 0,36
Mažiausias nurodytas trienantoato grynumas – 95 %
Mažiausia nurodyta trienantoato norma sviesto riebaluose – 11 kg/t
Atsižvelgiant į kritinį skirtumą, kai pasikliovimo lygis 95 %, dviejų rezultatų vidurkis turi būti ne mažesnis kaip:

10,09 kg/t, jei pridedamas 95 % grynumo trienantoatas.

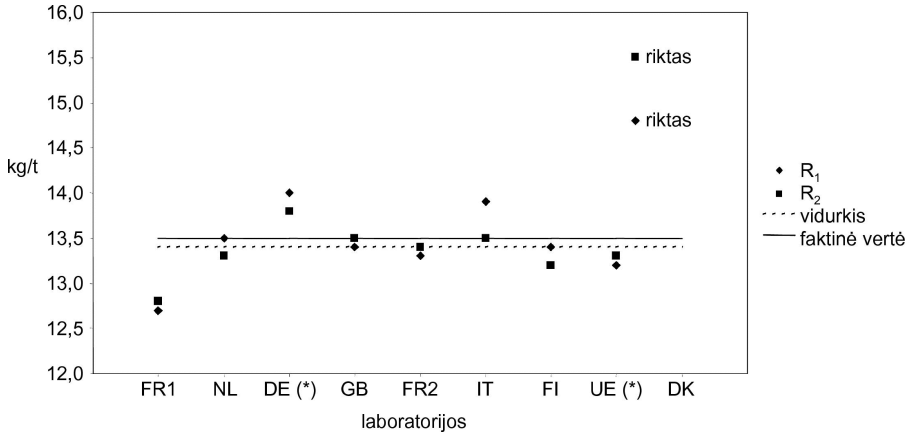
▼B

1 paveikslas (*)

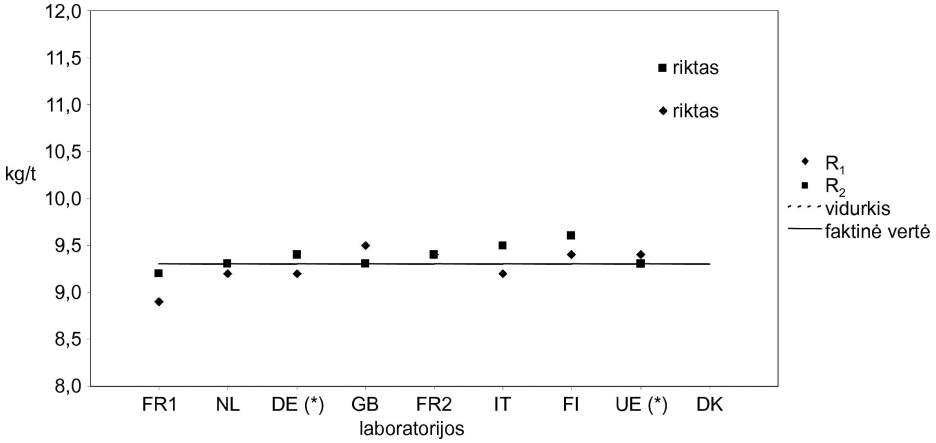
Tyrimų rezultatai. A ėminys



Tyrimų rezultatai. B ėminys



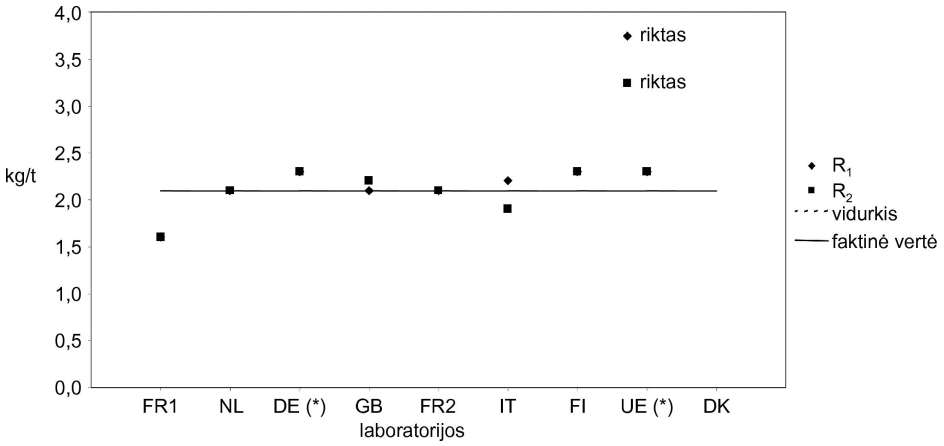
Tyrimų rezultatai. C ėminys



(*) = FAME metodas.

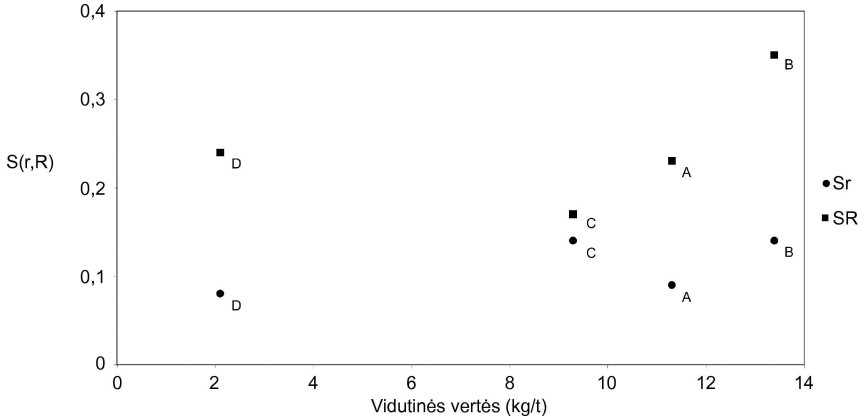
▼B

Tyrimų rezultatai. D ėminys



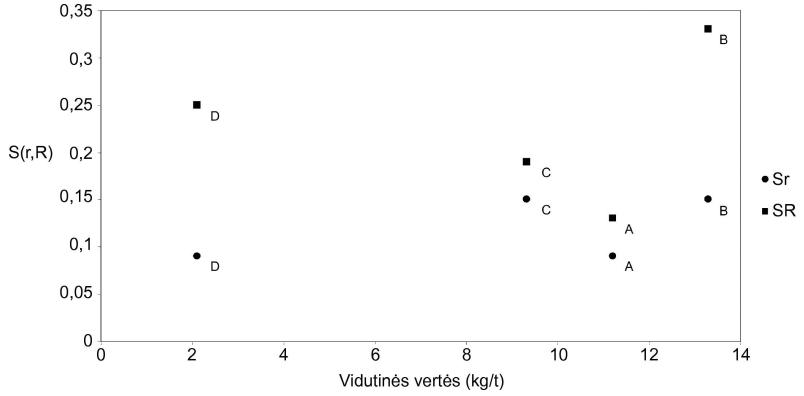
2 paveikslas

Pakartojamumo ir atkartojamumo standartinis nuokrypis esant skirtingai koncentracijai (TG + FAME)



3 paveikslas

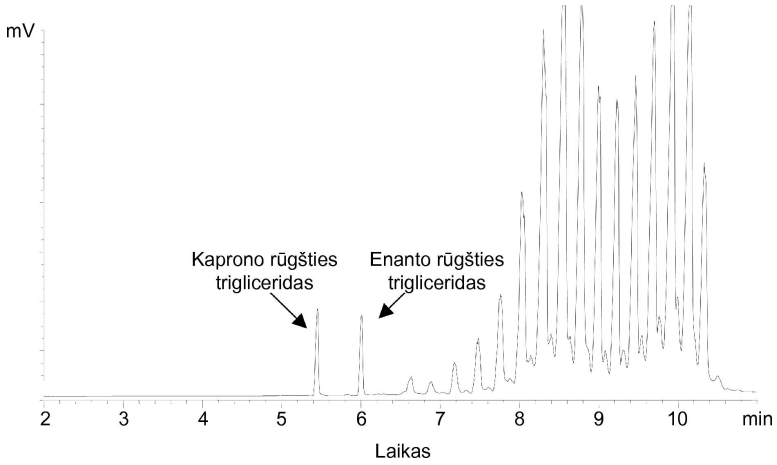
Pakartojamumo ir atkartojamumo standartinis nuokrypis esant skirtingai koncentracijai (TG)



▼B

4 paveikslas

Injektoriaus ant kolonėlės naudojimo pavyzdys



▼B

VI PRIEDAS

(5 straipsnis)

VANILINO KIEKIO NUSTATYMAS KONCENTRUOTAME SVIESTE, SVIESTE ARBA GRIETINĖLĖJE EFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU

1. TAIKYMO SRITIS

Aprašyta vanilino nustatymo koncentruotame svieste, svieste arba grietinėlėje metodo taikymo procedūra.

2. METODO ESMĖ

Žinomas mėginio kiekis ekstrahuojamas izopropilo alkoholio/etanolio/acetonitrilo mišiniu (1:1:2). Didesnė riebalų dalis nusodinama esant temperatūrai nuo –15 °C iki –20 °C, vėliau mišinys centrifuguojamas.

Centrifugatas skiedžiamas vandeniu ir vanilinas nustatomas efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu.

3. APARATŪRA

Įprastinė laboratorinė įranga, visų pirma:

3.1. Šaldiklis, kuriame temperatūrą nuo –15 °C iki –20 °C

3.2. Vienkartiniai 2 ml talpos švirkštai

3.3. Membraniniai mikrofiltrai, poros 0,45 μm dydžio, atsparūs 5 % ekstrakto tirpalui (4.4)

3.4. Skysčių chromatografijos sistema, kurią sudaro siurblys (1,0 ml/min srautas), injektorius (įpurkšti 20 μl, automatinio arba rankinio valdymo), UV detektorius (veikiantis esant 306 nm bangos ilgiui, 0,01 Å visa skalė), rašytuvas arba integratorius ir kolonėlės termostatas, nustatytas 25 °C temperatūrai

3.5. Analizės kolonėlė (250 mm × 4,6 mm ID) su LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) arba lygiaverte įkrova

3.6. Apsauginė kolonėlė (apie 20 mm × 3 mm ID), sausu būdu pripildyta LiChrospher RP 18 (nuo 5 iki 10 μm) arba lygiavertė

3.7. Centrifuga, veikianti 2 000 min^{-1} apsisukimų dažniu.

4. REAGENTAI

Visi naudojami reagentai turi būti analitiškai gryni.

4.1. Izopropilo alkoholis

4.2. Etanolis 96 % (tūrio)

4.3. Acetonitrilas

4.4. Ekstrahavimo tirpalas

Izopropilo alkoholio (4.1), etanolio (4.2) ir acetonitrilo (4.3) mišinys santykiu 1:1:2 (tūrio).

4.5. Vanilinas (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehidas) ≥ 98 %

4.5.1. *Pradinis vanilino tirpalas (= 500 μg/ml)*

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg (CM mg) vanilino (4.5), įpilama 25 ml ekstrahavimo tirpalo (4.4) ir skiedžiama vandeniu iki žymės.

4.5.2. *Etaloninis vanilino tirpalas (= 10 μg/ml)*

Pipete įpilama 5 ml pradinio vanilino tirpalo (4.5.1) į 250 ml matavimo kolbą ir skiedžiama vandeniu iki žymės.

4.5.3. *Metanolis, HPLC grynumo*

4.5.4. *Ledinė acto rūgštis*

4.5.5. *Vanduo, HPLC grynumo*

▼B

4.5.6. *HPLC judančioji fazė*

1 000 ml matavimo kolboje sumaišoma 300 ml metanolio (4.5.3), apie 500 ml vandens (4.8) ir 20 ml acto rūgšties (4.5.4) ir skiedžiama vandeniu (4.5.5) iki žymės. Mišinys filtruojamas per 0,45 μm filtrą (3.3).

5. PROCEDŪRA

5.1. **Mėginio ruošimas**

5.1.1. *Sviestas*

Ėminys šildomas tol, kol pradeda lydytis. Vengiama kaitinti aukščiau kaip maždaug 30 °C. Bet kokiu atveju negali susidaryti dvi ėminio fazės. Kai ėminys tampa pakankamai minkštas, jis homogenizuojamas purtant. Prieš paimant mėginį, sviesto ėminys maišomas 15 s. Į 100 ml talpos matavimo kolbą pasveriama 1 mg tikslumu apie 5g (SM g) sviesto.

5.1.2. *Koncentruotas sviestas*

Prieš imant mėginį indas su koncentruoto sviesto ėminiu dedamas į krosnį, įkaitintą nuo 40 °C iki 50 °C, ir laikomas joje tol, kol visiškai išsilydo. Ėminys maišomas sukant arba maišant, vengiant oro burbuliukų susidarymo dėl per stipraus maišymo. Į 100 ml matavimo kolbą pasveriama 1 mg tikslumu apie 4g (SM g) koncentruoto sviesto.

5.1.3. *Grietinėlė*

Ėminys šildomas 35–40 °C temperatūros vandens vonioje arba termostate. Riebalai paskirstomi tolygiai ėminį sukant ir, jei reikia, maišant. Ėminys greitai atšaldomas iki 20 ± 2 °C. Ėminys turėtų atrodyti vienalytis, priešingu atveju procedūrą reikėtų kartoti. Į 100 ml matavimo kolbą pasveriama 1 mg tikslumu apie 10g (SM g) grietinėlės.

5.2. **Tiriamojo tirpalo paruošimas**

Į mėginį (5.1.1, 5.1.2 arba 5.1.3), įpilama maždaug 75 ml ekstrahavimo tirpalo (4.4), maišoma arba smarkiai purtoma apie 15 min ir skiedžiama ekstrahavimo tirpalu (4.4) iki žymės. Apie 10 ml šio ekstrakto pilama į užkemšamą mėgintuvėlį. Mėgintuvėlis dedamas į šaldiklį (3.1) ir laikomas jame apie 30 min. Atšaldytas ekstraktas 5 min centrifuguojamas, esant maždaug 2 000 min^{-1} dažniui, ir tuoj pat dekantuojamas. Dekantuotas tirpalas paliekamas pasiekti kambario temperatūrą. 5 ml dekantuoto tirpalo pipete įpilama į 100 ml matavimo kolbą ir skiedžiama vandeniu iki žymės. Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per membraninį mikrofiltrą (3.3), naudojant švirkštą (3.2). Filtratas yra paruoštas HPLC analizei.

5.3. **Kalibravimas**

Į 100 ml matavimo kolbą pipete įpilama 5 ml etaloninio vanilino tirpalo (4.5.2). Įpilama 5 ml ekstrahavimo tirpalo (4.4) ir skiedžiama vandeniu iki žymės. Tirpalo koncentracija –0,5 μg/ml vanilino.

5.4. **HPLC analizė**

Chromatografinei sistemai leidžiama stabilizuotis apie 30 min. Įpurškiamas etaloninis tirpalas (5.3). Tai kartojama tol, kol vienas paskui kitą įpurškiamų tirpalų smailės ploto arba smailės aukščio skirtumas yra mažesnis kaip 2 %. Aprašytomis sąlygomis vanilino sulaikymo trukmė yra apie 9 min. Etaloninis tirpalas (5.3) analizuojamas du kartus, įpurškiant 20 μl. Įpurškiama 20 μl tiriamųjų tirpalų (5.2). Nustatomas gautos vanilino smailės plotas arba aukštis. Po 10 tiriamųjų tirpalų (5.2) įpurškimo vėl du kartus įpurškiamas etaloninis tirpalas (5.3).

6. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Apskaičiuojamas vidutinis vanilino smailių, gautų atliekant po du įpurškimus prieš ir po tiriamųjų tirpalų serijos įpurškimo, plotas arba aukštis (AC) (iš viso keturios ploto arba aukščio vertės).

▼B

Apskaičiuojamas atsako faktorius (R):

$$R = AC/CM$$

kai CM yra vanilino masė mg (4.5.1).

Vanilino kiekis (mg/kg) (C) mėginyje apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia:

AS = mėginio vanilino smailės plotas

SM = mėginio (5.1.1, 5.1.2 arba 5.1.3) masė, g.

Pastaba. Kai vanilinas nustatomas grietinėlėje, atsekamosios medžiagos koncentracija turi būti išreiškiama mg atsekamosios medžiagos/kg pieno riebalų. Tai daroma C dauginant iš 100/f. f – grietinėlės riebumas procentais (masės).

20 = etaloninio ir mėginio tirpalų skiedimo faktorius

0,96 = riebalų kiekio pataisos faktorius dėl mėginio pirmojo skiedimo.

Pastaba. Vietoje smailių ploto galima naudoti smailių aukštį (žr. 8.3).

7. METODO TIKSLUMAS

7.1. **Pakartojamumas (r)**

Dviejų analizių, vieno analitiko per kiek įmanomą trumpesnį laiko tarpą atliktų ta pačia aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, rezultatai neturi skirtis daugiau kaip 16 mg/kg.

7.2. **Atkuriamumas (R)**

Dviejų analizių rezultatų, gautų analitikams skirtingose laboratorijose ir skirtinga aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 27 mg/kg.

8. LEIDŽIAMŲJŲ NUOKRYPŲ RIBOS

8.1. Vienalytiškumui tikrinti turi būti imami trys atsekamąją medžiagą turinčio produkto ėminiai.

8.2. Kaip atsekamoji medžiaga naudojama vanilė arba sintetinis vanilinas.

8.2.1. 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehido pridėjimo norma yra 250 g tonai koncentruoto sviesto arba sviesto. Šios medžiagos pridėjimo norma grietinėlei pažymėti – 250 g tonai pieno riebalų.

8.2.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 220,8 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos),

— 158,3 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos).

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 220,8 mg/kg ir 158,3 mg/kg.

8.3. Kaip atsekamoji medžiaga naudojama vanilė, gauta tik iš vanilės pupelių arba jos vientisų ekstraktų.

8.3.1. 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehido pridėjimo norma yra 100g tonai koncentruoto sviesto arba sviesto. Šios medžiagos pridėjimo norma grietinėlei pažymėti – 100 g tonai pieno riebalų.

▼B

8.3.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 78,3 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos),

— 53,3 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos).

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 78,3 mg/kg ir 53,3 mg/kg.

9. PASTABOS

9.1. Pridėto vanilino atgavimo laipsnis, kai koncentracija 250 mg/kg lydyto sviesto, svyruoja nuo 97,0 iki 103,8 %. Vidutinis nustatytas kiekis buvo 99,9 %, kai standartinis nuokrypis 2,7 %

9.2. Siekiant kompensuoti smailės platėjimą dėl mėginio tirpale esančio 5 % ekstrahavimo tirpalo, etaloniniame tirpale irgi yra 5 % ekstrahavimo tirpalo. Taip galima atlikti kiekybinį nustatymą pagal smailės aukštį.

9.3. Analizė atliekama pagal kalibravimo tiesę, kertančią koordinačių pradžią.

9.4. Tiesiškumas turėtų būti tikrinamas pirmą kartą atliekant analizę ir vėliau reguliariais laiko tarpais ir po HPLC įrangos pakeitimų arba remonto, naudojant tinkamai atskiestą etaloninį tirpalą (4.5.2). Veikiant būdingiems fermentams, vanilinas nepasterizuotoje grietinėlėje arba jos produktuose gali virsti vanilino rūgštimi, divanilinu ir kitais junginiais.

▼B

VII PRIEDAS

(5 straipsnis)

BETA-APO-8'-KAROTINO RŪGŠTIES ETILESTERIO KONCENTRUOTAME SVIESTE IR SVIESTE NUSTATYMAS SPEKTROSKOPIJOS METODU

1. TAIKYMO SRITIS

Aprašyta kiekybinio β-apo-8'-karotino rūgšties etilesterio (apokarotino esterio) nustatymo koncentruotame svieste ir svieste metodo taikymo procedūra. Apokarotino esteris yra suma visų cheminių medžiagų, esančių pagal šią metodiką gautame mėginio ekstrakte ir absorbuojančių 440 nm bangos ilgio šviesą.

2. METODO ESMĖ

Pieno riebalai tirpinami petroleteryje ir matuojama jų absorbcija esant 440 nm bangos ilgiui. Apokarotino esterio kiekis nustatomas pagal kalibravimo kreivę.

3. APARATŪRA

3.1. Graduotos pipetės, 0,25, 0,50, 0,75 ir 1,0 ml talpos

3.2. Spektrofotometras, kuriuo galima matuoti esant 440 nm (ir 447–449 nm) bangos ilgiui, ir 1 cm optinio kelio ilgio kiuvetės

3.3. Matavimo kolbos, 20 ml ir 100 ml talpos

3.4. Analizės svarstyklės, kurių jautrumas 0,1 mg ir kuriomis galima matuoti 1 mg tikslumu, o mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg

3.5. Krosnis, 45 °C ± 1 °C

3.6. Greitojo filtravimo bepeleniai filtrai.

4. REAGENTAI

Visi naudojami reagentai turi būti analitiškai gryni.

4.1. Apokarotino esterio suspensija (maždaug 20 %)

4.1.1. Suspensijos grynumas nustatomas taip:

Suspensija šildoma iki 45–50 °C ir homogenizuojama neatidarytoje pirminėje pakuotėje. Į matavimo kolbą (100 ml) pasveriama apie 400 mg, ištirpinama 20 ml chloroformo (4.4) ir skiedžiama iki žymės cikloheksanu (4.5). 5 ml šio tirpalo skiedžiama cikloheksanu iki 100 ml (A tirpalas). 5 ml A tirpalo skiedžiama cikloheksanu iki 100 ml. Optinis tankis matuojamas esant 447–449 nm bangos ilgiui (didžiausia absorbcija matuojama palyginamuoju tirpalu naudojant cikloheksaną ir 1 cm optinio kelio ilgio kiuvetes).

Apokarotino esterio kiekis P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **arba** išskleista formulė: $(Abs_{max}/2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{max} = matuojamo tirpalo didžiausias optinis tankis

M_{susp} = suspensijos masė (g)

2 550 = etaloninio A tirpalo absorbcijos (1 %, 1 cm) vertė

P = suspensijos grynumas (kiekis) (%)

▼B

Pastaba. Apokarotino esterių suspensija yra jautri šviesos, karščio ir oro poveikiui. Neatidarytoje originalioje pakuotėje (užsandarintoje azoto atmosferoje) ir šaltoje vietoje suspensija gali būti laikoma apie 12 mėnesių. Atidarius pakuotę, suspensiją reikia sunaudoti per trumpą laiką.

4.1.2. Apokarotino esterio etaloninis tirpalas, apie 0,2 mg/ml

0,1 mg tikslumu pasveriama maždaug 0,100 g (W) apokarotino esterio suspensijos (4.1.1), ištirpinama petroleteryje (4.2), tirpalas kiekybiškai supilamas į 100 ml matavimo kolbą ir petroleteriu skiedžiamas iki žymės.

Šio tirpalo apokarotino esterio koncentracija yra (W × P)/10 mg/ml.

Pastaba Tirpalas turi būti laikomas šaltoje tamsioje vietoje. Nesunaudotas tirpalas išpilamas po mėnesio.

4.2. Petroleteris (40–60 °C)

4.3. Bevandenio natrio sulfato granulės, prieš naudojant 2 val. džiovinamos 102 °C temperatūroje

4.4. Chloroformas

4.5. Cikloheksanas

5. PROCEDŪRA

5.1. **Mėginio ruošimas**

5.1.1. *Koncentruotas sviestas*

Mėginys išlydomas krosnyje, kurios temperatūra apie 45 °C.

5.1.2. *Sviestas*

Mėginys išlydomas apie 45 °C temperatūros krosnyje ir jo reprezentatyvi dalis filtruojama per filtrą, į kurį įdėta apie 10 g bevandenio natrio sulfato (4.3). Filtruojama nuo stiprios saulės šviesos ir apšvietimo apsaugotoje aplinkoje, kurios temperatūra apie 45 °C. Surenkamas reikiamas pieno riebalų kiekis.

5.2. **Nustatymas**

1 mg tikslumu pasveriama apie 1 g koncentruoto sviesto (arba ekstrahuotų pieno riebalų (5.1.2)) (M). Tirpinant petroleteryje (4.2) kiekybiškai supilama į 20 ml (V) matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės ir gerai sumaišoma.

Alikvotinė tirpalo dalis supilama į 1 cm kiuvetę ir optinis tankis matuojamas esant 440 nm bangos ilgiui, palyginimui naudojant petroleterį. Apokarotino esterio koncentracija tirpale (C µ/ml) nustatoma pagal gautą kalibravimo kreivę.

5.3. **Kalibravimas**

Į penkias 100 ml matavimo kolbas pipete įpilama 0, 0,25, 0,5, 0,75 ir 1,0 ml apokarotino esterio etaloninio tirpalo (4.1.2). Skiedžiama petroleteriu (4.2) iki žymės ir sumaišoma.

Apytikrės tirpalų koncentracijos vertės yra nuo 0 iki 2 µg/ml ir tiksliai apskaičiuojamos pagal etaloninio tirpalo (4.1.2) koncentraciją (W × P)/10 mg/ml. Optinis tankis matuojamas esant 440 nm bangos ilgiui ir palyginimui naudojant petroleterį (4.2).

Optinio tankio vertės užrašomos y ašyje, apokarotino esterio koncentracijos vertės – x ašyje. Apskaičiuojama kalibravimo kreivės lygtis.

▼B

6. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

6.1. Apokarotino esterio kiekis, išreikšta mg/kg produkto, apskaičiuojamas pagal lygtį:

Koncentruotas sviestas: (C × V)/M

Sviestas: 0,82 (C × V)M

čia:

C = apokarotino esterio kiekis, µg/ml, gautas pagal kalibravimo kreivę (5.3)

V = tiriamojo tirpalo (5.2) tūris (ml)

M = mėginio (5.2) masė (g)

0,82 = –sviesto riebalų svieste pataisos faktorius

7. METODO TIKSLUMAS

7.1. **Pakartojamumas**

7.1.1. *Sviesto analizė*

Dviejų analizių, vieno analitiko per kiek įmanomą trumpesnį laiko tarpą atliktų ta pačia aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, rezultatai neturi skirtis daugiau kaip 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Koncentruoto sviesto analizė*

Dviejų analizių, vieno analitiko per kiek įmanomą trumpesnį laiko tarpą atliktų ta pačia aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, rezultatai neturi skirtis daugiau kaip 1,6 mg/kg.

7.2. **Atkuriamumas**

7.2.1. *Sviesto analizė*

Dviejų analizių rezultatų, gautų analitikams skirtingose laboratorijose ir skirtinga aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 4,7 mg/kg.

7.3. **Koncentruoto sviesto analizė**

Dviejų analizių rezultatų, gautų analitikams skirtingose laboratorijose ir skirtinga aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 5,3 mg/kg.

7.4. **Tikslumo duomenų šaltinis**

Tikslumo duomenys buvo gauti 1995 m. atliekant tarplaboratorinius tyrimus, kuriuose dalyvavo 11 laboratorijų; buvo naudojama 12 sviesto ėminių (šešios poros kontrolinių ėminių) bei 12 koncentruoto sviesto ėminių (šešios poros kontrolinių ėminių), pažymėtų atsekamąja medžiaga.

8. LEIDŽIAMŲJŲ NUOKRYPŲ RIBOS

8.1. Turi būti paimti trys atsekamąja medžiaga pažymėto produkto ėminiai jo tinkamam žymėjimui patikrinti.

8.2. **Sviestas**

8.2.1. Pridėjimo norma sviestui, įskaitant fono optinį tankį, yra 22 mg/kg.

8.2.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 17,7 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos),

— 12,2 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos).

▼B

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 17,7 mg/kg ir 12,2 mg/kg.

8.3. **Koncentruotas sviestas**

8.3.1. Pridėjimo norma koncentruotam sviestui, įskaitant fono optinį tankį, yra 24 mg/kg.

Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 19,2 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos),

— 13,2 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos).

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 19,2 mg/kg ir 13,2 mg/kg.

▼B

VIII PRIEDAS

(5 straipsnis)

SITOSTEROLIO ARBA STIGMASTEROLIO NUSTATYMAS SVIESTE ARBA KONCENTRUOTAME SVIESTE KAPILIARINĖS DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU

1. TAIKYMO SRITIS

Aprašyta kiekybinio sitosterolio arba stigmasterolio nustatymo svieste ir koncentruotame svieste metodo taikymo procedūra. Sitosteroliu priimta vadinti β-sitosterolio ir 22-dihidro-β-sitosterolio mišinį, kiti sitosteroliai laikomi nereikšmingais.

2. METODO ESMĖ

Sviestas arba koncentruotas sviestas muilinami kalio hidroksidu etanoliniame tirpale ir nemuilinamos medžiagos ekstrahuojamos dietileteriu.

Steroliai paverčiami trimetilsililеteriais ir analizuojami kapiliarinės dujų chromatografijos metodu, kaip vidinį etaloną naudojant betuliną.

