Šis dokuments ir izveidots vienīgi dokumentācijas nolūkos, un iestādes neuzņemas nekādu atbildību par tā saturu

►**B**

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 273/2008

(2008. gada 5. marts),

ar kuru nosaka sīki izstrādātus noteikumus Padomes Regulas (EK) Nr. 1255/1999 piemērošanai attiecībā uz piena un piena produktu analīžu un kvalitātes vērtēšanas metodēm

(OV L 88, 29.3.2008., 1. lpp.)

Grozīta ar:

		Oficiālais Vēstnesis		
		Nr.	Lappuse	Datums
►**M1**	Komisijas Īstenošanas regula (ES) Nr. 565/2013 (2013. gada 18. jūnijs)	L 167	26	19.6.2013.

▼B

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 273/2008

(2008. gada 5. marts),

ar kuru nosaka sīki izstrādātus noteikumus Padomes Regulas (EK) Nr. 1255/1999 piemērošanai attiecībā uz piena un piena produktu analīžu un kvalitātes vērtēšanas metodēm

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1999. gada 17. maija Regulu (EK) Nr. 1255/1999 par piena un piena produktu tirgus kopīgo organizāciju ([1]) un jo īpaši tās 10. un 15. pantu, 26. panta 3. punktu, 29. panta 1. punktu un 31. panta 4. punktu,

tā kā:

(1) Komisijas Regulā (EK) Nr. 213/2001 ([2]) noteikti sīki izstrādāti noteikumi par to, kā piemērot Padomes Regulu (EK) Nr. 1255/1999 attiecībā uz piena un piena produktu analīžu un kvalitātes vērtēšanas metodēm. Ņemot vērā tehniskos sasniegumus analītisko metožu jomā, jāveic būtiskas izmaiņas. Skaidrības un efektivitātes dēļ, kā arī tādēļ, ka ir veikti daudzi tehniska rakstura grozījumi, Regula (EK) Nr. 213/2001 jāatceļ un jāaizstāj ar jaunu regulu.

(2) Jāpārbauda piena un piena produktu sastāva un kvalitātes prasības, kas noteiktas ar Regulā (EK) Nr. 1255/1999 paredzētajiem pasākumiem, lai nodrošinātu, ka šīs kvalitātes prasības tiek stingri ievērotas.

(3) Šādu pārbaužu standartmetodes bieži publicē starptautiskas organizācijas, piemēram, Eiropas Standartizācijas komiteja (*CEN*), Starptautiskā Piensaimniecības federācija (*IDF*), Starptautiskā Standartizācijas organizācija (*ISO*) un Zinātniskā biedrība analītisko metožu pilnveidošanai (*AOAC International*), šīs organizācijas tās arī regulāri atjaunina. Dažos gadījumos ir noteikta Kopienas standartmetode, bet citos gadījumos Kopienas noteikumos standartmetode nav precizēta. Lai nodrošinātu, ka standartmetodes tiek piemērotas vienādi, jāizveido standartmetožu saraksts un jāparedz Komisijai iespēja vajadzības gadījumā šo sarakstu pielāgot.

(4) Nevajadzētu izslēgt parasto metožu izmantojumu. Tādēļ jāprecizē to izmantošanas nosacījumi.

(5) Jāizstrādā kopējas metodes, lai nodrošinātu vienādu praksi analīžu rezultātu vērtēšanā, attiecīgā produkta organoleptiskajā vērtēšanā un apstrīdēto rezultātu pārskatīšanā.

([1]) OV L 160, 26.6.1999., 48. lpp. Regulā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 1152/2007 (OV L 258, 4.10.2007., 3. lpp.). Regula (EK) Nr. 1255/1999 tiks aizstāta ar Regulu (EK) Nr. 1234/2007 (OV L 299, 16.11.2007., 1. lpp.) no 2008. gada 1. jūlija.

([2]) OV L 37, 7.2.2001., 1. lpp.

▼B

(6) Attiecībā uz dažām analīzēm pašlaik nav starptautiski atzītu standartmetožu, kas ir apstiprinātas, un tādēļ nav pieejama informācija par analītisko rezultātu atšķirībām dažādās laboratorijās. Tādēļ jānosaka Kopienas metodes, kas apstiprinātas saskaņā ar starptautiski izstrādātiem noteikumiem un kuras piemērotu kā standartmetodes.

(7) Komisijas Regulā (EK) Nr. 1898/2005 ([1]) noteikti sīki izstrādāti noteikumi Padomes Regulas (EK) Nr. 1255/1999 īstenošanai attiecībā uz pasākumiem krējuma, sviesta un koncentrēta sviesta realizācijai Kopienas tirgū un paredzēta krējuma, sviesta un koncentrēta sviesta marķēšana noteiktos apstākļos, lai nodrošinātu pareizu šo produktu galapatēriņu. Marķēšanai ir svarīga nozīme, lai šī shēma darbotos pareizi. Lai nodrošinātu to, ka pret visiem šajā shēmā iesaistītiem tirgus dalībniekiem būtu vienāda attieksme, jāizveido kopējas metodes dažu šādu marķieru noteikšanai.

(8) Saskaņā ar Regulas (EK) Nr. 1255/1999 9. pantu par sieriem, kas gatavoti no aitas piena, var piešķirt privātās uzglabāšanas atbalstu. Īpašu kompensāciju par šiem pašiem produktiem var piešķirt saskaņā ar minētās regulas 31. pantu. Sierus, kas gatavoti no aitas piena, kazas piena, bifeļu piena un aitas, kazas un bifeļu piena maisījumiem, no noteiktām trešām valstīm var ievest Kopienā saskaņā ar preferenču sistēmu. Ņemot vērā iepriekšminētos nosacījumus, ir vajadzīgas piemērotas pārbaudes, lai nodrošinātu, ka attiecīgajiem produktiem netiek pievienots govs piens. Tādēļ, neskarot parasto metožu izmantošanu un ar nosacījumu, ka tās atbilst noteiktiem kritērijiem, jāparedz Kopienas standartmetode govs piena klātbūtnes noteikšanai.

(9) Saskaņā ar 1990. gada 10. oktobra Komisijas Regulu (EEK) Nr. 2921/90 par atbalstu kazeīna un kazeinātu ražošanai no vājpiena ([2]) jākonstatē kolibaktēriju neesība. Starptautiski atzītas standartmetodes kolibaktēriju klātbūtnes konstatācijai pienā un piena produktos ir standarts ISO 4831. Pamatojoties uz iepriekš minēto standartu, ir noteikta Kopienas standartmetode kolibaktēriju klātbūtnes noteikšanai.

(10) Padomes 1987. gada 23. jūlija Regulā (EEK) Nr. 2658/87 par tarifu un statistikas nomenklatūru un kopējo muitas tarifu ([3]) paredzētas dažādas muitas nodokļa likmes par kombinēto lopbarību, uz ko attiecas muitas tarifu pozīcija Nr. 2309, atkarībā no piena produktu satura tajā. Lai nodrošinātu attiecīgo noteikumu vienotu piemērošanu, laktozes satura analīzei visās dalībvalstīs jānosaka obligāti izmantojama vispāratzīta metode.

([1]) OV L 308, 25.11.2005., 1. lpp. Regulā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 1546/2007 (OV L 337, 21.12.2007., 68. lpp.).
([2]) OV L 279, 11.10.1990., 22. lpp. Regulā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 1487/2006 (OV L 278, 10.10.2006., 8. lpp.).
([3]) OV L 256, 7.9.1987., 1. lpp. Regulā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas Regulu (EK) Nr. 1352/2007 (OV L 303, 21.11.2007., 3. lpp.).

▼B

(11) Saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1255/1999 sviestam un sausajam vājpienam, kas paredzēts intervencei vai sausajam vājpienam izmantošanai lopbarībā, jāatbilst noteiktām kvalitātes prasībām. Jānosaka standartmetodes, lai pārbaudītu, vai šīs prasības ir ievērotas.

(12) Dažas metodes šajā regulā ir ieviestas pirmo reizi. Pēc šīs regulas stāšanās spēkā jāparedz pietiekami ilgs laiks, lai laboratorijas varētu pareizi ieviest un lietot šīs jaunās metodes. Ikreiz, kad I pielikumā minēto standartmetodi pārskata un publicē organizācija, kas izstrādā standartus, laboratorijām jādod sešu mēnešu ilgs laiks, lai tās atjauninātu savas analīžu procedūras atbilstīgi jaunajam standartam.

(13) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Piena un piena produktu pārvaldības komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

I NODAĻA

VISPĀRĪGI NOTEIKUMI

1. pants

Priekšmets un darbības joma

1. Šajā regulā noteiktas dažas standartmetodes, lai veiktu piena un piena produktu ķīmisko, fizikālo un mikrobioloģisko analīzi un organoleptisko novērtēšanu saskaņā ar pasākumiem, kas paredzēti piena un piena produktu tirgus kopīgajā organizācijā, kas izveidota ar Regulu (EK) Nr. 1255/1999, un šo metožu izmantošanas noteikumiem.

2. To standartmetožu saraksts, kuras piemērojamas 1. punktā minētajām analīzēm, ir norādīts šīs regulas I pielikumā.

3. Komisija atjauno šo sarakstu saskaņā ar procedūru, kas izklāstīta Regulas (EK) Nr. 1255/1999 42. pantā.

2. pants

Parastās metodes

Parastās metodes var izmantot analīzēm, kas paredzētas Kopienas noteikumos, ar nosacījumu, ka šīs metodes pienācīgi kalibrētas un regulāri pārbaudītas, salīdzinot ar standartmetodēm. Rezultāti jāsalīdzina, ievērojot pastāvīgo novirzi, atkārtojamību un reproducējamību.

Strīdu gadījumos izšķirīgie ir rezultāti, kas iegūti ar standartmetodi.

Dalībvalstis informē Komisiju par 1. pantā minētajās analīzēs izmantotajām parastajām metodēm.

▼B

II NODAĻA

ANALĪZES METODES

3. pants

Produkta partijas tiesisko ierobežojumu atbilstības novērtējums

Lai noteiktu sastāva atbilstību tiesiskajiem nosacījumiem, izņemot marķieru analīzi, piemērojams šīs regulas II pielikums.

4. pants

Organoleptiskā vērtēšana

1. Attiecībā uz pienu un piena produktiem, izņemot sviestu valsts rezervē, standartmetode, kas dalībvalstīm jāizmanto organoleptiskajai novērtēšanai, ir vai nu *IDF* standarts 99C:1997, vai citas salīdzināmas metodes, par kurām dalībvalstis paziņo Komisijai.

Lai pārbaudītu vērtētāju sniegumu un rezultātu ticamību, attiecībā uz organoleptiskajām analīzēm piemēro III pielikumā aprakstītās procedūras.

2. Lai pārbaudītu vērtētāju sniegumu un rezultātu ticamību, attiecībā uz organoleptiskajām analīzēm sviesta uzglabāšanai valsts rezervēs piemēro III pielikumā aprakstītās procedūras.

Procedūru, kas aprakstīta IV pielikumā, izmanto par organoleptiskās vērtēšanas standartmetodi.

5. pants

Marķieri

1. Par standartmetodi enantskābes triglicerīda noteikšanai sviestā, sviesta eļļā un krējumā izmantojama V pielikumā aprakstīto analīzes metode.

2. Lai noteiktu vanilīnu koncentrētā sviestā, sviestā un krējumā, par standartmetodi izmanto VI pielikumā aprakstīto metodi.

3. Lai noteiktu beta-apo-8' karotīnskābes etilestera saturu koncentrētā sviestā un sviestā, par standartmetodi izmanto analīzes metodi, kas aprakstīta VII pielikumā.

4. Lai noteiktu beta-sitosterīna vai stigmasterīna saturu sviestā un koncentrētā sviestā, par standartmetodi izmanto VIII pielikumā aprakstīto analīzes metodi.

5. Uzskata, ka koncentrētais sviests, sviests un krējums ir marķēts atbilstīgi attiecīgajiem Kopienas noteikumiem, ja iegūtie rezultāti ir saskaņā ar V pielikuma 10. un 11. punkta un VI, VII un VIII pielikuma 8. punkta specifikācijām.

6. pants

Govs piena kazeīna noteikšana

1. Analīžu standartmetodi, kas aprakstīta IX pielikumā, izmanto, lai nodrošinātu, ka siers, kam jābūt gatavotam tikai no aitas piena, kazas piena vai bifeļu piena vai aitas, kazas un bifeļu piena maisījuma, nesatur govs piena kazeīnu.

▼B

Uzskata, ka govs piena kazeīna klātbūtne ir konstatēta, ja govs piena kazeīna saturs analizējamā paraugā ir vienāds ar saturu references paraugā, kas satur 1 % govs piena, kā aprakstīts IX pielikumā, vai lielāks par to.

2. Lai konstatētu govs piena kazeīnu 1. punktā minētajos sieros, parastās metodes var izmantot ar nosacījumu, ka:

a) noteikšanas robeža ir maksimāli 0,5 % un

b) nevar iegūt kļūdaini pozitīvus rezultātus, un

c) govs piena kazeīns ir nosakāms ar vajadzīgo precizitāti pat pēc ilgstošas nogatavināšanas, kā tas var notikt parastos tirdzniecības apstākļos.

Ja nav ievēroti minētie nosacījumi, jālieto IX pielikumā minētās standartmetodes.

7. pants

Kolibaktēriju noteikšana

Kolibaktērijas sviestā, vājpiena pulverī, kazeīnā un kazeinātos nosaka saskaņā ar X pielikumā izklāstīto standartmetodi.

8. pants

Laktozes satura noteikšana

Laktozes saturu produktos, kas atbilst KN kodam 2309, nosaka saskaņā ar XI pielikumā izklāstīto standartmetodi.

9. pants

Siera sūkalu noteikšana

1. Siera sūkalas vājpiena pulverī, ko paredzēts uzglabāt valsts rezervēs, nosaka saskaņā ar XII pielikumā izklāstīto standartmetodi.

2. Siera sūkalas vājpiena pulverī un maisījumos, kas paredzēti izmantošanai lopbarībā, nosaka saskaņā ar XII pielikumā izklāstīto standartmetodi. Ja tiek konstatētas siera sūkalas, jāīsteno XIII pielikuma noteikumi.

10. pants

Paniņu noteikšana

Paniņas vājpiena pulverī nosaka saskaņā ar XIV pielikumā izklāstīto standartmetodi.

11. pants

Antibiotiku atlieku noteikšana

Antibiotiku atliekas vājpiena pulverī nosaka saskaņā ar XV pielikumā izklāstīto standartmetodi.

▼B

12. pants

Vājpiena pulvera satura noteikšana

Vājpiena pulvera saturu kombinētajā lopbarībā nosaka saskaņā ar XVI pielikumā izklāstīto standartmetodi.

13. pants

Cietes noteikšana

Cieti vājpiena pulverī, denaturētā piena pulverī un kombinētajā lopbarībā nosaka saskaņā ar XVII pielikumā izklāstīto standartmetodi.

14. pants

Mitruma satura noteikšana sausajā krējumā

Mitruma saturu sausajā krējumā nosaka saskaņā ar XVIII pielikumā izklāstīto standartmetodi.

15. pants

Mitruma noteikšana sauso skābo paniņu pulverī

Mitruma saturu sauso skābo paniņu pulverī, kas paredzēts izmantošani lopbarībā, nosaka saskaņā ar XIX pielikumā izklāstīto standartmetodi.

16. pants

Piena tauku tīrības noteikšana

Piena tauku tīrību nosaka saskaņā ar XX pielikumā izklāstīto standartmetodi.

III NODAĻA

VISPĀRĪGIE UN NOBEIGUMA NOTEIKUMI

17. pants

Kvalitātes nodrošināšana

Analīzes jāveic laboratorijās, kurās ir ieviesta analīžu kvalitātes nodrošināšanas sistēma, tostarp iekšējās kvalitātes kontroles procedūras. Neakreditētās laboratorijas vismaz reizi gadā piedalās kompetences izvērtēšanas pārbaudās, un tajās gūto rezultātu novirzes no saskaņotajām vērtībām nav lielākas par $2\sigma_R$ (standartmetodes reproducējamības standartnovirze). Laboratorijā informācijai ir pieejams sīks izmantoto sistēmu apraksts.

Obligātās kompetences pārbaudes nav jāveic laboratorijām, kas ir akreditētas saskaņā ar standartiem, kas minēti 12. pantā Eiropas Padomes un Parlamenta 2004. gada 29. aprīļa Regulā (EK) Nr. 882/2004 par oficiālo

▼B

kontroli, ko veic, lai nodrošinātu atbilstības pārbaudi saistībā ar dzīvnieku barības un pārtikas aprites tiesību aktiem un dzīvnieku veselības un dzīvnieku labturības noteikumiem ([1]).

18. pants

Paraugu ņemšana un strīdi par analīžu rezultātiem

1. Paraugi tiek ņemti atbilstīgi attiecīgajam produktam piemērojamajam normatīvajam regulējumam. Ja šāda regulējuma nav, tiek piemēroti *ISO 707 IDF 50* ietvertie nosacījumi "Piens un piena produkti – paraugu ņemšanas vadlīnijas".

2. Laboratorijas ziņojumos par analīžu rezultātiem jāiekļauj pietiekama informācija par rezultātu novērtējumu, kas jāveic saskaņā ar II un XXI pielikumu.

3. Lai veiktu analīzes, kas paredzētas Kopienas noteikumos, jāņem dubultparaugi.

4. Procedūru, kas aprakstīta XXI pielikumā, izmanto gadījumos, kad attiecīgais tirgus dalībnieks nepiekrīt analīžu rezultātiem.

5. Ja piecu darba dienu laikā pēc paraugu ņemšanas ražotājs var pierādīt, ka paraugu ņemšana nav veikta pareizi, tad, ja vien iespējams, paraugu ņemšana jāatkārto. Ja paraugu ņemšanu nevar atkārtot, tad preču partija jāpieņem.

▼M1

19.a pants

Paziņojumi

Regulas 2. pantā, 4. panta 1. punktā un III pielikuma C daļā paredzētos paziņojumus sniedz saskaņā ar Komisijas Regulu (EK) Nr. 792/2009 ([2]).

▼B

20. pants

Atcelšana

Regula (EK) Nr. 213/2001 ir atcelta.

Atsauces uz atcelto regulu uzskata par atsaucēm uz šo regulu, un tās lasa saskaņā ar XXII pielikumā iekļauto atbilstības tabulu.

21. pants

Stāšanās spēkā

Šī regula stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

To piemēro no 2008. gada 31. marta.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

([1]) OV L 165, 30.4.2004., 1. lpp.
([2]) OV L 228, 1.9.2009., 3. lpp.

▼B

I PIELIKUMS

(1. pants)

STANDARTMETOŽU SARAKSTS

Rādītājs Min. = minimums, Maks. = maksimums, Pielikums = citētās regulas pielikums, BS = beztauku sausna, PS = peroksīda skaitlis, I = izskats, G = garša, K = konsistence, KBS = kopējais baktēriju skaits, TBS = termofilo baktēriju skaits, DS = dalībvalsts, SPF = Starptautiskā Piensaimnieku federācija, *ISO* = Starptautiskā Standartizācijas organizācija, *IUPAC* = Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība, *ADPI* = Amerikas Piena produktu institūts, IPC = iebiezināts piens ar cukuru, PKP = piena vai krējuma pulveris.