3. APARATŪRA

3.1. 150 ml hidrolizės kolba ir grįžtamasis kondensatorius su šlifo jungtimis

3.2. 500 ml dalijamieji piltuvai

3.3. 250 ml kolbos

3.4. Išlyginamojo slėgio piltuvai, 250 ml arba panašios talpos, dietileterio likučiams surinkti

3.5. Stiklinė kolonėlė, 350 mm × 20 mm, su sukepintojo stiklo kamščiu

3.6. Vandens vonia arba izoterminis kaitinimo apvalkalas

3.7. Buteliukai reakcijai atlikti, 2 ml

3.8. Dujų chromatografas, kuris yra pritaikytas naudoti su kapiliarine kolonėle, turi dalijimo sistemą ir kurį sudaro:

3.8.1. kolonėlėms skirta pastovios temperatūros kamera, kurioje įmanoma palaikyti reikiamą temperatūrą ±1 °C tikslumu;

3.8.2. reguliuojamos temperatūros garinimo įtaisas;

3.8.3. liepsnos jonizacinis detektorius ir keitiklis-stiprintuvas;

3.8.4. integratorius (rašytuvas), pritaikytas naudoti su keitikliu-stiprintuvu (3.8.3)

3.9. Lydyto kvarco kapiliarinė kolonėlė, visa padengta BP1 arba lygiaverte medžiaga vienodu 0,25 μm storiu (arba ne mažesnės skyros kita kolonėlė); kolonėlė turi gebėti atskirti lanosterolio ir sitosterolio trimetilsilildarinius. Tinka BP1, ilgis 12 m, vidinis skersmuo 0,2 mm

3.10. 1 μl dujų chromatografijai skirtas mikrošvirkštas su grūdinta adata.

4. REAGENTAI

Visi naudojami reagentai turi būti analitiškai gryni. Naudojamas distiliuotas ar bent tokio paties grynumo vanduo

4.1. Etanolis, ne mažesnio kaip 95 % grynumo

4.2. Kalio hidroksidas, 60 % tirpalas. 600 g kalio hidroksido (ne mažesnio kaip 85 % grynumo) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama vandeniu iki vieno litro

▼B

4.3. Betulinas, ne mažesnio kaip 99 % grynumo

4.3.1. Betulino tirpalai dietileteryje (4.4)

4.3.1.1. Sitosteroliui nustatyti naudojamo betulino tirpalo koncentracija turėtų būti 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. Stigmasteroliui nustatyti naudojamo betulino tirpalo koncentracija turėtų būti 0,4 mg/ml.

4.4. Dietileteris, analitiškai grynas (neturi būti peroksidų arba likučių)

4.5. Bevandenio natrio sulfato granulės, prieš naudojant 2 h džiovinamos 102 °C temperatūroje

4.6. Sililinimo reagentas, pvz., TRI-SIL (galima gauti iš *Pierce Chemical Co*, katalogo Nr. 49001) arba lygiavertė medžiaga (svarbu: TRI-SIL yra degi, toksinė, ėsdinanti ir galbūt kancerogeninė medžiaga. Laboratorijos darbuotojai turi būti supažindinti su TRI-SIL saugos informacija ir imtis reikiamų atsargumo priemonių).

4.7. Lanosterolis

4.8. Sitosterolis, žinomo grynumo, kuris turi būti ne mažesnis kaip 90 % (P)

1 pastaba: Kalibravimui naudojamų etaloninių medžiagų grynumas turi būti nustatytas taikant normalizavimo metodą. Daroma prielaida, kad visi mėginyje esantys sitosteroliai yra chromatogramoje, visas visų smailių plotas yra sitosterolių komponentų plotas ir steroliams gaunamas vienodas detektoriaus atsakas. Sistemos tiesiškumas turi būti patvirtintas tiriamų koncentracijos verčių ribose.

4.8.1. Sitosterolio etaloninis tirpalas. Ruošiamas sitosterolio (4.8) tirpalas dietileteryje (4.4), kuriame 0,001 mg/ml tikslumu yra maždaug 0,5 mg/ml (W_1)

4.9. Stigmasterolis, žinomo grynumo, kuris turi būti ne mažesnis kaip 90 % (P)

4.9.1. Stigmasterolio etaloninis tirpalas. Ruošiamas stigmasterolio (4.9) tirpalas dietileteryje (4.4), kuriame 0,001 mg/ml tikslumu yra maždaug 0,2 mg/ml (W_1)

4.10. Skyros tikrinimo mišinys. Ruošiamas 0,05 mg/ml lanosterolio (4.7) ir 0,5 mg/ml sitosterolio (4.8) tirpalas dietileteryje (4.4).

5. PROCEDŪRA

5.1. **Chromatografijos etaloninių tirpalų ruošimas.**

Vidinio etalono tirpalas (4.3.1) turi būti įpiltas vienu metu į atitinkamą sterolių etaloninį tirpalą ir į muilinto mėginio tirpalą (žr. 5.2.2).

5.1.1. Sitosterolio etaloninis tirpalas chromatografijai: į kiekvieną iš dviejų reakcijai skirtų buteliukų (3.7) įpilamas 1 ml sitosterolio etaloninio tirpalo (4.8.1) ir dietileteris pašalinamas azoto srove. Įpilamas 1 ml vidinio etalono tirpalo (4.3.1.1) ir dietileteris pašalinamas azoto srove.

5.1.2. Stigmasterolio etaloninis tirpalas chromatografijai: į kiekvieną iš dviejų reakcijai skirtų buteliukų (3.7) įpilamas 1 ml stigmasterolio etaloninio tirpalo (4.9.1) ir dietileteris pašalinamas azoto srove. Įpilamas 1 ml vidinio etalono tirpalo (4.3.1.1) ir dietileteris pašalinamas azoto srove.

5.2. **Nemuilinamų medžiagų ruošimas**

5.2.1. Sviesto ėminys išlydomas ne aukštesnėje kaip 35 °C temperatūroje ir gerai sumaišomas

Į 150 ml kolbą (3.1) pasveriama 1 mg tikslumu maždaug 1 g sviesto (W_2) arba koncentruoto sviesto (W_2). Įpilama 50 ml etanolio (4.1) ir 10 ml kalio hidroksido tirpalo (4.2). Prijungiamas grįžtamasis kondensatorius ir 30 min kaitinama maždaug 75 °C temperatūroje. Kondensatorius atjungiamas ir kolba atvėsinama maždaug iki kambario temperatūros.

▼B

5.2.2. Į kolbą įpilama 1,0 ml vidinio etalono tirpalo (4.3.1.1), jei reikia nustatyti sitosterolį, arba (4.3.1.2), jei reikia nustatyti stigmasterolį. Gerai sumaišoma. Kolbos turinys kiekybiškai supilamas į 500 ml dalijamąjį piltuvą (3.2), kolbą paeiliui plaunant 50 ml vandens ir 250 ml dietileterio (4.4). Dalijamasis piltuvas stipriai purtomas dvi minutes ir fazėms leidžiama atsiskirti. Apatinis vandeninis sluoksnis išleidžiamas ir eterinis sluoksnis plaunamas keturis kartus iš eilės įpilant po 100 ml vandens ir purtant piltuvą.

2 pastaba: Vengiant emulsijos susidarymo, svarbu du pirmus kartus plauti atsargiai (piltuvas apverčiamas 10 kartų). Plaunant trečią kartą, galima stipriai purtyti 30 s. Jei susidaro emulsija, ją galima suardyti įpilant 5–10 ml etanolio. Jei įpilama etanolio, kitus du kartus reikia plauti vandeniu stipriai purtant.

5.2.3. Skaidrus, muilo neturintis eterinis sluoksnis supilamas į stiklinę kolonėlę (3.5), pripildytą 30 g bevandenio natrio sulfato (4.5). Eterinis tirpalas surenkamas į 250 ml kolbą (3.3). Įdedama viena granulė stipriam virimui slopinti ir distiliuojama beveik iki sausojo likučio ant vandens vonios arba izoterminiame apvalkale, kruopščiai surenkant tirpiklio likučius.

3 pastaba: Jei mėginių ekstraktai visiškai išgarinami per aukštoje temperatūroje, gali būti sterolių nuostolių.

5.3. **Trimetilsililеterių ruošimas**

5.3.1. Kolboje likęs eterinis tirpalas supilamas į 2 ml mėgintuvėlį (3.7) plaunant 2 ml dietileterio ir eteris pašalinamas azoto srove. Kolba du kartus plaunama 2 ml dietileterio, perpilant tirpalą į buteliuką ir kiekvieną kartą pašalinant eterį azotu.

5.3.2. Mėginys sililinamas įpilant 1 ml TRI-SIL (4.6). Buteliukas užkemšamas ir stipriai purtomas, kad turinys ištirptų. Jei jis ne visiškai ištirpsta, pašildoma iki 65–70 °C temperatūros. Prieš įpurškiant į dujinį chromatografą, paliekama pastovėti bent 5 min. Etaloniniai tirpalai sililinami tuo pačiu būdu kaip ir mėginiai. Skyros tikrinimo mišinys (4.10) sililinamas kaip mėginiai.

4 pastaba: Sililinti reikia bevandenėje aplinkoje. Ne visišką betulino sililinimą rodo šalia betulino smailės esanti antroji smailė.

Sililinti trukdo etanolio buvimas sililinant. Jo gali likti dėl nepakankamo plovimo ekstrahavimo stadijoje. Jei ši problema lieka, ekstrahavimo stadijoje galima plauti penktą kartą, intensyviai purtant 30 s.

5.4. **Dujų chromatografinė analizė**

5.4.1. *Darbinių sąlygų parinkimas*

Dujinis chromatografas paruošiamas pagal gamintojo instrukciją.

Rekomenduojamos tokios darbinės sąlygos:

— kolonėlės temperatūra – 265 °C

— injektoriaus temperatūra – 265 °C

— detektoriaus temperatūra – 300 °C

— nešančiųjų dujų srautas – 0,6 ml/min

— vandenilio slėgis – 84 kPa

— oro slėgis: 155 kPa

▼B

— mėginio dalijimas – nuo 10:1 iki 50:1; dalijimo santykis turi būti optimizuotas pagal gamintojo instrukcijas ir detektoriaus atsako tiesiškumą, vėliau patvirtintas tiriamosios koncentracijos intervalui.

5 pastaba: Ypač svarbu, kad reguliariai būtų valomas injektoriaus įdėklas.

— įpurškiamos medžiagos kiekis – 1 µl TMSE tirpalo.

Prieš pradedant bet kokią analizę, sudaromos sąlygos, kad sistema pasiektų pusiausvyrą ir kad būtų gautas tinkamas stabilus atsakas.

Atsižvelgiant į kolonėlės ir dujų chromatografo charakteristikas, šios sąlygos turi būti keičiamos, kad būtų gautos chromatogramos, kurios atitinka šiuos reikalavimus:

— sitosterolio ir linosterolio smailės turi būti tinkamai atskirtos. 1 paveiksle pavaizduota tipinė chromatograma, kuri turėtų būti gauta sililintam skyros tikrinimo mišiniui (4.10),

— sterolių santykinė sulaikymo trukmė turėtų būti apytikriai tokia:

cholesterolio – 1,0

stigmasterolio – 1,3

sitosterolio – 1,5

betulino – 2,5

— apytikrė betulino sulaikymo trukmė turėtų būti lygi 24 min.

5.4.2. *Analizės procedūra*

Įpurškiamas 1 µl sililinto etaloninio tirpalo (stigmasterolio arba sitosterolio) ir nustatomi integratoriaus kalibravimo parametrai.

Įpurškiamas dar 1 µl sililinto etaloninio tirpalo atsako faktoriams nustatyti pagal betuliną.

Įpurškiamas 1 µl sililinto mėginio tirpalo ir matuojami smailių plotai. Prieš ir po mėginių serijos įpurškimo turi būti įpurškiami etalonai.

Rekomenduojama etaloninius tirpalus įpurkšti po šešių mėginių įpurškimo.

6 pastaba: Integruojant stigmasterolio smailę reikėtų įtraukti visas fono smailes, kaip pažymėta taškais 1, 2 ir 3 2b paveiksle.

Kai įvertinamas suminis sitosterolio kiekis, integruojant sitosterolio smailę reikėtų įtraukti 22-dihidro-β-sitosterolio (stigmastanolio), kuris išplaunamas iškart po sitosterolio (žr. 3b paveikslą), smailės plotą.

6. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

6.1. Nustatomi sterolio ir betulino smailių plotai, gauti abiem etaloniniams tirpalams, įpurškiamiems prieš mėginių seriją ir po jos, ir apskaičiuojamas R_1:

R_1 = (etalono sterolio smailės plotas)/(etalono betulino smailės plotas).

Nustatomi mėginio sterolio (stigmasterolio ir sitosterolio) ir betulino smailių plotai ir apskaičiuojamas R_2:

R_2 = (mėginio sterolio smailės plotas)/(mėginio betulino smailės plotas).

W_1 = sterolio etalono kiekis 1 ml etaloninio tirpalo (4.8.1 arba 4.9.1) (mg)

W_2 = mėginio (5.2.1) masė (g)

P = etaloninio sterolio (4.8 arba 4.9) grynumas

▼B

Sterolio kiekis mėginyje (mg/kg) = $((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$

7. METODO TIKSLUMAS

7.1. **Sviestas**

7.1.1. *Pakartojamumas*

7.1.1.1. Stigmasterolis

Dviejų analizių, vieno analitiko per kiek įmanomą trumpesnį laiko tarpą atliktų ta pačia aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, rezultatai neturi skirtis daugiau kaip 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterolis

Dviejų analizių, vieno analitiko per kiek įmanomą trumpesnį laiko tarpą atliktų ta pačia aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, rezultatai neturi skirtis daugiau kaip 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Atkuriamumas*

7.1.2.1. Stigmasterolis

Dviejų analizių rezultatų, gautų analitikams skirtingose laboratorijose ir skirtinga aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterolis

Dviejų analizių rezultatų, gautų analitikams skirtingose laboratorijose ir skirtinga aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 8,7 % vidutinės analizių vertės.

7.1.3. *Tikslumo duomenų šaltinis*

Tikslumo duomenys buvo gauti 1992 m. atliekant tyrimus, kuriuose dalyvavo aštuonios laboratorijos ir buvo tiriami šeši stigmasterolio ėminiai (trys poros kontrolinių ėminių) ir šeši sitosterolio ėminiai (trys poros kontrolinių ėminių).

7.2. **Koncentruotas sviestas**

7.2.1. *Pakartojamumas*

7.2.1.1. Stigmasterolis

Dviejų analizių, vieno analitiko per kiek įmanomą trumpesnį laiko tarpą atliktų ta pačia aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, rezultatai neturi skirtis daugiau kaip 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterolis

Dviejų analizių, vieno analitiko per kiek įmanomą trumpesnį laiko tarpą atliktų ta pačia aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, rezultatai neturi skirtis daugiau kaip 3,6 % vidutinės analizių vertės.

7.2.2. *Atkuriamumas*

7.2.2.1. Stigmasterolis

Dviejų analizių rezultatų, gautų analitikams skirtingose laboratorijose ir skirtinga aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterolis

Dviejų analizių rezultatų, gautų analitikams skirtingose laboratorijose ir skirtinga aparatūra tiriant tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 8,9 % vidutinės analizių vertės.

▼B

7.2.3. *Tikslumo duomenų šaltinis*

Tikslumo duomenys buvo gauti 1991 m. atliekant tyrimus, kuriuose dalyvavo devynios laboratorijos ir buvo tiriami šeši stigmasterolio ėminiai (trys poros kontrolinių ėminių) ir šeši sitosterolio ėminiai (trys poros kontrolinių ėminių).

8. LEIDŽIAMŲJŲ NUOKRYPŲ RIBOS

8.1. Turi būti paimti trys atsekamąja medžiaga pažymėto produkto ėminiai jo tinkamam žymėjimui patikrinti.

8.2. **Sviestas**

8.2.1. *Stigmasterolis*

8.2.1.1. Stigmasterolio pridėjimo norma yra 150 g ne mažesnio kaip 95 % grynumo stigmasterolio vienai tonai sviesto, t. y. 142,5 mg/kg, arba 170 g ne mažesnio kaip 85 % grynumo stigmasterolio vienai tonai sviesto, t. y. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 115,8 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 85 %).

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 115,8 mg/kg ir 80,1 mg/kg arba tarp 117,7 mg/kg ir 81,5 mg/kg.

8.2.2. *Sitosterolis*

8.2.2.1. Sitosterolio pridėjimo norma yra 600 g ne mažesnio kaip 90 % grynumo sitosterolio vienai tonai sviesto, t. y. 540 mg/kg.

8.2.2.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 482,6 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai sitosterolio grynumas 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai sitosterolio grynumas 90 %).

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 482,6 mg/kg ir 347,6 mg/kg.

8.3. **Koncentruotas sviestas**

8.3.1. *Stigmasterolis*

8.3.1.1. Stigmasterolio pridėjimo norma yra 150 g ne mažesnio kaip 95 % grynumo stigmasterolio vienai tonai koncentruoto sviesto, t. y. 142,5 mg/kg, arba 170 g ne mažesnio kaip 85 % grynumo stigmasterolio vienai tonai sviesto, t. y. 144,5 mg/kg.

▼B

8.3.1.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 118,5 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai stigmasterolio grynumas 85 %).

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 118,5 mg/kg ir 82,9 mg/kg arba tarp 120,4 mg/kg ir 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitosterolis*

8.3.2.1. Sitosterolio pridėjimo norma yra 600 g ne mažesnio kaip 90 % grynumo sitosterolio vienai tonai sviesto, t. y. 540 mg/kg.

8.3.2.2. Atsekamosios medžiagos pridėjimo normai ir vienalytiškumui tikrinti naudojami rezultatai, gauti analizuojant tris produkto ėminius, ir mažiausias iš šių rezultatų lyginamas su šiomis ribinėmis vertėmis:

— 480,9 mg/kg (95 % mažiausios pridėjimo normos, kai sitosterolio grynumas 90 %),

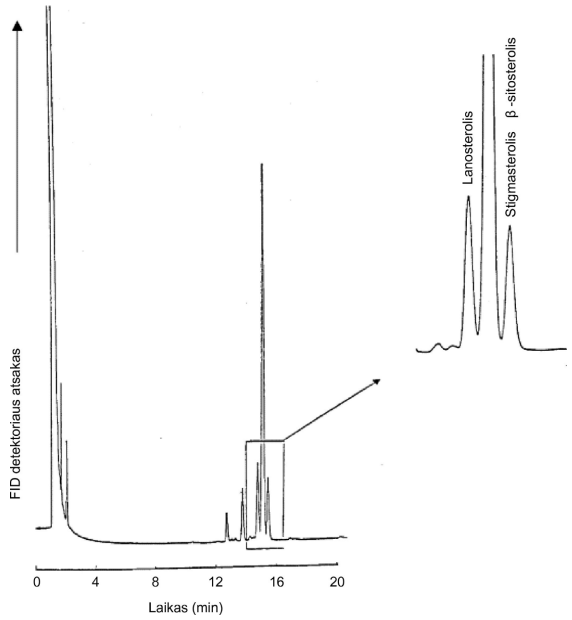
— 345,9 mg/kg (70 % mažiausios pridėjimo normos, kai sitosterolio grynumas 90 %).

Mažiausias atsekamosios medžiagos koncentracijos ėminyje rezultatas yra naudojamas interpoliuojant tarp 480,9 mg/kg ir 345,9 mg/kg.

1 paveikslas

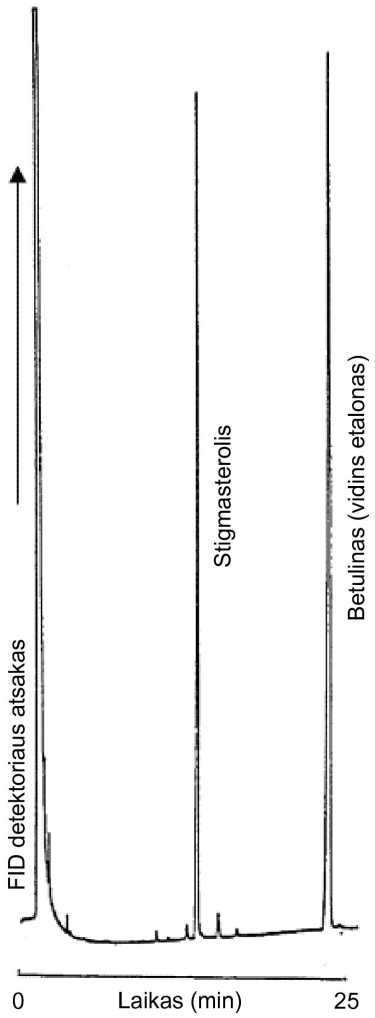
Skyros tikrinimo mišinio chromatograma

Pageidautina, kas atsiskyrimas būtų visiškas, t. y. lanosterolio smailės linija turėtų grįžti iki bazinės linijos prieš pradėdama kilti kaip sitosterolio smailė, nors priimtinas ir dalinis atsiskyrimas.

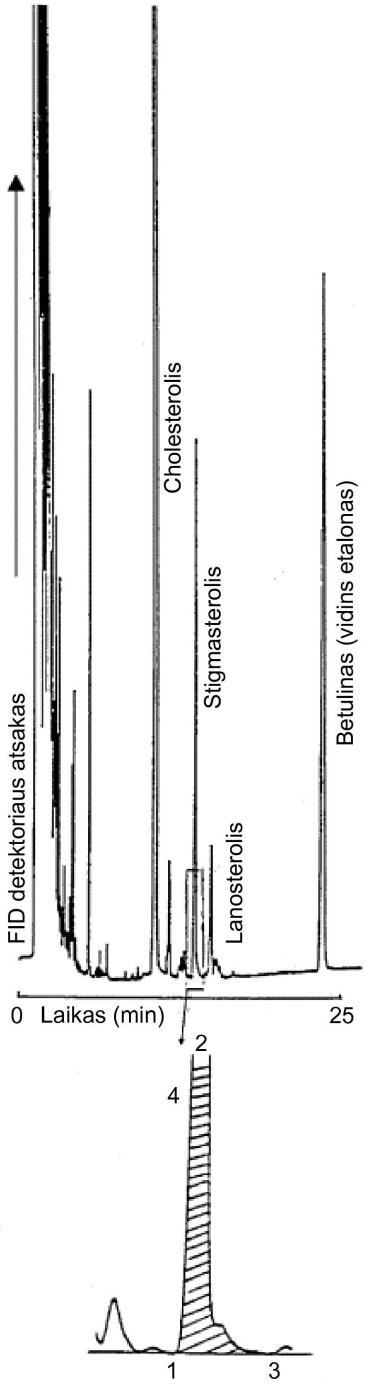


▼B

2a paveikslas.
Stigmasterolio etalonas



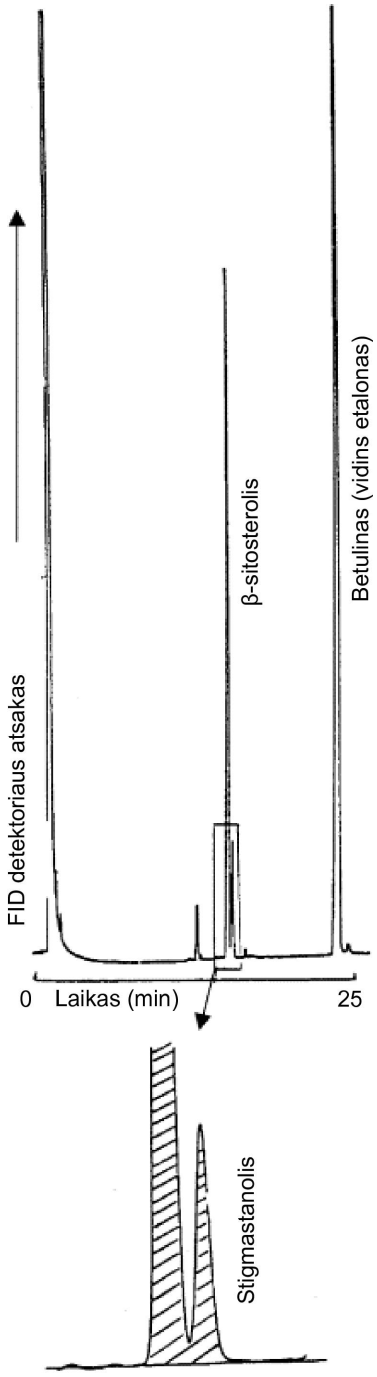
2b paveikslas.
Stigmasteroliu denatūruotas sviesto ėminys



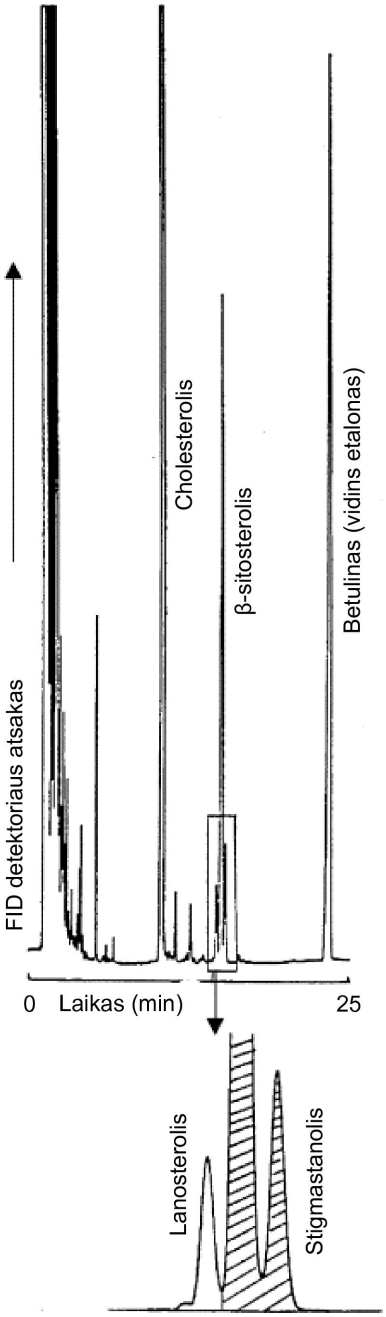
Pastaba: Integruojant stigmasterolio smailę reikėtų įtraukti visas fono smailes, kaip pažymėta 1, 2 ir 3 taškais.

▼B

3a paveikslas.
Sitosterolio etalonas



3b paveikslas.
β-sitosteroliu denatūruotas sviesto ėminys



Pastaba: β-sitosterolyje yra priemaiša (vadinama stigmastanoliu), kuri išplaunama iš karto po -sitosterolio. Šių dviejų smailių plotai turėtų būti sudėti, kai vertinamas suminis esamo -sitosterolio kiekis.

▼B

IX PRIEDAS

(6 straipsnis)

PAMATINIS METODAS KARVIŲ PIENUI IR KAZEINATUI NUSTATYTI SŪRIUOSE, PAGAMINTUOSE IŠ AVIŲ, OŽKŲ ARBA BUIVOLIŲ PIENO ARBA AVIŲ, OŽKŲ IR BUIVOLIŲ PIENO MIŠINIŲ

1. TYRIMO OBJEKTAS

Karvių pieno ir kazeinato aptikimas sūriuose iš avių pieno, ožkų pieno ir buivolių pieno ir avių, ožkų ir buivolių pieno mišinių, naudojant izoelektrinį γ-kazeinų fokusavimą po skaidymo plazminu.

2. TAIKYMO SRITIS

Metodas tinka, kai reikia jautraus ir specifinio metodo natūraliam ir termiškai apdorotam karvių pienui ir kazeinatui nustatyti šviežiuose ir nokintuose sūriuose, pagamintuose iš avių, ožkų ir buivolių pieno arba avių, ožkų ir buivolių pieno mišinių. Jis netinka norint nustatyti, ar falsifikuojant į pieną ir sūrį yra pridėta termiškai apdorotų karvių pieno išrūgų baltymų koncentratų.

3. METODO ESMĖ

3.1. Kazeinų išskyrimas iš sūrio ir pamatinių etalonų.

3.2. Gautų kazeinų tirpinimas ir skaidymas plazminu (EC.3.4.21.7).

3.3. Plazminu apdorotų kazeinų izoelektrinis fokusavimas karbamido aplinkoje ir baltymų dažymas.

3.4. Dažytų γ_3- ir γ_2-kazeinų elektroforegramų įvertinimas (karvių pieno buvimo mėginyje įrodymas) mėginiui gautas elektroforegramas lyginant su elektroforegramomis, tame pačiame gelyje gautomis pamatiniams etalonams, turintiems 0 % ir 1 % karvių pieno.

4. REAGENTAI

Jei nenurodyta kitaip, turi būti naudojami analitiškai grynos cheminės medžiagos. Vanduo turi būti du kartus distiliuotas arba tokio paties grynumo.

Pastaba. Šie duomenys taikomi laboratorijoje pagamintiems poliakrilamido geliams su karbamidu, kurių matmenys 265 × 125 × 0,25 mm. Jei naudojamas kito tipo ir dydžio gelis, gali tekti reguliuoti atskyrimo sąlygas.

Izoelektrinis fokusavimas

4.1. **Reagentai, skirti poliakrilamido geliams su karbamidu gaminti**

4.1.1. *Pradinis gelio tirpalas*

Vandenyje ištirpinama:

4,85 g akrilamido,

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

48,05 g karbamido,

15,00 g glicerolio (87 % masės),

skiedžiama iki 100 ml ir laikoma šaldytuve rudo stiklo butelyje.