A DAĻA

Komisijas regula	Produkts	Rādītājs	Robežvērtība [1]	Standartmetode	Piezīme
Regula (EK) Nr. 2771/1999 – valsts rezerve	Nesālīts sviests	Tauki	Min. 82 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194:2003	
		Ūdens	Līdz 16 % m/m	ISO 3727–1: 2001IDF 80–1:2001	
		BS	Līdz 2 % m/m	ISO 3727–2: 2001IDF 80–2:2001	
		Tauku skābums	1,2 mmol/100 g tauku	ISO 1740: 2004IDF 6:2004	
		PS (maks.)	0,3 mekv. skābekļa/ 1 000 g tauku	ISO 3976: 2006IDF 74:2006	1. piezīme
		Kolibaktērijas	1 g nav konstatējamas	X pielikums	3. piezīme
		Tauki, kas nav piena tauki	Triglicerīdu analīzē nav nosakāmi	XX pielikums	
		Sterīna marķieri	Nav nosakāmi, beta-sterīns ≤ 40 mg/kg	VIII pielikums	
		Citi marķieri			
		— vanilīns	Nav konstatējams	VI pielikums	
		— karotīnskābes etilesteris	≤ 6 mg/kg	VII pielikums	
		— enantskābes triglicerīdi	Nav konstatējami	V pielikums	
		Organoleptiskās īpašības	Attiecībā uz I, G un K vismaz 4 punkti no 5	IV pielikums	
		Ūdens dispersija	Vismaz 4 punkti	ISO 7586:1985IDF 112A:1989	
Regula (EK) 2771/1999 – privāta uzglabāšana	Nesālīts sviests	Tauki	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ūdens	Līdz 16 % m/m	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	

▼B

Komisijas regula	Produkts	Rādītājs	Robežvērtība (1)	Standartmetode	Piezīme
		BS	Līdz 2 % m/m	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
Regula (EK) 2771/1999 – privāta uzglabāšana	Sālīts sviests	Tauki	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ūdens	Līdz 16 % m/m	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		BS (bez sāls)	Līdz 2 % m/m	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Sāls	Līdz 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
Regula (EK) Nr. 1898/2005, II nodaļa	Nesālīts sviests	Tauki	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Tauki, kas nav piena tauki		XX pielikums	
		Ūdens	Līdz 16 % m/m	ISO 3727–1 2001IDF 80–1:2001	
		BS	Līdz 2 % m/m	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Marķieri:			
		— sterīni	Skatīt VIII pielikumu	VIII pielikums	
		— vanilīns	Skatīt VI pielikumu	VI pielikums	
		— karotīnskābes etilesteris	Skatīt VII pielikumu	VII pielikums	
		— enantskābes triglicerīdi	Skatīt V pielikumu	V pielikums	
Regula (EK) Nr. 1898/2005, II nodaļa	Sālīts sviests	Tauki	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Tauki, kas nav piena tauki		XX pielikums	
		Ūdens	Līdz 16 % m/m	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		BS (bez sāls)	Līdz 2 % m/m	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Sāls	Līdz 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Marķieri:			
		— sterīni	Skatīt VIII pielikumu	VIII pielikums	
		— vanilīns	Skatīt VI pielikumu	VI pielikums	
		— karotīnskābes etilesteris	Skatīt VII pielikumu	VII pielikums	
		— enantskābes triglicerīdi	Skatīt V pielikumu	V pielikums	
Regula (EK) Nr. 1898/2005, II nodaļa	Koncentrēts sviests	Tauki	Min. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	

▼B

Komisijas regula	Produkts	Rādītājs	Robežvērtība (1)	Standartmetode	Piezīme
		Ūdens un BS	Līdz 0,2 % m/m	ISO 5536:2002IDF 23:2002 (mitrums) IDF 24:1964 (SNF)	
		Tauku skābums	1,2 mmol/100 g tauku	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PS (maks.)	0,5 mekv. skābekļa/ 1 000 g tauku	ISO 3976:2006IDF 74:2006	1. piezīme
		Tauki, kas nav piena tauki	Nav	XX pielikums	
		Garša	Tīra		
		Smarža	Nav svešu smaržu		
		Citi	Nav neitralizācijas līdzekļu, antioksidantu un konservantu		
		Marķieri:			
		— sterīni	Skatīt VIII pielikumu	VIII pielikums	
		— vanilīns	Skatīt VI pielikumu	VI pielikums	
		— karotīnskābes etilesteris	Skatīt VII pielikumu	VII pielikums	
		— enantskābes triglicerīdi	Skatīt V pielikumu	V pielikums	
Regula (EK) Nr. 1898/2005, II nodaļa	Krējums	Tauki	Vismaz 35 % m/m	ISO 2450:1999IDF 16 C:1987	
		Tauki, kas nav piena tauki		XX pielikums	
		Marķieri:			
		— sterīni	Skatīt VIII pielikumu		2. piezīme
		— vanilīns	Skatīt VI pielikumu	VI pielikums	
		— karotīnskābes etilesteris	Skatīt VII pielikumu		2. piezīme
		— enantskābes triglicerīdi	Skatīt V pielikumu	V pielikums	
Regula (EK) Nr. 1898/2005, III nodaļa	Koncentrēts sviests	Tauki	Min. 96 % m/m		2. piezīme
		Tauki, kas nav piena tauki		XX pielikums	
		BS	Līdz 2 % m/m		2. piezīme

▼B

Komisijas regula	Produkts	Rādītājs	Robežvērtība [1]	Standartmetode	Piezīme
		Marķieri:			
		— stigmasterīns (95 % m/m)	15g/100 kg koncentrēta sviesta	VIII pielikums	
		— stigmasterīns (85 % m/m)	17g/100 kg koncentrēta sviesta	VIII pielikums	
		— enantskābes triglicerīdi	10,34 kg/t koncentrēta sviesta	V pielikums	
		— sviestskābes etilesteris un stigmasterīns		— sviestskābes etilesteris — stigmasterīns: VIII pielikums	2. piezīme
		— sviestskābes etilesteris un enantskābes triglicerīdi		— sviestskābes etilesteris — enantskābes triglicerīdi:V pielikums	2. piezīme
		lecitīns (E 322)	Līdz 0,5 % m/m		2. piezīme
		NaC1	Līdz 0,75 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Tauku skābums	1,2 mmol/100 g tauku	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PS (maks.)	Līdz 0,5 mekv. skābekļa/ 1 000 g tauku	ISO 3976:2006IDF 74:2006	1. piezīme
		Garša	Tīra		
		Smarža	Nav svešu smaržu		
		Citi	Nav neitralizācijas līdzekļu, antioksidantu un konservantu		
Regula (EK) Nr. 1898/2005, IV nodaļa	Nesālīts sviests	Tauki	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ūdens	Līdz 16 % m/m	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		BS	Līdz 2 % m/m	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
Regula (EK) Nr. 1898/2005, IV nodaļa	Sālīts sviests	Tauki	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ūdens	Līdz 16 % m/m	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		BS (bez sāls)	Līdz 2 % m/m	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Sāls	Līdz 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	

▼B

Komisijas regula	Produkts	Rādītājs	Robežvērtība (1)	Standartmetode	Piezīme
Regulas (EK) Nr. 1255/1999 9. pants un II sadaļa	Aitas un/vai kazas piena siers	Govs piens	<1 % (m/m)	IX pielikums	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	I pielikums – skābais kazeīns	Ūdens	Līdz 12,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tauki	Līdz 1,75 % m/m	ISO 5543:2004IDF127:2004	
		Brīvās skābes saturs	Līdz 0,30 ml 0,1N NaOH šķīduma/g	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	I pielikums – himozīna kazeīns	Ūdens	Līdz 12,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tauki	Līdz 1,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Pelni	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978IDF 90:1979	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	I pielikums – kazeināti	Ūdens	Līdz 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Piena proteīns	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Tauki un pelni	Līdz 6,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Saistīti pelni		ISO 5544:1978IDF 89:1979	
		Pelni		ISO 5545:1978IDF 90:1979	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	II pielikums – skābais kazeīns	Ūdens	Līdz 10,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tauki	Līdz 1,50 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Brīvās skābes saturs	Līdz 0,20 ml 0,1N NaOH šķīduma/g	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
		KBS (maks.)	30 000/g	ISO 4833:2003	3. piezīme
		Kolibaktērijas	0,1 g nav	X pielikums	3. piezīme
		TBS (maks.)	5 000/g	ISO 4833:2003	3. un 4. piezīme
Regula (EEK) Nr. 2921/90	II pielikums – himozīna kazeīns	Ūdens	Līdz 8,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tauki	Līdz 1,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Pelni	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		KBS (maks.)	30 000/g	ISO 4833:2003	3. piezīme
		Kolibaktērijas	0,1 g nav	X pielikums	3. piezīme
		TBS (maks.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	3. un 4. piezīme

▼B

Komisijas regula	Produkts	Rādītājs	Robežvērtība [1]	Standartmetode	Piezīme
Regula (EEK) Nr. 2921/90	II pielikums – kazeināti	Ūdens	Līdz 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Piena proteīns	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Tauki un pelni	Līdz 6,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004 ISO 5544:1978IDF 89:1979 vai ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		KBS (maks.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	3. piezīme
		Kolibaktērijas	0,1 g nav	X pielikums	3. piezīme
		TBS (maks.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	3. un 4. piezīme
Regula (EEK) Nr. 2921/90	III pielikums – kazeināti	Ūdens	Līdz 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Piena proteīns	Min. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Tauki	Līdz 1,50 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Laktoze	Līdz 1,00 % m/m	ISO 5548:2004IDF 106:2004	
		Pelni	Līdz 6,50 % m/m	ISO 5544:1978IDF 89:1979 vai ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		KBS (maks.)	30 000/g	ISO 4833:2003	3. piezīme
		Kolibaktērijas	0,1 g nav	X pielikums	3. piezīme
		TBS (maks.)	5 000/g	ISO 4833:2003	3. un 4. piezīme
Regula (EK) Nr. 2799/1999	Kombinētā lopbarība un vājpiena pulveris (VP) (lietošanai lopbarībā)	Ūdens (sauso skābo paniņu pulveris)	Līdz 5 % m/m	XIX pielikums	
		Proteīns	31,4 % m/m (min.) beztauku sausnas	ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
		Ūdens (VP)	Līdz 5 % m/m	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Tauki (VP)	Līdz 11 % m/m	ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
		Siera sūkalu pulveris (VP)	Nav	XIII pielikums	6. piezīme
		Ciete (VP)	Nav	XVII pielikums	
		Ūdens (maisījumi)	Līdz 5 % m/m no beztauku sausnas	ISO 5537:2004IDF 26:2004	

▼B

Komisijas regula	Produkts	Rādītājs	Robežvērtība (1)	Standartmetode	Piezīme
		Tauki (maisījumi)		Komisijas Direktīva 84/4/EEK (OV L 15, 18.1.1984., 29. lpp.)	
		Siera fermenta sūkalas (maisījumi)	Nav	XIII pielikums	
		VP saturs (galaproduktā)	Min. 50 % m/m	XVI pielikums	
		Tauki (galaproduktā)	Min. 2,5 % m/m vai 5 % m/m	Komisijas Direktīva 84/4/EEK (OV L 15, 18.1.1984., 29. lpp.)	7. piezīme
		Ciete (galaproduktā)	Min. 2 % m/m	XVII pielikums	8. piezīme
		Varš (galaproduktā)	25 ppm	Komisijas Direktīva 78/633/EEK (OV L 206, 26.7.1987., 43. lpp.)	
Regula (EK) Nr. 214/2001	VP (aerosols)	Tauki	Līdz 1,0 % m/m	ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
		Proteīns	31,4 % (2)m/m (min.) no sausnas, kas nav tauki	ISO 8968–1/2:2001IDF 20–1/2:2001	
		Ūdens	Līdz 3,5 % m/m	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Skābums	Līdz 19,5 ml 0,1N NaOH, 10 g beztauku sausnas	ISO 6091:1980IDF 86:1981	
		Laktāti	Līdz 150 mg/100 g beztauku sausnas	ISO 8069:2005IDF 69:2005	
		Fosfatāze	Negatīva	ISO 11816–1:2006IDF 155–1:2006	
		Nešķīdības rādītājs	Līdz 0,5 ml 24 °C temperatūrā	ISO 8156:2005IDF 129:2005	
		Dedzinātas daļiņas	A vai B disks (15,0 mg)	*ADPI* (1990)	
		KBS	40 000/g	ISO 4833:2003	3. piezīme
		Kolibaktērijas	Negatīvs/0,1 g	X pielikums	3. piezīme
		Paniņas	Negatīva	XIV pielikums	
		Siera fermenta sūkalas	Negatīva	XII pielikums	
		Skābās sūkalas	Negatīva		2. piezīme
		Antibakteriālie līdzekļi		XV pielikums	

(1) Neskarot konkrētās regulas prasības.
(2) No 2009. gada 1. septembra minimālajam proteīna saturam būtu jābūt 34 %.

▼B

B DAĻA

B daļas saraksta standartmetodes var izmantot to produktu analizēšanā, uz kuriem attiecas kāda no 1. slejā minētajām regulām.

Komisijas regula	Produkts	KN kods	Rādītājs	Robežvērtība	Standartmetode	Piezīme
Regula (EEK) Nr. 2658/87 Regula (EK) Nr. 2535/2001 Regula (EK) Nr. 1282/2006	Piens un krējums, neiebiezināts un bez cukura vai cita saldinātāja piedevas	0401	Tauki (≤ 6 % m/m)	Robežvērtības norādītas konkrētā produkta KN koda aprakstā, attiecīgos gadījumos papildus precizētas Komisijas Regulas (EEK) Nr. 3846/87 (OV L 366, 24.12.1987., 1. lpp.) eksporta preču nomenklatūras 9. daļā vai Regulā (EK) Nr. 2535/2001 (OV L 341, 22.12.2001., 29. lpp.)	ISO 1211:2001IDF 1D:1996	
			Tauki (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999IDF 16C:1987	
	Piens un krējums, iebiezināts vai ar cukuru vai cita saldinātāja piedevu	0402	Tauki (šķidri)		ISO 1737:1999IDF 13C:1987	
			Tauki (cieti)		ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
			Proteīns		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Saharoze (normāls saturs)		ISO 2911:2004 IDF 35:2004	
			Saharoze (samazināts saturs)			2. piezīme
			Cietvielas (IPC)		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	
			Cietvielas (PKP)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
			Ūdens (piena pulveris)		ISO 5537:2004/IDF 26:2004	
			Ūdens (krējuma pulveris)		XVIII pielikums	

▼B

Komisijas regula	Produkts	KN kods	Rādītājs	Robežvērtība	Standartmetode	Piezīme
	Paniņas, fermentēts piens vai piens ar paaugstinātu skābumu un krējums, iebiezināts vai neiebiezināts, ar cukura vai citu saldinātāju piedevu	0403	Tauki		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	
			Proteīns		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Saharoze (normāls saturs)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Saharoze (samazināts saturs)			2. piezīme
			Ūdens (skābo paniņu pulveris)		XIX pielikums	
			Ūdens (saldo paniņu pulveris)		ISO 5537:2004IDF26:2004	
			Cietvielas (citi produkti)		Kompetentas iestādes apstiprinātas metodes	
	Sūkalas, arī iebiezinātas un ar cukura vai cita saldinātāja piedevu; produkti, kas satur dabiskās piena sastāvdaļas,	0404	Tauki		ISO 1736:2000IDF 9C:1987 ISO 2450:1999IDF 16C:1987 ISO 7208:1999IDF 22B:1987	
			Proteīns		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Saharoze (normāls saturs)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Saharoze (samazināts saturs)			2. piezīme
		0404 90	Proteīns		ISO 8968 1/2 2001IDF 20–1/2:2001	
			Ūdens		IDF 21B:1987	
			Cietvielas		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	

▼B

Komisijas regula	Produkts	KN kods	Rādītājs	Robežvērtība	Standartmetode	Piezīme
			(Iebiezināti produkti)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
	Sviests un citi piena tauki; piena tauku pastas	0405	Tauki (ja ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Sviests	Ūdens		ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
			BS		ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
			NaCl		ISO 15648:2004IDF 179:2004	
			Tauki (ja > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	Sviesta eļļa		Ūdens (ja tauki < 99 % (m/m)		ISO 5536:2002IDF 23:2002	
	Siers un biezpiens	0406	Tauki		ISO 1735:2004IDF 5:2004	
			Cietvielas		ISO 5534:2004IDF 4:2004	
			Cietvielas (*Ricotta* siers)		ISO 2920:2004IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006IDF 88:2006	
			Laktoze		ISO 5765–1/2:2002IDF 79–1/2:2002	
Regula (EEK) Nr. 2658/87	Kombinētā lopbarība	2309	Laktoze		XI pielikums	

Piezīmes par Eiropas Savienības standartmetožu sarakstu

1. piezīme. Piena tauku izdalīšana saskaņā ar ISO 1740:1991 aprakstu (aizsardzība pret gaismu).
2. piezīme. Standartmetode nav noteikta. Kompetentas iestādes apstiprinātas metodes.
3. piezīme. Paraugs jāsagatavo atbilstīgi ISO 8261:2001IDF 122:2001.
4. piezīme. Inkubēšana 48 stundas 55 °C temperatūrā, jārūpējas, lai barotne neizžūst.
5. piezīme. % m/m BS = % m/m cietvielas – % m/m tauki.
6. piezīme. Komisijas Direktīva 84/4/EEK.
7. piezīme. Komisijas Regula (EK) Nr. 2799/1999 (OV L 340, 31.12.1999., 3.–27. lpp.).
8. piezīme. Komisijas Direktīva 78/633/EEK.

▼B

II PIELIKUMS

(3. pants)

PREČU PARTIJAS ATBILSTĪBAS NOVĒRTĒJUMS ATTIECĪBĀ UZ NORMATĪVAJĀM ROBEŽVĒRTĪBĀM

1. PRINCIPS

Ja tiesību aktos ir noteiktas sīki izstrādātas paraugu ņemšanas procedūras, šīs procedūras ir jāievēro. Visaos pārējos gadījumos jāņem paraugs no vismaz 3 izlases kārtā izraudzītām vienībām no preču sūtījuma, kas iesniegts pārbaudei. Var sagatavot apvienotu paraugu. Iegūto rezultātu salīdzina ar normatīvajām robežvērtībām, aprēķinot 95 % ticamības intervālu kā divkāršu standartnovirzi, attiecīgā standartnovirze ir atkarīga no tā, vai (1) metode ir apstiprināta, starptautiski sadarbojoties, ar σr un σ_R vērtībām, vai (2) iekšējas novērtēšanas gadījumā tiek aprēķināta iekšējā reproducējamība. Šis ticamības intervāls tad būs vienāds ar rezultāta mērījumu nenoteiktību.

2. METODE IR APSTIPRINĀTA, STARPTAUTISKI SADARBOJOTIES

Šajā gadījumā atkārtojamības standartnovirze σr un reproducējamības standartnovirze σ_R ir noteikta, un laboratorija var apliecināt apstiprinātās metodes atbilstību izpildes raksturlielumiem.

Jāaprēķina *n* reizes atkārtota mērījuma aritmētiskais vidējais $\bar{x}$.

Jāaprēķina $\bar{x}$ izvērstā nenoteiktība ($k = 2$) pēc formulas

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

Ja mērījuma galarezultāts *x* tiek aprēķināts pēc formulas $x = y_1 + y_2$, *x* = $y_1 - y_2$, $x = y_1$. y_2 vai $x = y_1 / y_2$, šajos gadījumos jāveic parastā standartnoviržu apvienošanas procedūra.