▼B

Pastaba. Vietoje nurodytos masės neurotoksinių akrilamidų galima naudoti iš anksto sumaišytą akrilamido (BIS) tirpalą, kurį galima pirkti. Vietoj nurodytų akrilamidų kiekių galima naudoti 16,2 ml šio tirpalo, jei jame yra 30 % (masės pagal tūrį) akrilamido ir 0,8 % (masės pagal tūrį) BIS. Pradinio tirpalo naudojimo trukmė – ne daugiau kaip10 dienų; jei jo laidis didesnis kaip 5 μS, tirpalas dejonizuojamas 30 min maišant su 2 g *Amberlite MB-3* ir filtruojant per 0,45 μm membraną.

4.1.2. *Gelio tirpalas*

Gelio tirpalas ruošiamas pradinį gelio tirpalą (žr. 4.1.1) maišant su priedais ir amfolitais:

9,0 ml pradinio tirpalo

24 mg β-alanino

500 μl amfolito pH 3,5–9,5 ([1])

250 μl amfolito pH 5–7 ([1])

250 μl amfolito pH 6–8 ([1])

Gelio tirpalas sumaišomas ir nuo dviejų iki trijų minučių nudujinamas ultragarso vonioje arba vakuume.

Pastaba. Gelio tirpalas ruošiamas prieš pat jo naudojimą (žr. 6.2).

4.1.3. *Katalizatorių tirpalai*

4.1.3.1. N, N, N' N'-tetrametiletilendiaminas (Temed)

4.1.3.2. 40 % (masės pagal tūrį) amonio peroksosulfato (PER):

800 mg PER ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 2 ml.

Pastaba. Visuomet naudojamas ką tik pagamintas PER tirpalas.

4.2. **Kontaktinis skystis**

Žibalas arba skystas parafinas

4.3. **Anodinis tirpalas**

5,77 g fosforo rūgšties (85 % masės) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 100 ml.

4.4. **Katodinis tirpalas**

2,00 g natrio hidroksido ištirpinama vandenyje ir skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

Mėginio ruošimas

4.5. **Reagentai baltymams išskirti**

4.5.1. *Praskiesta acto rūgštis (25,0 ml ledinės acto rūgšties atskiedžiama vandeniu iki 100 ml)*

4.5.2. *Dichlormetanas*

4.5.3. *Acetonas*

4.6. **Buferinis tirpalas baltymams tirpinti**

Vandenyje ištirpinama:

5,75 g glicerolio (87 % masės)

24,03 g karbamido

250 mg ditiotreitolio

ir skiedžiama iki 50 ml.

([1]) Reikiamam γ-kazeinų atskyrimui gauti ypač tiko *Ampholine*® pH 3,5–9,5 (*Pharmacia*) ir *Resolyte*® pH 5–7 bei pH 6–8 (*BDH, Merck*).

▼B

Pastaba. Laikomas šaldytuve ne ilgiau kaip 1 savaitę.

4.7. **Reagentai kazeinui skaidyti plazminu**

4.7.1. *Amonio karbonato buferinis tirpalas*

0,2 mol/l amonio hidrokarbonato tirpalas (1,58 g/100 ml vandens), turintis 0,05 mol/l etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA, 1,46 g/100 ml), iki pH 8 titruojamas 0,2 mol/l amonio karbonato tirpalu (1,92 g/100 ml vandens), turinčiu 0,05 mol/l EDTA.

4.7.2. *Galvijų plazminas (EC. 3.4.21.7), kurio aktyvumas ne mažesnis kaip 5 U/ml*

4.7.3. *ε-aminoheksano rūgšties tirpalas fermentams slopinti*

2,624 g ε-aminoheksano rūgšties (6 amino-*n*-heksano rūgšties) ištirpinama 100 ml 40 % (tūrio) etanolyje.

4.8. **Etalonai**

4.8.1. *Sertifikuotus pamatinius sutraukto nugriebto avių ir ožkų pieno mišinio, turinčio 0 % ir 1 % karvių pieno, etalonus galima gauti Komisijos etaloninių medžiagų ir matavimų institute (Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440, Geel, Belgija).*

4.8.2. *Laikinojo laboratorinio sutraukto buivolių pieno, kuriame yra 0 % ir 1 % karvių pieno, etalono ruošimas*

Nugriebtam pienui gauti žalias buivolių arba karvių pienas centrifuguojamas 20 min 37 °C temperatūroje (2 500 g). Greitai atšaldžius mėgintuvėlį ir jo turinį iki 6–8 °C, visiškai pašalinamas viršutinis riebalų sluoksnis. 1 % etaloniniam tirpalui paruošti į 1 l talpos stiklinę įpilama 5,00 ml nugriebto karvių pieno, 495 ml nugriebto buivolių pieno ir praskiesta pieno rūgštimi (10 % masės) nustatomas pH 6,4. Mišinys šildomas iki 35 °C, įpilama 100 µl šliužo fermento (fermento aktyvumas 1:10 000, koncentracija 3 000 U/ml), maišoma 1 min ir aliuminio folija uždengta stiklinė paliekama stovėti 35 °C temperatūroje vieną valandą, kad pienas susitrauktų. Susidarius varškei, visas sutrauktas pienas džiovinamas sublimaciniu būdu prieš tai jo nesumaišant arba nenupilant išrūgų. Po sublimacinio džiovinimo produktas malamas vienalyčiams milteliams gauti. Norint paruošti 0 % etaloną, ta pati procedūra atliekama naudojant gryną nugriebtą buivolių pieną. Etalonai turi būti laikomi –20 °C temperatūroje.

Pastaba. Prieš ruošiant etalonus patartina tikrinti buivolių pieno grynumą, atliekant izoelektrinį plazminu apdorotų kazeinų fokusavimą.

Reagentai baltymams dažyti

4.9. **Fiksažas**

150 g trichloracto rūgšties ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 000 ml.

4.10. **Blukinimo tirpalas**

500 ml metanolio ir 200 ml ledinės acto rūgšties skiedžiama distiliuotu vandeniu iki 2 000 ml.

Pastaba. Naujas blukinimo tirpalas ruošiamas kasdien; jį galima ruošti lygiomis dalimis sumaišant pradinius 50 % (tūrio) metanolio ir 20 % (tūrio) ledinės acto rūgšties tirpalus.

4.11. **Dažymo tirpalai**

4.11.1. *Dažymo tirpalas (1-asis pradinis tirpalas)*

Maišant magnetine maišykle, 3,0 g Coomassie briliantinio žaliojo G-250 (C.I. 42655) ištirpinama 1 000 ml 90 % (tūrio) metanolio (apie 45 min) ir filtruojama per du sulankstytus vidutinio tankumo filtrus.

▼B

4.11.2. *Dažymo tirpalas (2-asis pradinis tirpalas)*

5,0 g vario sulfato pentahidrato ištirpinama 1 000 ml 20 % (tūrio) acto rūgšties.

4.11.3. *Dažymo tirpalas (darbinis tirpalas)*

Prieš pat dažymą sumaišoma po 125 ml abiejų pradinių tirpalų (4.11.1, 4.11.2).

Pastaba. Dažymo tirpalus reikėtų ruošti naudojimo dieną.

5. ĮRANGA

5.1. Stiklinės plokštelės (265 × 125 × 4 mm); guminis volelis (plotis 15 cm); lyginamasis stalas

5.2. Gelio nešiklio lapas (265 × 125 mm)

5.3. Dengiamasis lapas (280 × 125 mm). Ant kiekvieno išilginio lapo krašto priklijuojama lipnios plėvelės juosta (280 × 6 × 0,25 mm) (žr. 1 paveikslą)

5.4. Elektrofokusavimo kamera su šaldomąja plokšte (pvz., 265 × 125 mm) ir tinkamas maitinimo šaltinis (≥ 2,5 kV) arba automatinis elektroforezės įtaisas

5.5. Reguliuojamos temperatūros cirkuliacinis kriostatas, nustatytas 12 ± 0,5 °C

5.6. Centrifuga, reguliuojama iki 3 000 g

5.7. Elektrodų juostos (ilgis ≥ 265 mm)

5.8. Plastikiniai anodinio ir katodinio tirpalų lašintuvai

5.9. Mėginių aplikatoriai (10 × 5 mm, viskozė arba filtravimo popierius, mažai adsorbuojantis baltymus)

5.10. Nerūdijančiojo plieno žirklės, skalpeliai ir pincetai

5.11. Nerūdijančiojo plieno arba stikliniai dažymo ir blukinimo indai (pvz., 280 × 150 mm įrankių padėklai)

5.12. Reguliuojamo apsisukimų dažnio homogenizatorius (veleno skersmuo 10 mm), apsisukimų dažnio intervalas nuo 8 000 min^{-1} iki 20 000 min^{-1}

5.13. Magnetinė maišyklė

5.14. Ultragarso vonia

5.15. Plėvelės suvirinimo įtaisas

5.16. 25 µl mikropipetės

5.17. Vakuuminis garintuvas arba sublimatorius

5.18. Reguliuojamos temperatūros vandens vonia, nustatoma 35 °C ir 40 ± 1 °C, ir purtyklė

5.19. Densitometras, rodmenų skaitymo bangos ilgis λ = 634 nm

6. PROCEDŪRA

6.1. **Mėginio ruošimas**

6.1.1. *Kazeinų išskyrimas*

Į 100 ml centrifugavimo mėgintuvėlį pasveriamas sūrio arba pamatinio etalono kiekis, atitinkantis 5 g sausos masės, įpilama 60 ml distiliuoto vandens ir homogenizuojama homogenizatoriumi (nuo 8 000 min^{-1} iki 10 000 min^{-1}). Praskiesta acto rūgštimi (4.5.1) nustatomas pH 4,6 ir centrifuguojama (5 min, 3 000 g). Riebalai ir išrūgos dekantuojami,

▼B

likutis homogenizuojamas, esant 20 000 min^{-1}, 40 ml distiliuoto vandens, kurio pH 4,5 nustatomas praskiesta acto rūgštimi (4.5.1), įpilama 20 ml dichlormetano (4.5.2), dar kartą homogenizuojama ir centrifuguojama (5 min, 3 000 g). Tarp vandens ir organinio tirpiklio fazių esantis kazeino sluoksnis (žr. 2 paveikslą) nuimamas mentele, abi fazės dekantuojamos. Kazeinas dar kartą homogenizuojamas 40 ml distiliuoto vandens (žr. aukščiau) ir 20 ml dichlormetano (4.5.2) ir centrifuguojamas. Ši procedūra kartojama tol, kol abi ekstrakto fazės tampa bespalvės (2–3 kartus). Baltymų likutis homogenizuojamas 50 ml acetono (5.3) ir filtruojamas per sulankstytą vidutinio tankumo filtravimo popierių. Likutis plaunamas ant filtro du kartus po 25 ml acetono, paliekamas džiūti ore arba azoto srovėje ir sumalamas į miltelius grūstuvėje.

Pastaba. Išdžiovinti kazeino ekstraktai turėtų būti laikomi –20 °C temperatūroje.

6.1.2. *β-kazeinų skaidymas plazminu γ-kazeinų intensyvumui padidinti*

25 mg kazeinų ekstrakto (6.1.1) disperguojama 0,5 ml amonio karbonato buferiniame tirpale (4.7.1) ir 20 min homogenizuojama, pvz., apdorojant ultragarsu. Šildoma iki 40 °C, įpilama 10 µl plazmino (4.7.2), maišoma ir inkubuojama vienai valandai 40 °C temperatūroje, visą laiką maišant. Fermentams slopinti įpilama 20 µl ε-aminoheksano rūgšties tirpalo (4.7.3), įdedama 200 mg karbamido kristalų ir 2 mg ditiotreitolio.

Pastaba. Jei norima gauti didesnę fokusuotų kazeino juostų simetriją, pridėjus ε-aminoheksano rūgšties, tirpalą patartina sublimuoti, o gautą baltymų likutį ištirpinti 0,5 ml baltymus tirpinti skirtame buferiniame tirpale (4.6).

6.2. **Poliakrilamido gelių su karbamidu ruošimas**

Keliais vandens lašais suvilgytas gelio nešiklio lapas (5.2) išlyginamas ant stiklinės plokštės (5.1), visą perteklinį vandenį pašalinant popieriniu rankšluosčiu arba servetėle. Tokiu pačiu būdu ant kitos stilinės plokštės dedamas dengiamasis lapas (5.3) su tarpikliais (0,25 mm). Plokštė dedama horizontaliai ant lyginamojo stalo.

Į paruoštą ir nudujintą gelio tirpalą (4.1.2) įpilama 10 µl Temed (4.1.3.1), maišoma ir įpilama 10 µl PER tirpalo (4.1.3.2), gerai sumaišoma ir iš karto išpilama tolygiai dengiamojo lapo viduryje. Plokštė su gelio nešiklio lapu vienu kraštu padedama (lapu į apačią) ant plokštės su dengiamuoju lapu ir lėtai nuleidžiama taip, kad tarp lapų susidarytų vienodai pasklidusi gelio plėvelė be oro burbuliukų (3 paveikslas.). Naudojant ploną mentelę, plokštė su gelio nešiklio lapu visiškai iš lėto nuleidžiama ir jai prispausti ant jos viršaus uždedamos trys stiklinės plokštės. Pasibaigus polimerizacijai (apie 60 min.), ant gelio nešiklio lapo gautas gelio polimeras ir dengiamasis lapas nuimami, apverčiant stiklines plokštes. Gelio nešiklio lapo išorinė pusė gerai nuvaloma gelio ir karbamido likučiams pašalinti. Kelių sluoksnių gelio nešiklio lapo kraštai suvirinami, taip iš plėvelės gaunamas vamzdis, kuris laikomas šaldytuve (ne ilgiau kaip šešias savaites).

Pastaba. Dengiamasis lapas su tarpikliais gali būti panaudotas dar kartą. Poliakrilamido gelį galima supjaustyti į mažesnius gabaliukus, ir taip daryti rekomenduojama, jei yra keli mėginiai arba jei naudojamas automatinis elektroforezės įrenginys (du geliai, kurių dydis 4,5 × 5 cm).

6.3. **Izoelektrinis fokusavimas**

Šaldymo termostatas nustatomas 12 °C. Gelio nešiklio lapo išorinė pusė nuvaloma žibalu, keli žibalo lašai (4.2) užlašinami ant šaldymo bloko vidurio. Ant jo patiesiamas kelių sluoksnių gelio nešiklio lapas gelio puse žemyn, vengiant oro burbuliukų susidarymo. Žibalo perteklius nuvalomas ir nuimamas dengiamasis lapas. Elektrodo juostelės suvilgomos anodiniu ir katodiniu tirpalais (4.3, 4.4), juostelės atpjaunamos pagal gelio ilgį ir dedamos į numatytas vietas (atstumas tarp elektrodų 9,5 cm).

▼B

Izoelektrinio fokusavimo sąlygos:

6.3.1. *Gelio plokštės matmenys 265 × 125 × 0,25 mm*

Žingsnis	Trukmė (min)	Įtampa (V)	Srovė (mA)	Galia (W)	Voltvalandės (Vh)
1. Parengiamasis fokusavimas	30	ne didesnė kaip 2 500	ne didesnė kaip 15	pastovi 4	apie 300
2. Mėginio fokusavimas ([1])	60	ne didesnė kaip 2 500	ne didesnė kaip 15	pastovi 4	apie 1 000
3. Galutinis fokusavimas	60	ne didesnė kaip 2 500	ne didesnė kaip 5	ne didesnė kaip 20	apie 3 000
	40	ne didesnė kaip 2 500	ne didesnė kaip 6	ne didesnė kaip 20	apie 3 000
	30	ne didesnė kaip 2 500	ne didesnė kaip 7	ne didesnė kaip 25	apie 3 000

([1]) Mėginio uždėjimas. Po parengtinio fokusavimo (1 veiksmas), ant mėginio aplikatorių (10 × 5 mm) pipete užlašinama po 18 µl mėginio ir etalono tirpalų, aplikatoriai dedami ant gelio 1 mm atstumu vienas nuo kito ir 5 mm išilginiu atstumu nuo anodo ir švelniai prispaudžiami. Fokusuojama pirmiau nurodytomis sąlygomis, nuimant mėginio aplikatorius praėjus 60 min po mėginio fokusavimo.

Pastaba. Jei gelių storis arba plotis keičiamas, srovės ir galios reikšmes turi būti tinkamai pataisytos (pvz., elektros srovės ir galios vertės dvigubinamos, jei naudojamas 265 × 125 × 0,5 mm matmenų gelis).

6.3.2. *Automatinio elektroforezės įtaiso įtampos programos pavyzdys (2 geliai 5,0 × 4,5 cm), elektrodai be juostų dedami tiesiai ant gelio.*

Žingsnis	Įtampa	Srovė	Galia	Temp.	Voltvalandės
1. Parengiamasis fokusavimas	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Mėginio fokusavimas	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusavimas	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusavimas	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Atliekant 2 žingsnį, mėginio aplikatorius uždedamas esant 0 Vh.

Atliekant 2 žingsnį, mėginio aplikatorius nuimamas esant 30 Vh.

6.4. **Baltymų dažymas**

6.4.1. *Baltymų fiksavimas*

Elektrodų juostos nuimamos iškart po maitinimo išjungimo ir gelis greitai įdedamas į dažymo (blukinimo) indą, į kurį įpilta 200 ml fiksažo (4.9); laikoma jame 15 min, visą laiką purtant.

6.4.2. *Gelio plokštės plovimas ir dažymas*

Fiksažas gerai nuvarvinamas ir gelio plokštė du kartus plaunama 30 s, kiekvieną kartą sunaudojant po 100 ml blukinimo tirpalo (4.10). Dažų blukinimo tirpalas išpilamas ir į indą pripilama 250 ml dažymo tirpalo (4.11.3); dažoma 45 min, švelniai purtant.

6.4.3. *Gelio plokštės blukinimas*

Dažymo tirpalas išpilamas, gelio plokštė plaunama du kartus, kiekvieną kartą sunaudojant po 100 ml blukinimo tirpalo (4.10), vėliau gelio plokštė 15 min purtoma 200 ml dažų blukinimo tirpale, ir blukinimo procedūra kartojama ne mažiau kaip du arba tris kartus tol, kol pagrindas tampa skaidrus ir bespalvis. Po to plokštė plaunama distiliuotu vandeniu (du kartus po 2 min) ir džiovinama ore (nuo 2 h iki 3 h) arba plaukų džiovintuvu (nuo10 min iki 15 min).

▼B

1 pastaba. Fiksuojama, plaunama, dažoma ir blukinama 20 °C temperatūroje. Neturi būti dirbama aukštoje temperatūroje.

2 pastaba. Jei naudojamas jautresnis dažymo tirpalas (pvz., *Siver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code* No.17–1150–01), plazminu apdoroti kazeino mėginiai turi būti atskiesti iki 5 mg/ml.

7. ĮVERTINIMAS

Įvertinama lyginant nežinomo mėginio ir etalono baltymų elektroforegramas ant to paties gelio. Karvių pienas nustatomas sūriuose iš avių, ožkų ir buivolių pieno ir iš avių, buivolių ir ožkų pieno mišinių pagal γ_3- ir γ_2-kazeinus, kurių izoelektrinis taškas yra nuo pH 6,5 iki pH 7,5 (4 a, b paveikslai ir 5 paveikslas). Aptikimo riba yra mažesnė kaip 0,5 %.

7.1. **Vizualinis įvertinimas**

Norint vizualiai įvertinti karvių pieno kiekį, rekomenduojama parinkti tokią mėginių ir etalonų koncentraciją, kad būtų gautas vienodas avių, ožkų ir (arba) buivolių γ_2- ir γ_3-kazeinų intensyvumas (žr. γ_2 E,G,B ir γ_3 E,G,B 4 a, b paveiksluose ir 5 paveiksle). Tokiu atveju apie karvių pieno kiekį (mažesnis, lygus ar didesnis kaip 1 %) nežinomame mėginyje galima spręsti tiesiog lyginant karvių pieno γ_3- ir γ_2-kazeinų intensyvumą (žr. γ_3 C ir γ_2 C 4 a, b paveiksluose ir 5 paveiksle) su kazeinų intensyvumu 0 % ir 1 % pamatiniuose etalonuose (avių, ožkų pieno) arba laikinuosiuose laboratoriniuose etalonuose (buivolių pieno).

7.2. **Densitometrinis įvertinimas**

Jei yra galimybių, taikomas densitometrinis metodas (5.19) karvių ir avių, ožkų ir (arba) buivolių γ_2- ir γ_3-kazeinų smailių plotų santykiui nustatyti (žr. 5 paveikslą). Ši vertė lyginama su ant to paties gelio analizuotų 1 % pamatinių etalonų (avių, ožkų pieno) arba laikinųjų laboratorinių etalonų (buivolių pieno), γ_2- ir γ_3-kazeinų smailių plotų santykiu.

Pastaba. Metodas veikia tinkamai, jei yra aiškus teigiamas karvių γ_2- ir γ_3-kazeinų signalas 1 % pamatiniam etalonui, bet ne 0 % pamatiniam etalonui. Jei taip nėra, procedūra optimizuojama tiksliai laikantis metodo detalių.

Laikoma, kad mėginiui yra gautas teigiamas rezultatas, jei karvių pieno abiejų γ_2- ir γ_3-kazeinų arba atitinkamų smailių plotų santykiai yra lygus arba didesni kaip 1 % pamatinio etalono vertės.

8. NUORODOS

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

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

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

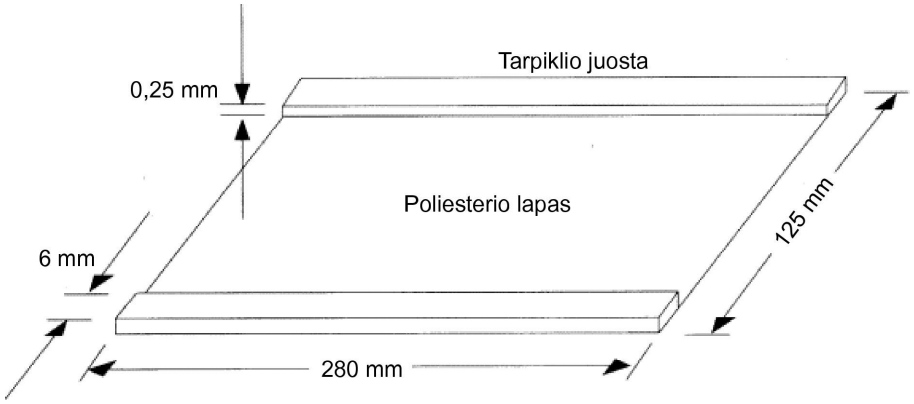
4. *Krause I., Belitz H.–D., Kaiser K.–P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195–199 (1982).*

▼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).*

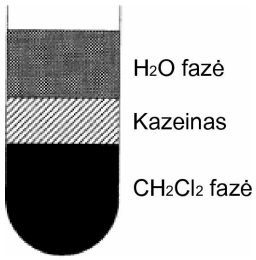
1 paveikslas

Scheminis dengiamojo lapo vaizdas



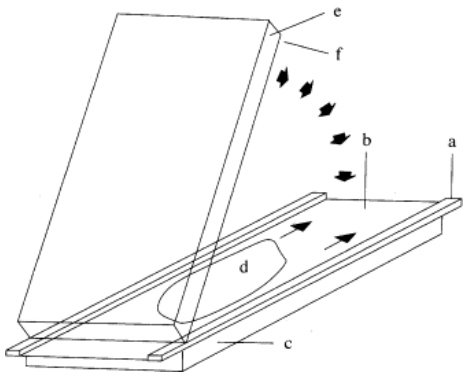
2 paveikslas

Kazeino sluoksnis, kuris plūduriuoja tarp vandeninės ir organinės fazių po centrifugavimo



3 paveikslas

Labai plono poliakrilamido gelio sluoksnio liejimo prispaudimu būdas

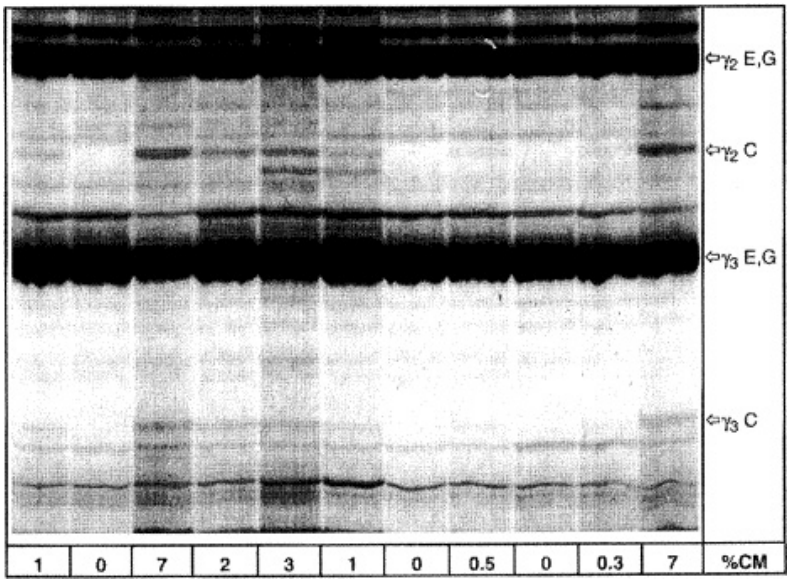


a – tarpikio juosta (0,25 mm); b – dengiamasis lapas (5.3); c, e – stiklinės plokštės (5.1); d – gelio tirpalas (4.1.2); f – gelio nešiklio lapas (5.2)

▼B

4a paveikslas

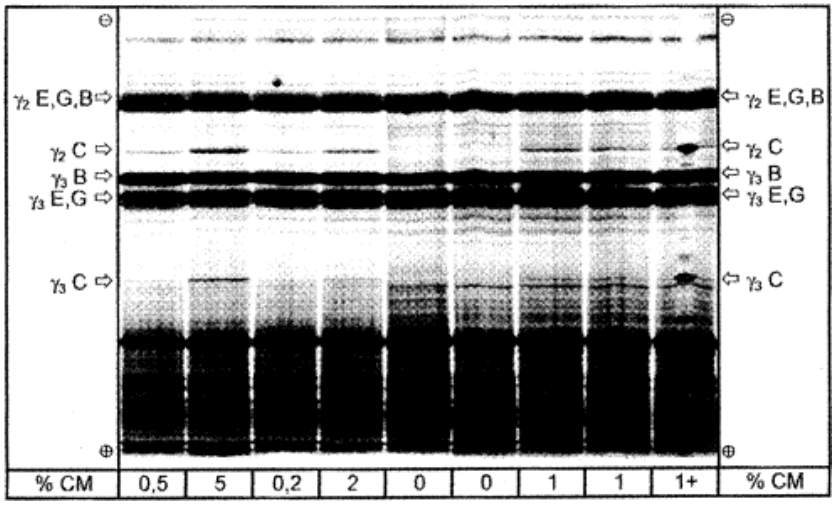
Plazminu apdorotų kazeinų, gautų iš skirtinga kiekį karvių pieno turinčių avių ir ožkų pieno sūrių, izoelektrinis fokusavimas



% CM – karvių pieno procentinis kiekis, C – karvių pienas, E – avių pienas, G – ožkų pienas
Pavaizduota viršutinė IEF gelio pusė.

4b paveikslas

Plazminu apdorotų kazeinų, gautų iš skirtinga kiekį karvių pieno turinčių avių, ožkų ir buivolių pieno mišinių sūrių, izoelektrinis fokusavimas

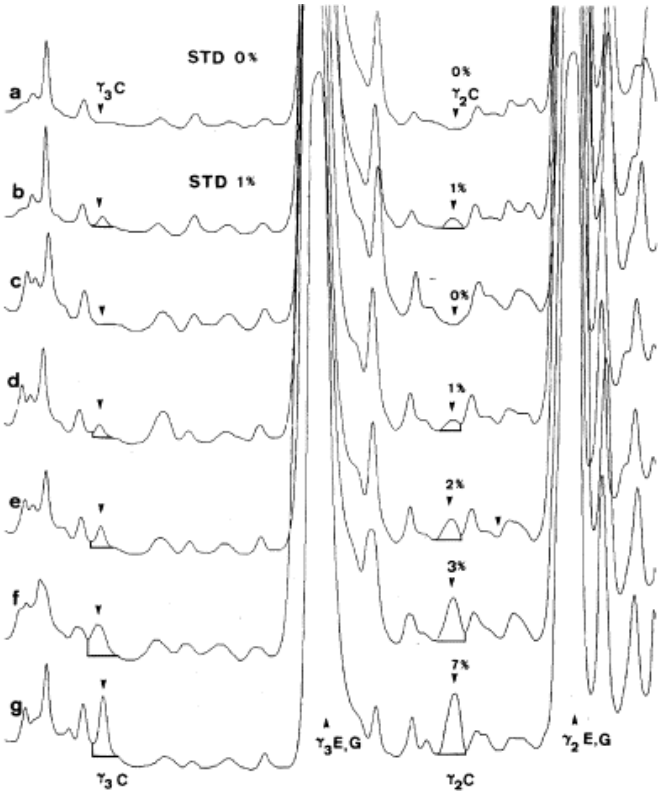


% CM – karvių pieno procentinis kiekis; 1 + – mėginys, turintis 1 % karvių pieno, į kurį elektroforegramos viduryje pridėta gryno karvių pieno kazeino. C – karvių pienas, E – avių pienas, G – ožkų pienas, B – buivolių pienas.
Pavaizduotas visas atskyrimo ant IEF gelio atstumas.