Uzskata, ka preču partija neatbilst augšējai normatīvajai robežvērtībai *UL*, ja

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

pretējā gadījumā uzskata, ka tā atbilst *UL*.

Uzskata, ka preču partija neatbilst apakšējai normatīvajai robežvērtībai *LL*, ja

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

pretējā gadījumā uzskata, ka tā atbilst *LL*.

3. IEKŠĒJĀ APSTRIPRINĀŠANA, APRĒĶINOT IEKŠĒJĀS REPRODUCĒJAMĪBAS STANDARTNOVIRZI

Ja tiek izmantotas šajā regulā nenosauktas metodes un nav noteikti precizitātes lielumi, jāveic iekšējā apstiprināšana. Izvērstās nenoteiktības *U* aprēķināšanai formulā jālieto iekšējās atkārtojamības standartnovirze s_{ir} un iekšējās reproducējamības standartnovirze σ_R attiecīgi σ_r un σ_R vietā.

Lēmumu pieņemšanas noteikumi ir izklāstīti 1. punktā. Tomēr, ja preču partija ir novērtēta kā neatbilstoša normatīvajām robežvērtībām, mērījumi jāatkārto ar šajā regulā nosaukto metodi, un jāpieņem lēmums atbilstīgi 1. punktam.

▼B

III PIELIKUMS

(4. pants)

VĒRTĒTĀJU NOVĒRTĒŠANA UN SENSORISKO ANALĪŽU REZULTĀTU TICAMĪBA

Ja izmanto punktu piešķiršanas metodes (IDF standarts 99C:1997), izmantojamas šādas procedūras.

A. "ATKĀRTOJAMĪBAS INDEKSA" NOTEIKŠANA

Vērtētājs 12 mēnešu laikā analizē vismaz desmit paraugus kā neatpazīstamus dubultparaugus. Parasti tas notiks dažādos laikposmos. Atsevišķu produkta īpašību rezultātus novērtē, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

w_1: atkārtojamības indekss;

x_{i1}: punktu skaits x_i parauga pirmajā novērtēšanā;

x_{i2}: punktu skaits x_i parauga otrajā novērtēšanā;

n: paraugu skaits.

Vērtējamiem paraugiem jāpārstāv plašs kvalitātes diapazons. w_I nedrīkst pārsniegt 1,5 (5 punktu skalā).

B. "NOVIRZES INDEKSA" NOTEIKŠANA

Minētais indekss jāizmanto, lai pārbaudītu, vai vērtētājs vērtēšanai izmanto to pašu skalu, ko pieredzējusi vērtētāju grupa. Vērtētāja iegūtos punktus salīdzina ar vidējo punktu skaitu, ko ieguvusi vērtētāju grupa.

Lai novērtētu rezultātus, izmanto šādu formulu:

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

kur:

x_{i1}; x_{i2}: skatīt A) iedaļu;

$\overline{x}_{i1}$; $\overline{x}_{i2}$: vidējais vērtētāju grupas noteiktais punktu skaits attiecīgi x_i parauga pirmajā un otrajā novērtēšanā;

n: paraugu skaits (vismaz desmit 12 mēnešos).

Vērtējamajiem paraugiem jāatspoguļo plašs kvalitātes diapazons. D_I nedrīkst pārsniegt 1,5 (5 punktu skalā).

Dalībvalstīm jāpaziņo par visām grūtībām, kas radušās, izmantojot šo procedūru.

Ja konstatē, ka atsevišķa vērtētāja uzrādītās novirzes vai atkārtojamības indeksi pārsniedz 1,5 punktu robežu, oficiālās iestādes ekspertam vai ekspertiem jāveic viena vai vairākas paraugu izlases veida "atkārtotas" pārbaudes, ko šie vērtētāji turpmākajās nedēļās klasificē, vai arī viņi veic vienu vai vairākas pārbaudes ar ekspertu līdzdalību. Lai izlemtu, vai turpināt šī pakalpojuma sniegšanu, jāveic rūpīga novērošana. Rādījumi jādokumentē un jāsaglabā kā pierādījumi turpmākajām darbībām.

▼B

C. DAŽĀDOS DALĪBVALSTS REĢIONOS UN DAŽĀDĀS DALĪBVALSTĪS IEGŪTO REZULTĀTU SALĪDZINĀŠANA

Ja iespējams, tests jāorganizē vismaz reizi gadā, lai salīdzinātu rezultātus, ko vērtētāji ieguvuši dažādos reģionos. Ja novērotas ievērojamas atšķirības, jāveic vajadzīgie pasākumi, lai noteiktu atšķirību iemeslus un iegūtu salīdzināmus rezultātus.

Dalībvalstis var organizēt testus, lai salīdzinātu rezultātus, ko ieguvuši šīs dalībvalsts vērtētāji un vērtētāji no kaimiņu dalībvalsts. Ja konstatētas ievērojamas atšķirības, jāveic padziļināta izpēte, lai iegūtu salīdzināmus rezultātus.

Dalībvalstis šādas salīdzināšanas rezultātus paziņo Komisijai.

▼B

IV PIELIKUMS

(4. pants)

SVIESTA ORGANOLEPTISKĀ VĒRTĒŠANA

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Sviesta organoleptiskās vērtēšanas procedūras mērķis ir nodrošināt vienotu metodiku, ko piemēro visās dalībvalstīs.

Plašāku informāciju par organoleptisko vērtēšanu lasiet konkrētā IDF starptautiskā piena un piena produktu standarta IDF 99 1., 2., 3. daļā.

2. DEFINĪCIJAS

Organoleptiskā vērtēšana (novērtēšana) nozīmē produkta īpašību pārbaudi ar maņu orgāniem.

Vērtētāju grupa nozīmē izraudzītu vērtētāju grupu, kas novērtēšanas laikā strādā, savstarpēji nesazinoties un savstarpēji neietekmējoties.

Vērtētājs ir persona, kas izraudzīta tās spēju dēļ veikt organoleptisko testu. Šī veida vērtētājam var būt ierobežota pieredze.

Vērtētājs eksperts ir persona ar augstu maņu orgānu jutību un pieredzi organoleptiskās vērtēšanas metodēs, kura spēj veikt dažādu produktu sistemātisku un ticamu organoleptisko novērtēšanu. Šī veida vērtētājam jābūt ar labu ilglaicīgu maņu atmiņu.

Punktu piešķiršana nozīmē organoleptisko vērtēšanu, ko veic vērtētāju grupa, izmantojot skaitļu skalu. Jāizmanto kļūdu nomenklatūra.

Klasifikācija nozīmē klasificēšanu pēc kvalitātes, ko veic, pamatojoties uz piešķirtajiem punktiem.

Kontroles dokumenti: dokumenti, kas izmantoti, lai pierakstītu individuāli piešķirtos punktus par katru īpašību un produkta galīgo šķiru. (Šo dokumentu var izmantot arī ķīmiskā sastāva pierakstīšanai.)

3. VĒRTĒŠANAS TELPA

Sīku informāciju lasiet standarta ISO 8589 un ISO/DIS 22935–2 IDF 99–2 7. punktā.

Lai vērtētājus vērtēšanas telpā neietekmētu ārējie faktori, jāveic piesardzības pasākumi.

Vērtēšanas telpai jābūt bez svešas izcelsmes smaržām un viegli tīrāmai. Sienām jābūt gaišā krāsā un gaismu neatstarojošām.

Vērtēšanas telpai un apgaismojumam tajā jābūt tādam, lai neietekmētu vērtējamā produkta īpašības.

Lai uzturētu konstantu sviesta temperatūru, telpa jāaprīko ar atbilstošu termoregulatoru. Klasifikācijas laikā sviesta temperatūrai jābūt 12 °C (±2 °C).

4. VĒRTĒTĀJU ATLASE

Vērtētājam jāpazīst sviesta izstrādājumi, un viņam jābūt kompetentam, lai veiktu organoleptisko klasifikāciju. Kompetentajai iestādei regulāri (vismaz reizi gadā) jāpārbauda viņa kompetence.

4.1. Detalizētu informāciju par vispārējiem darbinieku atlases testiem, kurus var izmantot pirms jauna vērtētāja pieņemšanas darbā, lasiet ISO/DIS 22935–1 IDF 99–1 4. punktā (darbinieku pieņemšana) un 5.1. punktā.

Svarīgi ir turpināt apmācības un regulāri rīkot vispārējas sanāksmes. Par vērtētāju grupas apmācībām lasiet standartā ISO 8586–1.

▼B

4.2. Sākotnējā apmācībā jāietver šādi priekšmeti:

— organoleptiskās vērtēšanas vispārējā teorija un praktiskā nozīmība,

— maņu orgānu sajūtu noteikšanas metodes, pakāpes un apraksts,

— sajūtu pazīmju un specifisku sajūtu attiecību konstatēšana un atpazīšana,

— sviesta ražošanas pamatapmācība,

— apstiprināti standarti un paraugi, lai palīdzētu vērtētājam identificēt konkrētu garšu un garšas intensitāti produktā.

5. PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ VĒRTĒTĀJU GRUPU

Vērtētāju grupas vērtētāju skaitam jābūt nepāra skaitlim, minimālais skaits ir trīs. Vairākumā jābūt kompetentās iestādes darbiniekiem vai pilnvarotām personām, kas nav nodarbinātas piensaimniecības nozarē.

Grupas vadītājam jābūt atbildīgam par procedūru kopumā, un viņš var piedalīties grupā.

Pirms vērtēšanas jāņem vērā virkne faktoru, lai personas optimāli veiktu tām uzticēto uzdevumu:

— personas nedrīkst būt slimas ar slimībām, kas var ietekmēt to uzdevuma veikšanu. Tādos gadījumos attiecīgais vērtētājs vērtētāju grupā jāaizstāj ar citu,

— lai veiktu novērtēšanu, personām jāierodas laikus un jāpārliecinās, ka to rīcībā ir pietiekami daudz laika vērtēšanai,

— personas nedrīkst lietot vielas, kam ir stipra smarža, piemēram, smaržas, pēcskūšanās losjonus, dezodorantus utt., un tām nevajadzētu būt ēdušām ēdienus ar stipru smaržu (piemēram, ļoti vircotus ēdienus) utt.,

— pusstundu pirms novērtēšanas personas nedrīkst smēķēt, ēst un nedrīkst neko dzert, izņemot ūdeni.

6. VĒRTĒŠANAS IZPILDE

Lai uzturētu kompetenci, visiem vērtētājiem regulāri jāpiedalās organoleptiskās vērtēšanas grupu darbā. Grupu darba biežums atkarīgs no sviesta apjoma un ražošanas intensitātes, un tam, ja iespējams, jānotiek vismaz reizi mēnesī.

Arī vecākajiem vērtētājiem katru gadu jāpiedalās noteiktā skaitā grupu darba, ja iespējams, vismaz reizi ceturksnī.

7. PARAUGU ŅEMŠANA UN PARAUGU SAGATAVOŠANA

Vēlams, lai paraugu identitāte novērtēšanas laikā netiktu atklāta, novēršot jebkādu ietekmēšanas iespējamību. Paraugi jākodē.

Tas jāizdara pirms vērtēšanas. Sviesta temperatūra transportēšanas laikā uz vērtēšanas telpu jābūt 6 °C ± 2 °C.

Ja organoleptisko vērtēšanu veic saldētavā, paraugu ņem, izmantojot sviesta taustu. Ja organoleptisko vērtēšanu neveic saldētavā, jāņem vismaz 500 g liels paraugs. Vērtēšanas laikā sviesta temperatūrai jābūt 12 °C (±2 °C) (standartā ISO/DIS 22935–2 IDF 99–2 sviesta vērtēšanas temperatūra ir 14 °C ± 2 °C). Noteikti jānovērš lielas novirzes.

8. KATRAS ĪPAŠĪBAS NOVĒRTĒŠANA

8.1. Organoleptiskā vērtēšana jāveic attiecībā uz šādām trim īpašībām: izskats, konsistence un garša.

Izskats ietver šādas pazīmes: krāsa, redzamā tīrība, fiziska piesārņojuma neesība, pelējuma neesība un ūdens dispersijas viendabīgums. Ūdens dispersiju analizē saskaņā ar IDF standartu 112A/1989.

▼B

Konsistence ietver šādas pazīmes: struktūra, tekstūra un stingrība. Ja kāda dalībvalsts to vēlas, ziežamību var pārbaudīt ar fiziskiem līdzekļiem, lai apmierinātu patērētāju prasības. Nākotnē Komisija var izlemt, vai saskaņot metodoloģiju.

Struktūra ir jēdziens, kas raksturo produkta stabilitāti patērēšanas laikā. To parasti saista ar stingrību un ziežamību, un visā produktā tai jābūt vienādai. Tā ir cieši saistīta ar tekstūru, un tā ir produkta spēja nedeformēties sava svara ietekmē. To rāda pretestība griešanas laikā, to var vērtēt ar mehāniskiem līdzekļiem, izgaršojot vai aptaustot.

Garša ir īpašība, ko uztver ar muti, galvenokārt ar mēles garšas kārpiņām.

Smarža ir īpašība, ko saož ar degunu.

Būtiska novirze no ieteicamās temperatūras neļauj ticami novērtēt konsistenci un garšu. Sevišķi svarīga ir temperatūra.

Ja temperatūra ir ārpus ieteiktā diapazona, sviesta klasifikācija jāatliek.

8.2. Katra īpašība atsevišķi organoleptiski jānovērtē. Punktu piešķiršanu veic saskaņā ar 1. tabulu.

8.3. Pirms vērtēšanas ir vēlams, lai vērtētāji kopā piešķirtu punktus par izskatu, konsistenci un garšu vienam vai vairākiem references paraugiem, lai panāktu vienādību.

8.4. Punktu skaits produkta pieņemšanai ir šāds:

Skatīt 7. daļu – "Nomenklatūra" – un punktiem piemērojamo kritēriju aprakstu, klasificējot sviestu.

	Maksimālā vērtība	Vajadzīgs
Izskats	5	4
Konsistence	5	4
Garša/smarža	5	4

— Ja nav iegūts vajadzīgais punktu skaits, jāsniedz trūkuma apraksts.

— Punktu skaits, ko katrs vērtētājs piešķīris par katru īpašību, jāieraksta kontroles dokumentā.

— Produktu pieņem vai noraida, pamatojoties uz vairākuma lēmumu.

— Gadījumiem, kad atšķirības starp individuāliem katras īpašības vērtējumiem pārsniedz blakusesošos punktus, nevajadzētu būt biežiem (ne vairāk par vienu no 20 paraugiem). Pretējā gadījumā grupas vadītājam būtu jāpārbauda vērtētāju grupas kompetence.

9. UZRAUDZĪBA

Vērtētāju grupas vadītājam, kuram jābūt oficiālam kompetentās iestādes darbiniekam un kurš var būt vērtētāju grupas loceklis, jābūt atbildīgam par visu procedūru. Viņam kontroles dokumentā jāpieraksta individuāli piešķirtie punkti par katru atsevišķu īpašību un jāapstiprina, vai produkts ir pieņemts vai noraidīts.

10. NOMENKLATŪRA

Skatīt pievienoto 2. tabulu.

11. ATSAUCES

FIL-IDF 99C:1997 Piena produktu sensoriskā novērtēšana pēc punktiem – standartmetode

ISO/DIS 22935 IDF 99 Piena un piena produktu starptautiskais standarts – sensoriskā analīze – 1.–3. daļa

▼B

ISO 8586–1 Sensoriskā analīze – Vispārējas vadlīnijas vērtētāju izvēlei, apmācībām un uzraudzībai – 1. daļa

ISO 8589 Sensoriskā analīze – Vispārējas vadlīnijas vērtēšanas telpu iekārtojumam

FIL-IDF 112A:1989 Sviests – Ūdens dispersijas skaitļa noteikšana

1. tabula

Punktu piešķiršana sviestam

Izskats			Konsistence			Garša un smarža		
Punkti	Nr. (1)	Piezīmes	Punkti (kvalitātes šķira)	Nr. (1)	Piezīmes	Punkti (kvalitātes šķira)	Nr. (1)	Piezīmes
5		*Ļoti labs* ideāls augstākā kvalitāte (vienādi sauss)	5		*Ļoti laba* ideāla augstākā kvalitāte (laba ziežamība)	5		*Ļoti laba* ideāla augstākā kvalitāte (absolūti tīra smarža)
4		*Labs* (2) nav acīmredzamu defektu	4	17 18	*Laba* (2) ciets mīksts	4		*Laba* (2) nav acīmredzamu defektu
3	1 2 3 4 5 6 7 8	*Apmierinošs (nelieli defekti)* drupans, ūdeņains neviendabīgs, divkrāsains slāņains raibs, lāsumains plankumains izdalās eļļa pārāk krāsots irdens	3	14 15 16 17 18	*Apmierinoša (nelieli defekti)* drupans, trausls, kunkuļains mīklveidīgs, eļļains, staipīgs lipīgs, ciets mīksts	3	21 22 25 27 33 34 35	*Apmierinoša (nelieli defekti)* netīra svešas izcelsmes garša skāba piedeguma piegarša, dedzināta sviesta piegarša lopbarības piegarša nepatīkama garša un smarža, rūgts pārsālīts
2	1 3 4 5 6 10 11 12	*Slikts (acīmredzami defekti)* drupans, ūdeņains slāņains raibs, lāsumains plankumains izdalās eļļa ar piemaisījumiem pelējis neizšķīdis sāls	2	14 15 16 17 18	*Slikta (acīmredzami defekti)* drupans, trausls, kunkuļains mīklveidīgs, eļļains, staipīgs lipīgs, ciets mīksts	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Slikta (acīmredzami defekti)* netīra svešas izcelsmes garša sastāvējusies skāba oksidēšanās garša, metāliska smarža un garša lopbarības piegarša nepatīkama garša un smarža, rūgts pārsālīts pelējuma, puvuma piegarša, smaka ķimikāliju piegarša
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Ļoti slikts (izteikti defekti)* drupans, ūdeņains slāņains raibs, lāsumains plankumains izdalās eļļa pārāk krāsots graudains ar piemaisījumiem pelējis neizšķīdis sāls	1	14 15 16 17 18	*Ļoti slikta (lieli defekti)* drupans, trausls, kunkuļains mīklveidīgs, eļļains, staipīgs lipīgs, ciets mīksts	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Ļoti slikta (lieli defekti)* svešas izcelsmes garša siera piegarša, pienskābā siera piegarša skāba rauga piegarša pelējuma piegarša sasmacis eļļas piegarša, zivju piegarša tauku piegarša oksidēšanās smarža, metāliska smarža un garša nepatīkama garša un smarža, rūgts pārsālīts pelējuma, puvuma piegarša, smaka iesala piegarša ķimikāliju piegarša

(1) 2. tabula.
(2) Defekti, kas apzīmēti ar "labi", ir tikai nelielas novirzes no ideālā tipa.