▼B

5 paveikslas

Etalonų (STD) ir iš avių bei ožkų pieno pagamintų sūrių mėginių densitogramų po izoelektrinio fokusavimo sanklota



a,b – etalonai, turintys 0 % ir 1 % karvių pieno; c–g – sūrio mėginiai, turintys 0, 1, 2, 3 ir 7 % karvių pieno. C – karvių pienas, E – avių pienas; G – ožkų pienas.
Viršutinė IEF gelio pusė buvo skenuojama, esant λ = 634 nm.

▼B

X PRIEDAS

(7 straipsnis)

KOLIFORMINIŲ BAKTERIJŲ NUSTATYMO SVIESTE, NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE, KAZEINE IR KAZEINATUOSE PAMATINIS METODAS

1. MĖGINIŲ RUOŠIMAS

   ISO standartas 8261.

2. PROCEDŪRA

   ISO standartas 4831.

   Į mitybinę terpę įdiegiami 1 g sviesto arba 0,1 g nugriebto pieno miltelių arba kazeino (kazeinatų) atitinkantys mėginiai.

   Vienam mėginiui diegimas atliekamas trijuose mėgintuvėliuose.

3. REZULTATAI

   Jei 3 mėgintuvėliuose gaunami 3 neigiami rezultatai, rezultatas atitinka reikalavimus.

   Jei iš 3 mėgintuvėlių 2 arba 3 gaunami teigiami rezultatai, rezultatas neatitinka reikalavimų.

   Jei iš 3 mėgintuvėlių 2 gaunami neigiami rezultatai, analizė kartojama du kartus (su dviem mėgintuvėliais):

   — jei 2 rezultatai neigiami, rezultatas atitinka reikalavimus,

   — jei nors 1 rezultatas yra teigiamas, rezultatas neatitinka reikalavimų.

▼B

XI PRIEDAS

(8 straipsnis)

LAKTOZĖS NUSTATYMAS KOMBINUOTUOSIUOSE PAŠARUOSE

1. TAIKYMO SRITIS

Laktozės nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose.

2. NUORODA

Laktozės kiekis, nustatytas taikant aprašytą procedūrą, nurodomas masės procentais.

3. APIBRĖŽTIS

Bevandenės laktozės kiekis išreiškiamas g laktozės 100 g mėginio.

4. METODO ESMĖ

Kombinuotųjų pašarų koncentratas skiedžiamas vandeniu. Į pasvertą praskiestą alikvotinę dalį įpilama *Biggs* tirpalo kombinuotųjų pašarų riebalų ir baltymų komponentams nusodinti. Mėginys filtruojamas (arba centrifuguojamas), o filtratas (arba centrifugatas) įpurškiamas į švino jonų jonitinę HPLC kolonėlę, kaip judančiąją fazę naudojant HPLC grynumo vandenį. Išplauta laktozė nustatoma diferenciniu refraktometru ([i]).

5. REAGENTAI

5.1. **Bendrosios pastabos**

Naudojami tik analitiškai gryni reagentai, jei nenurodyta kitaip, ir HPLC grynumo nudujintas vanduo.

5.2. **Laktozė**

D-laktozės monohidratas ($(C_{12}H_{22})O_{11} \cdot H_2O$) gali sugerti drėgmę papildomai. Prieš ją naudojant matuojamas faktinis vandens kiekis Karlo Fisherio metodu arba papildoma drėgmė pašalinama, 8 h laikant laktozę 105 °C temperatūros džiovinimo spintoje (taip apdorojant laktozę kristalizacinis vanduo lieka).

5.3. **Koncentruotas *Biggs/Szijarto* tirpalas** ([ii])

9,10 g cinko acetato dihidrato ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) ir 5,46 g fosforovolframo rūgšties monohidrato ($H_3[P(W_3O_{10})_4 \cdot xH_2O]$) tirpinama 100 ml matavimo kolboje, įpilant maždaug 70 ml HPLC grynumo vandens (6.8).

Įpilama 5,81 ml ledinės acto rūgšties (CH_3COOH). Skiedžiama iki 100 ml žymės HPLC grynumo vandeniu (6.8) ir sumaišoma. Tirpalas gali būti laikomas kambario temperatūroje 1 metus.

5.4. **Praskiestas *Biggs/Szijarto* tirpalas**

25 ml koncentruoto *Biggs/Szijarto* tirpalo (5.3) skiedžiama matavimo kolboje vandeniu iki 500 ml. Tirpalas gali būti laikomas kambario temperatūroje 1 mėnesį.

5.5. **HPLC grynumo vandens ruošimas**

Ypač grynas vanduo (6.8) filtruojamas vakuuminio filtravimo sistema (6.9). Siurblio veiksmingumui pagerinti ir stabiliai bazinei linijai gauti, judančioji fazė kasdien nudujinama, pasirenkant vieną iš esamų būdų, pvz., prapūtimą heliu, veikimą ultragarsu, vakuumavimą arba naudojant linijoje įrengtą nudujinimo sistemą.

Pastaba: Siekiant prailginti kolonėlės naudojimo trukmę, svarbu, kad anglies dioksido kiekis eliuente būtų kiek įmanoma mažesnis ir būtų išvengta jo sugėrimo.

▼B

6. APARATŪRA

Įprasta laboratorinė įranga, o visų pirma:

6.1. **HPLC kolonėlė su jonitine derva**

Kolonėlės įkrova: 8 % tinklinės struktūros polistireno ir divinilbenzeno kopolimeras su švino jonų funkcinėmis katijonitų grupėmis.

Kolonėlės matmenys: ilgis 300 mm, vidinis skersmuo apie 8 mm.

Galima naudoti kito skersmens kolonėles, jei atitinkamai reguliuojamas srautas.

6.2. **Apsauginė kolonėlė**

Apsauginė kolonėlė yra atskirai katijonito (H^+) ir anijonito (CO_3-) derinys, kurių kiekvienas supilamas į nuosekliai sujungtas maždaug 30 mm × 4,6 mm (L × VS) kolonėles (*pvz*., apsauginės mikrokolonėlės su laikikliu), arba kolonėlė su mišriuoju sluoksniu, kurį sudaro AG 50W–X4, – 400 mešų (H^+) ir AG3-X4A, 200–400 mešų (OH-) santykiu 35:65 (masės), rankiniu būdu supiltų į maždaug 20 × 9 mm (L × VS) kolonėlę.

6.3. **Kolonėlės krosnis**

Krosnis, kurioje gali būti palaikoma pastovi 85 °C ± 1 °C temperatūra.

6.4. **HPLC siurblys**

Siurblys, kuriuo galima gauti pastovų 0,2–1,0 ml/min srautą (svyravimas < 0,5 %).

6.5. **HPLC įpurškimo įtaisas**

Automatinis ėmiklis, kuris gali įpurkšti 25 µl ir kurio pakartojamumas < 0,5 %.

Vietoj jo galima naudoti rankinio valdymo įtaisą (turi atitikti automatinio ėmiklio reikalavimus).

6.6. **HPLC detektorius**

Didelio jautrio lūžio rodiklio detektorius, kurio triukšmas < $5{,}10^{-9}$ lūžio rodiklio vieneto.

6.7. **Integratorius**

Programinė įranga arba specialiosios paskirties integratorius duomenims kaupti, apdoroti ir gauti smailių plotą bei aukštį, kuriuos būtų galima perskaičiuoti į laktozės koncentraciją.

6.8. **Vandens gryninimo įrenginys**

Sistema, kuria galima gauti ypač gryną vandenį (1 tipo), kurio savitoji varža > 14 MΩ.cm.

6.9. **Tirpiklio filtravimo įrenginys**

Sistema, kuria galima filtruoti vandenį per 0,45 µm akučių membraninį filtrą.

Pastaba: Daugelyje vandens gryninimo įrenginių (6.8) yra 0,45 arba 0,2 µm filtrai. Jei tiesiogiai naudojamas šis vanduo, jo papildomai filtruoti nereikia.

6.10. **Analizės svarstyklės**

Svarstyklės, kurių mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg.

6.11. **Vandens vonia**

Vandens vonia, kuri gali palaikyti 40 °C (±0,5) temperatūrą.

6.12. **Centrifuga**

Galinti sukurti ne mažesnį kaip 3 000*g* pagreitį, naudojant Ependorfo mėgintuvėlius arba lygiaverčius ar didesnius mėgintuvėlius.

▼B

6.13. **Matavimo kolba, 50 ml**

Talpa 50 ml, A klasė.

Pastaba: Galima naudoti kitos talpos kolbas, atsižvelgiant į praskiedimo faktorių.

6.14. **Matavimo kolba, 100 ml**

Talpa 100 ml, A klasė.

6.15. **Graduota pipetė**

Graduota pipetė, 10 ml

Pastaba: Vietoj jos galima naudoti rankinio valdymo 5 ml talpos daugiakanalę pipetę, įpilant du kartus po 5 ml reagento (5.3).

7. ĖMINIŲ ĖMIMAS

Svarbu, kad laboratorija gautų ėminį, paimtą pagal ISO 707/IDF 50 ([iii]), kuris būtų tikrai reprezentatyvus ir nesugadintas vežant arba laikant.

8. LAKTOZĖS ETALONINIO TIRPALO RUOŠIMAS

8.1. **1 etaloninis tirpalas**

Į 100 ml matavimo kolbą (5.2) ištirpinama apie 50 mg tiksliai (mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg) pasverto laktozės monohidrato (6.14) ir skiedžiama iki žymės vandeniu.

8.2. **2 etaloninis tirpalas**

Į 100 ml matavimo kolbą (5.2) ištirpinama apie 100 mg tiksliai (mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg) pasverto laktozės monohidrato (6.14) ir skiedžiama iki žymės vandeniu.

Pastaba: Etaloninius tirpalus galima laikyti maždaug 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 1 savaitę.

9. MĖGINIO RUOŠIMAS

9.1. **Mėginio koncentrato skiedimas**

Į 50 ml kolbą (6.13) pasveriama apie 5 g miltelių, masę užrašant 1 mg tikslumu (W_1, (11)). Įpilama 50 ml vandens ir padidėjusi masė užrašoma 0,01 g tikslumu (W_2 (11)). Užkimšta kolba 30 min dedama į vandens vonią (6.11), per tą laiką ją kelis kartus apverčiant. Vėliau kolba paliekama atausti iki kambario temperatūros.

9.2. **Mėginio apdorojimas**

Maždaug 1 g šio tirpalo supilama 50 ml matavimo kolbą (6.13), masę užrašant 1 mg tikslumu (W_3 (11)), įpilama 20 ml vandens, vėliau 10 ml praskiesto Biggs/Szijarto reagento (5.4) ir skiedžiama iki žymės vandeniu. Kolba švelniai apverčiama 5 kartus per pirmąsias 30 min.

Po 1 h paimama alikvotinė dalis ir 10 min centrifuguojama (6.12), esant 3 000 g (galima naudoti didesnes g vertes, trumpiau centrifuguojant). Alikvotinė centrifugato dalis naudojama HPLC analizei.

10. HPLC NUSTATYMAS

10.1. **Pradinis pasiruošimas HPLC analizei**

10.1.1. *Kolonėlės ir prieškolonėlės įrengimas*

Prieškolonėlė (6.2) įrengiama kolonėlės krosnies (6.3) išorėje, o kolonėlė (6.1) krosnyje.

Pastaba: Jei krosnyje nėra vamzdžių pradiniam eliuento šildymui, būtina, kad prieš patekdamas į kolonėlę eliuentas tekėtų krosnyje maždaug 15 cm ilgio nerūdijančiojo plieno vamzdžiu (pradinis eliuento šildymas prieš jam patenkant į kolonėlę yra būtinas, kitaip platėja smailės).

▼B

10.1.2. *Detektorius ir pradinis srautas*

Kad būtų gauta pastovi bazinė linija, detektorius (6.6) įjungiamas ne vėliau kaip 24 val. prieš analizės pradžią. Nustatoma 35 C vidinė detektoriaus temperatūra. Nustatomas 0,2 ml/min (6.4) srautas ne trumpiau kaip 20 min., o kolonėlės krosnis (6.3) nustatoma kambario temperatūrai.

10.1.3. *Kolonėlės krosnis ir galutinis srautas*

Kolonėlės krosnies (6.3) temperatūra nustatoma 85 °C. Praėjus 30 min, kai pasiekiama ši temperatūra, srautas palaipsniui didinamas nuo 0,2 ml/min iki 0,6 ml/min (6.4). Esant šiam srautui ir 85 °C, sistema paliekama pusiausvyrai nusistovėti 2 h arba tol, kol gaunama pastovi bazinė linija.

10.1.4. *Integravimas*

Kruopščiai parenkami duomenų kaupimo ir integravimo parametrai (6.7), pvz., duomenų gavimo sparta, jautris, laiko konstanta, smailės plotis ir ribinė vertė.

Laktozės sulaikymo trukmė yra apie 11 min.

Pastaba: Daug duomenų kaupimo programų (6.7) sudaro sąlygas lengvai išmatuoti teorinių lėkščių skaičių. Reguliariai matuojamas 1 etaloninio tirpalo (8.1) teorinių lėkščių skaičius ir kolonėlė (6.1) keičiama, kai teorinių lėkščių skaičius yra 25 % mažesnis nei naujos kolonėlės pradinė vertė.

10.1.5. *Apsauginės kolonėlės tikrinimas*

Reguliariai (bet kartą kiekvienai serijai) tikrinama apsauginės kolonėlės (6.2) geba šalinti druskas iš mėginio, įpurškiant 25 µl 0,05 % natrio chlorido tirpalo. Jei atsiranda smailės, apsauginė kolonėlė turėtų būti pakeista.

10.2. **Etalonų eliuavimas**

Prieš kiekvieną analizių seriją įpurškiama 25 µl (6.5) 1 etaloninio tirpalo (8.1) ir vėliau 2 etaloninio tirpalo (8.2). Šis veiksmas kartojamas kas 10–20 mėginių ir serijos pabaigoje.

10.3. **Mėginių eliuavimas**

Įpurškiama 25 µl ėminio centrifugato (9.2).

11. APSKAIČIAVIMAS IR REZULTATŲ IŠRAIŠKA

11.1. **Kalibravimas**

Rezultatams apskaičiuoti paprastai naudojamas smailių aukštis, tačiau jei signalą sudaro per didelė triukšmo dedamoji, galima naudoti smailių plotą (kiekybinį nustatymą pagal smailių aukštį mažiau veikia mažos koncentracijos komponentų smailės, kurios yra iš dalies, bet nepakankamai atsiskyrusios nuo laktozės smailės).

Programa (6.7) turėtų apskaičiuoti per koordinačių pradžią einančią tiesinę kalibravimo kreivę. Tikrinamas galimas kreivės netiesiškumas (matomo netiesiškumo dažniausia priežastis – klaida ruošiant 1 (8.1) arba 2 (8.2) etaloną, netinkamas integravimas ir, mažiau tikėtina, blogai veikiantis injektorius).

Kaip įvesties duomenys naudojamos apskaičiuotos 1 (8.1) arba 2 (8.2) etalono laktozės koncentracijos vertės, išreikštos mg/ml bevandenės laktozės.

Kalibravimo tiesės kampinis koeficientas (RF) apibrėžiamas kaip plotas/koncentracija mg/ml santykis.

11.2. **Mėginiai**

Gautas analizės rezultatas išreiškiamas g/100 g ir apskaičiuojamas naudojant programinę įrangą (6.7) arba šią formulę:

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

▼B

čia:

C: laktozės koncentracija, g/100 g miltelių;

H: mėginio laktozės smailės aukštis;

RF: kalibravimo tiesės atsako faktorius (kampinis koeficientas), mV/mg/ml;

W_1: miltelių mėginio masė (9.1), g;

W_2: į miltelių mėginį įpilto vandens masė (9.1), g;

W_3: atskiesto miltelių koncentrato tirpalo masė (9.2), g;

50: (9.2) naudotos matavimo kolbos tūris;

0,1: rezultato perskaičiavimo į g/100 g faktorius.

12. TIKSLUMAS

Šiame tarplaboratoriniame tyrime gautos vertės gali netikti kitoms nei nurodytos koncentracijos vertėms ir matricoms. Pakartojamumo ir atkuriamumo vertės bus nustatytos naudojant rezultatus, gautus atlikus laboratorinį tyrimą pagal ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Pakartojamumas**

Dviejų atskirų analizių rezultatų, kuriuos vienas analitikas gavo per trumpą laiką toje pačioje laboratorijoje, ta pačia įranga tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip xxx (turi būti nustatytas atliekant tarplaboratorinį tyrimą) ([v]).

12.2. **Atkuriamumas**

Dviejų atskirų analizių rezultatų, kuriuos skirtingi analitikai gavo skirtingose laboratorijose, dirbdami su skirtinga įranga ir tai pačiai bandomajai medžiagai taikydami tą patį metodą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 0,5 g/100g (turi būti nustatytas atliekant tarplaboratorinį tyrimą).

13. NUORODOS

([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 PRIEDAS

(9 straipsnis)

FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ APTIKIMAS VIEŠAJAM SAUGOJIMUI SKIRTUOSE NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE NUSTATANT GLIKOMAKROPEPTIDUS EFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS (HPLC) METODU

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatant *kazeino makropeptidus* galima aptikti fermentines išrūgas viešajam saugojimui skirtuose nugriebto pieno milteliuose.

2. NUORODA

Tarptautinis standartas ISO 707 *Milk and Milk Products – Methods of sampling* (*Pienas ir pieno produktai. Mėginių ėmimo taisyklės*) atitinkantis rekomendacijas, pateiktas I priedo 2 dalies c punkto paskutinę pastraipą.

3. APIBRĖŽTIS

Fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų kiekis apibrėžiamas kaip procentais išreikštas kazeino makropeptidų kiekis, nustatytas taikant aprašytą procedūrą.

4. METODO ESMĖ

— Pieno gavimas iš nugriebto pieno miltelių, riebalų ir baltymų nusodinimas trichloracto rūgštimi ir atskyrimas centrifugavimu arba filtravimu.

— Kazeino makropeptidų (CMP) nustatymas centrifugate didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodu (HPLC).

— Mėginiams gautų rezultatų įvertinimas, lyginant juos su etaloniniais mėginiais, gautais į nugriebto pieno miltelius pridedant arba nepridedant žinomą procentinį kiekį išrūgų miltelių.

5. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti analitiškai gryni, naudojamas vanduo – distiliuotas arba tokio pat grynumo.

5.1. **Trichloracto rūgšties tirpalas**

240 g trichloracto rūgšties (CCl_3COOH) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 000 ml. Tirpalas turėtų būti skaidrus ir bespalvis.

5.2. **Eliuento tirpalas, pH 6,0**

1,74 g dikalio hidrofosfato (K_2HPO_4), 12,37 g kalio dihidrofosfato (KH_2PO_4) ir 21,41 g natrio sulfato (Na_2SO_4) ištirpinama maždaug 700 ml vandens. Prireikus pH reguliuojamas fosforo rūgšties arba kalio hidroksido tirpalu, nustatant pH 6,0.

Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml ir sumaišoma.

Pastaba: Eliuento sudėtis gali būti atnaujinta, kad ji galėtų atitikti standartų sertifikatą arba kolonėlės įkrovos medžiagos gamintojo rekomendacijas.

Prieš vartojant eliuento tirpalas filtruojamas per membraninį filtrą, kurio akučių skersmuo 0,45 μm.

5.3. **Plovimo tirpiklis**

Maišomas vienas tūris acetonitrilo (CH_3CN) ir devyni tūriai vandens. Prieš vartojant mišinys filtruojamas per membraninį filtrą, kurio akučių skersmuo 0,45 μm.

▼B

Pastaba: Galima naudoti bet kurį kitą baktericidinį plovimo tirpiklį, kuris neblogintų kolonėlės skiriamosios gebos.

5.4. **Etaloniniai mėginiai**

5.4.1. *Nugriebto pieno milteliai, atitinkantys šios Rezoliucijos nustatytus reikalavimus (t. y. [0])*

5.4.2. *Tie patys nugriebto pieno milteliai, į kuriuos įdėta 5 % (masės) etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y. [5])*

6. APARATŪRA

6.1. Analizės svarstyklės

6.2. Bet kokio tipo centrifuga, kuria galima gauti 2 200 g ištcentrinę jėgą, ir maždaug 50 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėliai su kamščiais arba dangčiais

6.3. Mechaninė purtyklė

6.4. Magnetinė maišyklė

6.5. Stikliniai piltuvai, skersmuo apie 7 cm

6.6. Filtravimo popierius, vidutinio tankio, skersmuo apie 12,5 cm

6.7. Filtravimo per stiklinį filtrą įranga, naudojant 0,45 μm skersmens membraninį filtrą

6.8. 10 ml talpos graduotos pipetės (ISO 648 A klasė arba ISO/R 835) arba dozavimo sistema, kuri galėtų tiekti 10,0 ml per dvi minutes

6.9. Dozavimo sistema, galinti tiekti 20,0 ml maždaug 50 °C temperatūros vandens

6.10. Reguliuojamos temperatūros vandens vonia, nustatyta 25 ± 0,5 °C

6.11. HPLC įranga, kurią sudaro:

6.11.1. Siurblys

6.11.2. Injektorius, rankinio arba automatinio valdymo, 15–30 μl talpos

6.11.3. Dvi nuosekliai sujungtos TSK 2 000-SW kolonėlės (ilgis 30 cm, vidinis skersmuo 0,75 cm) arba lygiavertės kolonėlės (pvz., viena TSK 2 000-SWxl, viena Agilent Technologies Zorbax GF 250) ir prieškolonėlė (3 cm × 0,3 cm) su I 125 arba tokio paties veiksmingumo medžiagos įkrova

6.11.4. Reguliuojamos temperatūros kolonėlių krosnis, nustatyta 35 ± 1 °C

6.11.5. Keičiamo bangos ilgio UV detektorius, kuriuo būtų galima matuoti esant 205 nm ir 0,008 A *jautriui*

6.11.6. Integratorius, kuriuo galima integruoti tarp įdubų

Pastaba: Kolonėlės gali veikti kambario temperatūroje, bet šiek tiek sumažėtų jų skiriamoji geba. Tokiu atveju atliekant bet kurią analizių seriją, temperatūra neturėtų svyruoti daugiau kaip ± 5 °C.

7. ĖMINIŲ ĖMIMAS

7.1. Ėminiai turi būti imami pagal tarptautiniame standarte ISO 707 nustatytą procedūrą. Tačiau valstybės narės gali taikyti kitą ėminių ėmimo metodą, jei jis atitinka nurodyto standarto principus.

7.2. Ėminiai laikomi tokiomis sąlygomis, kuriomis jie nebūtų sugadinti arba nepakistų jų sudėtis.

8. PROCEDŪRA

▼B

8.1. **Mėginio ruošimas**

Milteliai suberiami į maždaug dvigubai didesnio tūrio nei miltelių tūris indą su orui sandariu dangčiu. Dangtis tuoj pat uždaromas. Pieno milteliai gerai sumaišomi kelis kartus apverčiant indą.

8.2. **Tiriamoji mėginio dalis**

Į centrifugavimo mėgintuvėlį (6.2) arba į tinkamą užkemšamą kolbą (50 ml) pasveriama 2,000 ± 0,001 g mėginio.

8.3. **Riebalų ir baltymų pašalinimas**

8.3.1. Į tiriamąjį mėginį įpilama 20,0 ml šilto vandens (50 °C). Milteliai ištirpinami purtant penkias minutes mechanine purtykle (6.3). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonią (6.10) 25 °C pusiausvyrinei temperatūrai pasiekti.

8.3.2. Per dvi minutes supilama maždaug 25 °C temperatūros 10,0 ml trichloracto rūgšties tirpalo (5.1), stipriai maišant magnetine maišykle (6.4). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonią (6.10) ir paliekamas 60 min.

8.3.3. Centrifuguojama (6.2) 10 min, esant 2 200 g, arba filtruojama per filtravimo popierių (6.6), išpilant pirmuosius 5 ml filtrato.

8.4. **Chromatografinis nustatymas**

8.4.1. Nuo 15 iki 30 µl tiksliai žinomo tūrio centrifugato arba filtrato (8.3.3) įpurškiama į HPLC aparatą (6.11), kuris veikia esant 1,0 ml per minutę eliuento tirpalo (5.2) srautui.

1 pastaba: Gali būti kitas srautas, atsižvelgiant į naudojamų kolonėlių vidinį skersmenį arba į kolonėlės gamintojo instrukcijas.

2 pastaba: Eliuento tirpalo (5.2) temperatūra visą chromatografinės analizės trukmę turi būti 85 °C, kad eliuentas būtų nudujintas ir būtų išvengta bakterijų augimo. Galima naudoti bet kurias kitas panašaus poveikio apsaugines priemones.

3 pastaba: Kiekvienos pertraukos metu kolonėles reikia plauti vandeniu. Jokiu būdu negalima palikti jose eliuento (5.2).

Prieš ilgesnę nei 24 valandų pertrauką kolonėles reikia išplauti vandeniu ir dar mažiausiai tris valandas plauti tirpalu (5.3), esant 0,2 ml per minutę srautui.

8.4.2. Mėginio (E) chromatografinės analizės rezultatai užrašomi kaip chromatograma, kurios kiekviena smailė identifikuojama pagal sulaikymo trukmę RT taip:

II smailė:	antroji chromatogramos smailė, kurios RT yra apie 12,5 min.
III smailė:	trečioji chromatogramos smailė, atitinkanti CMP, kurios RT yra 15,5 min.

Pasirinkta (-os) kolonėlė (-ės) gali labai paveikti atskirų smailių sulaikymo trukmės vertes.

Integratorius (6.11.6) automatiškai apskaičiuoja kiekvienos smailės plotą A:

A_{II}:	II smailės plotas
A_{III}:	III smailės plotas

Prieš atliekant kiekybinį duomenų įvertinimą labai svarbu išnagrinėti kiekvienos chromatogramos išvaizdą, kad būtų galima aptikti visus neįprastus rezultatus dėl aparatūros arba kolonėlių netinkamo veikimo arba dėl analizuojamo ėminio kilmės ir tipo.

Jei yra abejonių, analizė kartojama.

▼B

8.5. **Kalibravimas**

8.5.1. Etaloniniams mėginiams (5.4) tiksliai taikoma procedūra, aprašyta nuo 8.2 punkto iki 8.4.2 punkto.

Naudojami tik ką paruošti tirpalai, nes CMP skyla 8 % trichloracto rūgšties tirpale. Esant 30 °C temperatūrai, skilimo sparta yra 0,2 % per valandą.

8.5.2. Prieš mėginių chromatografinę analizę kolonėlės kondicionuojamos, kelis kartus įpurškiant etaloninio mėginio (5.4.2) tirpalą (8.5.1) tol, kol gaunamas pastovus CMP atitinkančios smailės plotas ir sulaikymo trukmė.

8.5.3. Atsako faktoriai R nustatomi įpurškiant filtratų (8.5.1) tūrį, atitinkantį mėginių tūrį.

9. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

9.1. **Apskaičiavimo metodas ir formulės**

9.1.1. *Atsako faktorių R apskaičiavimas:*

II smailė:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

čia:

R_{II} = II smailių atsako faktoriai,

A_{II} [0] = etaloninio mėginio [0] II smailių plotai, gauti 8.5.3.

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

čia:

R_{III} = III smailės atsako faktoriai,

A_{III} [0] ir A_{III} [5] = etaloninių mėginių [0] ir [5] III smailės plotai, gauti 8.5.3,

W = išrūgų kiekis etaloniniame ėminyje [5], t. y. 5.

9.1.2. *Mėginio [E] smailių santykinio ploto apskaičiavimas*

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

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

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

čia:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = mėginio [E] II, III ir IV smailių santykiniai plotai,

A_{II} [E], A_{III} [E] = mėginio [E] II ir III smailių plotai, gauti 8.4.2,

R_{II}, R_{III} = atsako faktoriai, apskaičiuoti 9.1.1.

9.1.3. *Mėginio [E] III smailės santykinės sulaikymo trukmės apskaičiavimas:* $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$

čia:

RRT_{III} [E] = mėginio [E] III smailės santykinė sulaikymo trukmė,

RT_{III} [E] = mėginio [E] III smailės sulaikymo trukmė, gauta 8.4.2,

▼B

RT_{III} [5] = etaloninio mėginio [5] III smailės sulaikymo trukmė, gauta 8.5.3.