▼B

2. tabula

Sviesta defektu tabula

I.	Izskats
1)	irdens, ūdeņains
2)	neviendabīgs, divkrāsains
3)	slāņains
4)	raibs, lāsumains
5)	plankumains
6)	izdalās eļļa
7)	pārāk krāsots
8)	irdens
9)	graudains
10)	ar piemaisījumiem
11)	appelējis
12)	neizšķīdis sāls
II.	Konsistence
14)	drupans, trausls, kunkuļains
15)	staipīgs, mīklveidīgs, eļļains
16)	lipīgs
17)	ciets
18)	mīksts
III.	Garša un smarža
20)	bez garšas/smaržas
21)	netīrs ([1])
22)	svešas izcelsmes garša
23)	sasmacis
24)	siera piegarša, pienskābā siera piegarša
25)	skābs
26)	rauga piegarša
27)	a) piedeguma garša
	b) dedzināta sviesta piegarša
28)	pelējuma piegarša
29)	sasmacis
30)	eļļas piegarša, zivju piegarša
31)	tauku piegarša
32)	a) oksidēšanās piegarša
	b) metāliska piegarša
33)	lopbarības piegarša
34)	nepatīkama garša un smarža, rūgts
35)	pārsālīts
36)	pelējuma, puvuma piegarša
37)	iesala piegarša
38)	ķimikāliju piegarša

([1]) Šis apzīmējums jāizmanto, cik reti vien iespējams un tikai tad, ja defektu nevar aprakstīt precīzāk.

▼B

V PIELIKUMS

(5. pants)

ENANTSKĀBES TRIGLICERĪDU SATURA NOTEIKŠANA SVIESTĀ, SVIESTA EĻĻĀ UN KRĒJUMĀ AR GĀZES HROMATOGRĀFIJAS ANALĪZI

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Šī ir metode enantskābes triglicerīdu satura noteikšanai sviesta eļļā, sviestā un krējumā.

2. TERMINI UN DEFINĪCIJAS

Enantskābes saturs: enantskābes triglicerīdu saturu nosaka ar procedūru, kas izklāstīta šajā metodē.

Piezīme: Enantskābes saturu izsaka kg uz tonnu produkta sviesta eļļai un sviestam un kg uz tonnu piena tauku krējumam.

3. PRINCIPS

Atbilstīgi ISO 14156 IDF 172:2001 piena tauki tiek ekstrahēti no dažādiem produktiem. Enantskābes triglicerīdu saturu ekstrahētajos taukos kvantitatīvi nosaka ar kapilāra kolonnas gāzes hromatogrāfiju (GH). Rezultātus, kas iegūti par paraugu, novērtē, pamatojoties uz kapronskābes triglicerīdu kā iekšējo standartu.

Piezīme: Iekšējam standartam der arī tributirīns.

4. REAĢENTI

Jāizmanto tikai atzītas analītiskas kvalitātes reaģenti.

4.1. n-heksāns

4.2. Standarta kapronskābes triglicerīds ar vismaz 99 % tīrību

4.3. Standarta enantskābes triglicerīds ar vismaz 99 % tīrību

4.4. Bezūdens nātrija sulfāts (Na_2SO_4)

5. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums un jo īpaši:

5.1. Analītiskie svari ar precizitāti 1 mg

5.2. Mērkolbas, kuru tilpums ir 10 ml un 20 ml

5.3. Centrifugēšanas mēģenes, kuru tilpums ir 30 ml

5.4. Rotācijas ietvaicētājs

5.5. Termostats, kurā var uzturēt 50 ± 5 °C temperatūru

5.6. Filtrpapīrs, kam ir vidēja porainība un diametrs ap 15 cm

5.7. Gāzu hromatogrāfijas iekārta

5.7.1. Gāzu hromatogrāfs ar plūsmas dalīšanas/nedalīšanas ievades metodi vai kolonnas inžektoru un liesmas jonizācijas detektoru (LJD)

5.7.2. GH kolonna ar stacionāro fāzi, kas sekmīgi veic triglicerīda atdalīšanu (100 % dimetilpolisiloksāna vai 5 % fenil-95 %-metilpolisiloksāna). Izvēlieties stacionāro fāzi, kolonnas garumu (no 4 m līdz 15 m), iekšējo diametru (no 0,22 mm līdz 0,50 mm) un slāņa biezumu (0,12 μm vai lielāks), ņemot vērā laboratorijas pieredzi un izmantojamo inžektora sistēmu. Jebkurā gadījumā izvēlētajai kolonnai jāspēj nodrošināt gan pilnīga šķīdinātāja signāla un kapronskābes triglicerīda signāla atdalīšana, gan pamata izšķirtspēja starp kapronskābes un enantskābes triglicerīdu signāliem. Turpmāk doti piemērojamo nosacījumu piemēri.

▼B

5.7.2.1. Piemērojamo nosacījumu piemērs, izmantojot plūsmas dalījuma inžektoru:

— nesējgāze – hēlijs,

— kolonnas ieejas spiediens: 100 kPa,

— kolonna: 12 m augsta, iekšējais diametrs 0,5 mm, kolonnas silikagela slāņa biezums 0,1 μm,

— stacionārā fāze: 100 % dimetilpolisiloksāns vai 5 % fenil-95 %-dimetilpolisiloksāns (piem., HT5),

— kolonnas temperatūra: sākotnējā temperatūra 130 °C, ko uztur 1 minūti, tiek paaugstināta ar ātrumu 20 °C/min līdz 260 °C, pēc tam tiek paaugstināta ar ātrumu 30 °C/min līdz 360 °C; 360 °C temperatūru uztur 10 minūtes,

— detektora temperatūra: 370 °C,

— inžektora temperatūra: 350 °C,

— plūsmas dalījuma attiecība 1:30,

— inžektējamā parauga lielums: 1 μl.

5.7.2.2. Piemērojamo nosacījumu piemērs, izmantojot inžektoru kolonnā:

— nesējgāze: ūdeņradis (pastāvīgas plūsmas sistēma);

— kolonnas ieejas spiediens: 89 kPa;

— kolonna: 4 m augsta, iekšējais diametrs 0,32 mm, silikagela kolonnas slāņa biezums 0,25 μm;

— stacionārā fāze: 5 % fenil-95 % dimetilpolisiloksāna;

— kolonnas temperatūra: sākotnējā temperatūra 60 °C, ko uztur 2 minūtes, tiek paaugstināta ar ātrumu 35 °C/min līdz 340 °C, šo temperatūru uztur 5 min;

— detektora temperatūra: 350 °C;

— ievadāmā parauga lielums: 1 μl.

5.8. Injekcijas šļirces tilpums 5 μl.

6. PARAUGU ŅEMŠANA

Svarīgi, lai laboratorija saņemtu patiesi reprezentatīvus paraugus, kas nav bojāti vai izmainīti transportēšanas un uzglabāšanas laikā.

Paraugu ņemšana nav šajā starptautiskajā standartā noteiktās metodes sastāvdaļa. Vadlīnijas paraugu ņemšanai ir iekļautas IDF: standartā 50C:1995 vai ISO 707–1997 – "Piens un piena produkti – paraugu ņemšanas vadlīnijas".

7. PROCEDŪRA

7.1. **Testa parauga un analizējamā parauga sagatavošana**

Jārīkojas saskaņā ar ISO 14156 IDF 172:2001.

7.1.1. *Sviesta eļļa, sviests*

7.1.1.1. Izkausējiet termostatā 50 līdz 100 g testa parauga (5.5.).

7.1.1.2. Ievietojiet 0,5 līdz 1,0 g bezūdens nātrija sulfāta (5.4.) salocītā kroku filtrpapīrā.

7.1.1.3. Filtrējiet taukus caur filtrpapīru, kurā ir bezūdens nātrija sulfāts, savācot filtrātu vārglāzē, kas tiek turēta termostatā (5.5.) Dekantējot izkusušo sviestu uz filtrpapīra, jāuzmanās, lai nepārnestu serumu.

7.1.2. *Krējums*

7.1.2.1. Uzsildiet paraugu līdz 20 °C ± 2 °C temperatūrai.

7.1.2.2. Rūpīgi samaisiet paraugu.

7.1.2.3. Atšķaidiet piemērotu testa parauga daudzumu, lai iegūtu 100 ml analizējamā parauga, kurā tauku daļa ir aptuveni 4 %.

▼B

7.1.2.4. Lai ekstrahētu taukus no krējuma, jārīkojas tāpat kā ar svaigu vai homogenizētu pienu (skatīt ISO 14156 IDF 172:2001, 8.3. §).

7.1.2.5. Iesveriet 1 g ekstrahēto tauku 10 ml mērkolbā (5.2.) ar precizitāti līdz 1 mg. Pievienojiet 1 ml 7.2.2. punktā minētā šķīduma. Uzpildiet līdz 10 ml ar n-heksānu (4.1.) un homogenizējiet.

7.1.2.6. Ielejiet 1 ml 7.1.1.2. punktā minētā šķīduma 10 ml mērkolbā (5.2.) un atšķaidiet līdz 10 ml ar n-heksānu (4.1.).

7.2. **Kalibrēšanas standartu sagatavošana**

7.2.1. Izšķīdiniet 100 mg enantskābes triglicerīda (4.3.) 10 mililitros n-heksāna (4.1.).

7.2.2. Izšķīdiniet 100 mg kapronskābes triglicerīda (4.2.) 10 mililitros n-heksāna (4.1.).

7.2.3. Ievadiet 1 ml 7.2.2. punktā minētā šķīduma 10 ml mērkolbā (5.2.). Uzpildiet līdz 10 ml ar heksānu (4.1.).

7.2.4. Ievadiet 1 ml 7.2.1. punktā minētā šķīduma un 1 ml 7.2.2. punktā minētā šķīduma 10 ml mērkolbā (5.2.). Uzpildiet līdz 10 ml ar n-heksānu (4.1.).

7.2.5. Ievadiet 1 ml 7.2.4. punktā minētā šķīduma 10 ml mērkolbā (5.2.) un uzpildiet līdz 10 ml ar n-heksānu (4.1.).

7.3. **Hromatogrāfiskā noteikšana**

7.3.1. Ievadiet divas reizes 1 µl no 7.2.5. punktā minētā standarta šķīduma.

7.3.2. Ievadiet 1 µl no katra parauga šķīduma.

Piezīme: Ja kolonnas inžektora sistēma ir pielāgota, gan standarta, gan parauga šķīdumiem jālieto lielāks atšķaidījums.

7.3.3. Atkārtojiet 7.3.1. punktā minēto darbību katram trešajam paraugam, lai pirms un pēc paraugiem varētu veikt standarta ievadīšanu. Rezultātus nosaka, ņemot vērā standartu hromatogrammu signālu vidējās vērtības (signālu attiecības).

8. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

Katrai hromatogrammai jāintegrē ar enantskābes un kapronskābes triglicerīdiem saistītais signāla laukums.

Šie norādījumi jāievēro katrā paraugu sekvencē, proti, katrā tādu paraugu grupā, kur divreiz tieši pirms sekvences ievadīto standartu apzīmē ar STD_1, un standartu, kas ievadīts tieši pēc sekvences, apzīmē ar STD_2.

8.1. **Kalibrēšana**

8.1.1. Katram divkāršajam STD_1, $Rf_1(a)$ un $Rf_1(b)$ jāaprēķina signāla vērtība

Rf_1 (a) vai (b) = (signāla laukums kapronskābes triglicerīdam/signāla laukums enantskābes triglicerīdam) × 100.

Jāaprēķina signāla vidējā aritmētiskā vērtība Rf_1.

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

8.1.2. Līdzīgi jāaprēķina signāla vidējā aritmētiskā vērtība STD_2, Rf_2.

8.1.3. Jāaprēķina signāla vidējā aritmētiskā vērtība Rf.

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

8.2. **Testa paraugi**

Katra parauga hromatogrammai, kas iegūta starp STD_1 un STD_2, jāaprēķina enantskābes saturs C (kg/t):

C = (signāla laukums enantskābes triglicerīdam × Rf × 100)/(signāla laukums kapronskābes triglicerīdam × Wt × 1 000),

kur:

— Wt = ņemto tauku svars (g),

— 100 = parauga atšķaidīšanas tilpums,

— 1 000 = konversijas koeficients (no µg/g uz kg/t)

▼B

Sviesta paraugiem jāņem vērā tauku saturs un jāaprēķina koriģētā koncentrācijas vērtība $C_{sviests}$ (kg/t sviesta).

$$C_{sviests} = C_{tauki} \times F,$$

kur F ir tauku saturs sviestā.

9. PRECIZITĀTE

Sīkāka informācija par starplaboratoriju sviesta testu atbilstīgi ISO 5725–1 un ISO 5725–2 par metodes precizitāti ir izklāstīta 12. punktā.

Atkārtojamības un reproducējamības robežlielumiem ir 95 % ticamība, un tos nevar piemērot citiem koncentrāciju diapazoniem un matricēm.

9.1. **Atkārtojamība**

Absolūtā starpība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, ko ieguvis viens un tas pats operators, izmantojot vienu un to pašu metodi, identisku testa materiālu tajā pašā laboratorijā ar to pašu iekārtu neilgā laika posmā, ne vairāk kā 5 % gadījumu pārsniegs 0,35 kg/t.

9.2. **Reproducējamība**

Absolūtā starpība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, ko ieguvuši dažādi operatori, izmantojot vienu un to pašu metodi un identisku testa materiālu dažādās laboratorijās ar dažādu iekārtu, ne vairāk kā 5 % gadījumu pārsniegs 0,66 kg/t.

10. PIELAIDES ROBEŽAS: APAKŠĒJĀS ROBEŽAS (NEPIETIEKAMU DAUDZUMU GADĪJUMĀ)

10.1. **Lai pārbaudītu, vai produkts marķēts pareizi, no marķētā produkta jāņem trīs paraugi.**

10.2. **Sviests un koncentrēts sviests**

10.2.1. Vismaz 95 % tīra enantskābes triglicerīda iekļaušanas pakāpe tonnā sviesta ir 11 kg, proti, 10,45 kg/t.

10.2.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazākais rezultāts tiek salīdzināts ar šādām robežvērtībām:

— 9,51 kg/t (95 % tīras enantskābes triglicerīda minimāla 95 % iekļaušanas pakāpe, viena noteikšana),

— 6,89 kg/t (95 % tīras enantskābes triglicerīda minimāla 70 % iekļaušanas pakāpe, viena noteikšana),

— marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju, resp., starp 9,51 kg/t un 6,89 kg/t.

10.3. **Krējums**

10.3.1. Vismaz 95 % tīra enantskābes triglicerīda iekļaušanas pakāpe tonnā piena tauku ir 10 kg, proti, 9,50 kg/t marķētu piena tauku.

10.3.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultātus izmanto, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežvērtībām:

— 8,60 kg/t (95 % tīras enantskābes triglicerīda minimāla 95 % iekļaušanas pakāpe, viena noteikšana),

— 6,23 kg/t (95 % tīras enantskābes triglicerīda minimāla 70 % iekļaušanas pakāpe, viena noteikšana),

▼B

— marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju, resp., starp 8,60 kg/t un 6,23 kg/t.

11. PIELAIDES ROBEŽAS: AUGŠĒJĀS ROBEŽAS (GADĪJUMOS, KAD DAUDZUMS IR VAIRĀK NEKĀ PAR 20 % LIELĀKS)

11.1. **Lai pārbaudītu, vai produkts marķēts pareizi, no marķētā produkta jāņem trīs paraugi.**

11.2. **Sviests un koncentrēts sviests**

11.2.1. Produkta trīs paraugu analīzes rezultātus izmanto, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un šo rezultātu vidējo lielumu salīdzina ar šādām robežvērtībām:

— augšējā robežvērtība ir 12,96 kg/t.

11.3. **Krējums**

11.3.1. Produkta trīs paraugu analīzes rezultātus izmanto, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un šo rezultātu vidējo lielumu salīdzina ar šādām robežvērtībām:

— augšējā robežvērtība ir 11,82 kg/t.

12. PAPILDU INFORMĀCIJA: REZULTĀTU STATISTISKĀ ANALĪZE, NOSAKOT TRIENANTOĀTUS SVIESTA TAUKOS, IZMANTOJOT TRIGLICERĪDU ANALĪZI.

Trienantoātu satura noteikšanai marķētā sviestā ir veikti četri kopdarbības pētījumi.

Pirmās kārtas testā piedalījās deviņas laboratorijas, kurām nedeva instrukcijas par izmantojamajām analītiskajām metodēm.

Otrās kārtas testā piedalījās desmit laboratorijas, kas izmantoja 4 dažādas metodes:

— metilheptanoāta kvantitatīva noteikšana, par iekšējo standartu izmantojot n-nonānu vai metilnonanoātu,

— trienantoāta kvantitatīva noteikšana, par iekšējo standartu izmantojot trikaproātu,

— metilheptanoāta kvantitatīva noteikšana, izmantojot kalibrācijas paraugu vai maisījumu,

— metilheptanoāta kvantitatīva noteikšana, izmantojot kalibrācijas maisījumu.

Turklāt analizējot TSME (taukskābju metilesterus), izmantoja divas dažādas metilēšanas procedūras (*De Francesco* un *Christopherson & Glass*).

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem, 3. testa kārtai tika izraudzītas divas metodes:

— metilheptanoāta kvantitatīva noteikšana, par iekšējo standartu izmantojot n-nonānu vai metilnonanoātu,

— trienantoāta kvantitatīva noteikšana, par iekšējo standartu izmantojot trikaproātu.

Septiņu laboratoriju rezultāti liecināja, ka TSME metode dod lielāku dažādību, tādēļ triglicerīdu noteikšanai nolēma izmantot vienīgi trienantoātu, veicot trienantoāta q kvantitatīvās noteikšanas procedūru, par iekšējo standartu izmantojot trikaproātu. Turklāt triglicerīdu analīze bija jāveic kapilāra kolonnā.

Ceturtās kārtas testā izplatīja četrus paraugus (A, B, C, D), un rezultātus sniedza deviņas laboratorijas (1.–2. tabula).

▼B

Divas laboratorijas (DE un UE) analizēja paraugus, izmantojot TSME metodi.

Tā kā piedalījās neliels skaits laboratoriju, statistisko aprēķinu veica gan pilnam datu komplektam (1.–2. tabula), ietverot TSME rezultātus, gan datiem, kas iegūti ar TG (termogravimetrijas) analīzi.

Testi galēju vērtību noteikšanai:

— paraugs A. *Dixon, Cochran* un *Grubbs* testi 1 un 5 % līmenī uzrādīja vienai laboratorijai galējus rezultātus,

— paraugs B. *Grubbs* tests 5 % līmenī uzrādīja vienai laboratorijai galējus rezultātus,

— paraugs C. *Dixon* un *Grubbs* testi 1 un 5 % līmenī uzrādīja vienai laboratorijai galējus rezultātus,

— paraugs D. *Dixon* un *Grubbs* testi 1 un 5 % līmenī uzrādīja vienai laboratorijai galējus rezultātus.

Galējie rezultāti tika izslēgti no aprēķina.

Svarīgi norādīt, ka veiktie testi ar TSME nevienā gadījumā nedeva galējus rezultātus.

Precizitātes parametri

1. un 2. tabulā ir visu laboratoriju rezultāti un to precizitātes parametri, kas aprēķināti pieņemamam laboratoriju skaitam (8), bet diemžēl rezultāti nav iegūti ar vienu un to pašu analītisko metodi.

3. un 4. tabulā ir rezultāti, kas iegūti tikai ar TG metodi un atbilstīgiem precizitātes parametriem. Šo parametru akceptēšana nozīmē, ka tiek akceptēts mazāks laboratoriju skaits (6.).

3. un 4. tabula rāda tendenci, ka Sr un SR aprēķināti iepriekš aprakstīto 2 datu komplektu 4 paraugiem.

5. tabulā ir dotas Sr un SR vērtības kopā ar apkopotajām vērtībām un vispārējiem r un R parametriem.

Visbeidzot aprēķināja kritisko atšķirību ar 95 % varbūtības pakāpi.

1. tabula

TG + TSME* metožu statistiskie rezultāti

A paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Galējās vērtības	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Vidējā vērtība	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Patiesā vērtība	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Atkārtojamības standartnovirze (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Atkārtojamība r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Relatīvā atkārtojamība r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,23
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	2,04
					Reproducējamība R (95 %)	0,84
					Relatīvā reproducējamība R %	5,71

▼B

B paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Galējās vērtības	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Vidējā vērtība	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Patiesā vērtība	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Atkārtojamības standarta novirze (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Atkārtojamība r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Relatīvā atkārtojamība r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,35
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	2,61
					Reproducējamība R (95 %)	0,99
					Relatīvā reproducējamība R %	7,31

2. tabula

TG + TSME* metožu statistiskie rezultāti

C paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Galējās vērtības	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Vidējā vērtība	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Patiesā vērtība	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Atkārtojamības standartnovirze (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Atkārtojamība r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Relatīvā atkārtojamība r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,17
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	1,82
					Reproducējamība R (95 %)	0,47
					Relatīvā reproducējamība R %	5,10
D paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Galējās vērtības	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Vidējā vērtība	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Patiesā vērtība	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Atkārtojamības standartnovirze (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Atkārtojamība r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Relatīvā atkārtojamība r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,24
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	11,43
					Reproducējamība R (95 %)	0,67
					Relatīvā reproducējamība R %	32,00

▼B

3. tabula

TG + TSME* metožu statistiskie rezultāti

A paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Galējās vērtības	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Vidējā vērtība	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Patiesā vērtība	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Atkārtojamības standartnovirze (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Atkārtojamība r (95 %)	0,25
					Relatīvā atkārtojamība r %	2,24
					Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,13
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	1,16
					Reproducējamība R (95 %)	0,36
					Relatīvā reproducējamība R %	3,25
B paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Galējās vērtības	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Vidējā vērtība	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Patiesā vērtība	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Atkārtojamības standartnovirze (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Atkārtojamība r (95 %)	0,42
					Relatīvā atkārtojamība r %	3,16
					Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,33
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	2,48
					Reproducējamība R (95 %)	0,93
					Relatīvā reproducējamība R %	6,94

4. tabula

TG metodes statistiskie rezultāti

C paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Galējās vērtības	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Vidējā vērtība	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Patiesā vērtība	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Atkārtojamības standartnovirze (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Atkārtojamība r (95 %)	0,42
					Relatīvā atkārtojamība r %	4,51
					Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,19
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDR %)	2,04
					Reproducējamība R (95 %)	0,53
					Relatīvā reproducējamība R %	5,71

▼B

D paraugs		R_1	R_2	Vidējā vērtība	Saglabāto laboratoriju skaits pēc galējo vērtību izslēgšanas	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Galējo vērtību skaits	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Galējās vērtības	DK
					Vidējā vērtība	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Patiesā vērtība	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Atkārtojamības standartnovirze (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Atkārtojamība r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Relatīvā atkārtojamība	12,01
					Reproducējamības standartnovirze (SR)	0,25
					Reproducējamības relatīvā standartnovirze (RSDR %)	11,90
					Reproducējamība R (95 %)	0,69
					Relatīvā reproducējamība R %	33,32

5. tabula

Atkārtojamība un reproducējamība (ar TSME)

	Laboratoriju skaits	Galējā vērtība	Atkārtojamība Sr (95 %)	Reproducējamība SR (95 %)
A paraugs	8	1	0,09	0,23
B paraugs	8	1	0,14	0,35
C paraugs	8	1	0,14	0,17
D paraugs	8	1	0,08	0,24
Apkopotā vērtība			0,116	0,256
			R	**R**
Apkopotā vērtība* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Trienantoātam norādītā minimālā tīrība = 95 %
Trienantoāta minimālais norādītais daudzums sviesta taukos = 11 kg/t
Ņemot vērā kritisko atšķirību ar 95 % varbūtības līmeni, divu rezultātu vidējā vērtība nevar būt mazāka par:

95 % tīra trienantoāta 10,05 kg/t iekļaušanas gadījumā

Atkārtojamība un reproducējamība (bez TSME)

	Laboratoriju skaits	Galējā vērtība	Atkārtojamība Sr (95 %)	Reproducējamība SR (95 %)
A paraugs	6	1	0,09	0,13
B paraugs	6	1	0,15	0,33
C paraugs	6	1	0,15	0,19
D paraugs	6	1	0,09	0,25
Apkopotā vērtība			0,124	0,237
			r	**R**
Apkopotā vērtība* 2.8			**0,347**	**0,663**

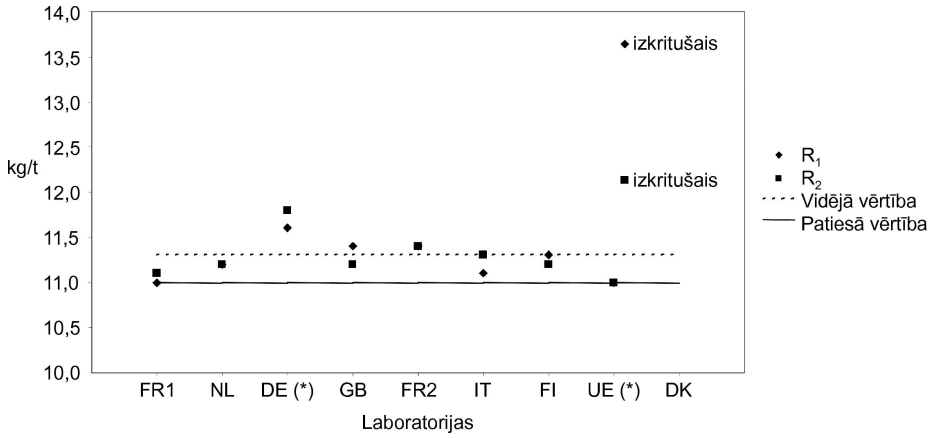
CrD95 = 0,36
Trienantoātam norādītā minimālā tīrība = 95 %
Trienantoāta minimālais norādītais daudzums sviesta taukos = 11 kg/t
Ņemot vērā būtisko atšķirību ar 95 % varbūtības līmeni, divu rezultātu vidējā vērtība nevar būt mazāka par:

95 % tīra trienantoāta 10,09 kg/t iekļaušanas gadījumā

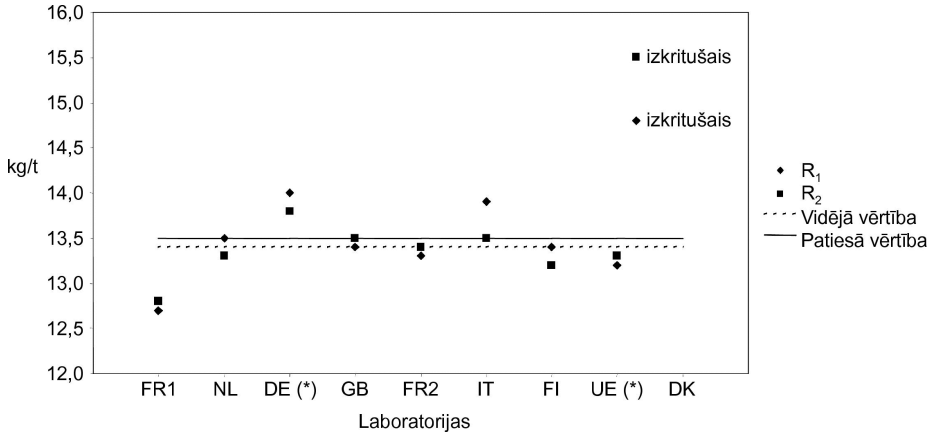
▼B

1. zīmējums (*)

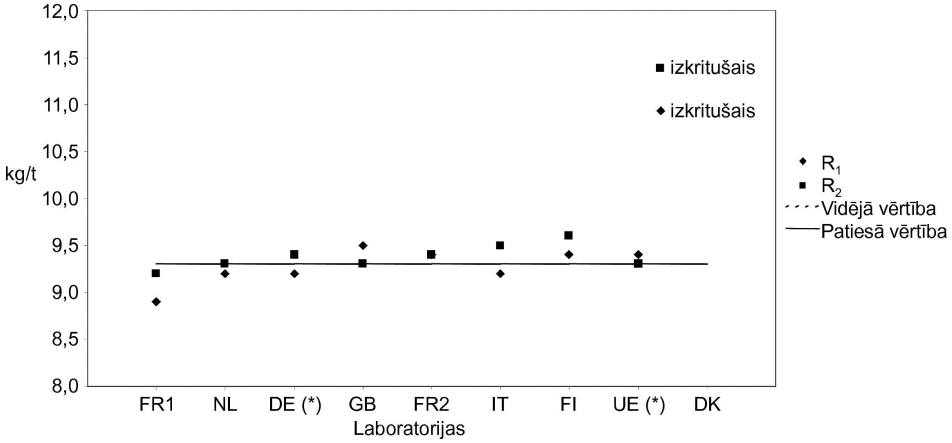
Eksperimenta rezultāti. A paraugs



Eksperimenta rezultāti. B paraugs



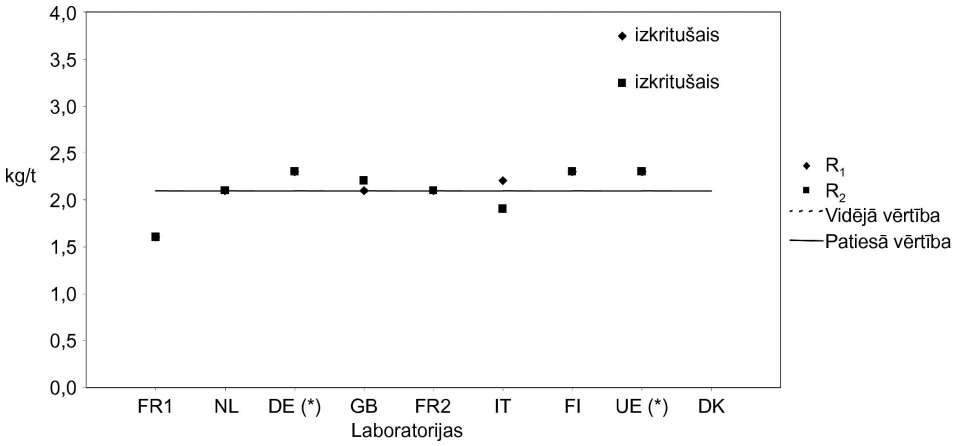
Eksperimenta rezultāti. C paraugs



(*) = FAME metode

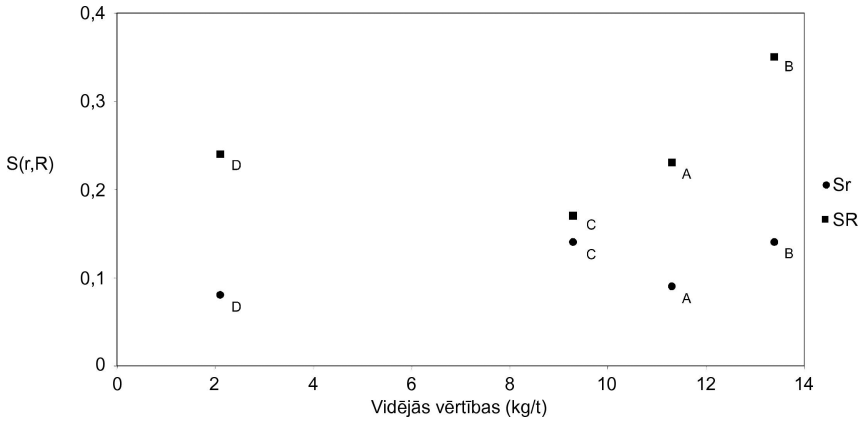
▼B

Eksperimenta rezultāti. D paraugs



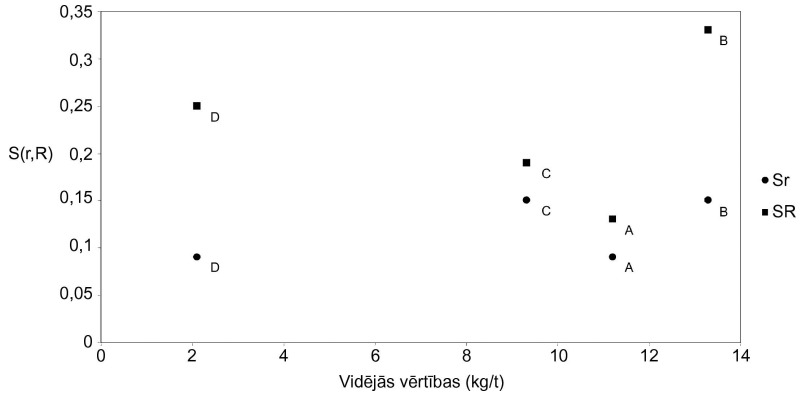
2. zīmējums

Atkārtojamības un reproducējamības standartnovirzes dažādās koncentrācijās (TG+FAME)



3. zīmējums

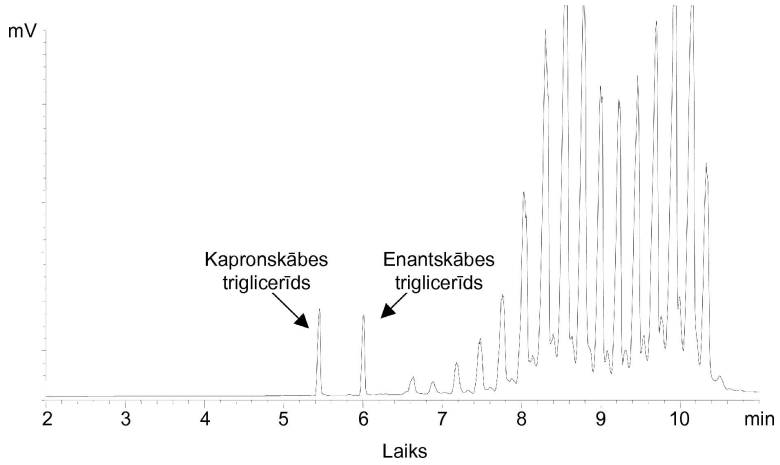
Atkārtojamības un reproducējamības standartnovirzes dažādās koncentrācijās (TG)



▼B

4. zīmējums

Piemērs ar kolonnas inžektoru



▼B

VI PIELIKUMS

(5. pants)

VANILĪNA SATURA NOTEIKŠANA KONCENTRĒTĀ SVIESTĀ, SVIESTĀ VAI KRĒJUMĀ AR AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJU

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Ar šo metodi apraksta procedūru vanilīna kvantitatīvai noteikšanai koncentrētā sviestā, sviestā vai krējumā.

2. PRINCIPS

Zināma daudzuma parauga ekstrahēšana ar izopropanola/etanola/acetonitrila maisījumu (1:1:2). Lielākās tauku daļas izgulsnēšana ar atdzesēšanu temperatūrā no –15 °C līdz –20 °C, kam seko centrifugēšana.

Pēc atšķaidīšanas ar ūdeni veic vanilīna satura noteikšanu ar augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju (*HPCL*).

3. APARATŪRA

Parastā laboratorijas aparatūra, un jo īpaši šāda:

3.1. Saldētava, kas darbojas –15 °C līdz –20 °C temperatūras diapazonā

3.2. Vienreiz lietojamas 2 ml tilpuma šļirces

3.3. Membrānu mikrofiltri (poru izmērs 0,45 μm), kuri ir rezistenti pret šķīdumu, kas satur 5 % ekstrakcijas šķīduma (4.4. punkts)

3.4. Šķidruma hromatogrāfijas iekārta, kas sastāv no sūkņa (plūsma 1,0 ml/min), inžektora (ar 20 μl automātisko vai manuālo iesmidzināšanu), UV detektora (darbojas 306 nm viļņu garumā, 0,01 Å pilna skala), pašrakstītāja vai integratora un kolonnas termostata, kas darbojas 25 °C temperatūrā

3.5. Analītiskā kolonna (250 mm × 4,6 mm ID) uzpildīta ar *LiChrospher RP 18* (Merck, 5 μm) vai ekvivalentu pildījumu

3.6. Aizsargkolonna (aptuveni 20 mm × 3 mm ID) sausi uzpildīta ar *LiChrospher RP* 18 (no 5 μm līdz 10 μm) vai ekvivalentu pildījumu

3.7. Centrifūga, kas darbojas ar 2 000 apgr./min

4. REAĢENTI

Visiem izmantotajiem reaģentiem jābūt ar atzītu analītisko kvalitāti.

4.1. Izopropanols

4.2. Etanols, 96 % (v/v)

4.3. Acetonitrils

4.4. Ekstrakcijas šķīdums

Sajauc izopropanolu (4.1.), etanolu (4.2.) un acetonitrilu (4.3.) attiecībā 1:1:2 (v/v)

4.5. Vanilīns (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehīds) ≥ 98 %

4.5.1. *Vanilīna standartšķīdums (= 500 (μg/ml)*

Ar precizitāti līdz 0,1 mg iesver apmēram 50 mg (CM mg) vanilīna (4.5.) 100 ml mērkolbā, pievieno 25 ml ekstrakcijas šķīduma (4.4.) un uzpilda ar ūdeni.

4.5.2. *Vanilīna standartšķīdums (= 10 (μg/ml)*

Ar pipeti pārnes 5 ml vanilīna standartšķīduma (4.5.1.) uz 250 ml mērkolbu un uzpilda ar ūdeni.

4.5.3. *HPCL tīrības metanols*

4.5.4. *Ledus etiķskābe*

4.5.5. *HPCL tīrības ūdens*

▼B

4.5.6. *HPCL kustīgā fāze*

Mērkolbā, kuras tilpums ir 1 000 ml, sajauc 300 ml metanola (4.5.3.) ar apmēram 500 ml ūdens (4.5.5.) un 20 ml etiķskābes (4.5.4.) un uzpilda ar ūdeni (4.5.5.). Filtrē ar 0,45 μm filtru (3.3.).

5. PROCEDŪRA

5.1. **Testa parauga sagatavošana**

5.1.1. *Sviests*

Karsē paraugu, līdz tas sāk kust. Nepieļauj parauga sakaršanu virs 30 °C. Sviests nekādā gadījumā nedrīkst sadalīties divās fāzēs. Kad paraugs kļuvis pietiekami plastisks, to homogenizē sakratot. Pirms parauga ņemšanas sviestu maisa 15 s. Mērkolbā, kuras tilpums ir 100 ml, ar precizitāti līdz 1 mg iesver apmēram 5 g (SM g) sviesta.

5.1.2. *Koncentrēts sviests*

Tieši pirms parauga ņemšanas ieliek trauku ar koncentrēto sviestu žāvēšanas skapī 40 līdz 50 °C temperatūrā, līdz tas pilnībā izkusis. Skalinot vai maisot sajauc paraugu, izvairoties no gaisa burbuļu veidošanās pārāk spēcīgas maisīšanas rezultātā. Mērkolbā, kuras tilpums ir 100 ml, ar precizitāti līdz 1 mg iesver apmēram 4 g (SM g) koncentrēta sviesta.