9.1.4. Tyrimais nustatyta, kad III smailės santykinę sulaikymo trukmę, t. y. RRT_{III} [E], ir išrūgų miltelių, kurių įdėta ne daugiau kaip 10 %, kiekį sieja tiesinis santykis

— RRT_{III} [E] yra < 1,000, kai išrūgų kiekis > 5 %,

— RRT_{III} [E] yra ≥ 1,000, kai išrūgų kiekis ≤ 5 %.

RRT_{III} vertėms leidžiama neapibrėžtis yra ±0,002.

Paprastai RRT_{III} [0] vertė nedaug skiriasi nuo 1,034. Atsižvelgiant į kolonėlių būklę, ši vertė gali priartėti prie 1,000, tačiau ji visuomet turi būti didesnė nei vienetas.

9.2. Fermentinių išrūgų miltelių mėginyje procentinio kiekio apskaičiavimas:

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

čia:

W = fermentinių išrūgų mėginyje [E] kiekis, masės procentais;

S_{III} [E] = mėginio [E] III smailės santykinis plotas, gautas 9.1.2;

1,3 = atitinka vidutinį santykinį II smailės plotą, išreikštą fermentinių išrūgų gramais 100 gramų miltelių, nustatytą įvairios kilmės nefalsifikuotiems nugriebto pieno milteliams. Šis skaičius gautas bandymų keliu;

S_{III} [0] = atitinka III smailės santykinį plotą, kuris yra lygus $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Šios vertės gautos 9.1.1 ir 8.5.3;

(S_{III} [0] – 0,9) = atitinka pataisą, kuri turi būti padaryta santykiniam vidutiniam plotui 1,3, kai S_{III} [0] nėra lygus 0,9. Bandymais nustatyta, kad vidutinis santykinis etaloninio mėginio [0] III smailės plotas lygus 0,9.

9.3. **Procedūros tikslumas**

9.3.1. *Pakartojamumas*

Dviejų nustatymų rezultatų, kuriuos vienas analitikas gavo vienu metu arba per trumpą laiką ta pačia aparatūra tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 0,2 % masės.

9.3.2. *Atkuriamumas*

Dviejų atskirų nepriklausomų rezultatų, gautų tai pačiai bandomajai medžiagai dviejose skirtingose laboratorijose, skirtumas neturi būti didesnis kaip 0,4 % masės.

9.4. **Aiškinimas**

9.4.1. Daroma prielaida, kad išrūgų nėra, jei III smailės santykinis plotas S_{III} [E], išreikštas fermentinių išrūgų gramais 100 g produkto, yra ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), kai:

2,0 = didžiausias galimas santykinis III smailės plotas, atsižvelgiant į santykinį III smailės plotą, t.y. 1,3, neapibrėžtį dėl nugriebto pieno miltelių sudėties kitimo ir metodo atkuriamumą (9.3.2),

(S_{III} [0] – 0,9) = pataisa, kuri daroma, kai plotas S_{III} [0] nėra lygus 0,9 (žr. 9.2 punktą).

9.4.2. Jei III smailės santykinis plotas S_{III} [E] yra > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) ir II smailės santykinis plotas S_{II} [E] ≤ 160, fermentinių išrūgų kiekis nustatomas, kaip nurodyta 9.2 punkte.

▼B

9.4.3. Jei III smailės santykinis plotas S_{III} [E] yra > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) ir II smailės santykinis plotas S_{II} [E] ≤ 160, nustatomas suminis baltymų kiekis (P %); vėliau tiriami 1 ir 2 paveikslai.

9.4.3.1. Duomenys, gauti analizuojant nefalsifikuotus didelį baltymų kiekį turinčius nugriebto pieno miltelius, buvo apibendrinti 1 ir 2 paveiksluose.

Ištisine linija pavaizduota tiesinė regresija, kurios koeficientai apskaičiuoti mažiausių kvadratų metodu.

Brūkšninė linija nustato viršutinę III smailės santykinio ploto ribą, kuri nebus viršyta 90 % atvejų.

1 ir 2 paveiksluose pateiktų brūkšninių tiesių lygtys:

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

čia:

S_{III} = III smailės santykinis plotas, apskaičiuotas pagal bendrą baltymų kiekį arba pagal santykinį smailės S_{II} [E] plotą,

P % = suminis baltymų kiekis, masės procentais,

(S_{II} [E] = mėginio smailės santykinis plotas, apskaičiuotas pagal 9.1.2 punktą.

Šios lygtys atitinka 9.2 nurodytą skaičių 1,3.

Skirtumas (T_1 ir T_2) tarp nustatyto santykinio ploto S_{III} [E] ir santykinio ploto S_{III} išreiškiamas lygtimis: $T_1 = S_{III}[E] – [(0,376\ P\ \% – 10,7) + (S_{III}[0] – 0,9)]$; $T_2 = S_{III}[E] – [(0,0123\ S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] – 0,9)]$

9.4.3.2.

Jei T_1 ir (arba) T_2 yra lygūs arba mažesni už nulį, fermentinių išrūgų buvimo nustatyti negalima.

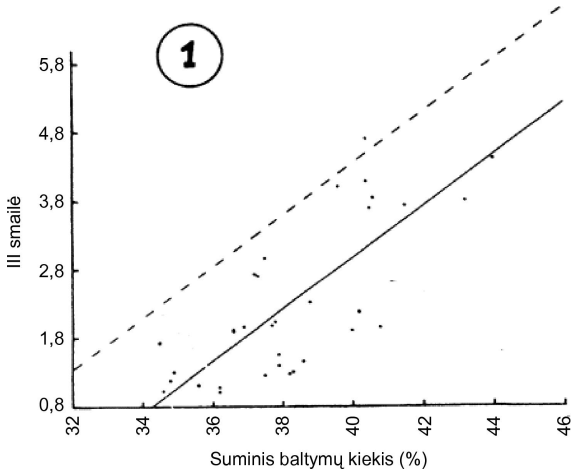
Jei T_1 ir T_2 yra didesni už nulį, fermentinių išrūgų yra.

Fermentinių išrūgų kiekis apskaičiuojamas pagal šią formulę: $W = T_2 + 0,91$

čia:

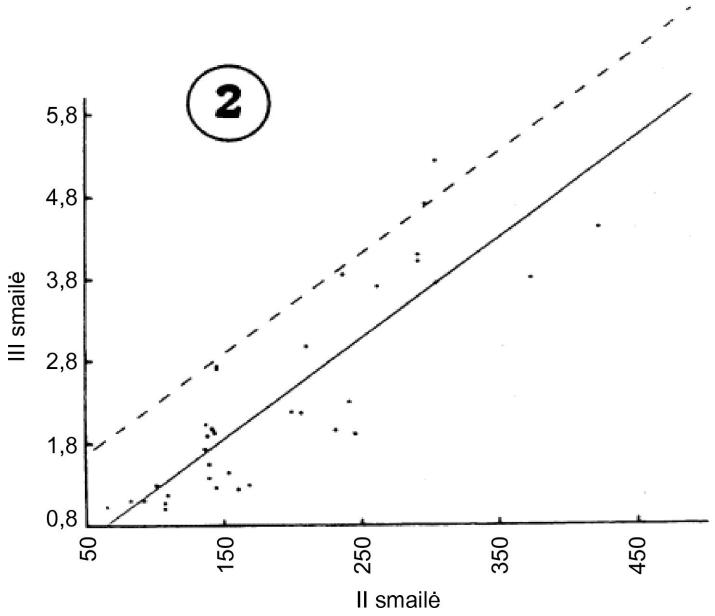
0,91 atstumas vertikalioje ašyje tarp ištisinės ir brūkšninės linijų.

Nugriebto pieno milteliai



▼B

Nugriebto pieno milteliai



▼B

XIII PRIEDAS

(9 straipsnis)

FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ SAUSŲJŲ MEDŽIAGŲ KIEKIO NUSTATYMAS NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE IR MIŠINIUOSE, NURODYTUOSE REGLAMENTE (EB) Nr. 2799/1999

1. TIKSLAS: APTIKTI, AR BUVO PRIDĖTA FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ SAUSŲJŲ MEDŽIAGŲ Į:

   a) nugriebto pieno miltelius, kaip apibrėžta Reglamento (EB) Nr. 2799/1999 2 straipsnyje;

   b) mišinius, kaip apibrėžta Reglamento (EB) Nr. 2799/1999 4 straipsnyje.

2. NUORODOS: TARPTAUTINIS STANDARTAS ISO 707

3. APIBRĖŽTIS

   Fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų kiekis – kazeino makropeptidų kiekis masės procentais, nustatytas taikant aprašytą procedūrą.

4. METODO ESMĖ

   Kazeino makropeptidų kiekis nustatomas pagal XII priedą. Mėginiai, kuriems gaunami teigiami rezultatai, analizuojami kazeino makropeptidui A nustatyti taikant atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos procedūrą (HPLC procedūrą). Arba mėginiai tiesiogiai analizuojami taikant atvirkštinių fazių HPLC procedūrą. Rezultatai vertinami lyginant su etaloniniais mėginiais, kuriuos sudaro vien tik pieno milteliai ir pieno milteliai su žinomu išrūgų miltelių procentiniu kiekiu. Didesnis kaip 1 % (masės) rezultatas rodo, kad produkte yra išrūgų sausųjų medžiagų.

5. REAGENTAI

   Visi reagentai turi būti analitiškai gryni, naudojamas vanduo – distiliuotas arba tokio pat grynumo. Acetonitrilas turėtų būti spektroskopijai tinkamo arba HPLC grynumo.

   Procedūrai atlikti reikiami reagentai yra aprašyti šio reglamento XII priede.

   Atvirkštinių fazių HPLC reagentai.

5.1. **Trichloracto rūgšties tirpalas**

   240 g trichloracto rūgšties (CCl_3COOH) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 000 ml. Tirpalas turėtų būti skaidrus ir bespalvis.

5.2. **A ir B eliuentai**

   A eliuentas: į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 150 ml acetonitrilo (CH_3CN), 20 ml izopropilo alkoholio ($CH_3CHOHCH_3$) ir 1,00 ml trifluoracto rūgšties (TFA, CF_3COOH). Vandeniu skiedžiama iki 1 000 ml.

   B eliuentas: į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 550 ml acetonitrilo (CH_3CN), 20 ml izopropilo alkoholio ($CH_3CHOHCH_3$) ir 1,00 ml TFA. Vandeniu skiedžiama iki 1 000 ml. Prieš naudojant eliuentų tirpalai filtruojami per membraninį filtrą, kurio akučių skersmuo 0,45 μm.

5.3. **Kolonėlės konservavimas**

   Baigus analizę, kolonėlė plaunama B eliuentu (taikant gradientinį eliuavimą) ir vėliau plaunama acetonitrilu (30 min taikant gradientinį eliuavimą). Kolonėlė laikoma acetonitrile.

5.4. **Etaloniniai mėginiai**

5.4.1. Nugriebto pieno milteliai, atitinkantys viešojo saugojimo reikalavimus (t. y. [0]).

▼B

5.4.2. Tie patys nugriebto pieno milteliai, į kuriuos įdėta 5 % (masės) etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y. [5]).

5.4.3. Tie patys nugriebto pieno milteliai, į kuriuos įdėta 50 % (masės) etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y [50].) ([1]).

6. APARATŪRA

Aprašytai procedūrai reikiama aparatūra aprašyta šio reglamento XII priede.

6.1. Analizės svarstyklės

6.2. Bet kokio tipo centrifuga, kuria galima gauti 2 200 g ištcentrinę jėgą, ir maždaug 50 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėliai su kamščiais arba dangčiais

6.3. Mechaninė purtyklė

6.4. Magnetinė maišyklė

6.5. Stikliniai piltuvai, skersmuo apie 7 cm

6.6. Filtravimo popierius, vidutinio tankio, skersmuo apie 12,5 cm

6.7. Filtravimo per stiklinį filtrą įranga, naudojant 0,45 μm skersmens membraninį filtrą

6.8. 10 ml talpos graduotos pipetės (ISO 648 A klasė arba ISO/R 835) arba dozavimo sistema, kuri galėtų tiekti 10,0 ml per dvi minutes

6.9. Dozavimo sistema, galinti tiekti 20,0 ml maždaug 50 °C temperatūros vandens

6.10. Reguliuojamos temperatūros vandens vonia, nustatyta 25 ± 0,5 °C

6.11. HPLC įranga, kurią sudaro:

6.11.1. Dviejų tirpiklių gradientinė siurbimo sistema

6.11.2. Injektorius, rankinio arba automatinio valdymo, 100 μl talpos

6.11.3. Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 kolonėlė (ilgis 25 cm, vidinis skersmuo 0,46 cm) arba lygiavertė atvirkštinių fazių kolonėlė su didelio skersmens akučių silikagelio įkrova

6.11.4. Reguliuojamos temperatūros kolonėlių krosnis, nustatyta 35 ± 1 °C

6.11.5. Keičiamo bangos ilgio UV detektorius, kuriuo būtų galima matuoti esant 210 nm bangos ilgiui (prireikus galima naudoti didesnį bangos ilgį iki 220 nm) ir 0,02 Å jautriui

6.11.6. Integratorius, kuriuo galima integruoti pagal bendrąją bazinę liniją arba tarp įdubų

Pastaba: Kolonėlė gali veikti kambario temperatūroje, jei kambario temperatūra svyruoja ne daugiau kaip 1 °C, kitaip bus per didelis CMP_A sulaikymo trukmės kitimas.

7. ĖMINIŲ ĖMIMAS

7.1. Ėminiai turi būti imami pagal tarptautiniame standarte ISO 707 nustatytą procedūrą. Tačiau valstybės narės gali taikyti kitą ėminių ėmimo metodą, jei jis atitinka nurodyto standarto principus.

7.2. Ėminiai laikomi tokiomis sąlygomis, kuriomis jie nebūtų sugadinti arba nepakistų jų sudėtis.

8. PROCEDŪRA

([1]) Etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių ir išrūgomis falsifikuotų pieno miltelių galima gauti iš NIZO (Nyderlandų pienininkystės institutas). Kernsemheweg 2, PO Box 20-NL-6710BA Ede. Tačiau taip pat gali būti vartojami ir kiti NIZO miltelius atitinkantys milteliai.

▼B

8.1. **Mėginio ruošimas**

Milteliai suberiami į maždaug dvigubai didesnio tūrio nei miltelių tūris indą su orui sandariu dangčiu. Dangtis tuoj pat uždaromas. Pieno milteliai gerai sumaišomi kelis kartus apverčiant indą.

8.2. **Tiriamoji mėginio dalis**

Į centrifugavimo mėgintuvėlį (6.2) arba į tinkamą užkemšamą kolbą (50 ml) pasveriama 2,00 ± 0,001 g mėginio.

Pastaba: Jei analizuojami mišiniai, sveriamas toks mėginio kiekis, kad nuriebalinto mėginio masė atitiktų 2,00 g.

8.3. **Riebalų ir baltymų pašalinimas**

8.3.1. Į tiriamąjį mėginį įpilama 20,0 ml šilto vandens (50 °C). Milteliai ištirpinami purtant mechanine purtykle (6.3) penkias minutes arba 30 min, jei analizuojamos rūgščiosios pasukos. Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonią (6.10) 25 °C pusiausvyrinei temperatūrai pasiekti.

8.3.2. Per dvi minutes pastovia sparta supilama maždaug 25 °C temperatūros 10,0 ml trichloracto rūgšties tirpalo (5.1), stipriai maišant magnetine maišykle (6.4). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonią (6.10) ir paliekamas 60 min.

8.3.3. Centrifuguojama (6.2) 10 min, esant 2 200 g, arba filtruojama per filtravimo popierių (6.6), išpilant pirmuosius 5 ml filtrato.

8.4. **Chromatografinis nustatymas**

8.4.1. Atliekama HPLC analizė, kaip aprašyta XII priede. Jei gaunamas neigiamas rezultatas, analizuojamame mėginyje nėra aptinkamo kiekio fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų. Jei rezultatas teigiamas, turi būti taikoma toliau aprašyta atvirkštinių fazių HPLC procedūra. Arba atvirkštinių fazių HPLC metodą galima taikyti tiesiogiai. Dėl rūgščiųjų pasukų miltelių buvimo gali būti gauti klaidingai teigiami rezultatai, jei taikomas XII priede aprašytas metodas. Taikant atvirkštinių fazių HPLC metodą, šios galimybės nėra.

8.4.2. Prieš atliekant atvirkštinių fazių HPLC analizę, turėtų būti optimizuotos gradientinio eliuavimo sąlygos. CMP_A sulaikymo trukmė 26 ± 2 min yra optimali gradientinio eliuavimo sistemoms, kurių neveikos tūris (tūris nuo tos vietos, kurioje tirpikliai tiekiami kartu, iki injektoriaus kilpos, įskaitant ir jos tūrį) yra apie 6 ml. Mažesnio neveikos tūrio (pvz., 2 ml) gradientinių eliuavimo sistemų optimali sulaikymo trukmė turėtų būti 22 min.

Imami etaloninių mėginių (5.4) be fermentinių išrūgų ir turinčių 50 % išrūgų tirpalai.

Į HPLC aparatą, veikiantį 1 lentelėje pateiktomis paieškų gradiento sąlygomis, įpurškiama 100 µl centrifugato arba filtrato (8.3.3).

1 lentelė

Paieškų gradiento sąlygos chromatografinei analizei optimizuoti

Laikas (min)	Srautas (ml/min)	% A	% B	Kreivė
Pradinis	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	tiesė
32	1,0	10	90	tiesė
37	1,0	10	90	tiesė
42	1,0	90	10	tiesė

Dviejų chromatogramų lyginimas turėtų parodyti CMP_A smailės vietą.

▼B

Pagal toliau pateiktą formulę galima apskaičiuoti naudotiną pradinę tirpalo sudėtį, kurį atitinka normalų gradientą (žr. 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

čia:

RT_{cmpA}: CMP_A sulaikymo trukmė, atitinkanti paieškų gradientą

10: pradinė % B dalis, atitinkanti paieškų gradientą

2,5: viduriniojo taško % B dalis minus normalaus gradiento pradinė % B dalis

13,5: vidurinįjį tašką atitinkanti trukmė, esant paieškų gradientui

26: reikiama CMP_A sulaikymo trukmė

6: paieškų ir normaliojo gradientų kampinių koeficientų santykis

30: pradinė % B dalis minus % B dalis 27 min, esant paieškų gradientui

27: paieškų gradiento ciklo trukmė.

8.4.3. Mėginių tirpalų ėmimas

100 µl tiksliai išmatuoto centrifugato arba filtrato (8.3.3) įpurškiama į HPLC aparatą, kuris veikia esant 1,0 ml per minutę eliuento tirpalo (5.2) srautui.

Analizės pradžios eliuento sudėtis gaunama pagal 8.4.2. Paprastai ji maždaug atitinka A:B = 76:24 (5.2). Iš karto po įpurškimo nustatomas tiesinis gradientas, kurį taikant B tirpiklio dalis po 27 min. yra 5 % didesnė. Vėliau nustatomas tiesinis gradientas, kuriam esant B dalis eliuente per penkias minutes pasiekia 90 %. Ši sudėtis nekeičiama penkias minutes, vėliau sudėtis per penkias minutes grąžinama iki pradinės sudėties taikant tiesinį gradientą. Atsižvelgiant į siurbimo sistemos vidinį tūrį, kitas įpurškimas gali būti daromas po 15 min nuo pradinių sąlygų pasiekimo momento.

1 pastaba: CMP_A sulaikymo trukmė turėtų būti 26 ± 2 min. Tai galima pasiekti keičiant pradines ir galutines pirmojo gradiento sąlygas. Tačiau pradines ir galutines pirmojo gradiento sąlygas atitinkantis % B skirtumas turi likti 5 % B.

2 pastaba: Eliuentai turėtų būti pakankamai nudujinti ir tokiais būti visą laiką. Tai svarbu siekiant, kad tinkamai veiktų gradientinio eliuavimo siurbimo sistema. CMP_A smailės sulaikymo trukmės standartinis nuokrypis turėtų būti mažesnis kaip 0,1 min (n = 10).

3 pastaba: Kas penkis mėginius turėtų būti įpurškiamas etaloninis mėginys (5), naudojamas naujam atsako faktoriui apskaičiuoti R (9.1.1).

8.4.4. Mėginio (E) chromatografinės analizės rezultatai gaunami kaip chromatograma, kurioje CMP_A smailė identifikuojama pagal maždaug 26 min. sulaikymo trukmę.

Integratorius (6.11.6) automatiškai apskaičiuoja CMP_A smailės aukštį H. Kiekvienoje chromatogramoje turi būti patikrinta bazinės linijos padėtis. Analizė arba integravimas turi būti kartojami, jeigu buvo neteisingai nustatyta bazinės linijos padėtis.

▼B

Pastaba: Jei CMP_A smailė yra pakankamai atsiskyrusi nuo kitų smailių, reikėtų naudoti bazinės linijos padėties nustatymą nuo įdubos iki įdubos, kitaip naudojami statmenys, nuleisti į bendrąją bazinę liniją, kurios pradžios taškas turėtų būti šalia CMP_A smailės (taigi ne taške t = 0 min!). Etalonai ir mėginiai turi būti integruojami vienodu būdu ir bendrosios bazinės linijos atveju tikrinama jos atitiktis mėginiams ir etalonui.

Prieš atliekant kiekybinį duomenų įvertinimą labai svarbu išnagrinėti kiekvienos chromatogramos išvaizdą, kad būtų galima aptikti visus neįprastus rezultatus dėl aparatūros arba kolonėlių netinkamo veikimo arba dėl analizuojamo ėminio kilmės ir tipo. Jei yra abejonių, analizė kartojama.

8.5. **Kalibravimas**

8.5.1. Etaloniniams mėginiams (nuo 5.4.1 iki 5.4.2) tiksliai taikoma procedūra, aprašyta nuo 8.2 punkto iki 8.4.4 punkto. Naudojami tik ką paruošti tirpalai, nes 8 % trichloracto rūgšties tirpale CMP skyla kambario temperatūroje. 4 °C temperatūroje tirpalas yra stabilus 24 valandas. Atliekant ilgą analizių seriją, automatiniame injektoriuje pageidautina naudoti šaldomą mėginių laikiklį.

Pastaba: 8.4.2. punktas gali būti praleidžiamas, jeigu % B pradinėmis sąlygomis yra žinomas iš ankstesnės analizės.

Etaloninio mėginio [5] chromatograma turi atitikti tą, kuri pavaizduota 1 paveiksle. Šiame paveiksle prieš CMP_A smailę yra dvi mažos smailės. Svarbu gauti panašų atskyrimą.

8.5.2. Prieš mėginių chromatografinį nustatymą įpurškiama 100 µl etaloninio mėginio be fermentinių išrūgų [0] (5.4.1)

Chromatogramoje neturėtų būti smailės, kurios sulaikymo trukmė atitiktų CMP_A smailės trukmę.

8.5.3. Atsako faktoriai R nustatomi įpurškiant filtrato (8.5.1) tūrį, atitinkantį mėginių tūrį.

9. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

9.1. **Apskaičiavimo metodas ir formulės**

9.1.1. *Atsako faktoriaus R apskaičiavimas:*

CMP_A smailė: R = W/H

čia:

R = CMP_A smailės atsako faktorius

H = CMP_A smailės aukštis

W = išrūgų kiekis etaloniniame mėginyje [5].

9.2. **Fermentinių išrūgų procentinio kiekio mėginyje apskaičiavimas**

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

čia:

W(E) = fermentinių išrūgų mėginyje (E) procentinė dalis (masės)

R = CMP_A smailės atsako faktorius (9.1.1)

H(E) = mėginio (E) CMP_A smailės aukštis.

Jei W(E) yra didesnis kaip 1 %, o mėginio ir etaloninio mėginio [5] sulaikymo trukmių skirtumas yra mažesnis kaip 0,2 min., mėginyje yra fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų.

9.3. **Procedūros tikslumas**

9.3.1. *Pakartojamumas*

Dviejų nustatymų rezultatų, kuriuos vienas analitikas gavo vienu metu arba per trumpą laiką ta pačia aparatūra tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 0,2 % masės.

▼B

9.3.2. *Atkuriamumas*

Nenustatytas.

9.3.3. *Tiesiškumas*

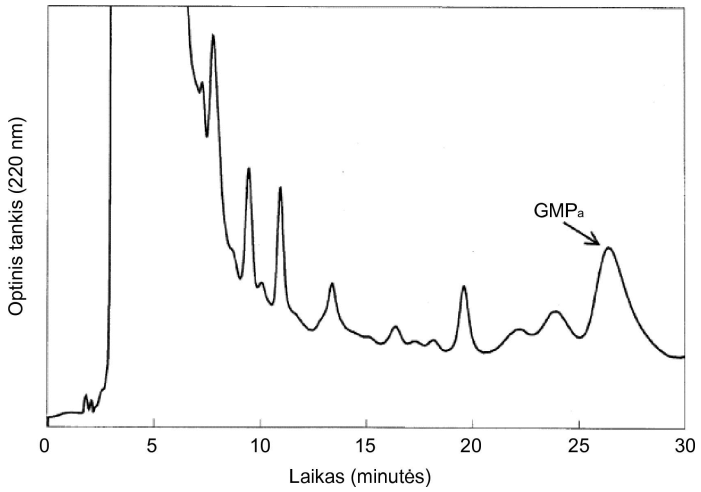
Jei fermentinių išrūgų yra nuo 0 % iki 16 %, turėtų būti gauta tiesinė priklausomybė, kai koreliacijos koeficientas > 0,99.

9.4. **Aiškinimas**

Pagal Reglamento (EEB) Nr. 214/2001 XIX priedo 9.2 ir 9.4.1 punktų nuostatas yra nustatyta 1 % ribinė vertė, į kuria įtraukta neapibrėžtis dėl atkuriamumo.

1 paveikslas

Ni-4.6 etalonas



▼B

XIV PRIEDAS

(10 straipsnis)

NUGRIEBTO PIENO MILTELIAI. KIEKYBINIS FOSFATIDILSERINO IR FOSFATIDILETANOLAMINO NUSTATYMAS

Metodas – atvirkštinių fazių efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC)

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Šiame metode aprašyta fosfatidilserino (FS) ir fosfatidiletanolamino (FE) kiekybinio nustatymo nugriebto pieno milteliuose (NPM) procedūra, kuri tinka NPM esančioms pasukų sausosioms medžiagoms nustatyti.

2. APIBRĖŽTIS

PS +PE kiekis – medžiagos masės dalis, nustatoma taikant čia aprašytą procedūrą. Rezultatas išreiškiamas dipalmitoilfosfatidiletanolamino (DPFE) miligramais 100 gramų miltelių.

3. METODO ESMĖ

Aminofosfolipidai, esantys iš pieno miltelių gautame piene, ekstrahuojami metanoliu. PS ir PE, kaip o-ftalio rūgšties dialdehido (OFA) dariniai, nustatomi atvirkštinių fazių (RP) HPLC, naudojant fluorescencinį detektorių. PS ir PE kiekis mėginyje kiekybiškai nustatomas pagal etaloninį ėminį, turintį žinomą DPFE kiekį.

4. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti analitiškai gryni, naudojamas distiliuotas arba tokio pat grynumo vanduo, jei nenurodyta kitaip.

4.1. **Etaloninė medžiaga: DPFE, ne mažesnio kaip 99 % grynumo.**

Pastaba: Etaloninė medžiaga turi būti laikoma –18 °C temperatūroje.

4.2. **Reagentai etaloniniam ir tiriamajam mėginiams ruošti:**

4.2.1. HPLC grynumo metanolis

4.2.2. HPLC grynumo chloroformas

4.2.3. triptamino monohidrochloridas

4.3. **Reagentai o-ftalio rūgšties dialdehido dariniams gauti:**

4.3.1. natrio hidroksidas, 12 mol/l vandeninis tirpalas

4.3.2. boro rūgštis, 0,4 mol/l vandeninis tirpalas, kurio pH 10,0 nustatomas natrio hidroksidu (4.3.1)

4.3.3. 2-merkaptoetanolis

4.3.4. o-ftalio rūgšties dialdehidas (OFA)

4.4. **HPLC eliavimo tirpikliai:**

4.4.1. eliavimo tirpikliai turi būti ruošiami naudojant HPLC grynumo reagentus

4.4.2. HPLC grynumo vanduo

4.4.3. metanolis, fluorescencinės analizės metodu patikrinto grynumo

4.4.4. oksolanas

4.4.5. natrio dihidrofosfatas

4.4.6. natrio acetatas

4.4.7. acto rūgštis.