5.1.3. *Krējums*

Karsē paraugu ūdens peldē vai inkubatorā 35 līdz 40 °C temperatūrā. Taukus vienmērīgi sadala, skalinot vai vajadzības gadījumā samaisot. Paraugu ātri atdzesē līdz 20 ± 2 °C. Paraugam jāizskatās homogēnam. Ja tā nav, procedūra jāatkārto. Mērkolbā, kuras tilpums ir 100 ml, ar precizitāti līdz 1 mg iesver apmēram 10 g (SM g) krējuma.

5.2. **Testa šķīduma sagatavošana**

Analizējamam paraugam (5.1.1., 5.1.2. vai 5.1.3. punkts) pievieno apmēram 75 ml ekstrakcijas šķīduma (4.4.), maisa vai enerģiski krata apmēram 15 minūtes un papildina ar ekstrakcijas šķīdumu (4.4.). Apmēram 10 ml šā ekstrakta pārnes testa mēģenē, kurai ir aizbāznis. Ieliek testa mēģeni saldētavā (3.1.) un atstāj tur apmēram 30 minūtes. Auksto ekstraktu centrifugē 5 minūtes ar apmēram 2 000 apgr./min un tūlīt dekantē. Ļauj dekantētajam šķīdumam sasniegt istabas temperatūru. Ar pipeti pārnes 5 ml dekantētā šķīduma mērkolbā, kuras tilpums ir 100 ml, un uzpilda ar ūdeni. Izmantojot šļirci (3.2.), filtrē alikvoto daļu cauri membrānas mikrofiltram (3.3.). Filtrāts ir gatavs noteikšanai ar *HPCL*.

5.3. **Kalibrēšana**

Ar pipeti pārnes 5 ml vanilīna standartšķīduma (4.5.2. punkts) mērkolbā, kuras tilpums ir 100 ml. Pievieno 5 ml ekstrakcijas šķīduma (4.4.) un uzpilda ar ūdeni līdz zīmei. Šis šķīdums satur 0,5 μg/ml vanilīna.

5.4. **Noteikšana ar *HPCL***

Ļauj hromatogrāfijas iekārtai stabilizēties apmēram 30 minūtes. Iesmidzina standartšķīdumu (5.3.). Atkārto, kamēr starpība starp signāla laukumiem vai augstumiem starp divām secīgām iesmidzināšanām ir mazāka par 2 %. Aprakstītajos apstākļos vanilīna izdalīšanas laiks ir apmēram 9 minūtes. Analizē standartšķīdumu (5.3.) divas reizes, iesmidzinot 20 μl. Iesmidzina 20 μl testa šķīdumu (5.2.). Nosaka iegūto vanilīna signāla laukumu vai augstumu. Atkārto divkāršo standartšķīduma (5.3.) iesmidzināšanu pēc 10 iesmidzinātām testa paraugu reizēm (5.2.).

6. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

Aprēķina vanilīna signāla vidējo laukumu (vai augstumu) (AC) saistībā ar grupētajām divkāršajām iesmidzināšanas reizēm katrai testa šķīdumu partijai (kopā četri laukumi vai augstumi).

▼B

Aprēķina atsauces koeficientu (R):

$$R = AC/CM,$$

kur CM ir vanilīna masa mg (4.5.1. punkts).

Vanilīna (C) saturu (mg/kg) testa paraugā izsaka ar šādu formulu:

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

kur:

AS = testa parauga vanilīna signāla laukums vai augstums;

SM = testa parauga masa gramos (5.1.1., 5.1.2. vai 5.1.3.).

Piezīme. Ja veic krējuma analīzes, lai noteiktu vanilīna saturu, marķiera koncentrācija jāizsaka kā mg marķiera/kg piena tauku. To dara, reizinot C ar 100/f. f ir krējuma tauku saturs procentos (m/m).

20 = koeficients, kurā ņemts vērā standarta un testa parauga atšķaidījums

0,96 = korekcijas koeficients tauku saturam pirmajā testa parauga atšķaidījumā

Piezīme. Signāla laukuma vietā var izmantot signālu augstumus (skat. 8.3.).

7. METODES PRECIZITĀTE

7.1. **Atkārtojamība (r)**

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 16 mg/kg.

7.2. **Reproducējamība (R)**

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās veicot divas noteikšanas identiskiem testa materiāliem, izmantojot dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 27 mg/kg.

8. PIELAIDES ROBEŽAS

8.1. Lai pārbaudītu homogenitāti, no marķētā produkta jāņem trīs paraugi.

8.2. Marķieris, kas iegūts no vaniļas vai sintētiskā vanilīna.

8.2.1. Iekļaušanas pakāpe 4-hidroksi-3metoksibenzaldehīdam ir 250 g uz tonnu koncentrēta sviesta vai sviesta. Ja krējums ir marķēts, tad iekļaušanas pakāpe ir 250 g uz tonnu piena tauku.

8.2.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazākais rezultāts tiek salīdzināts ar šādām robežvērtībām:

— 220,8 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes),

— 158,3 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju starp 220,8 mg/kg un 158,3 mg/kg.

8.3. Marķieris, kas iegūts tikai no vaniļas pākstīm vai pilnīga to ekstrakta.

8.3.1. Iekļaušanas pakāpe 4-hidroksi-3metoksibenzaldehīdam ir 100 g uz tonnu koncentrēta sviesta vai sviesta. Ja krējums ir marķēts, tad iekļaušanas pakāpe ir 100 g uz tonnu piena tauku.

▼B

8.3.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazākais rezultāts tiek salīdzināts ar šādām robežvērtībām:

— 78,3 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes),

— 53,3 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju starp 78,3 mg/kg un 53,3 mg/kg.

9. PIEZĪMES

9.1. Pievienotā vanilīna atgūšana, ja sviesta eļļas daudzums ir 250 mg/kg, svārstās no 97,0 līdz 103,8. Vidējais konstatētais saturs bija 99,9 % ar 2,7 % standartnovirzi.

9.2. Standartšķīdums satur 5 % ekstrakcijas šķīduma, lai kompensētu signāla paplašināšanos, ko izraisa 5 % ekstrakcijas šķīduma testa paraugos. Tas ļauj veikt kvantitatīvu noteikšanu ar signāla augstumu.

9.3. Analīzes pamatā ir lineāra kalibrēšanas līnija bez pārrāvuma.

9.4. Izmantojot attiecīgus standartšķīduma (4.5.2. punkts) atšķaidījumus, linearitāte jāpārbauda, kad analīzes veic pirmo reizi, turpmāk – ar regulāriem intervāliem un pēc *HPCL* aprīkojuma nomaiņas vai labošanas. Vanilīns var būt noārdījies līdz vanilīnskābei, divanilīnam vai citiem savienojumiem, iedarbojoties iekšējiem fermentiem, kādi atrodas nepasterizētā krējumā vai tā izstrādājumos.

▼B

VII PIELIKUMS

(5. pants)

SPEKTROMETRISKA BETA-APO-8'-KAROTĪNSKĀBES ETILESTERA NOTEIKŠANA KONCENTRĒTĀ SVIESTĀ UN SVIESTĀ

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Ar šo metodi apraksta procedūru beta-apo-8'-karotīnskābes etilestera (apo-karotīnestera) kvantitatīvai noteikšanai koncentrētā sviestā un sviestā. Apo-karotīnesteris ir visu to vielu summa paraugu ekstraktā, kas iegūts metodē aprakstītajos apstākļos, kuras 440 nm absorbē gaismu.

2. PRINCIPS

Sviesta taukus izšķīdina petrolēterī un 440 nm mēra absorbciju. Apo-karotīnestera saturu salīdzinājumā ar ārēju standartu.

3. APARATŪRA

3.1. Mērpipetes, kuru tilpums ir 0,25, 0,50, 0,75 un 1,0 ml.

3.2. Spektrofotometrs, kas piemērots izmantošanai 440 nm (un 447–449 nm) un aprīkots ar kivetēm, kuru optiskais ceļš ir 1 cm.

3.3. Mērkolbas, kuru tilpums ir 20 ml un 100 ml.

3.4. Analītiskie svari ar precizitāti 0,1 mg, kuros var nosvērt ar 1 mg precizitāti un kuru rādījumu iedaļa ir 0,1 mg.

3.5. Termostats, 45 °C ± 1 °C

3.6. Ātri filtrējoši bezpelnu filtri

4. REAĢENTI

Visiem reaģentiem jābūt ar atzītu analītisko kvalitāti.

4.1. Apo-karotīnestera suspensija (apmēram 20 %).

4.1.1. Suspensijas saturu nosaka šādi.

Uzsilda suspensiju līdz 45–50 °C un homogenizē neatvērtu oriģinālajā traukā. Mērkolbā (100 ml) iesver 400 mg, izšķīdina to 20 ml hloroforma (4.4. punkts) un uzpilda ar cikloheksānu (4.5.). Atšķaida 5 ml šā šķīduma līdz 100 ml ar cikloheksānu (A šķīdums). 5 ml A šķīduma atšķaida ar cikloheksānu līdz 100 ml. Absorbciju mēra 447–449 nm (mēra maksimumu salīdzinājumā ar cikloheksānu kā tukšo analīzi, izmantojot kivetes ar 1 cm garu optisko mērceļu).

Apo-karotīnestera saturs P (%) = $(Abs_{maks.} \times 40\,000)/(M_{susp.} \times 2\,550)$
vai izvērsti: $(Abs_{maks.}/2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{maks} = mērīšanas šķīduma absorbcija maksimuma punktā

M_{susp} = suspensijas masa (g)

2 550 = abs. references (1 %, 1 cm) vērtība

P = suspensijas tīrība (saturs) (%)

▼B

Piezīme. Apo-karotīnestera suspensija ir jutīga pret gaisu, karstumu un gaismu. Neatvērtā oriģinālkārtā (noslēgts ar slāpekli) un vēsā vietā to var uzglabāt aptuveni 12 mēnešus. Pēc atvēršanas saturs īsā laikā jāizmanto.

4.1.2. Apo-karotīnestera standartšķīdums, apm. 0,2 mg/ml.

Ar precizitāti līdz 0,1 mg nosver apmēram 0,100 g apo-karotīnestera suspensijas (4.1.1.) (W), izšķīdina vaitspirtā (4.2.), pēc iespējas visu šķīdumu pārnes mērkolbā, kuras tilpums ir 100 ml, un uzpilda līdz zīmei ar vaitspirtu.

Šis šķīdums satur (W × P)/10 mg/ml apo-karotīnestera.

Piezīme. Šķīdums jāuzglabā tumšā vēsā vietā. Pēc viena mēneša šķīdums vairs nav izmantojams.

4.2. Vaitspirts (40–60 °C)

4.3. Bezūdens granulēts nātrija sulfāts, kas iepriekš divas stundas žāvēts 102 °C temperatūrā

4.4. Hloroforms

4.5. Cikloheksāns

5. PROCEDŪRA

5.1. **Testa parauga sagatavošana**

5.1.1. *Koncentrēts sviests*

Paraugu kausē termostatā apmēram 45 °C temperatūrā.

5.1.2. *Sviests*

Paraugu kausē sildierīcē apmēram 45 °C temperatūrā un reprezentatīvu daļu filtrē ar filtru, kas satur aptuveni 10 gramus bezūdens nātrija sulfāta (4.3. punkts), vidē, kas aizsargāta no spēcīgas dabiskas vai mākslīgas gaismas un kas uzturēta 45 °C temperatūrā. Savāc pietiekamu daudzumu sviesta tauku.

5.2. **Noteikšana**

Ar precizitāti līdz 1 mg nosver apmēram 1 g koncentrēta sviesta (vai ekstrahētu sviesta tauku (5.1.2.)), (M). Izmantojot vaitspirtu (4.2.), pēc iespējas visu nosvērto masu pārnes uz mērkolbu, kuras tilpums ir 20 ml, (V), uzpilda līdz zīmei un rūpīgi sajauc.

Pārnes alikvoto daļu uz 1 cm kiveti un mēra absorbciju 440 nm salīdzinājumā ar vaitspirta tukšo analīzi. Pamatojoties uz kalibrēšanas grafiku (C µ/ml), iegūst apo-karokarotīnestera koncentrāciju šķīdumā.

5.3. **Kalibrēšana**

Ar pipeti pārnes 0; 0,25; 0,5; 0,75 un 1,0 ml apo-karokarotīnestera standartšķīduma (4.1.2. punkts) piecās mērkolbās, kuru tilpums ir 100 ml. Atšķaida līdz attiecīgajam ar vaitspirtu (4.2.) un samaisa.

Šķīdumu aptuvenās koncentrācijas sarindo no 0 līdz 2 µg/ml un precīzi tās aprēķina, pamatojoties uz standartšķīduma koncentrāciju (4.1.2.) (W × P)/10 mg/ml. Absorbciju mēra 440 nm salīdzinājumā ar vaitspirta (4.2.) tukšo mērījumu.

Atzīmē absorbcijas lielumus uz y ass salīdzinājumā ar apo-karokarotīnestera koncentrāciju uz x ass. Aprēķina standartlīknes vienādojumu.

▼B

6. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

6.1. Apo-karokarotīnestera saturu, kas izteikts mg/kg produkta, aprēķina šādi.

Koncentrēts sviests: (C × V)/M

Sviests: 0,82 (C × V)M

kur:

C = apo-karokarotīnestera saturs, (g/ml, nolasīts no kalibrēšanas grafika (5.3.)

V = testa šķīduma (5.2.) tilpums (ml)

M = analizējamā parauga (5.2.) masa (g)

0,82 = korekcijas koeficients sviesta tauku saturam sviestā

7. METODES PRECIZITĀTE

7.1. **Atkārtojamība**

7.1.1. *Sviesta analīze*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Koncentrēta sviesta analīze*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 1,6 mg/kg.

7.2. **Reproducējamība**

7.2.1. *Sviesta analīze*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās veicot divas noteikšanas identiskiem testa materiāliem, izmantojot dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 4,7 mg/kg.

7.2. **2. Koncentrēta sviesta analīze**

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās veicot divas noteikšanas identiskiem testa materiāliem, izmantojot dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 5,3 mg/kg.

7.3. **Precizitātes datu avots**

Precizitātes datus noteica eksperimentā, ko veica 1995. gadā, aptverot 11 laboratorijas un 12 marķētus paraugus (sešas neatpazīstamas (aklās) dubultanalīzes) sviestam un 12 marķētus paraugus (sešas neatpazīstamas (aklās) dubultanalīzes) koncentrētam sviestam.

8. PIELAIDES ROBEŽAS

8.1. Lai pārbaudītu, vai produkts marķēts pareizi, no marķētā produkta jāņem trīs paraugi.

8.2. **Sviests**

8.2.1. Iekļaušanas pakāpe sviestam, ņemot vērā fona absorbciju, ir 22 mg/kg.

8.2.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežvērtībām:

— 17,7 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes),

— 12,2 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes).

▼B

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju starp 17,7 mg/kg un 12,2 mg/kg.

8.3. **Koncentrēts sviests**

8.3.1. Iekļaušanas pakāpe koncentrētam sviestam, ņemot vērā fona absorbciju, ir 24 mg/kg.

Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežvērtībām:

— 19,2 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes),

— 13,2 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju starp 19,2 mg/kg un 13,2 mg/kg.

▼B

VIII PIELIKUMS

(5. pants)

SITOSTERĪNA UN STIGMASTERĪNA NOTEIKŠANA SVIESTĀ UN KONCENTRĒTĀ SVIESTĀ AR KAPILĀRA KOLONNAS GĀZU HROMATOGRĀFIJU

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Ar šo metodi apraksta procedūru sitosterīna vai stigmasterīna satura noteikšanai sviestā un koncentrētā sviestā. Sitosterīnu aprēķina kā beta-sitosterīna un 22 dihidro-beta- sitosterīna summu, citus sitosterīnus uzskata par nenozīmīgiem.

2. PRINCIPS

Sviestu vai koncentrētu sviestu pārziepo ar kālija hidroksīdu etanola šķīdumā, un nepārziepjojamo vielu ekstrahē ar dietilēteri.

Sterīnus pārveido trimetilsililēteros un analizē ar kapilāra kolonnas gāzu hromatogrāfiju salīdzinājumā ar iekšējo standartu/betulīnu.

3. APARATŪRA

3.1. Pārziepošanas kolba, kuras tilpums ir 150 ml, ar šlifa savienojumiem un atteces dzesinātāju

3.2. Dalāmpiltuves, kuru tilpums ir 500 ml

3.3. Kolbas, kuru tilpums ir 250 ml

3.4. Spiedienu izlīdzinošās piltuves, kuru tilpums ir 250 ml vai līdzīgs, dietilētera atlieku savākšanai

3.5. Stikla kolonna, kuras izmērs ir 350 mm × 20 mm un kurai ir keramiskā stikla aizbāznis

3.6. Ūdens vanna vai sildapvalks

3.7. Reakcijas mēģenes, kuru tilpums ir 2 ml

3.8. Gāzu hromatogrāfs, kas piemērots izmantošanai ar kapilāra kolonnu un aprīkots ar sadalījuma sistēmu un kura sastāvdaļas ir šādas:

3.8.1. termostatējama kamera ar regulējamu temperatūru vēlamās temperatūras uzturēšanai kolonnās ar precizitāti līdz ± 1 °C;

3.8.2. iztvaicētājs ar regulējamu temperatūru;

3.8.3. liesmas jonizācijas detektors un pārveidotājs/pastiprinātājs;

3.8.4. pašrakstītājs/integrators, kas piemērots darbam ar pārveidotāju/pastiprinātāju (3.8.3.)

3.9. Silikagela kapilāra kolonna ir pilnīgi pārklāta ar BP1 vai ekvivalentu materiālu (vai jebkura cita kolonna, kurai ir vismaz tāda pati izšķirtspēja) vienmērīgā 0,25 μm biezumā; kolonnai jāspēj izšķirt trimetilsililatvasinājumus lanosterīnu un sitosterīnu. Piemērots ir BP1, kura garums ir 12 m un iekšējais diametrs 0,2 mm.

3.10. Gāzu hromatogrāfijas 1 μl mikrošļirce ar rūdītu adatu

4. REAĢENTI

Visiem reaģentiem jābūt ar atzītu analītisko kvalitāti. Jāizmanto destilēts ūdens vai ūdens ar vismaz līdzvērtīgu tīrību.

4.1. Etanols, tīrības pakāpe vismaz 95 %

4.2. Kālija hidroksīda 60 % šķīdums, izšķīdina 600 g kālija hidroksīda (minimums 85 %) ūdenī un uzpilda ar ūdeni līdz vienam litram

▼B

4.3. Betulīns, tīrības pakāpe vismaz 99 %

4.3.1. Betulīna šķīdumi dietilēterī (4.4.)

4.3.1.1. Sitosterīna noteikšanai izmantotā betulīna šķīduma koncentrācijai jābūt 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. Stigmasterīna noteikšanai izmantotā betulīna šķīduma koncentrācijai jābūt 0,4 mg/ml.

4.4. Analītiski tīrs dietilēteris (bez peroksīdiem vai nogulsnēm)

4.5. Bezūdens granulēts nātrija sulfāts, kas iepriekš divas stundas žāvēts 102 °C temperatūrā

4.6. Sililējošs reaģents, piemēram *TRI-SIL* (saņemams no *Pierce Chemical Co*, kat. Nr. 49001) vai līdzvērtīgs. (Uzmanību! *TRI-SIL* ir viegli uzliesmojošs, toksisks, kodīgs un, iespējams, kancerogēns. Laboratorijas personālam jāzina drošības informācija par *TRI-SIL* un jāveic attiecīgi piesardzības pasākumi.)

4.7. Lanosterīns

4.8. Sitosterīns, zināmā tīrības pakāpe ne mazāka par 90 % (P)

1. piezīme. Kalibrēšanai izmantoto standartmateriālu tīrība jānosaka ar normalizācijas metodi. Pieņem, ka visi paraugā esošie sterīni ir atspoguļoti hromatogrammā, ka kopējais signālu laukums atspoguļo 100 % sterīna sastāvdaļu un ka ar detektoru noteiktie dati par sterīniem ir tādi paši. Sistēmas linearitāte jāapstiprina visos attiecīgajos koncentrācijas diapazonos.

4.8.1. Sitosterīna standartšķīdums – ar precizitāti līdz 0,001 mg/ml sagatavo šķīdumu, kas satur apmēram 0,5 mg/ml (W_1) sitosterīna (4.8.) dietilēterī (4.4.).

4.9. Stigmasterīns, zināmā tīrības pakāpe ne mazāka par 90 % (P).

4.9.1. Stigmasterīna standartšķīdums – ar precizitāti līdz 0,001 mg/ml sagatavo šķīdumu, kas satur apmēram 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterīna (4.9.) dietilēterī (4.4.).

4.10. Izšķirtspējas testa maisījums. Sagatavo šķīdumu, kas satur 0,05 mg/ml lanosterīna (4.7.) un 0,5 mg/ml sitosterīna (4.8.) dietilēterī (4.4.).

5. METODE

5.1. **Hromatogrāfijas standartšķīdumu sagatavošana**

Vienlaikus ar pievienošanu pārziepojamajam paraugam (skat. 5.2.2.) iekšējais standartšķīdums (4.3.1.) jāpievieno attiecīgajam sterīna standartšķīdumam.

5.1.1. Sitosterīna hromatogrāfijas standartšķīdums: pārnes 1 ml sitosterīna standartšķīduma (4.8.1.) abās reakcijas kolbās (3.7.) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri. Pievieno 1 ml iekšējā standarta šķīduma (4.3.1.1.) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri.

5.1.2. Stigmasterīna hromatogrāfijas standartšķīdums: pārnes 1 ml stigmasterīna standartšķīduma (4.9.1.) abās reakcijas kolbās (3.7.) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri. Pievieno 1 ml iekšējā standarta šķīduma (4.3.1.2.) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri.

5.2. **Nepārziepjojamo vielu pagatavošana**

5.2.1. Kausē sviesta paraugu temperatūrā, kas nepārsniedz 35 °C, maisot paraugu kārtīgi sajauc.

Ar precizitāti līdz 1 mg kolbā, kuras tilpums ir 150 ml (3.1.) iesver apmēram 1 g sviesta (W_2) vai koncentrēta sviesta (W_2). Pievieno 50 ml etanola (4.1.) un 10 ml kālija hidroksīda šķīduma (4.2.). Pieliek atteces dzesinātāju un 30 minūtes karsē apmēram 75 °C temperatūrā. Atvieno dzesinātāju un atdzesē kolbu apmēram līdz telpas temperatūrai.

▼B

5.2.2. Ja jānosaka sitosterīns, kolbā ielej 1,0 ml iekšējā standartšķīduma (4.3.1.1.) vai, ja jānosaka stigmasterīns, 4.3.1.2. punktā paredzētā šķīduma. Rūpīgi sajauc. Pēc iespējas visu kolbas saturu pārnes dalāmpiltuvē, kuras tilpums ir 500 ml (3.2.), izskalojot kolbu vispirms ar 50 ml ūdens un tad ar 250 ml dietilētera (4.4.). Divas minūtes dalāmpiltuvi enerģiski krata un ļauj atdalīties fāzēm. Notecina apakšējo ūdens slāni un ar četrām secīgām 100 ml ūdens porcijām kratot nomazgā ētera slāni.

2. piezīme. Lai neveidotos emulsija, kolba pirmās divas reizes ar ūdeni jāmazgā viegli (10 apvērsieni). Kolbu mazgājot trešo reizi, to var darīt enerģiski, kratot 30 sekundes. Ja izveidojusies emulsija, to var likvidēt, pievienojot 5–10 ml etanola. Ja pievienots etanols, kolba nākamās divas reizes enerģiski jāmazgā ar ūdeni.

5.2.3. Tīro, no ziepēm brīvo ētera slāni laiž caur stikla kolonnu (3.5.), kurā ir 30 g bezūdens nātrija sulfāta (4.5.). Ēteri savāc kolbā, kuras tilpums ir 250 ml (3.3.). Pievieno vienu vārķermeņa granulu un tvaicē gandrīz sausu ūdens peldē vai sildapvalkā, raugoties, lai tiktu savākts šķīdinātāja pārpalikums.

3. piezīme. Ja ņemtie parauga ekstrakti ir pilnīgi izžāvēti pārāk augstā temperatūrā, ir iespējami sterīna zudumi.

5.3. **Trimetilsililēteru sagatavošana**

5.3.1. Kolbā palikušo ētera šķīdumu ar 2 ml ētera pārnes uz reakcijas kolbu, kuras tilpums ir 2 ml (3.7.), un ar slāpekļa plūsmu aizvada ēteri. Kolbu mazgā ar divām secīgām 2 ml dietilētera alikvotām daļām, katrreiz pārnesot uz reakcijas kolbu un aizvadot ēteri ar slāpekli.

5.3.2. Sililē paraugu, pievienojot 1 ml TRI-SIL (4.6.). Noslēdz reakcijas kolbu un enerģiski krata, lai izšķīdinātu paraugu. Ja paraugs pilnīgi neizšķīst, to silda līdz 65–70 °C. Pirms iesmidzināšanas gāzu hromatogrāfā ļauj nostāvēties vismaz piecas minūtes. Standartus sililē tāpat kā paraugus. Izšķirtspējas testa maisījumu (4.10.) sililē tāpat kā paraugus.

4. piezīme. Sililēšana jāveic no ūdens brīvā vidē. Uz nepilnīgu betulīna sililēšanu norāda betulīna signālam tuvu esošs signāls, kas atbilst betulīnam.

Etanola klātbūtne sililēšanas stadijā traucē sililēšanu. To var izraisīt neatbilstīga mazgāšana ekstrakcijas posmā. Ja pastāv šāda problēma, ekstrakcijas posmā var ieviest piekto mazgāšanu, enerģiski kratot 30 sekundes.

5.4. **Gāzu hromatogrāfijas analīze**

5.4.1. *Darba apstākļu izvēle*

Saskaņā ar ražotāja instrukcijām uzstāda gāzu hromatogrāfu.

Norādījumi par darba apstākļiem ir šādi:

— kolonnas temperatūra: 265 °C,

— inžektora temperatūra: 265 °C,

— detektora temperatūra: 300° C,

— nesējgāzes plūsmas ātrums: 0,6 ml/min,

— ūdeņraža spiediens: 84 kPa,

— gaisa spiediens: 155 kPa,

▼B

— parauga dalījums: no 10:1 līdz 50:1; dalījuma attiecība ir optimizējama saskaņā ar ražotāja instrukcijām un detektora atbildes reakcijas linearitāti, tad apstiprināma visos interesējošos koncentrācijas diapazonos,

5. piezīme. Ir īpaši svarīgi regulāri tīrīt smidzināšanas cauruli.

— iesmidzinātās vielas daudzums: 1 µl *TMSE* šķīduma.

Ļauj sistēmai stabilizēties, lai pirms analīžu sākšanas iegūtu pietiekami stabilu atbildes reakciju.

Šiem apstākļiem jābūt dažādiem atkarībā no kolonnas un gāzu hromatogrāfa īpašībām tā, lai iegūtu hromatogrammas, kas atbilst šādām prasībām:

— sitosterīna signālam jābūt atbilstīgi atdalītam no lanosterīna. Pirmajā attēlā parādīta tipiska hromatogramma, kāda būtu jāiegūst no sililēta izšķirtspējas testa maisījuma (4.10.),

— šādu sterīnu relatīvajam izdalīšanās laikam vajadzētu būt apmēram šādam:

holesterīns: 1,0,

stigmasterīns: 1,3,

sitosterīns: 1,5,

betulīns: 2,5,

— betulīna izdalīšanas laikam būtu jābūt aptuveni 24 minūtēm.

5.4.2. *Analītiskā procedūra*

Iesmidzina 1 µl sililēta standartšķīduma (stigmasterīna vai sitosterīna) un pieregulē integratora kalibrēšanas parametrus.

Iesmidzina nākamo 1 µl sililēta standartšķīduma, lai noteiktu atbildes koeficientus salīdzinājumā ar betulīnu.

Iesmidzina 1 µl sililēta parauga šķīduma un mēra signālu laukumus. Pēc katras hromatogrāfijas kārtas iesmidzina standartus.

Orientējoši katrā kārtā būtu sešreiz jāiesmidzina paraugs.

6. piezīme. Stigmasterīna signāla integrācijai būtu jāietver visi straujie kritumi kā 2.b attēla 1., 2. un 3. punktā

Novērtējot kopējo sitosterīnu, sitosterīna signāla integrācijai būtu jāietver 22-dihidro-β-sitosterīna (stigmastanīna) signāla laukums, kas eluē tūlīt pēc sitosterīna (skat. 3.b attēlu).

6. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

6.1. Nosaka sterīna signālu un betulīna signālu laukumus abos standartos, kas nodala partiju, un aprēķina R_1:

R_1 = (standarta sterīna signāla vidējais laukums)/(standarta betulīna signāla vidējais laukums)

Nosaka paraugā laukumu sterīna signālam (stigmasterīns un sitosterīns) un betulīna signālam, un aprēķina R_2:

R_2 = (parauga sterīna signāla laukums)/(parauga betulīna signāla laukums)

W_1 = sterīna saturs standartā (mg), ko satur 1 ml standartšķīduma (4.8.1. vai 4.9.1.).

W_2 = parauga masa (g) (5.2.1.)

P = sterīna standarta tīrība (4.8. vai 4.9.)

▼B

Parauga sterīna saturs (mg/kg) = $((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$

7. METODES PRECIZITĀTE

7.1. **Sviests**

7.1.1. *Atkārtojamība*

7.1.1.1. Stigmasterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Reproducējamība*

7.1.2.1. Stigmasterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās noteikšanās, ko ar identisku testa materiālu veikuši laboranti dažādās laboratorijās, izmantojot dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 8,7 %/kg no vidējā lieluma, kas iegūts, veicot noteikšanu.

7.1.3. *Precizitātes datu avots*

Precizitātes datus noteica eksperimentā, ko veica 1992. gadā, aptverot astoņas laboratorijas un sešus paraugus (trīs neatpazīstamas (aklās) dubultanalīzes) stigmasterīnam un sešus paraugus (trīs neatpazīstamas (aklās) dubultanalīzes) sitosterīnam.

7.2. **Koncentrēts sviests**

7.2.1. *Atkārtojamība*

7.2.1.1. Stigmasterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 3,6 % no vidējā lieluma, kas iegūts, veicot noteikšanu.

7.2.2. *Reproducējamība*

7.2.2.1. Stigmasterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās noteikšanās, ko ar identisku testa materiālu veikuši laboranti dažādās laboratorijās, izmantojot dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterīns

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem, izmantojot dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 8,9 % no vidējā lieluma, kas iegūts, veicot noteikšanu.

▼B

7.2.3. *Precizitātes datu avots*

Precizitātes datus noteica eksperimentā, ko veica 1991. gadā, aptverot astoņas laboratorijas un sešus paraugus (trīs neatpazīstamas (aklās) dubultanalīzes)) stigmasterīnam un sešus paraugus (trīs neatpazīstamas (aklās) dubultanalīzes)) sitosterīnam.

8. PIELAIDES ROBEŽAS

8.1. Lai pārbaudītu, vai produkts marķēts pareizi, no marķētā produkta jāņem trīs paraugi.

8.2. **Sviests**

8.2.1. *Stigmasterīns*

8.2.1.1. Stigmasterīna iekļaušanas pakāpe ir 150 g vismaz 95 % tīra stigmasterīna uz tonnu sviesta, proti, 142,5 mg/kg, vai 170 g vismaz 85 % tīra stigmasterīna uz tonnu sviesta, proti, 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazākais rezultāts tiek salīdzināts ar šādām robežvērtībām:

— 115,8 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 85 %).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju attiecīgi starp 115,8 mg/kg un 80,1 mg/kg vai 117,7 mg/kg un 81,5 mg/kg.

8.2.2. *Sitosterīns*

8.2.2.1. Vismaz 90 % tīra sitosterīna iekļaušanas pakāpe tonnā sviesta ir 600 g, proti, 540 mg/kg

8.2.2.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazākais rezultāts tiek salīdzināts ar šādām robežvērtībām:

— 482,6 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz sitosterīnu, tīrības pakāpe 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz sitosterīnu, tīrības pakāpe 90 %).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju starp 482,6 mg/kg un 347,6 mg/kg.

8.3. **Koncentrēts sviests**

8.3.1. *Stigmasterīns*

8.3.1.1. Stigmasterīna iekļaušanas pakāpe ir 150 g stigmasterīna ar vismaz 95 % tīrību uz tonnu koncentrēta sviesta, proti, 142,5 mg/kg vai 170 g stigmasterīna ar vismaz 85 % tīrību uz tonnu koncentrēta sviesta, proti, 144,5 mg/kg.

▼B

8.3.1.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazākais rezultāts tiek salīdzināts ar šādām robežvērtībām:

— 118,5 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz stigmasterīnu, tīrības pakāpe 85 %).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju attiecīgi starp 118,5 mg/kg un 82,9 mg/kg vai 120,4 mg/kg un 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitosterīns*

8.3.2.1. Vismaz 90 % tīra sitosterīna iekļaušanas pakāpe tonnā koncentrēta sviesta ir 600 g, proti, 540 mg/kg.

8.3.2.2. Produkta trīs paraugu analīzes rezultāti tiek izmantoti, lai pārbaudītu marķiera iekļaušanas pakāpi un homogenitāti, un mazākais rezultāts tiek salīdzināts ar šādām robežvērtībām:

— 480,9 mg/kg (95 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz sitosterīnu, tīrības pakāpe 90 %),

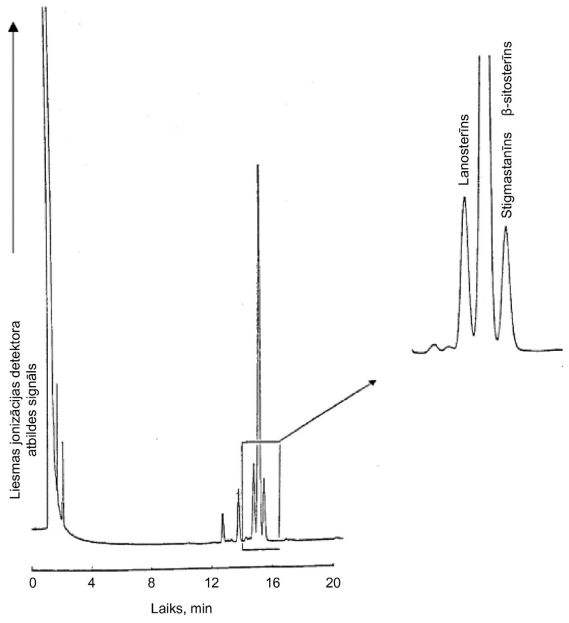
— 345,9 mg/kg (70 % no minimālās iekļaušanas pakāpes attiecībā uz sitosterīnu, tīrības pakāpe 90 %).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto kopā ar interpolāciju starp 480,9 mg/kg un 345,9 mg/kg.

1. attēls

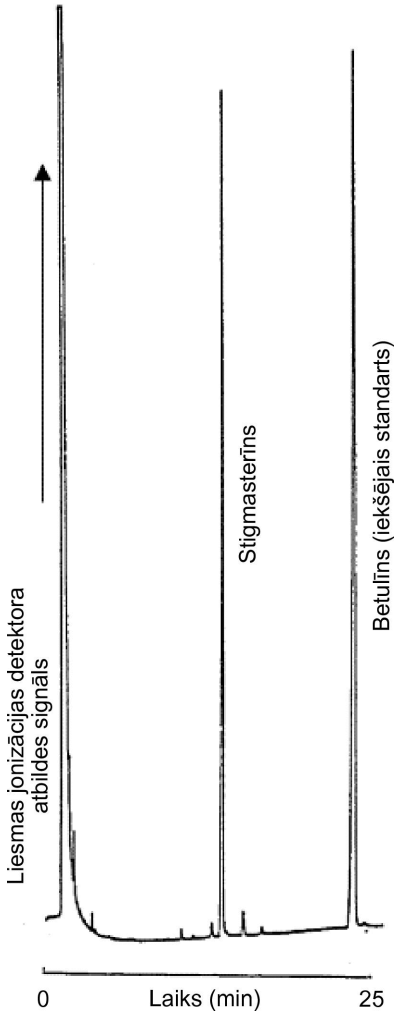
Testa maisījuma izšķirtspējas hromatogramma

Vēlams, lai izšķirtspēja būtu pilnīga, t. i., lai lanosterīna signāls atgrieztos bāzes līnijā pirms sitosterīna signāla, kaut nepilnīga izšķirtspēja ir pieļaujama.