5. APARATŪRA

5.1. Analizės svarstyklės, kuriomis galima sverti 1 mg tikslumu ir mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg

▼B

5.2. Cheminės stiklinės, 25 ml ir 100 ml

5.3. Pipetės, 1 ir 10 ml

5.4. Magnetinė maišyklė

5.5. Graduotos pipetės, 0,2, 0,5 ir 5 ml

5.6. Matavimo kolbos, 10, 50 ir 100 ml talpos

5.7. Švirkštai, 20 µl ir 100 µl

5.8. Ultragarsinė vonia

5.9. Centrifuga, kuria galima gauti 27 000 × *g*

5.10. Stikliniai buteliukai, maždaug 5 ml talpos

5.11. Graduotas cilindras, 25 ml talpos

5.12. pH-metras, kuris matuotų 0,1 pH vieneto tikslumu

5.13. HPLC įranga

5.13.1. reguliuojamo srauto siurbimo sistema, kuria galima gauti 1,0 ml/min srautą esant 200 bar

5.13.2. automatinis ėmiklis, kuriame galima sintetinti darinius

5.13.3. kolonėlės šildytuvas, kuriuo galima palaikyti 30 °C ± 1 °C kolonėlės temperatūrą

5.13.4. fluorescencinis detektorius, galintis veikti esant 330 nm sužadinimo bangos ilgiui ir 440 nm emisijos bangos ilgiui

5.13.5. integratorius arba duomenų apdorojimo programinė įranga smailės plotui išmatuoti

5.13.6. Lichrosphere – 100 kolonėlė (250 × 4,6 mm) arba lygiavertė kolonėlė, įkrova – oktadecilsilanas (C 18), dalelių dydis 5 µm.

6. MĖGINIŲ ĖMIMAS

Mėginiai turi būti imami pagal ISO 707 standartą.

7. PROCEDŪRA

7.1. **Vidinio etalono tirpalo ruošimas**

7.1.1. Į 100 ml matavimo kolbą (5.6) pasveriama 30,0 g ± 0,1 g triptamino monohidrochlorido (4.2.3) ir praskiedžiama metanoliu (4.2.1) iki žymės.

7.1.2. 0,15 mmol/l koncentracijos triptamino tirpalui gauti, 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.6) ir praskiedžiama metanoliu (4.2.1) iki žymės.

7.2. **Mėginio tirpalo ruošimas**

7.2.1. Į 25 ml stiklinę (5.2) pasveriama 1,000 g ±0,001 g NPM mėginio. Pipete (5.3) įpilama 10 ml iki 40 °C ± 1 °C pašildyto distiliuoto vandens ir 30 min maišoma magnetine maišykle (5.4), kad ištirptų visi gabalai.

7.2.2. Į 10 ml matavimo kolbą (5.6) pipete (5.5) įlašinama 0,2 ml iš miltelių gauto pieno, švirkštu (5.7) įšvirkščiama 100 µl 0,15 mmol/l triptamino tirpalo (7.1) ir skiedžiama metanoliu (4.2.1) iki žymės. Kruopščiai sumaišoma, vartant kolbą, ir 15 min. apdorojama ultragarsu (5.8).

7.2.3. 10 min. sukama centrifugoje (5.9), esant 27 000 × g, ir centrifugatas supilamas į stiklinį buteliuką (5.10).

Pastaba: Mėginio tirpalas iki HPLC analizės turėtų būti laikomas 4 °C temperatūroje.

7.3. **Išorinio etalono tirpalo ruošimas**

▼B

7.3.1. Į 50 ml matavimo kolbą (5.6) pasveriama 55,4 mg DPFE (4.1) ir graduotu cilindru (5.11) įpilama apie 25 ml chloroformo (4.2.2). Kolba užkemšama kamščiu ir, atsargiai maišant, šildoma iki 50 °C ± 1 °C tol, kol ištirpsta DPFE. Kolba atvėsinama iki 20 °C, įpilama metanolio (4.2.1) iki žymės ir, vartant kolbą, sumaišoma.

7.3.2. 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 100 ml matavimo kolbą (5.6) ir skiedžiama metanoliu (4.2.1) iki žymės. 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.6), švirkštu (5.7) įšvirkščiama 100 µl 0,15 mmol/l triptamino tirpalo (7.1) ir skiedžiama metanoliu (4.2.1) iki žymės. Vartant kolbą, tirpalas sumaišomas.

Pastaba: Etalono tirpalas iki HPLC analizės turėtų būti laikomas 4 °C temperatūroje.

7.4. **Reagento dariniui gauti ruošimas**

Į 10 ml matavimo kolbą (5.6) pasveriama 25,0 ±0,1 mg OFA (4.3.4), pipete (5.5) įlašinama 0,5 ml metanolio (4.2.1) ir atsargiai maišoma tol, kol OFA ištirpsta. Skiedžiama iki žymės boro rūgšties tirpalu (4.3.2) ir švirkštu (5.7) įšvirkščiama 20 µl 2-merkaptoetanolio (4.3.3).

Pastaba: Reagentas dariniui gauti turėtų būti laikomas rudo stiklo butelyje 4 °C temperatūroje, ir jis yra stabilus vieną savaitę.

7.5. **Nustatymas HPLC metodu**

7.5.1. *Eliuavimo tirpikliai (4.4)*

A tirpiklis: 0,3 mmol/l natrio dihidrofosfato ir 3 mmol/l natrio acetato tirpalas (pH 6,5 ± 0,1, nustatytas acto rūgštimi):metanolis:oksolanas = 558:440:2 (tūrio dalys)

B tirpiklis: metanolis.

7.5.2. *Siūlomas eliuavimo gradientas:*

Laikas (min)	A tirpiklis (%)	B tirpiklis (%)	Srautas (ml/min)
Pradinis	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

Pastaba: Eliuavimo gradientą gali tekti šiek tiek keisti norint gauti 1 paveiksle pavaizduotą skyrą.

Kolonėlės temperatūra: 30 °C.

7.5.3. *Įpurškiamas tūris: 50 µl reagento dariniui gauti ir 50 µl mėginio tirpalo.*

▼B

7.5.4. *Kolonėlės būklės lyginimas*

Sistema įjungiama kaip kasdien, kolonėlė 15 min plaunama grynu B tirpikliu, vėliau nustatomas A:B = 40:60 santykis ir lyginama 15 min (srautas – 1 ml/min). Tuščiasis bandymas atliekamas įpurškiant metanolio (4.2.1).

Pastaba: Jei kolonėlė nebus naudojama ilgesnį laiką, ji 30 min. plaunama mišiniu metanolis:chloroformas = 80:20 (tūrio).

7.5.5. *FS + FE kiekio nustatymas mėginyje*

7.5.6. *Chromatografinių analizių serija atliekama vienodais laiko tarpais pastoviai sulaikymo trukmei gauti. Po 5–10 mėginių tirpalų įpurškimo įpurškiamas išorinio etalono tirpalas (7.3) atsako faktoriui apskaičiuoti.*

Pastaba: Kolonėlė turi būti plaunama po 20–25 analizių, ne trumpiau kaip 30 min. leidžiant gryną B tirpiklį (7.5.1).

7.6. **Integravimo būdas**

7.6.1. *DPFE smailė*

DPFE išplaunamas kaip viena smailė. Smailės plotas nustatomas integravimu tarp įdubų.

7.6.2. *Triptamino smailė*

Triptaminas išplaunamas kaip viena smailė (1 paveikslas). Smailės plotas nustatomas integravimu tarp įdubų.

7.6.3. *FS ir FE smailių grupės*

Aprašytomis sąlygomis (1 paveikslas) FS išplaunamas kaip dvi iš dalies neatsiskyrusios smailės, prieš kurias yra mažesnė smailė. FE išplaunamas kaip trys iš dalies neatsiskyrusios smailės. Visas kiekvienos smailių grupės plotas nustatomas, nubrėžus pagrindo liniją, kaip pavaizduota 1 paveiksle.

8. APSKAIČIAVIMAS IR REZULTATŲ IŠRAIŠKA

FS ir FE kiekis mėginyje apskaičiuojamas pagal formulę: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

čia:

C = FS arba FE kiekis (mg/100 g miltelių) mėginyje

A_1 = etaloninio tirpalo (7.3) DPFE smailės plotas

A_2 = mėginio tirpalo (7.2) FS arba FE smailių plotas

T_1 = etaloninio tirpalo (7.2) triptamino smailės plotas

T_2 = mėginio tirpalo (7.2) triptamino smailės plotas.

9. METODO TIKSLUMAS

Pastaba: Pakartojamumo vertės buvo apskaičiuotos pagal tarptautinį IDF standartą ([1]). Laikinoji atkuriamumo ribinė vertė buvo apskaičiuota pagal III priedo b punkte aprašytą procedūrą.

([1]) Tarptautinis IDF standartas 135B/1991. Pienas ir pieno produktai. Analizės metodų preciziškumo charakteristikos. Tarplaboratorinių tyrimų procedūros apžvalga.

▼B

9.1. **Pakartojamumas**

Santykinio standartinio pakartojamumo nuokrypio, kuris išreiškia nepriklausomų analizės rezultatų, per trumpą laiką to paties analitiko gautų vienodomis sąlygomis toje pačioje laboratorijoje tam pačiam mėginiui, kintamumą, santykinė vertė neturėtų būti didesnė kaip 2 %. Jei šiomis sąlygomis buvo gauti dviejų nustatymų rezultatai, santykinis jų skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 6 % rezultatų aritmetinio vidurkio.

9.2. **Atkuriamumas**

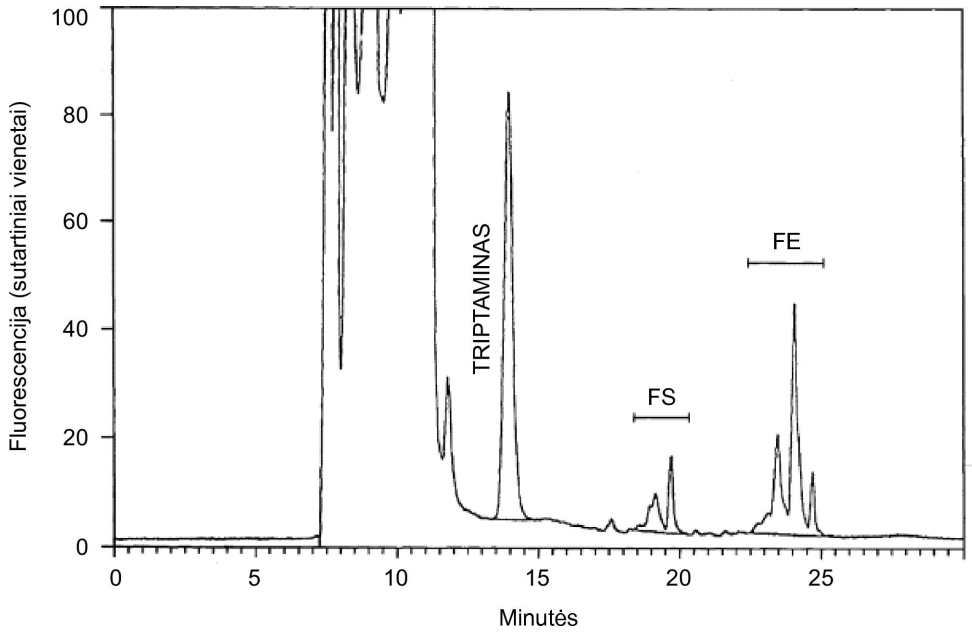
Jei du rezultatus analitikai gavo skirtingose laboratorijose, naudodami skirtingą aparatūrą skirtingomis to paties mėginio analizės sąlygomis, santykinis jų skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 11 % rezultatų aritmetinio vidurkio.

10. NUORODOS

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).*

1 paveikslas

Fosfatidilserino (FS) ir fosfatidiletanolamino (FE), esančių iš nugriebto pieno miltelių gauto pieno metanoliniame ekstrakte, OFA darinių HPLC vaizdas. Pateiktas PS, PE ir triptamino (vidinio etalono) smailių integravimo būdas.



▼B

XV PRIEDAS

(11 straipsnis)

ANTIMIKROBINIŲ PRIEMONIŲ LIKUČIŲ APTIKIMAS NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE

Mikrobų inhibitorių aptikimo bandymas, kuriame kaip bandymo mikroorganizmas turi būti naudojamas *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (atitinka C953 štamą), kuris yra pakankamai jautrus, kad būtų galima aptikti 4 μg benzilpenicilino ir 100 μg sulfadimidino viename kg pieno. Komercinius testų rinkinius taip pat galima gauti ir naudoti, jei jie yra pakankamai jautrūs benzilpenicilinui ir sulfadimidinui.

Bandymui atlikti naudojamas iš nugriebto pieno miltelių gautas pienas (1 g miltelių +9 ml distiliuoto vandens). Bandymas atliekamas, kaip aprašyta ISO/TS 26844:2006 *Milk and milk products – Determination of antimicrobial residues – Tube diffusion test* (*Pienas ir pieno milteliai. Antimikrobinių priemonių likučių nustatymas. Difuzijos mėgintuvėlyje bandymas*) IDF biuletenis Nr. 258/1991, 1 dalis, 2 skyrius, arba pagal analizės rinkinio gamintojo instrukcijas ([1]).

Teigiami rezultatai aiškinami taip:

1. β-laktamų buvimas gali būti patvirtintas kartojant bandymą, į bandymo sistemą pridėjus penicilinazės ([2]):

   neigiamas rezultatas: inhibitorius yra β-laktaminis antibiotikas,

   teigiamas rezultatas lieka: inhibitorius negali būti identifikuotas taikant šią procedūrą, tęsiama pagal 2 punktą.

2. Sulfonamidų buvimas gali būti patvirtintas kartojant bandymą, į bandymo sistemą pridėjus p-aminobenzenkarboksirūgšties:

   neigiamas rezultatas: inhibitorius yra sulfonamidas,

   teigiamas rezultatas lieka: inhibitorius negali būti identifikuotas taikant šią procedūrą, tęsiama pagal 3 punktą.

3. β-laktamo ir sulfonamido buvimas kartu gali patvirtintas kartojant bandymą, į bandymo sistemą pridėjus penicilinazės ir p-aminobenzenkarboksirūgšties:

   neigiamas rezultatas: inhibitoriai yra β-laktaminis antibiotikas ir sulfonamidas,

   teigiamas rezultatas: inhibitorius negali būti identifikuotas taikant šią procedūrą.

([1]) Svarbi pastaba. Analizuojant nugriebto pieno miltelius, gali būti gauti klaidingi teigiami rezultatai. Todėl labai svarbu patikrinti, ar taikomai bandymo sistemai negaunami klaidingi teigiami rezultatai.

([2]) Kai kurie β-laktamai yra mažiau jautrūs β-laktamazei. Tokiu atveju rekomenduojama papildomai iš anksto apdoroti mėginį (1 ml mėginio 2 val. apdoroti 0,3 ml penazės koncentrato 37 °C temperatūroje).

▼B

XVI PRIEDAS

(12 straipsnis)

KIEKYBINIS NUGRIEBTO PIENO MILTELIŲ KOMBINUOTUOSIUOSE PAŠARUOSE NUSTATYMAS FERMENTINĖS PARAKAZEINO KOAGULIACIJOS BŪDU

1. TIKSLAS

Kiekybinis pieno miltelių kombinuotuose pašaruose nustatymas fermentinės parakazeino koaguliacijos būdu.

2. TAIKYMO SRITIS

Šis metodas taikomas kombinuotiesiems pašarams, kurių sudėtyje yra ne mažiau kaip 10 % nugriebto pieno miltelių. Gali trukdyti didelis kiekis pasukų ir (arba) tam tikrų ne pieno baltymų.

3. METODO ESMĖ

3.1. Kombinuotuosiuose pašaruose esantis kazeinas ištirpinamas ekstrahuojant natrio citrato tirpalu.

3.2. Kalcio jonų koncentracija reguliuojama iki reikiamo parakazeinui nusodinti lygio ir kazeinas paverčiamas parakazeinu, naudojant šliužo fermentą.

3.3. Azoto kiekis parakazeino nuosėdose nustatomas Kjeldalio metodu, kaip aprašyta standarte ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001; pieno miltelių kiekis apskaičiuojamas darant prielaidą, kad mažiausias kazeino kiekis juose yra 27,5 % (žr. 8.1).

4. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti analitiškai gryni, naudojamas distiliuotas arba tokio pat grynumo vanduo. Išskyrus šliužo fermentą (4.5), visuose reagentuose ir tirpaluose turi nebūti azotinių medžiagų.

4.1. Trinatrio citrato dihidratas (1 % m/V tirpalas)

4.2. Kalcio chloridas (maždaug 5 mol/l tirpalas)

75g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ maišant ištirpinama 100 ml distiliuoto vandens (atkreipiamas dėmesys į egzoterminę reakciją). Tirpalas paliekamas stovėti per naktį ir filtruojamas. Tirpalas laikomas šaldytuve.

4.3. 0,1 mol/l natrio hidroksidas

4.4. 0,1 mol/l druskos rūgštis

4.5. Skystas šliužo fermentas (aktyvumas apie 100 IMCU/ml pagal standartą ISO 11815IDF 157). Laikomas šaldytuve 4–6 °C temperatūroje

4.6. Reagentai azotui kiekybiškai nustatyti pagal Kjeldalio metodą, kaip aprašyta ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001

5. APARATŪRA

Įprasta laboratorinė aparatūra:

5.1. Grūstuvė arba homogenizatorius

5.2. Analizės svarstyklės, kuriomis galima sverti 1 mg tikslumu ir mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg

5.3. Stalinė centrifuga (500 *g* arba nuo 2 000 min^{-1} iki 3 000 min^{-1}) su 50 ml mėgintuvėliais ir 2 000 *g*

5.4. Magnetinė maišyklė su (10–15 mm ilgio) strypeliais

5.5. 150–200 ml talpos cheminės stiklinės

5.6. 250 ir 500 ml talpos kolbos

▼B

5.7. 60–80 mm skersmens stikliniai piltuvai

5.8. 150 mm skersmens greitojo filtravimo bepeleniai filtrai (*Whatman* Nr. 41 arba lygiaverčiai)

5.9. Įvairaus vardinio tūrio pipetės

5.10. Reguliuojamos temperatūros vandens vonia, nustatyta 37 °C ± 1 °C

5.11. pH-metras, 0,1 vieneto tikslumo

5.12. Termometrai, 1 °C tikslumo

6. PROCEDŪRA

6.1. **Mėginio ruošimas**

Vienalyčiam mišiniui gauti nuo 10 g iki 20 g mėginio sugrūdama grūstuvėje arba sumalama malūnėliu.

6.2. **Pieno miltelių tirpinimas ir netirpiojo likučio atskyrimas**

6.2.1. Į 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlį pasveriama 1,000 g ± 0,002 g tinkamai homogenizuotų kombinuotųjų pašarų (6.1). Įpilama 30 ml iš anksto pašildyto iki 45 °C ± 2 °C trinatrio citrato tirpalo (4.1). Maišoma magnetine maišykle arba energingai purtant ne mažiau kaip 5 min.

6.2.2. Centrifuguojama 10 min, esant 500 g (nuo 2 000 min^{-1} iki 3 000 min^{-1}), ir skaidrus tirpalas virš nuosėdų dekantuojamas į 150–200 ml stiklinę, žiūrint, kad į ją nepatektų puri medžiaga nuo mėgintuvėlio dugno.

6.2.3. Likutis ekstrahuojamas dar du kartus pagal tą pačią procedūrą, ekstraktus supilant į pirmąjį.

6.2.4. Jei paviršiuje susidaro skystų riebalų sluoksnis, jiems sukietėti ekstraktas atvėsinamas šaldytuve ir kietosios medžiagos sluoksnis nuimamas mentele.

6.3. **Kazeino koaguliavimas šliužo fermentu**

6.3.1. Į visą vandeninį ekstraktą (apie 100 ml) nuolat maišant įlašinama 2 ml sotaus kalcio chlorido (4.2). NaOH (4.3) arba HCl (4.4) tirpalais nustatomas pH 6,4–6,5. Ekstraktas statomas 15–20 min į reguliuojamos temperatūros vandens vonią, nustatytą 37 °C ± 1 °C, druskų pusiausvyrai pasiekti. Tai parodo lengvas tirpalo drumstimasis.

6.3.2. Nuosėdoms atskirti skystis supilamas į centrifugavimo mėgintuvėlius ir centrifuguojamas 10 min, esant 2 000 g. Tirpalas virš nuosėdų supilamas į kitus centrifugavimo mėgintuvėlius, nuosėdų neplaunant.

6.3.3. Nuo nuosėdų nupiltas skystis vėl pašildomas iki 37 °C ± 1 °C. Į nuolat maišomą ekstraktą įlašinama 0,5 ml skysto šliužo fermento (4.5). Koaguliacija įvyksta per dvi minutes.

6.3.4. Mėginys dedamas atgal į vandens vonią ir paliekamas 15 min 37 °C ± 1 °C temperatūroje. Mėginys išimamas iš vonios ir koaguliatas suardomas maišant. Centrifuguojama 10 min, esant 2 000 g. Centrifugatas filtruojamas per tinkamą filtravimo popierių (5.8) ir filtras paliekamas saugoti. Maišant nuosėdos plaunamos centrifugavimo mėgintuvėlyje 50 ml vandens, kurio temperatūra maždaug 35 °C.

Vėl centrifuguojama 10 min, esant 2 000 g. Centrifugatas filtruojamas per prieš tai naudotą filtrą.

6.4. **Kazeino azoto nustatymas**

6.4.1. Nuosėdas išplovus, jos be nuostolių nuplaunamos distiliuotu vandeniu ant filtravimo popieriaus, naudoto pagal 6.3.4. Išdžiovintas filtravimo popierius dedamas į Kjeldalio kolbą. Azotas nustatomas Kjeldalio metodu, kaip aprašyta standarte ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001.

▼B

7. TUŠČIASIS BANDYMAS

7.1. Reguliariai turi būti atliekamas tuščiasis bandymas, mineralizuojant Kjeldalio metodu, kaip aprašyta standarte ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001, bepelenį filtravimo popierių (5.8), suvilgytą 90 ml (4.1) natrio citrato tirpalo, 2 ml kalcio chlorido tirpalo (4.2), 0,5 ml skysto šliužo fermento (4.5) tirpalu ir išplautą distiliuotu vandeniu 3 × 15 ml.

7.2. Tuščiajam bandymui sunaudotas rūgšties (4.4) kiekis turi būti atimtas iš mėginio titravimui sunaudoto rūgšties kiekio.

8. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

8.1. Nugriebto pieno miltelių kiekis kombinuotuosiuose pašaruose procentais apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia:

N yra procentais išreikštas azoto kiekis parakazeine;

27,5 – nustatyto kazeino kiekio perskaičiavimo į procentais išreikštą nugriebto pieno miltelių kiekį faktorius,

2,81 ir 0,908 – pataisos faktoriai, gauti atliekant regresinę analizę.

9. METODO TIKSLUMAS

9.1. **Pakartojamumas**

To paties mėginio dviejų analizių rezultatai, kuriuos gavo vienas analitikas toje pačioje laboratorijoje, ne mažiau kaip 95 % tirtų atvejų neturi skirtis daugiau kaip 2,3 g nugriebto pieno miltelių 100 g kombinuotųjų pašarų.

9.2. **Atkuriamumas**

To paties mėginio analizių rezultatai, gauti dviejose laboratorijose, ne mažiau kaip 95 % tirtų atvejų neturi skirtis daugiau kaip 6,5 g nugriebto pieno miltelių 100 g kombinuotųjų pašarų.

10. PASTABOS

10.1. Jei esant dideliam procentiniam kiekiui tam tikrų ne pieno kilmės baltymų, ypač sojos baltymų, jie kaitinami kartu su nugriebto pieno milteliais, gali būti gauti per dideli rezultatai dėl baltymų nusėdimo kartu su pieno parakazeinu.

10.2. Dėl pasukų pridėjimo skaičiai gali šiek tiek sumažėti, nes nustatoma tik jų neriebalinė dalis. Pridėjus tam tikrų rūgščiųjų pasukų, gali būti gauti gerokai mažesni skaičiai dėl nevisiško ištirpinimo citrato tirpale.

10.3. Be to, per maži rezultatai gali būti gauti pridėjus 0,5 % lecitinų arba daugiau.

10.4. Pridėjus aukšta temperatūra apdorotų nugriebto pieno miltelių, gauti skaičiai gali būti per dideli dėl kai kurių išrūgų baltymų nusėdimo kartu su parakazeinu.

▼B

XVII PRIEDAS

(13 straipsnis)

KRAKMOLO APTIKIMAS NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE, DENATŪRUOTUOSE PIENO MILTELIUOSE IR KOMBINUOTUOSIUOSE PAŠARUOSE

1. TAIKYMO SRITIS

Šis metodas skirtas aptikti krakmolą, kuris naudojamas kaip denatūruotų pieno miltelių atsekamoji medžiaga.

Šio metodo aptikimo riba yra maždaug 0,05 g krakmolo 100 g mėginio.

2. METODO ESMĖ

Metodas yra pagrįstas jodometrijoje naudojama reakcija:

— laisvo jodo surišimas koloidais vandeniniame tirpale,

— absorbcija krakmolo micelėmis ir spalvos gavimas.

3. REAGENTAI

3.1. Jodo tirpalas:

— jodas: 1,0 g,

— kalio jodidas: 2,0 g,

— distiliuotas vanduo: 100 ml,

— į vienos žymės 100 ml matavimo kolbą pasveriama 1,0 g jodo ir 2,0 g kalio jodido ir ištirpinama vandenyje. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml žymės ir sumaišoma.

4. APARATŪRA

4.1. Analizės svarstyklės

4.2. Verdančiojo vandens vonia

4.3. Mėgintuvėliai, 25 mm × 200 mm

5. PROCEDŪRA

1 g mėginio pasveriama 0,1 g tikslumu ir suberiama į mėgintuvėlį (4,3).

Įpilama 20 ml distiliuoto vandens ir mėgintuvėlis purtomas, kad mėginys ištirptų.

Mėgintuvėlis dedamas į verdančio vandens vonią (4,2) ir laikomas 5 min.

Mėgintuvėlis išimamas iš vonios ir atvėsinamas iki aplinkos temperatūros.

Įpilama 0,5 ml jodo tirpalo (3,1), mėgintuvėlis supurtomas ir stebima gauta spalva.

6. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

Mėlyna spalva rodo, kad mėginyje yra natūraliojo krakmolo.

Kai mėginio sudėtyje yra modifikuoto krakmolo, spalva gali būti ne mėlyna.

7. PASTABOS

Spalva, jos intensyvumas ir mikroskopinė krakmolo išvaizda keičiasi, atsižvelgiant į mėginyje esančio natūraliojo krakmolo kilmę (pvz., kukurūzų ar bulvių) ir modifikuoto krakmolo tipą.

Jei yra modifikuoto krakmolo, gauta spalva pasikeičia į violetinę, raudoną arba rudą, atsižvelgiant į natūraliojo krakmolo kristalinės struktūros modifikavimo laipsnį.

▼B

XVIII PRIEDAS

(14 straipsnis)

DRĖGMĖS KIEKIO GRIETINĖLĖS MILTELIUOSE NUSTATYMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Šiame priede apibrėžiamas drėgmės kiekio grietinėlės milteliuose nustatymo metodas.

2. TERMINAI IR APIBRĖŽTYS

Šiame priede taikomos šios apibrėžtys.

Drėgmės kiekis – masės sumažėjimas, nustatytas taikant šiame tarptautiniame standarte apibrėžtą procedūrą.

Jis yra išreiškiamas masės procentais.

3. METODO ESMĖ

Mėginio džiovinimas 102 ±2 °C temperatūroje iki pastoviosios masės ir svėrimas masės sumažėjimui nustatyti.

4. APARATŪRA

Įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

4.1. Analizės svarstyklės, kuriomis galima sverti 1 mg tikslumu, o mažiausias skaitomas rodmuo – 0,1 mg.

4.2. Tinkamai ventiliuojama reguliuojamos temperatūros džiovinimo spinta, kurios visoje darbinėje erdvėje būtų galima palaikyti pastovią 102 ±2 °C temperatūrą.

4.3. Eksikatorius su tik ką išdžiovintu silikageliu ir drėgmės rodytuvu arba su kitu veiksmingu džiovikliu.

4.4. Apvaliadugniai biuksai, kurių gylis maždaug 25 mm, skersmuo maždaug 50 mm, pagaminti iš tinkamos medžiagos (pvz., stiklo, nerūdijančiojo plieno, nikelio arba aliuminio) ir uždengiami gerai pritaikytais ir lengvai nuimamais dangčiais.

4.5. Buteliai su sandariai įstatomais kamščiais laboratoriniams mėginiams maišyti.

5. ĖMINIŲ ĖMIMAS

Svarbu, kad laboratorija gautų tikrai reprezentatyvų ėminį, kuris nebūtų sugadintas arba pakitęs vežant arba laikant.

Ėminių ėmimas nėra šiame tarptautiniame standarte apibrėžto metodo sudėtinė dalis. Rekomenduojamas ėminių ėmimo metodas yra pateiktas ISO 707IDF 50.

Ėminys laikomas taip, kad būtų išvengta jo sugadinimo ir sudėties kitimo.

6. MĖGINIŲ RUOŠIMAS

Ėminys gerai sumaišomas, indą kelis kartus supurtant ir apverčiant (visus ėminius supilant į pakankamos talpos orui sandarų indą, jei tai yra būtina šiam veiksmui atlikti).

Jei taikant šią procedūrą visiškas vienalytiškumas nepasiekiamas, bandiniai (dviems atskiriems nustatymams) imami iš paruošto ėminio dviejose kiek įmanoma nutolusiose vietose.

7. PROCEDŪRA

7.1. **Biukso ruošimas**

7.1.1. Neuždengtas biuksas ir jo dangtis (4.4) ne trumpiau kaip 1val.h kaitinami džiovinimo spintoje (4.2), kurioje nustatyta 102 ± 2 °C temperatūra.

7.1.2. Biuksas uždengiamas dangčiu, uždengtas biuksas dedamas į eksikatorių (4.3), paliekamas atvėsti iki svarstyklių kambario temperatūros ir sveriamas 1 mg tikslumu, masę užrašant 0,1 mg tikslumu.

▼B

7.2. **Tiriamoji mėginio dalis**

Maždaug 1–3 g paruošto mėginio (6) supilama į biuksą, biuksas uždengiamas dangčiu ir sveriamas 1 mg tikslumu, masę užrašant 0,1 mg tikslumu.

7.3. **Nustatymas**

7.3.1. Biuksas su nuimtu dangčiu 2 h kaitinamas džiovinimo spintoje (4.2), kurioje nustatyta 102 ± 2 °C temperatūra.

7.3.2. Biuksas uždengiamas, uždengtas biuksas dedamas į eksikatorių, paliekamas atvėsti iki svarstyklių kambario temperatūros ir sveriamas 1 mg tikslumu, masę užrašant 0,1 mg tikslumu.

7.3.3. Dangtis nuimamas ir biuksas su dangčiu vėl kaitinamas džiovinimo spintoje 1 val. Kartojamas 7.3.2 veiksmas.

7.3.4. Kaitinimo ir svėrimo procedūra kartojama tol, kol tarp dviejų nuoseklių svėrimų masė sumažėja arba padidėja ne daugiau kaip 1 mg.

Apskaičiavimui imama mažiausia užrašyta masė.

8. APSKAIČIAVIMAS IR REZULTATŲ IŠRAIŠKA

8.1. **Apskaičiavimas**

Drėgmės kiekis, išreikštas g/100 g, yra lygus:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

čia:

m_0 – biukso ir dangčio masė gramais (7.1.2),

m_1 – biukso, dangčio ir mėginio masė gramais prieš džiovinimą (7.2),

m_2 – biukso, dangčio ir mėginio masė gramais po džiovinimo(7.3.4).

Rezultatas užrašomas dviejų ženklų po kablelio tikslumu.

9. TIKSLUMAS

Pastaba. Pakartojamumo ir atkuriamumo vertės buvo gautos naudojant rezultatus, gautus tarplaboratoriniame tyrime (žr. Steiger, G. Bulletin of IDF Nr. 285/1993, p. 21–28), atliktame pagal IDF standartą 135B:1991. Pienas ir pieno produktai. Analizės metodų preciziškumo charakteristikos. Tarplaboratorinių tyrimų procedūros apžvalga.

9.1. **Pakartojamumas**

Dviejų atskirų analizių rezultatų, kuriuos vienas analitikas per trumpą laiką toje pačioje laboratorijoje gavo ta pačia įranga tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 0,20 g drėgmės 100 g produkto.

9.2. **Atkuriamumas**

Dviejų atskirų ir nepriklausomų analizių rezultatų, kuriuos skirtingi analitikai skirtingose laboratorijose gavo dirbdami su skirtinga įranga ir tai pačiai bandomajai medžiagai taikydami tą patį metodą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 0,40 g drėgmės 100 g produkto.

10. BANDYMO PROTOKOLAS

Bandymo protokole nurodoma:

— visa informacija ėminiui visiškai identifikuoti,

— taikytas ėminių ėmimo metodas, jei žinomas,

— taikytas tyrimo metodas ir nuoroda į šį tarptautinį standartą,

▼B

— visos darbo detalės, nenurodytos šiame tarptautiniame standarte arba laikomos neprivalomomis, ir duomenys apie visus įvykius, kurie galėjo paveikti tyrimo rezultatą (-us),

gautas (-i) tyrimo rezultatas (-ai) ir, jei buvo tikrinamas pakartojamumas, galutinis gautas pataisytas rezultatas.

▼B

XIX PRIEDAS

(15 straipsnis)

DRĖGMĖS KIEKIO RŪGŠČIŲJŲ PASUKŲ MILTELIUOSE NUSTATYMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Nustatyti drėgmės kiekį gyvūnų pašarams skirtuose rūgščiųjų pasukų milteliuose.

2. METODO ESMĖ

Mėginys džiovinamas vakuume. Masės sumažėjimas nustatomas sveriant.

3. APARATŪRA

3.1. Analizės svarstyklės, kuriomis galima sverti 1 mg tikslumu ir mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg.

3.2. Nerūdijančio metalo arba stikliniai biuksai su orui nelaidžiais dangčiais; biuksų darbinis paviršius turi būti tokio ploto, kad paskleisto mėginio tankis būtų 0,3 g/cm^2.

3.3. Reguliuojamos temperatūros elektrinė vakuuminė džiovykla su vakuuminiu alyvos siurbliu ir įtaisu, kuriuo tiekiamas karštas oras, džiovinamas leidžiant per kolonėlę su pvz., kalcio oksidu arba sulfatu (turinčiu drėgmės rodytuvą).

3.4. Eksikatorius su veiksmingu džiovikliu.

3.5. Reguliuojamos temperatūros ventiliuojama džiovinimo spinta, nustatyta 102 ± 2 °C.

4. PROCEDŪRA

Biuksas (3.2) ir jo dangtis kaitinami džiovinimo spintoje (3.5) ne trumpiau kaip 1 valandą. Vėliau dangčių uždengtas biuksas greitai dedamas į eksikatorių (3.4), paliekamas atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriamas 1 mg tikslumu, masę užrašant 0,1 mg tikslumu.

Nuėmus dangtį, į biuksą supilama maždaug 5 g mėginio ir pasveriama 1 mg tikslumu, masę užrašant 0,1 mg tikslumu. Dangčių uždengtas biuksas dedamas į vakuuminę džiovyklą (3.3), pakaitintą iki 83 °C. Siekiant išvengti per didelio temperatūros sumažėjimo, biuksas įdedamas kiek įmanoma greičiau.

Slėgis sumažinamas iki 100 torų (13,3 kPa) ir biuksas paliekamas džiūti šiame slėgyje iki pastoviosios masės (maždaug 4 valandas) karšto sauso oro srovėje.

Džiovinimo trukmė skaičiuojama nuo to momento, kai temperatūra džiovykloje vėl pasiekia 83 °C. Slėgis džiovykloje iš lėto padidinamas iki atmosferos slėgio. Džiovykla atidaroma, biuksas iš karto uždengiamas dangčiu, išimamas iš džiovyklos, nuo 30 min. iki 45 min. laikomas eksikatoriuje (3.4), kad atvėstų, ir pasveriamas 1 mg tikslumu, masę užrašant 0,1 mg tikslumu. Biuksas dar džiovinamas 30 min. 83 °C temperatūros vakuuminėje džiovykloje (3.3) ir vėl pasveriamas. Kaitinimo ir svėrimo procedūra kartojama tol, kol tarp dviejų nuoseklių svėrimų biukso ir jo dangčio masė sumažėja arba padidėja ne daugiau kaip 1 mg. Apskaičiavimui imama mažiausia užrašyta masė.

5. APSKAIČIAVIMAS

$\%\ \text{drėgmės} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100\ \%$

čia:

m_0 biukso ir dangčio masė,

m_1 biukso, dangčio ir mėginio masė prieš džiovinimą,

m_2 biukso, dangčio ir mėginio masė po džiovinimo.

Rezultatas užrašomas 0,1 g/100 g tikslumu.

▼B

6. TIKSLUMAS

6.1. **Pakartojamumo ribinė vertė**

Dviejų atskirų analizių rezultatų, kuriuos vienas analitikas per trumpą laiką toje pačioje laboratorijoje gavo ta pačia įranga tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 0,4 g vandens 100 g rūgščiųjų pasukų miltelių.

6.2. **Atkuriamumo ribinė vertė**

Dviejų atskirų ir nepriklausomų analizių rezultatų, kuriuos skirtingi analitikai skirtingose laboratorijose gavo tai pačiai bandomajai medžiagai taikydami tą patį metodą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 0,6 g vandens 100 g rūgščiųjų pasukų miltelių.

6.3. **Tikslumo duomenų šaltinis**

Tikslumo duomenys buvo nustatyti 1995 m. atliekant tyrimą, kuriame dalyvavo aštuonios laboratorijos ir buvo 12 mėginių (6 poros kontrolinių mėginių).

▼B

XX PRIEDAS

(16 straipsnis)

PAMATINIS METODAS PIENO RIEBALŲ GRYNUMUI NUSTATYTI TAIKANT DUJŲ CHROMATOGRAFINĘ TRIGLICERIDŲ ANALIZĘ. 2 REDAKCIJA

1. TAIKYMO SRITIS

Šiame standarte apibrėžiamas pamatinis pieno riebalų grynumo nustatymo metodas taikant trigliceridų dujų chromatografinę analizę. Galima aptikti augalinius ir gyvūninius riebalus, pvz., lajų ir kiaulinius taukus.

Naudojant nustatytas trigliceridų lygtis, nustatomas pieno riebalų vientisumas. Iš esmės metodas tinka piltiniam karvių pienui arba iš jo pagamintiems produktams, neatsižvelgiant į šėrimo arba laktacijos sąlygas. Tik ypač daug šeriant grynais augaliniais aliejais, pvz., rapsų aliejumi, gali būti gautas klaidingai teigiamas rezultatais. Iš atskirų karvių gauti pieno produktai irgi gali būti klaidingo teigiamo rezultato priežastimi.

Metodas ypač tinka riebalams, ekstrahuotiems iš pieno produktų, kurie, kaip laikoma, turi nepakitusios sudėties grynus pieno riebalus, pvz., iš sviesto, grietinėlės, pieno ir pieno miltelių. Dėl technologinio pieno riebalų apdorojimo, pvz., cholesterolio šalinimo arba frakcionavimo, gali būti gautas klaidingas teigiamas rezultatas. Tai galioja ir pieno riebalams, gautiems iš nugriebto pieno arba pasukų. Metodas ne visuomet tinka riebalams, ekstrahuotiems iš sūrio, nes nokinimo procesas taip stipriai gali paveikti riebalų sudėtį, kad gaunamas klaidingas teigiamas rezultatas.

1 pastaba: Sviesto (n-butano) rūgšties (C_4) yra tik pieno riebaluose, todėl mažą ir vidutinį jų kiekį galima kiekybiškai nustatyti augaliniuose ir gyvūniniuose riebaluose. Tačiau dėl didelio C_4 kintamumo apytikriame masės dalies intervale nuo 3,1 % iki 3,8 %, sunku gauti kokybinius ir kiekybinius duomenis, kai pašalinių riebalų grynuose pieno riebaluose yra mažiau kaip 20 % [1].

2 pastaba: Praktiškai neįmanoma gauti kiekybinių rezultatų pagal sterolio kiekį augaliniuose aliejuose, nes jie priklauso nuo gamybos ir apdorojimo sąlygų. Netgi kokybinis pašalinių riebalų nustatymas pagal sterolius yra nevienareikšmiškas.

2. APIBRĖŽTIS

Pieno riebalų grynumas – augalinių ir gyvūninių riebalų nebuvimas, nustatytas taikant šiame standarte apibrėžtą procedūra.

Pastaba: Grynumas nustatomas taikant *S* vertes, kurios apskaičiuojamos pagal trigliceridų sudėtį. Trigliceridų masės dalys išreiškiamos procentais.

3. METODO ESMĖ

Iš pieno arba pieno produktų ekstrahuoti riebalai analizuojami dujų chromatografijos metodu, naudojant įkrautinę kolonėlę arba trumpą kapiliarinę kolonėlę, kad būtų galima nustatyti trigliceridus (TG), atskiriamus pagal suminį anglies atomų skaičių. Į atitinkamas TG lygtis įrašant skirtingo dydžio (nuo C_{24} iki C_{54}, naudojami tik lyginiai C skaičiai) riebalų molekulių procentais išreikštą masės dalį, apskaičiuojamos *S* vertės. Jei *S* vertės neatitinka gryniems pieno riebalams nustatytų ribinių verčių, aptinkamas pašalinių riebalų buvimas.

▼B

1 pastaba: Įkrautinių ir kapiliarinių kolonėlių tinkamumas ir lygiavertiškumas buvo įrodytas anksčiau [2–4].

2 pastaba: *S* vertė yra TG masių dalių, padaugintų iš tam tikrų faktorių, suma.

4. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti analitiškai gryni.

4.1. Visų nešančiųjų dujų: azoto (arba helio ar vandenilio) grynumas turi būti ne mažesnis kaip 99,995 %.

4.2. Riebalų etalonai pieno riebalų etalonui gauti pagal 7.3.3 skyrių.

4.2.1. Trigliceridų etalonai, sotieji, tinkamus produktus galima pirkti.

4.2.2. Cholesterolio etalonas.

4.3. Metanolis (CH_3OH), bevandenis.

4.4. n-heksanas ($CH_3(CH_2)_4CH_3$).

4.5. n-heptanas ($CH_3(CH_2)_5CH_3$).

4.6. Kitos dujos: vandenilis, grynumas ne mažesnis kaip 99,995 %, be organinių priemaišų (C_nH_m < 1 µl/l); sintetinis oras, be organinių priemaišų (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Bevandenis natrio sulfatas (Na_2SO_4).

5. APARATŪRA

Įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

5.1. **Aukštatemperatūris dujų chromatografas**

Aukštatemperatūris dujų chromatografas, kurį būtų įmanoma naudoti ne žemesnėje kaip 400 °C temperatūroje, su liepsnos jonizaciniu detektoriumi (FID). Injektoriuje naudojama pertvara turi išlaikyti aukštą temperatūrą ir turėtų labai mažai „rasoti“. Su kapiliariniu dujų chromatografu reikia naudoti injektorių ant kolonėlės. Visuomet naudojami grafitiniai sandarikliai kolonėlei prijungti ir kaip injektoriaus ir (arba) detektoriaus tarpikliai (jei reikia).

5.2. **Chromatografinė kolonėlė**

5.2.1. *Įkrautinė kolonėlė*

Naudojama stiklinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 2 mm ir ilgis 500 mm, pripildyta nejudančiosios fazės, kurią sudaro 3 % OV-1 ant 125–150 µm (100–120 mešų) Gas ChromQ ([1])). Įkrautinės kolonėlės ruošimas, dengimas silanu, pripildymas ir įkrautinės kolonėlės kondicionavimas aprašytas A priede.

Galima naudoti ir kapiliarinę kolonėlę (5.2.2).

5.2.2. *Kapiliarinė kolonėlė*

Naudojama trumpa kapiliarinė kolonėlė, pvz., 5 m ilgio, su nepoline nejudančiaja faze, kuri galėtų išlaikyti 400 °C arba aukštesnę temperatūrą ([2])). Kolonėlei kondicionuoti per 2–3 dienas atliekama pieno riebalų tirpalo (7.2) 20 analizių, naudojant 7.3.4.2 pateiktus nuostačius. Po kondicionavimo atsako faktoriai (7.3.3) turi būti arti 1 ir mažesni kaip 1,20.

Pastaba: Galima naudoti skirtingų matmenų kolonėles su skirtinga nepoline, aukštai temperatūrai atsparia faze, jei jų charakteristikos suderinamos su šiuo standartu. Dar žr. 7.3.4.2.

([1]) Produkto, kurį galima pirkti, pavyzdys. Ši informacija yra pateikta šio tarptautinio standarto naudotojų patogumui ir nereiškia pritarimo šiam produktui.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) yra tinkamo produkto, kurį galima pirkti, pavyzdys. Ši informacija yra pateikta šio tarptautinio standarto naudotojų patogumui ir nereiškia pritarimo šiam produktui.

▼B

5.3. Extrelut kolonėlė, 1–3 ml talpos, su silikagelio įkrova, tik pieno riebalams ekstrahuoti pagal 7.1.3.

5.4. Grafitiniai sandarikliai, kurie gali išlaikyti ne žemesnę kaip 400 °C temperatūrą; naudojami GC kolonėlei prijungti ir kaip injektoriaus ir (arba) detektoriaus tarpikliai.

5.5. Vandens vonia, kuri galėtų palaikyti 50 °C ± 2 °C temperatūrą.

5.6. Krosnis, galinti veikti 50 °C ± 2 °C ir 100 °C ± 2 °C temperatūroje.

5.7. Mikropipetė.

5.8. Graduota pipetė, 5 ml talpos.

5.9. Apvaliadugnė kolba, 50 ml talpos.

5.10. Kūginė kolba, kurios vardinė talpa 250 ml.

5.11. Piltuvas.

5.12. Tankus filtravimo popierius.

5.13. Sukamasis garintuvas.

5.14. Buteliukai, kurių vardinė talpa 1 ml, su užspaudžiamais arba užsukamais dangčiais, turinčiais politetrafluoretileno įdėklą.

5.15. Įpurškimo švirkštas, kurio stūmoklis nesiekia adatos galo (GC įkrautinė kolonėlė).

Pastaba: Naudojant šiuos švirkštus gaunamas geresnis rezultatų pakartojamumas.

5.16. Analizės svarstyklės, kuriomis galima sverti 1 mg tikslumu ir mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg.

6. ĖMINIŲ ĖMIMAS

Į laboratorija turėtų būti siunčiamas reprezentatyvus ėminys. Jis neturi sugesti arba pakisti vežant arba laikant.

Ėminių ėmimas nėra šiame tarptautiniame standarte apibrėžto metodo sudėtinė dalis. Rekomenduojamas ėminių ėmimo metodas yra pateiktas ISO 707IDF 50 [5].

7. PROCEDŪRA

7.1. **Mėginių ruošimas**

Mėginiams ruošti taikomas vienas iš šių trijų pieno riebalų ekstrahavimo metodų.

7.1.1. *Išskyrimas iš sviesto arba lydyto sviesto*

Nuo 50 g iki 100 g ėminio išlydoma 50 °C temperatūros vandens vonioje (5.5) arba krosnyje (5.6). Į sulankstyta filtravimo popierių (5.12) įdedama nuo 0,5 iki 1,0 g natrio sulfato (4.7). 250 ml kūginė kolba (5.10) ir piltuvas (5.11) su įdėtu filtro popieriumi iš anksto pakaitinamas krosnyje (5.6), nustatytoje 50 °C. Iš anksto pakaitintą kolbą, piltuvą ir įdėtą filtravimo įtaisą laikant krosnyje, filtruojamas išlydyto ėminio riebalinis sluoksnis. Reikia žiūrėti, kad nepatektų išrūgos.

Tik tais atvejais, kai ėminio kiekis ribotas, galima naudoti mažesnį ėminį ir procedūra turėtų būti atitinkamai pakeista. Tačiau naudojant mažesnį ėminį didėja rizika, kad jis gali būti nereprezentatyvus.

1 pastaba: Sviestą galima gauti iš grietinėlės jį sumušant ir gerai išplaunant gautus sviesto grūdelius.

2 pastaba: Pieno riebaluose, gautuose pagal 7.1.1 procedūrą, beveik nebus fosfolipidų.

▼B

7.1.2. *Ekstrahavimas pagal Röse–Gottlieb gravimetrinį metodą*

Riebalų frakcija iš ėminio ekstrahuojama taikant gravimetrinį metodą, aprašytą viename iš standartų ISO 1211IDF 001D, ISO 2450IDF 016C arba ISO 7328IDF 116A.

Pastaba: Jei gautuose pieno riebaluose yra fosfolipidų, bus gauta cholesterolio smailė, kuri padidėjo maždaug 0,1 %. Todėl poveikis TG sudėčiai, kai etalonuojama pagal 100 %, įskaitant cholesterolį, yra labai nežymus.

7.1.3. *Ekstrahavimas iš pieno, naudojant silikagelio kolonėles*

0,7 ml ėminio, kondicionuoto 20 °C temperatūroje, mikropipete (5.7) įpilama į 1–3 ml Extrelut kolonėlę (5.3). Paliekama tolygiai pasiskirstyti ant silikagelio maždaug 5 min.

Baltymų ir lipidų kompleksams suardyti graduota pipete (5.8) įpilama į Extrelut kolonėlę 1,5 ml metanolio (4.3). Vėliau riebalų frakcija ekstrahuojama iš ėminio 20 ml *n*-heksano (4.4). *n*-heksanas įpilamas iš lėto ir nedideliais kiekiais. Ištekantis tirpiklis surenkamas į 50 ml apvaliadugnę kolbą (5.9), prieš tai išdžiovintą iki pastovios žinomos masės, pasveriant 1 mg tikslumu ir masę užrašant 0,1 mg tikslumu.

Leidžiama skysčiui po ekstrahavimo visiškai ištekėti iš kolonėlės. Eliuato tirpikliai nudistiliuojami sukamajame garintuve (5.13), kurio vandens vonios temperatūra nustatyta nuo 40 °C iki 50 °C. Nudistiliavus tirpiklius, apvaliadugnė kolba ir jos turinys sveriami 1 mg tikslumu, masę užrašant 0,1 mg tikslumu. Riebalų masės išeiga nustatoma iš gautos masės atimant sausos apvaliadugnės kolbos masę.

Pastaba: Riebalų ekstrahavimas Gerber, Weibull–Berntrop arba Schmid–Bondzynski–Ratzlaff metodais arba pieno riebalų atskyrimas plovikliais (BDI metodas) TG analizei netinka, nes dideli iš dalies esterifikuotų gliceridų arba fosfolipidų kiekiai gali pereiti į riebalų fazę. Todėl šio tarptautinio standarto taikymas tam tikriems produktams, ypač sūriui, yra ribotas.

7.2. **Mėginio tirpalo ruošimas**

Jei naudojama dujų chromatografo įkrautinė kolonėlė, ruošiamas 5 % (tūrio) riebalų (gautų pagal 7.1) tirpalas *n*-heksane (4.4) arba *n*-heptane (4.5). Atsižvelgiant į kolonėlės matmenis, į kapiliarinę kolonėlę įpurškiamų riebalų koncentracija yra 1 % (0,53 mm VS, didelis skersmuo) arba mažesnė.

Pagal naudojamos kolonėlės matmenis ir 7.1.3 gautą riebalų masę nustatomas tirpiklio (4.4 arba 4.5) kiekis, kuris turi būti įpiltas į mėginio medžiagą kolboje, kuri sveriama 1 mg tikslumu ir masė užrašoma 0,1 mg tikslumu. Likutis visiškai ištirpinamas.

Maždaug 1 ml mėginio tirpalo įpilama į buteliuką (5.14).

7.3. **Chromatografinis trigliceridų nustatymas**

7.3.1. *Bazinės linijos slinkis*

Siekiant kiek įmanoma sumažinti bazinės linijos kilimą, kolonėlė turi būti kondicionuojama, kaip nurodyta 5.2.2 (kapiliarinė kolonėlė) arba A.4 priede (įkrautinė kolonėlė).

Pastaba: Dėl aukštos kolonėlės temperatūros TG analizė yra ypač jautri bazinės linijos pakilimui didelio anglies atomų skaičiaus intervale.

7.3.2. *Įpurškimo būdas*

▼B

7.3.2.1. Įkrautinė kolonėlė

Siekiant išvengti diskriminacijos ir pagerinti aukštos virimo temperatūros TG komponentų kiekybinį nustatymą, taikomas įpurškimo karšta adata būdas. Siurbiant riebalų tirpalą į švirkštą, į adatą įtraukiama oro. Adata įstatoma į injektorių. Prieš įpurškimą adata pakaitinama maždaug 3 s. Po to greitai įpurškiamas švirkšto turinys.

7.3.2.2. Kapiliarinė kolonėlė

Kai naudojamas šaltas įpurškimas injektoriumi ant kolonėlės (*on-column*) (7.3.4.2), įstatoma švirkšto adata ir iš karto įpurškiama. Adatos buvimo įpurškimo angoje trukmė turėtų būti tokia, kad būtų išvengta tirpiklio smailės užpakalinės dalies platėjimo.

Pastaba: Optimali buvimo trukmė paprastai yra apie 3 s.

7.3.3. *Kalibravimas*

7.3.3.1. Bendrieji dalykai

Mėginiams kalibruoti kiekvienos dienos pradžioje atliekamos dvi arba trys etaloninių pieno riebalų analizės. Vėliausioji etaloninių pieno riebalų analizė naudojama TG ir cholesterolio atsako faktoriams RF_{si} (masės dalis/ploto dalis) nustatyti ir šios vertės taikomos vėliau analizuojamiems mėginiams (žr. 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

čia:

w_{si} kiekvieno etaloninių pieno riebalų TG arba cholesterolio masės dalis, išreikšta procentais,

A_{si} kiekvieno etaloninių pieno riebalų TG arba cholesterolio smailės ploto skaitmeninė vertė.

Žinomos TG sudėties etaloniniai pieno riebalai gaunami pagal 7.3.3.2 arba 7.3.3.3.

7.3.3.2. Komercinis pieno riebalų etalonas

Geriausias būdas kiekvienos mėginio sudedamosios dalies atsako faktoriui nustatyti yra naudoti sertifikuotos TG sudėties etaloninius pieno riebalus.

Pastaba: Tinka CRM 519 etalonas (bevandeniai pieno riebalai), kurį galima gauti Komisijos etaloninių medžiagų ir matavimų institute (Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440, Geel, Belgija) ([1]).

7.3.3.3. Laboratorinis pieno riebalų etalonas

Norint gauti pieno riebalus atitinkančią santykinę TG sudėtį, ruošiama apie 1 g riebalų etalonų mišinio (žr. 4.2, kurio sudėtyje būtų bent sotieji C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} ir C_{54} TG ir cholesterolis; be to, pageidautina C_{50} ir C_{52}), sveriant 1 mg tikslumu ir užrašant masę 0,1 mg tikslumu.

Riebalų etalonų mišinio tirpalas *n*-heksane (4.4) arba *n*-heptane (4.5) pakartotinai analizuojamas pagal 7.3.4. Tokia pačia seka pakartotinai analizuojami suvidurkintos sudėties pieno riebalai.

Pagal riebalų etalonų mišinį nustatomi TG atsako faktoriai. Mišinyje nesančių TG tarpiniai atsako faktoriai gali būti apskaičiuoti taikant

([1]) Produkto, kurį galima pirkti, pavyzdys. Ši informacija yra pateikta šio tarptautinio standarto naudotojų patogumui ir nereiškia pritarimo šiam produktui.

▼B

matematinį interpoliavimą. Gauti atsako faktoriai taikomi pieno riebalams, norint gauti etaloninę sudėtį. Taip gauti etaloniniai pieno riebalai gali būti laikomi kelis metus, jei būtų laikomi azoto aplinkoje ir ne aukštesnėje kaip -18 °C temperatūroje.

7.3.4. *Chromatografinės sąlygos*

Pastaba: Naudojant įkrautinę kolonėlę arba kapiliarinę kolonėlę, paprastai gaunama 1 paveiksle pavaizduota skyra. Lyginio skaičiaus TG smailių skilimo paprastai nestebima ir jo reikia vengti.

7.3.4.1. Įkrautinė kolonėlė

a) Temperatūros programa. Nustatoma pradinė krosnies temperatūra 210 °C. Ši temperatūra nekeičiama 1 min. Po to temperatūra keliama 6 °C/min sparta iki 350 °C. Ši (galutinė) temperatūra nekeičiama 5 min.

b) Detektoriaus ir injektoriaus temperatūra: abiejų įtaisų temperatūra nustatoma 370 °C.

c) Nešančiosios dujos. Naudojamas azotas, kurio pastovus srautas apie 40 ml/min. Tikslus nešančiųjų dujų srautas reguliuojamas tokiu būdu, kad C_{54} eliuavimas vyktų 341 °C temperatūroje.

d) Analizės trukmė – 29,3 min.

e) Įpurškiamas tūris – įpurškiama 0,5 µl 5 % (tūrio) mėginio tirpalo.

Per TG analizės pertraukas ir po darbo, savaitgaliais bei atostogų metu išlaikoma a) punkte nurodyta pradinė krosnies temperatūra, b) punkte nurodyta detektoriaus ir injektoriaus temperatūra ir c) punkte nurodytas pastovus nešančiųjų dujų srautas. Taip užtikrinamas tinkamiausias kolonėlės veikimas.

7.3.4.2. Kapiliarinė kolonėlė

a) Temperatūros programa. Nustatoma pradinė krosnies temperatūra 80 °C. Ši temperatūra nekeičiama 0,5 min. Vėliau temperatūra keliama iki 190 °C 50 °C/min sparta ir toliau 6 °C/min sparta iki 350 °C. Ši (galutinė) temperatūra nekeičiama 5 min.

b) Detektoriaus temperatūra. Nustatoma 370 °C temperatūra.

c) Nešančiosios dujos. Naudojamas azotas, kurio pastovus srautas apie 3 ml/min.

d) Analizės trukmė – 34,4 min.

e) Įpurškiamas tūris. Įpurškiama 0,5 µl 5 % (tūrio) mėginio tirpalo.

Tinkamiausiam veikimui užtikrinti šie nustatymai išlaikomi nedarbo metu (žr. 7.3.4.1).

7.3.4.2 pateikti analizės nustatymai tinka didelio vidinio skersmens kolonėlei (VS 0,53 mm), kaip nurodyta 5.2.2. Galima taikyti kitas sąlygas, jei naudojama kitokių matmenų kolonėlė arba kita fazė.

8. INTEGRAVIMAS, ĮVERTINIMAS IR ANALIZĖS PARAMETRŲ KONTROLĖ

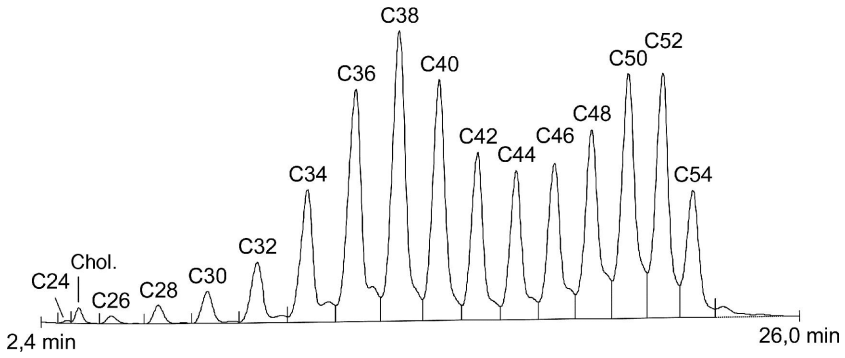
Įvertinamos chromatogramų smailės, naudojant integravimo sistemą, kuria galima nubrėžti bazinę liniją ir pakartotinai integruoti. 1 paveiksle pavaizduota integruoti tinkama chromatograma, o 2 paveiksle pavaizduota chromatograma su atsitiktine bazinės linijos, kuri baigiasi po C_{54}, padėties paklaida, daranti įtaką visų TG procentiniam kiekiui. Vis dėlto, apskaičiuojant neįtraukiamos smailės, kurios atsiranda po C_{54}.

TG su nelyginiu acilų C atomų skaičiumi ($2n + 1$) sudedami su prieš juos esančiu lyginio skaičiaus TG ($2n$). Neatsižvelgiama į mažą C_{56} kiekį. Likusių TG, įskaitant cholesterolį, smailių plotų procentinės vertės dauginamos iš atitinkamų atsako faktorių, gautų etaloniniams pieno riebalams (paskutinis kalibravimas), ir normalizuojamos sumą prilyginant 100 % pagal 9.1.

▼B

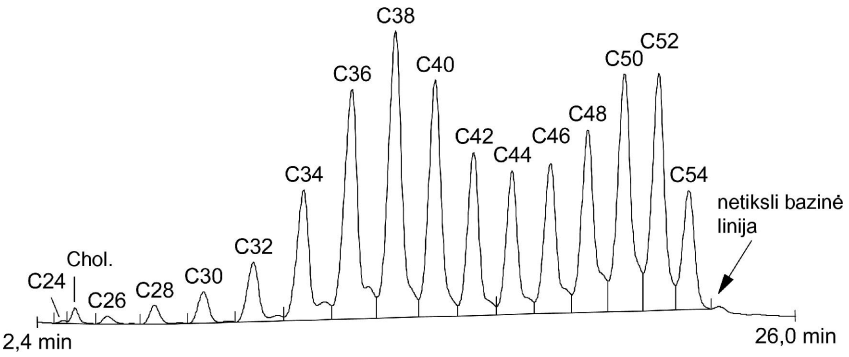
1 paveikslas

Pieno riebalų trigliceridų chromatogramos su tiksliai nustatyta bazine linija pavyzdys



2 paveikslas

Pieno riebalų trigliceridų chromatogramos su netiksliai nustatyta bazine linija pavyzdys



Matavimo sąlygoms kontroliuoti lyginama su 1 lentelėje pateiktais įvairių TG variacijos koeficientais CV, kurie yra pagrįsti to paties pieno riebalų mėginio 19 analizių.

Jei CV yra gerokai didesni nei 1 lentelėje pateiktos vertės, yra netinkamos chromatografinės sąlygos.

Pastaba: 1 lentelėje pateiktos vertės nėra privalomos, bet jomis galima vadovautis vykdant kokybės kontrolę.

Tačiau jei priimamos didesnės CV vertės, visgi būtina atitikti 10 skyriuje nurodytas pakartojamumo ir atkuriamumas ribines vertes.

1 lentelė

Trigliceridų kiekio variacijos koeficientai (19 nuosekliųjų analizių)

Trigliceridas	CV %
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

Trigliceridas	CV %
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. APSKAIČIAVIMAS IR REZULTATŲ IŠRAIŠKA

9.1. **Trigliceridų sudėtis**

9.1.1. *Apskaičiavimas*

Apskaičiuojama kiekvieno TG (kai 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} ir C_{54}) ir cholesterolio masės dalis w_i, išreikšta mėginio suminio TG kiekio procentais, taikant šią lygtį:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

čia:

A_i mėginio kiekvieno TG smailės ploto skaitmeninė vertė,

RF_{Si} kiekvieno TG atsako faktorius, nustatytas atliekant kalibravimą (7.3.3).

9.1.2. *Tyrimo rezultatų išraiška*

Rezultatai išreiškiami dviem skaičiais po kablelio.

9.2. ***S* vertės**

9.2.1. *Apskaičiavimas*

9.2.1.1. Apskaičiuojamos procentais išreikštos *S* vertės, įrašant atitinkamų TG procentines w_i (9.1.1) vertes į (3)–(7) lygtis. Naudojamos visos lygtis, neatsižvelgiant į numanomų pašalinių riebalų tipą.

9.2.1.2. Sojų, saulėgrąžų, alyvuogių, rapsų, sėmenų, kviečių gemalų, kukurūzų gemalų, vilnamedžio aliejus ir žuvų taukai.

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Kokosų ir palmių branduolių aliejus.

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Palmių aliejus ir galvijų lajus.

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Kiauliniai taukai.

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6. Visi riebalai.

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Tyrimo rezultatų išraiška*

Rezultatai išreiškiami dviem skaičiais po kablelio.

9.3. **Pašalinių riebalų aptikimas**

Penkios *S* vertės, gautos 9.2.1, lyginamos su atitinkamomis *S* ribinėmis vertėmis, pateiktomis 2 lentelėje.

Mėginys laikomas grynu pieno riebalų mėginiu, kai visos penkios *S* vertės patenka į 2 lentelėje nurodytų ribinių verčių intervalą. Tačiau laikoma, kad mėginyje yra pašalinių riebalų, jei kuri nors iš *S* verčių nepatenka į atitinkamų ribinių verčių intervalą.

Nors atskiros (3)–(6) lygtys tiksliau rodo tam tikrus pašalinius riebalus palyginti su visų riebalų (7) lygtimi (žr. B.1 lentelę), teigiamas rezultatas, gautas pagal kurią nors vieną iš (3)–(6) lygčių, neleidžia daryti išvadų apie pašalinių riebalų tipą.

B priede aprašyta augalinių arba gyvūninių riebalų kiekio falsifikuotuose pieno riebaluose apskaičiavimo procedūra. Šios procedūros tinkamumas nėra patvirtintas ir ji yra tik informacijai.

2 lentelė

Grynųjų pieno riebalų ribinės *S* vertės

Pašaliniai riebalai	Lygtis	Ribinės *S* vertės [a]
Sojų, saulėgrąžų, alyvuogių, rapsų, sėmenų, kviečių gemalų, kukurūzų gemalų, vilnamedžio aliejus ir žuvų taukai	(3)	98,05–101,95
Kokosų ir palmių branduolių aliejus	(4)	99,42–100,58
Palmių aliejus ir galvijų lajus	(5)	95,90–104,10
Kiauliniai taukai	(6)	97,96–102,04
Visi riebalai	(7)	95,68–104,32

[a] Apskaičiuota 99 % pasikliovimo lygiui, todėl pašalinių riebalų pridėjimas rodomas tik tokiu atveju, jei viršijamos atitinkamos lygties aptikimo ribos (žr. B.1 lentelę).

10. TIKSLUMAS

10.1. **Tarplaboratorinis tyrimas**

Pakartojamumo ir atkuriamumo vertės buvo nustatytos pagal (3)–(7) lygtis naudojant grynuosius pieno riebalus; jos gali netikti matricoms, išskyrus nurodytąsias.

10.2. **Pakartojamumas**

Dviejų atskirų analizių rezultatų, kuriuos vienas analitikas per trumpą laiką toje pačioje laboratorijoje gavo ta pačia įranga tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 3 lentelėje nurodytos ribinės vertės.

▼B

3 lentelė

Pakartojamumo ribinės vertės r, gautos (3)–(7) lygtims

Pašaliniai riebalai	Lygtis	r %
Sojų, saulėgrąžų, alyvuogių, rapsų, sėmenų, kviečių gemalų, kukurūzų gemalų, vilnamedžio aliejus ir žuvų taukai	(3)	0,67
Kokosų ir palmių branduolių aliejus	(4)	0,12
Palmių aliejus ir galvijų lajus	(5)	1,20
Kiauliniai taukai	(6)	0,58
Visi riebalai	(7)	1,49

10.3. **Atkuriamumas**

Dviejų atskirų ir nepriklausomų analizių rezultatų, kuriuos skirtingi analitikai skirtingose laboratorijose gavo tai pačiai bandomajai medžiagai taikydami tą patį metodą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų bus didesnis kaip 4 lentelėje nurodytos ribinės vertės.

4 lentelė

Atkuriamumo ribinės vertės R, gautos (3)–(7) lygtims

Pašaliniai riebalai	Lygtis	R %
Sojų, saulėgrąžų, alyvuogių, rapsų, sėmenų, kviečių gemalų, kukurūzų gemalų, vilnamedžio aliejus ir žuvų taukai	(3)	1,08
Kokosų ir palmių branduolių aliejus	(4)	0,40
Palmių aliejus ir galvijų lajus	(5)	1,81
Kiauliniai taukai	(6)	0,60
Visi riebalai	(7)	2,07

11. MATAVIMO NEAPIBRĖŽTIS

Turint pakartojamumo *r* ir atkuriamumo *R* vertes, galima apskaičiuoti *S* vertės išplėstinę neapibrėžtį.

Įtraukus išplėstinę neapibrėžtį (pagrįstą dviem to paties mėginio analizėmis) į 2 lentelės *S* ribinių verčių rezultatus, gaunamos išplėstinės *S* ribinės vertės, pateiktos 5 lentelėje.

5 lentelė

Grynųjų pieno riebalų išplėstinės ribinės *S* vertės, įskaitant išplėstinę neapibrėžtį

Pašaliniai riebalai	Lygtis	Išplėstinės ribinės *S* vertės
Sojų, saulėgrąžų, alyvuogių, rapsų, sėmenų, kviečių gemalų, kukurūzų gemalų, vilnamedžio aliejus ir žuvų taukai	(3)	97,36–102,64
Kokosų ir palmių branduolių aliejus	(4)	99,14–100,86
Palmių aliejus ir galvijų lajus	(5)	94,77–105,23
Kiauliniai taukai	(6)	97,65–102,35
Visi riebalai	(7)	94,42–105,58

▼B

12. TYRIMO PROTOKOLAS

Tyrimo protokole nurodoma:

— visa informacija, kurios reikia visiškai identifikuoti ėminį,

— ėminių ėmimo metodas, jei žinomas,

— taikytas tyrimo metodas su nuoroda į šį tarptautinį standartą,

— visos šiame tarptautiniame standarte nenurodytos arba neprivalomos darbo detalės ir visų incidentų detalės, kurios galėjo turėti įtakos tyrimo rezultatui (-ams),

— gautas (-i) tyrimo rezultatas (-ai) ir, jei buvo tikrinamas pakartojamumas, gautas galutinis pataisytas rezultatas.

▼B

A PRIEDAS

(Norminis)

ĮKRAUTINĖS KOLONĖLĖS RUOŠIMAS

A.1. REAGENTAI IR APARATŪRA

A.1.1. **Toluenas** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2. **Dimetildichlorsilano** [$Si(CH_3)_2\ Cl_2$] tirpalas.

50 ml dimetildichlorsilano ištirpinama 283 ml tolueno (A.1.1).

A.1.3. **Kakavos sviesto** tirpalas, 5 % masės kakavos sviesto *n*-heksane (4.4) arba *n*-heptane (4.5).

A.1.4. **Nejudančioji fazė**, 3 % OV-1 ant 125–150 μm (100–120 mešų) Gas ChromQ ([1]).

Pastaba: Grūdėtumas buvo perskaičiuotas į mikrometrus pagal BS 410 (visos dalys)[6].

A.1.5. **Stiklinė kolonėlė**, kurios vidinis skersmuo 2 mm ir ilgis 500 mm, U formos.

A.1.6. **Įtaisas** įkrautinei kolonėlei pildyti.

A.1.6.1. *Pildymo kolonėlė*, su užsukamais galiniais dangčiais, ant kurios yra pripildymo reikiamu nejudančiosios fazės kiekiu žyma.

A.1.6.2. *Mažų akučių sietas*, kurio akučių dydis apie 100 μm, su užsukamu dangčiu, pritaikytu stiklinei kolonėlei užkimšti pagal A.3 paveikslą.

A.1.6.3. *Silanizuota stiklo vata*, deaktyvuota.

A.1.6.4. *Vibratorius*, skirtas tolygiam nejudančiosios fazės paskirstymui pripildant.

A.1.6.5. *Silanizavimo įtaisai* kolonėlės stikliniam paviršiui silanizuoti.

A.1.6.6. *Vulfo kolba.*

A.1.6.7. *Vandens siurblys.*

A.2. SILANIZAVIMAS (STIKLINIO PAVIRŠIAUS DEAKTYVAVIMAS)

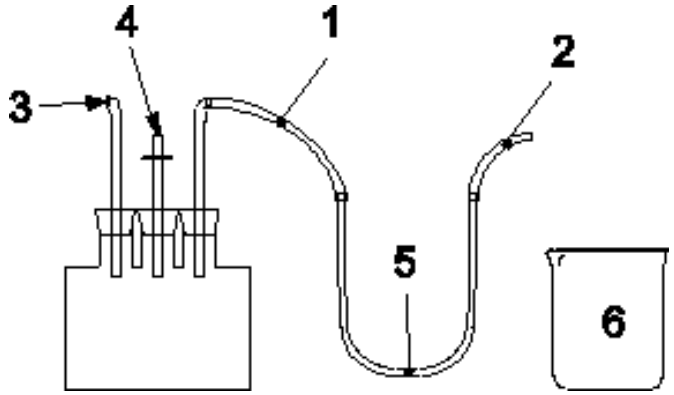
Vulfo kolba (A.1.6.6) prijungiama prie vandens siurblio (A.1.6.7), žarna 2 (žr. A.1 paveikslą) panardinama į dimetilchlorsilano tirpalą (A.1.2). Uždarant čiaupą, kolonėlė (A.1.5) pripildoma tuo tirpalu. Čiaupas atidaromas ir abi žarnos nuimamos. Kolonėlė tvirtinama stove. Pipete ji pripildoma iki viršaus dimetildichlorsilano tirpalu (A.1.2).

([1]) Tinkamo produkto, kurį galima pirkti, pavyzdys. Ši informacija yra pateikta šio tarptautinio standarto naudotojų patogumui ir nereiškia ISO arba IDF pritarimo šiam produktui.

▼B

A.1 paveikslas

Silanizavimo įtaisas



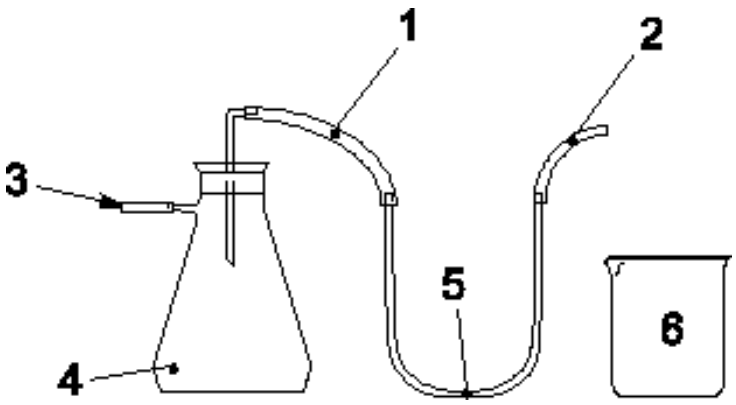
Paaiškinimas

1. 1-oji žarna
2. 2-oji žarna
3. vandens siurblys
4. čiaupas
5. stiklinė kolonėlė
6. dimetildichlorsilanas ir toluenas

Pripildyta kolonėlė paliekama 20–30 min. Vėliau vietoje Vulfo kolbos prijungiama filtravimo kolba. Kolonėlė ištuštinama ją prijungiant prie vandens siurblio (A.1.6.7) (žr. A.2 paveikslą). Ištuštinta kolonėlė plaunama 75 ml tolueno (A.1.1) ir 50 ml metanolio (4.3), panardinant žarną 2 į tirpiklį. Išplauta kolonėlė apie 30 min džiovinama krosnyje (5.6), nustatytoje 100 °C.

A.2 paveikslas

Plovimo įtaisas



Paaiškinimas

1. 1-oji žarna
2. 2-oji žarna
3. vandens siurblys
4. filtravimo kolba
5. stiklinė kolonėlė
6. ploviklis

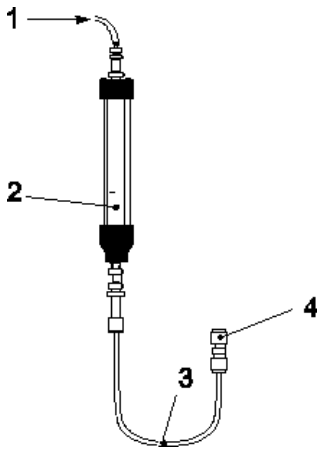
▼B

A.3 PRIPILDYMAS

Kolonėlė pripildoma naudojant A.3 paveiksle pavaizduotą įtaisą. Pildymo kolonėlė (A.1.6.1) iki žymės pripildoma nejudančiaja faze (A.1.4). Apatinis pripildomos stiklinės kolonėlės galas užkemšamas suspaustu apie 1 cm ilgio silanizuotos stiklo vatos (A.1.6.3) gniužulu. Ant kolonėlės galo užmaunamas mažų akučių sietas (A.1.6.2).

A.3 paveikslas

Stiklinės kolonėlės pripildymas



Paaiškinimas

1. azoto tiekimo anga

2. pildymo kolonėlė, pripildyta OV-1 iki žymės

3. pildoma stiklinė kolonėlė

4. užsukamasis dangtis su filtru, į kuriuos atsiremia stiklo pluoštas ir nejudančioji fazė

Kolonėlė pildoma nejudančiaja faze (azoto atmosferoje, esant 300 kPa slėgiui). Norint gauti tolygiai paskirstytą, ištisinę ir tvirtai suspaustą įkrovą, vibratorius turi judėti aukštyn ir žemyn pildoma stikline kolonėle. Pripildžius nejudančiąja faze, kitas kolonėlės galas užkemšamas kietai suspaustos silanizuotos stiklo vatos (A.1.6.3) gniužulu. Išsikišę galai nupjaunami. Kamštis įstumiamas mentele keletą milimetrų į kolonėlę.

A.4 KONDICIONAVIMAS

Atliekant a–c veiksmus, kolonėlė nesujungiama su detektoriumi, siekiant išvengti jo užteršimo. Pripildyta kolonėlė (A.3) kondicionuojama taip:

a) 15 min per kolonėlę pučiamas azotas, kurio srautas 40 ml/min ir chromatografo krosnis nustatyta 50 °C temperatūrai;

b) kolonėlė kaitinama didinant temperatūrą 1 °C/min sparta iki 355 °C, nustačius 10 ml/min azoto srautą;

c) 12–15 val. kolonėlė laikoma 355 °C temperatūroje;

d) įpurškiama du kartus po 1 µl kakavos sviesto tirpalo (A.1.3), naudojant įkrautinės kolonėlės temperatūros programą, nurodytą 7.3.4.1;

Pastaba: Kakavos sviestas sudarytas beveik vien iš aukštoje temperatūroje verdančių C_{50}–C_{54} trigliceridų, todėl sumažina kolonėlės kondicionavimo priemones, susijusias su atitinkamais atsako faktoriais.

▼B

e) per 2–3 dienas įpurškiama 20 kartų po 0,5 µl pieno riebalų tirpalo pagal 7.2, naudojant įkrautinės kolonėlės nuostačius, nurodytus 7.3.4.1.

— Mėginiams analizuoti naudojamos tik kolonėlės, kurių atsako faktoriai yra apie 1. Atsako faktoriai neturėtų būti didesni kaip 1,20.

▼B

B PRIEDAS

(Informacinis)

PAŠALINIŲ RIEBALŲ KIEKIO KIEKYBINIS ĮVERTINIMAS

B.1. BENDRIEJI DALYKAI

B.1 lentelėje nurodytos įvairių pašalinių riebalų aptikimo ribos, apskaičiuotos esant 99 % pasikliovimo lygiui. Vidurinėje skiltyje pateiktos aptikimo ribos taikant geriausią atskirąją lygtį nuo (3) iki (6).

Dešinėje skiltyje pateiktos aptikimo ribos pagal suminę lygtį (7) yra šiek tiek didesnės. Iš esmės, (7) lygties reikia tik kiekybiniam pašalinių riebalų įvertinimui atlikti.

Taikant visas lygtis, dar galima aptikti įvairių pašalinių riebalų derinius. Vieno tipo pašalinių riebalų TG sudėties kitimas atskiruose mėginiuose neturi didelės įtakos aptikimo riboms.

Kai naudojamos atskiros lygtis ir suminė lygtis, taikomos atskirų lygčių aptikimo ribos. Tačiau kiekybiniam įvertinimui atlikti tam tikrais atvejais reikia turėti suminės lygties *S* vertę (B.2).

B.1 lentelė

Į pieno riebalus pridėtų pašalinių riebalų aptikimo ribos procentais (pasikliovimo lygis – 99 %)

Pašaliniai riebalai	Atskiroji lygtis %	Suminė lygtis %
Sojų aliejus	2,1	4,4
Saulėgrąžų aliejus	2,3	4,8
Alyvuogių aliejus	2,4	4,7
Kokosų aliejus	3,5	4,3
Palmių aliejus	4,4	4,7
Palmių branduolių aliejus	4,6	5,9
Rapsų aliejus	2,0	4,4
Sėmenų aliejus	2,0	4,0
Kviečių gemalų aliejus	2,7	6,4
Kukurūzų gemalų aliejus	2,2	4,5
Vilnamedžio aliejus	3,3	4,4
Kiauliniai taukai	2,7	4,7
Galvijų lajus	5,2	5,4
Hidrinti žuvų taukai	5,4	6,1

B.2. APSKAIČIAVIMAS

Kiekybinis pašalinių riebalų įvertinimas atliekamas tik jei viršijama bent viena iš *S* ribinių verčių (2 lentelė arba 5 lentelė). Kiekybiniams duomenims gauti apskaičiuojama procentais išreikšta pašalinių riebalų masės dalis arba pašalinių riebalų mišinio masės dalis w_f mėginyje, naudojant šią lygtį:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \text{(B. 1)}$$

▼B

čia:

S rezultatas, gautas į vieną iš (3)–(7) lygčių įrašant pieno riebalų, į kuriuos pridėta pašalinių riebalų arba pašalinių riebalų mišinio, TG duomenis,

S_f konstanta, atitinkanti pridėtų pašalinių riebalų tipą.

Jei į pieno riebalus pridėtų pašalinių riebalų tipas nežinomas, naudojama bendroji S_f vertė 7,46 (B.2 lentelė). Visuomet naudojama pagal (7) lygtį gauta S vertė, net jei pagal ją S ribinės vertės nėra viršytos, bet jos yra viršytos pagal kitą lygtį.

Jei pašalinių riebalų tipas yra žinomas, jų atskiros S_f vertės (B.2 lentelė) įrašomos į (B.1) lygtį. S vertei apskaičiuoti reikiama pašalinių riebalų lygtis pasirenkama iš (3)–(6) lygčių.

B.2 lentelė

Įvairių pašalinių riebalų S_f vertės

Pašaliniai riebalai	S_f
Nežinomas	7,46
Sojų aliejus	8,18
Saulėgrąžų aliejus	9,43
Alyvuogių aliejus	12,75
Kokosų aliejus	118,13
Palmių aliejus	7,55
Palmių branduolių aliejus	112,32
Rapsų aliejus	3,30
Sėmenų aliejus	4,44
Kviečių gemalų aliejus	27,45
Kukurūzų gemalų aliejus	9,29
Vilnamedžio aliejus	41,18
Kiauliniai taukai	177,55
Galvijų lajus	17,56
Žuvų taukai	64,12

B.3. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

Tyrimo rezultatai išreiškiami dviejų ženklų po kablelio tikslumu.

Bibliografija

(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. *Riebalai 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. Nr. 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 PRIEDAS

(18 straipsnis)

PROCEDŪRA, TAIKYTINA GINČYTINŲ ANALIZĖS REZULTATŲ ATVEJU (CHEMINĖ ANALIZĖ)

1. Gamintojui paprašius, kitoje kompetentingos institucijos patvirtintoje laboratorijoje atliekama papildoma analizė, taikant reikiamą metodą, jei yra du užplombuoti kartotiniai mėginiai, kurie kompetentingos institucijos buvo laikomi tinkamomis sąlygomis. Prašymas pateikiamas ne vėliau kaip 7 darbo dienas nuo pirmosios analizės rezultatų paskelbimo. Analizė atliekama per 21 darbo dieną nuo prašymo gavimo. Kompetentingoji institucija siunčia šiuos mėginius kitai laboratorijai gamintojo prašymu ir jo sąskaita. Laboratorija turi būti įgaliota atlikti oficialiąsias analizes ir turėti patvirtintą kvalifikaciją atitinkamai konkrečiai analizei atlikti.

2. 1 laboratorijos $\overline{y}_1$ kartotinių matavimų vidurkio n_1 ir 2 laboratorijos $\overline{y}_2$ kartotinių matavimų vidurkio n_2 išplėstinės neapibrėžtys ($k = 2$) yra:

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ ir $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ čia σ_r yra atitinkamo metodo standartinis pakartojamumo nuokrypis ir σ_R yra apskaičiuojamas taikant $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ arr $y = x_1/x_2$ pavidalo formulę, neapibrėžčiai gauti turi būti laikomasi įprastų standartinių nuokrypių jungimo procedūrų.

4. Siekiant patikrinti, ar dviejų laboratorijų rezultatai atitinka metodo atkuriamumo standartinį nuokrypį σ_R, apskaičiuojama skirtumo $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$ išplėstinė neapibrėžtis:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Jei laboratorijų vidurkių skirtumo absoliučioji vertė $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ yra ne didesnė kaip jo neapibrėžtis $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

dviejų laboratorijų rezultatai atitinka atkuriamumo standartinį nuokrypį σ_r ir dviejų laboratorijų vidurkių aritmetinis vidurkis

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2},$$

yra pateikiamas ataskaitoje kaip galutinis rezultatas. Jo išplėstinė neapibrėžtis yra

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Siunta atmetama kaip neatitinkanti teisės aktais nustatytos viršutinės ribinės vertės *UL*, jei

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL;$$

kitaip ji priimama kaip atitinkanti *UL*.

Siunta atmetama kaip neatitinkanti teisės aktais nustatytos apatinės ribinės vertės *L* jei

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL;$$

kitaip ji priimama kaip atitinkanti *LL*.

Jei laboratorijų vidurkių skirtumo absoliučioji vertė $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ yra didesnė kaip jo neapibrėžtis $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

dviejų laboratorijų rezultatai neatitinka atkuriamumo standartinio nuokrypio.

Šiuo atveju siunta atmetama kaip netinkama, jei antroji analizė patvirtina pirmąją. Kitaip siunta priimama kaip tinkama.

Kompetentinga institucija gamintojui kuo greičiau turi pranešti galutinį rezultatą. Antrosios analizės išlaidas turi padengti gamintojas, jei siunta atmetama.

▼B

XXII PRIEDAS

KORELIACINĖ LENTELĖ

Reglamentas (EB) Nr. 213/2001	Šis reglamentas
1 straipsnis	1 straipsnis
2 straipsnis	1 straipsnis
3 straipsnis	2 straipsnis
—	3 straipsnis
4 straipsnis	—
5 straipsnis	—
6 straipsnis	4 straipsnis
7 straipsnis	18 straipsnis
8 straipsnis	—
9 straipsnis	5 straipsnis
10 straipsnis	6 straipsnis
11 straipsnis	7 straipsnis
12 straipsnis	8 straipsnis
13 straipsnis	9 straipsnis
14 straipsnis	10 straipsnis
15 straipsnis	11 straipsnis
16 straipsnis	12 straipsnis
17 straipsnis	13 straipsnis
—	14 straipsnis
18 straipsnis	15 straipsnis
19 straipsnis	16 straipsnis
	17 straipsnis
	19 straipsnis
20 straipsnis	—
21 straipsnis	—
22 straipsnis	20 straipsnis
23 straipsnis	21 straipsnis