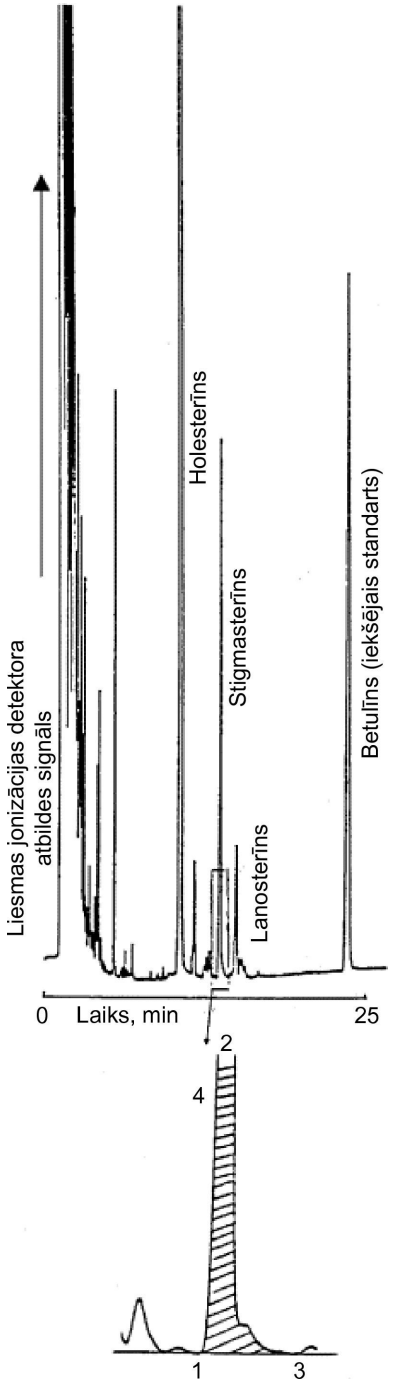


▼B

2.a attēls
Stigmasterīna standarts



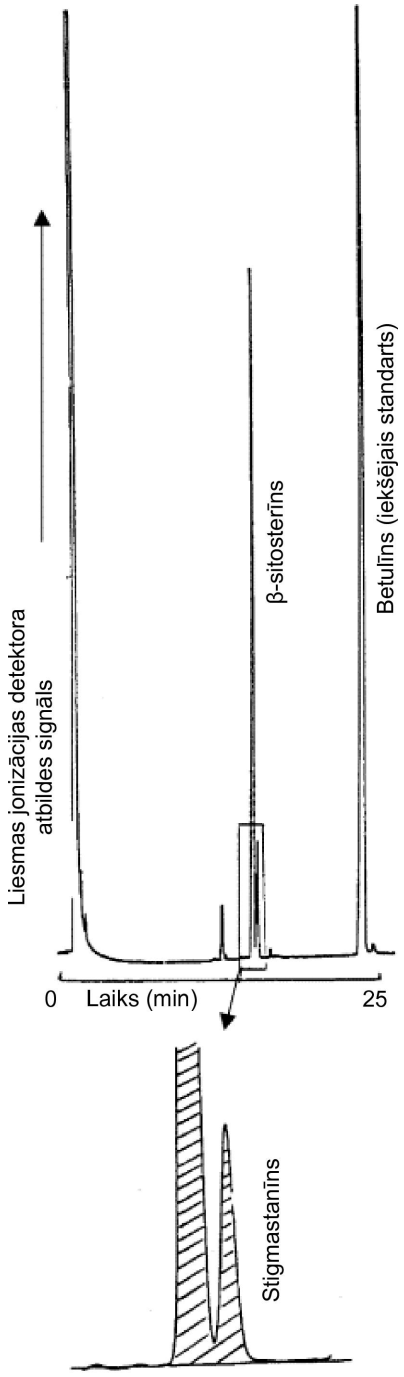
2.b attēls
Ar stigmasterīnu denaturēts sviesta paraugs



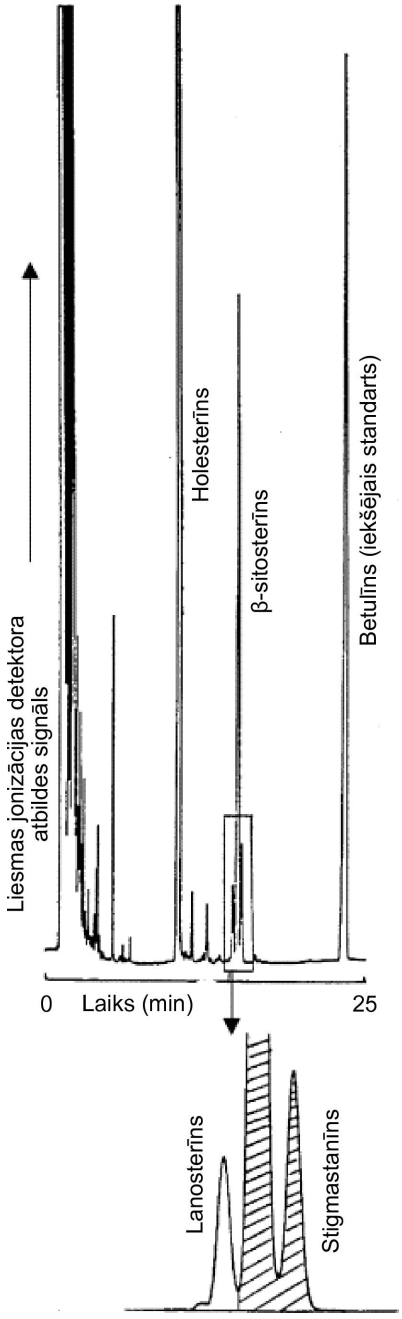
Piezīme. Stigmasterīna signāla integrēšanā būtu jāiekļauj jebkuri kritumi, kā noteikts 1., 2. un 3. punktā.

▼B

3.a attēls
Sitosterīna standarts



3.b attēls
Ar β-sitosterīnu denaturēta sviesta paraugs



Piezīme. β-sitosterīns bieži satur piemaisījumus (stigmasterīnu), kas eluē tūlīt pēc β- sitosterīna. Novērtējot kopējo β-sitosterīna daudzumu, abu signālu laukumi ir jāsummē.

▼B

IX PIELIKUMS

(6. pants)

STANDARTMETODE GOVS PIENA UN KAZEINĀTA KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANAI SIEROS, KAS GATAVOTI NO AITAS PIENA, KAZAS PIENA VAI BIFEĻU PIENA, VAI AITAS, KAZAS UN BIFEĻU PIENA MAISĪJUMIEM

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Govs piena un kazeināta klātbūtnes noteikšana sieros, kas gatavoti no aitas piena, kazas piena, bifeļu piena vai aitas, kazas un bifeļu piena maisījumiem ar γ-kazeīnu izoelektrisko fokusēšanu pēc plazminolīzes.

2. PIEMĒROŠANAS NOZARE

Šī metode ir piemērota sensitīvai un specifiskai svaiga govs piena un termiski apstrādāta govs piena un kazeināta klātbūtnes noteikšanai svaigos un nogatavinātos sieros, kas gatavoti no aitas piena, kazas piena, bifeļu piena vai aitas, kazas un bifeļu piena maisījumiem. Tā nav piemērota, lai noteiktu, vai piens un siers ir atšķaidīts ar termiski apstrādātiem liellopu sūkalu olbaltumvielu koncentrātiem.

3. METODES PRINCIPS

3.1. Kazeīnu izolēšana no siera un references standartiem.

3.2. Izolēto kazeīnu šķīdināšana un šķelšana ar plazmīniem (EK.3.4.21.7.).

3.3. Ar plazmīnu apstrādāto kazeīnu izoelektriskā fokusēšana urīnvielas klātbūtnē un olbaltumvielu iekrāsošana.

3.4. Iekrāsoto gamma-3 un gamma-2-kazeīnu joslu vērtēšana (pierādījums par govs piena klātbūtni), salīdzinot no parauga iegūtās joslas ar joslām, kas iegūtas tajā pašā gelā no references standartiem, kas satur 0 % un 1 % govs piena.

4. REAĢENTI

Ja vien nav norādīts citādi, analīzēm jāizmanto tīras ķīmiskās vielas. Ūdenim jābūt divreiz destilētam vai ar līdzvērtīgu tīrību.

Piezīme. Laboratorijā pagatavotiem poliakrilamīda geliem, kas satur urīnvielu, kuru izmēri ir 265 × 125 × 0,25 mm, piemēro turpmāk minētos nosacījumus. Ja tiek lietoti citu izmēru vai cita tipa geli, var būt nepieciešams pielāgot atdalīšanas apstākļus.

Izolelektriskā fokusēšana

4.1. **Reaģenti urīnvielu saturošu poliakrilamīda gelu iegūšanai**

4.1.1. *Gela rezerves standartšķīdums*

Izšķīdina:

4,85 g akrilamīda,

0,15 g N, N'-metilēn-*bis*-akrilamīda (BIS),

48,05 g urīnvielas,

15,00 g glicerīna (87 masas %),

uzpilda līdz 100 ml, glabā ledusskapī brūna stikla pudelē.

▼B

Piezīme. Labāk izmantot pārdošanā esošo iepriekš sajaukto akrilamīda/BIS šķīdumu, nevis noteiktu fiksēta svara neirotoksisko akrilamīdu. Ja šāds šķīdums satur 30 % m/V akrilamīda un 0,8 % m/V BIS, tad fiksētā svara vietā jāizmanto 16,2 ml tilpums. Rezerves standartšķīduma glabāšanas laiks ir ne ilgāk par 10 dienām; ja tā vadītspēja ir lielāka par 5 μS, to dejonizē, 30 minūtes maisot ar 2 g MB-3 amberlīta, tad filtrē caur 0,45 μm membrānas filtru.

4.1.2. *Gela šķīdums*

Sagatavo gela šķīdumu, sajaucot piedevas un amfolītus ar gela rezerves standartšķīdumu (skat. 4.1.1.):

9,0 ml rezerves standartšķīduma,

24 mg β-alanīna,

500 μl amfolīta pH 3,5–9,5 ([1]),

250 μl amfolīta pH 5–7 ([1]),

250 μl amfolīta pH 6–8 ([1]).

Gela šķīdumu sajauc un degazē divas līdz trīs minūtes ultraskaņas vannā vai vakuumā.

Piezīme. Sagatavo gela šķīdumu tieši pirms tā saliešanas (skat. 6.2.).

4.1.3. *Katalizatora šķīdumi*

4.1.3.1. N, N, N', N' – tetrametiletilēndiamīns (*Temed*)

4.1.3.2. 40 % m/V amonija persulfāts (PER):

ūdenī izšķīdina 800 mg PER un papildina līdz 2 ml.

Piezīme. Vienmēr izmanto svaigi pagatavotu PER šķīdumu.

4.2. **Kontaktšķīdums**

Petroleja vai šķidrais parafīns

4.3. **Anoda šķīdums**

Ūdenī izšķīdina 5,77 g fosforskābes (85 masas %) un atšķaida līdz 100 ml.

4.4. **Katoda šķīdums**

Ūdenī izšķīdina 2,00 g nātrija hidroksīda un atšķaida ar ūdeni līdz 100 ml.

Paraugu sagatavošana

4.5. **Reaģenti olbaltumvielu izolēšanai**

4.5.1. *Atšķaidīta etiķskābe (25,0 ml ledus etiķskābes uzpilda ar ūdeni līdz 100 ml)*

4.5.2. *Dihlormetāns*

4.5.3. *Acetons*

4.6. **Olbaltumvielas šķīdinošs buferšķīdums**

Izšķīdina

5,75 g glicerīna (87 masas %),

24,03 g urīnvielas,

250 mg ditiotreitola

ūdenī un uzpilda līdz 50 ml.

([1]) Ir pierādījies, ka produkti – *Ampholine*® pH 3,5–9,5 (*Pharmacia*) un *Resolyte*® pH 5–7, un pH 6–8 (*BDH, Merck*) – ir īpaši piemēroti, lai iegūtu vajadzīgo gamma-kazeīnu separāciju.

▼B

Piezīme. Uzglabā ledusskapī, maksimālais glabāšanas laiks ir viena nedēļa.

4.7. **Reaģenti kazeīnu šķelšanai ar plazmīniem**

4.7.1. *Amonija karbonāta buferšķīdums*

Titrē 0,2 mol/l amonija hidrogēnkarbonāta šķīduma (1,58 g/100 ml ūdens), kas satur 0,05 mol/l etilēndiamīntetraetiķskābes (EDTA, 1,46 g/100 ml), ar 0,2 mol/l amonija karbonāta šķīdumu (1,92 g/100 ml ūdens), kas satur 0,05 mol/l EDTA līdz pH 8.

4.7.2. *Liellopu plazmīns (EK. 3.4.21.7.) ar vismaz 5 vien./ml aktivitāti.*

4.7.3. *ε-aminokapronskābes šķīdums fermentu inhibēšanai*

Izšķīdina 2,624 g ε-aminokapronskābes (6 amino-n-heksānskābes) 100 mililitros 40 % (V/V) etanola.

4.8. **Standarti**

4.8.1. *Sertificētu ar siera fermentu sajaukta aitas un kazas vājpiena references standartu, kas satur 0 % un 1 % govs piena, var iegādāties Komisijas References materiālu un mērījumu institūtā, B-2440 Geel, Beļģija.*

4.8.2. *Laboratorijas pagaidu standartu pagatavošana no bifeļu piena, kas sajaukts ar siera fermentu un kas satur 0 % un 1 % govs piena*

Vājpienu sagatavo, 20 minūtes centrifugējot 2 500 g neapstrādāta bifeļu vai govs piena 37 °C temperatūrā. Pēc tam ātri atdzesē mēģeni un tās saturu līdz 6–8 °C temperatūrai, tad virsējo tauku slāni pilnībā noņem. Lai pagatavotu 1 % standartu, 1 l vārglāzē pie 495 ml bifeļu vājpiena pievieno 5,00 ml govs vājpiena, noregulē pH uz 6,4, pievienojot atšķaidītu pienskābi (10 % m/V). Noregulē temperatūru uz 35 °C un pievieno 100 µl no teļa iegūta siera fermenta (fermenta aktivitāte 1: 10 000, c. 3 000 vien./ml), maisa 1 minūti un vārglāzi, kas pārklāta ar alumīnija foliju, vienu stundu atstāj 35 °C temperatūrā, ļaujot veidoties rūgušpiena biezmasai. Pēc tam, kad izveidojusies rūgušpiena biezmasa, visu ar siera fermentu sajaukto pienu liofilizē bez iepriekšējas homogenizācijas vai sūkalu novadīšanas. Pēc liofilizēšanas tas ir smalkgraudains materiāls viendabīga pulvera iegūšanai. Lai sagatavotu 0 % standartu, veic to pašu procedūru, izmantojot tīru bifeļu vājpienu. Standarti jāuzglabā –20 °C temperatūrā.

Piezīme. Pirms standartu pagatavošanas ir ieteicams pārbaudīt bifeļu piena tīrību, izmantojot ar plazmīnu apstrādāto kazeīnu izoelektrisko fokusēšanas metodi.

Reaģenti olbaltumvielu iekrāsošanai

4.9. **Fiksators**

Ūdenī izšķīdina 150 g trihloretiķskābes un uzpilda līdz 1 000 ml.

4.10. **Atkrāsojošais šķīdums**

Ar destilēto ūdeni atšķaida 500 ml metanola un 200 ml ledus etiķskābes līdz 2 000 ml.

Piezīme. Katru dienu pagatavo svaigu atkrāsojošo šķīdumu; to var pagatavot, sajaucot vienādus 50 % (V/V) metanola un 20 % (V/V) ledus etiķskābes rezerves standartšķīdumu tilpumus.

4.11. **Iekrāsojošie šķīdumi**

4.11.1. *Iekrāsojošais šķīdums (1 rezerves standartšķīdums)*

Izmantojot magnētisko maisītāju (apmēram 45 minūtes), šķīdina 3,0 g *Coomassie* briljantzilā G-250 (C.I. 42655) 1 000 ml 90 % (V/V) metanola, filtrē ar diviem vidēji ātras filtrācijas kroku filtriem.

▼B

4.11.2. *Iekrāsojošais šķīdums (2 rezerves standartšķīdums)*

Šķīdina 5,0 g vara sulfāta pentahidrāta 1 000 ml 20 % (V/V) etiķskābes.

4.11.3. *Iekrāsojošais šķīdums (darba šķīdums)*

Tieši pirms iekrāsošanas sajauc kopā pa 125 ml no katra rezerves standartšķīduma (4.11.1. un 4.11.2.).

Piezīme. Iekrāsojošais šķīdums jāsagatavo tā izmantošanas dienā.

5. IEKĀRTA

5.1. Stikla plates (265 × 125 × 4 mm); gumijas veltnis (platums 15 cm); līmeņots galds

5.2. Gela nesējloksne (265 × 125 mm)

5.3. Segloksne (280 × 125 mm). Katrai garajai malai (skat. 1. attēlu) pielīmē strēmeli līmlentes (280 × 6 × 0,25 mm)

5.4. Elektrofokusēšanas kamera ar dzesēšanas plāksni (piem., 265 × 125 mm) un piemērota strāvas padeve (≥ 2,5 kV) vai automātiskā elektroforēzes ierīce

5.5. Cirkulācijas kriostats ar termostatu, kas noregulēts uz 12 ± 0,5 °C

5.6. Centrifūga, kas noregulējama uz 3 000 g

5.7. Elektrodu plāksnes (265 mm garas)

5.8. Plastmasas pilināmās pudeles anoda un katoda šķīdumiem

5.9. Parauga aplikators (10 × 5 mm, viskoze vai filtrpapīrs ar zemu olbaltumvielu adsorbētspēju)

5.10. Nerūsējošā tērauda grieznes, skalpeļi un pincetes

5.11. Nerūsējošā tērauda vai stikla iekrāsošanas un atkrāsošanas šķīvji (piem., 280 × 150 mm instrumentu paplātes)

5.12. Homogenizētājs ar regulējamu stieni (roktura diametrs 10 mm), 8 000 līdz 20 000 apgriezienu minūtē

5.13. Magnētiskais maisītājs

5.14. Ultraskaņas vanna

5.15. Iekārta folijas sametināšanai

5.16. 25 µl mikropipetes

5.17. Vakuumcentrifūga vai liofilizators

5.18. Termostatējama ūdens vanna, kas noregulējama uz 35 un 40 ± 1 °C, ar kratītāju

5.19. Densimetrs, kura rādījumi nolasāmi pie λ = 634 nm

6. PROCEDŪRA

6.1. **Paraugu sagatavošana**

6.1.1. *Kazeīnu izolēšana*

Centrifūgas mēģenē iesver daudzumu, kas vienāds ar 5 g siera sausās masas vai 100 ml standartvielas, pievieno 60 ml destilētā ūdens un homogenizē ar stieņa homogenizētāju (8 000 līdz 10 000 apgriezienu minūtē). Ar atšķaidītu etiķskābi noregulē pH 4,6 (4.5.1.) un centrifugē (5 minūtes, 3 000 g). Dekantē taukus un sūkalas, homogenizē atlikumu

▼B

ar 20 000 apgr./min. 40 ml destilēta ūdens, kurā ar atšķaidītu etiķskābi (4.5.1.) pH noregulēts uz 4,5, pievieno 20 ml dihlormetāna (4.5.2.), atkal homogenizē un centrifugē (5 min, 3 000 g). Ar lāpstiņu noņem kazeīna slāni, kas atrodas starp ūdens un organisko fāzi (skat. 2. attēlu), un dekantē abas fāzes. Vēlreiz homogenizē kazeīnu 40 mililitros destilēta ūdens (skat. iepriekš) un 20 mililitros dihlormetāna (4.5.2. apakšpunkts) un centrifugē. Atkārto šo procedūru, līdz abas ekstrakcijas fāzes ir bezkrāsainas (divas vai trīs reizes). Homogenizē olbaltumvielu atlikumu ar 50 ml acetona (4.5.3.) un filtrē ar vidēji ātras filtrācijas kroku filtrpapīru. Katru reizi mazgā atlikumu uz filtra ar divām atsevišķām 25 ml acetona porcijām un ļauj nožūt gaisā vai žāvē ar slāpekļa plūsmu, tad piestā saberž smalkā pulverī.

Piezīme. Sausie kazeīna izolāti ir jāuzglabā –20 °C temperatūrā.

6.1.2. *β-kazeīnu šķelšana ar plazmīnu, lai palielinātu γ-kazeīnu aktivitāti*

Disperģē 25 mg izolēto kazeīnu (6.1.1.) 0,5 ml amonija karbonāta buferšķīduma (4.7.1.) un homogenizē 20 minūtes, piemēram, apstrādājot ar ultraskaņu. Karsē līdz 40 °C un pievieno 10 µl plazmīna (4.7.2.), sajauc un inkubē vienu stundu 40 °C temperatūrā, nepārtraukti kratot. Fermenta inhibēšanai pievieno 20 µl ε-aminokapronskābes šķīduma (4.7.3.), tad pievieno 200 mg cietās urīnvielas un 2 mg ditiotreitola.

Piezīme. Lai iegūtu lielāku simetriju fokusētajās kazeīna joslās, pēc ε-aminokapronskābes pievienošanas ieteicams šķīdumu liofilizēt un tad izšķīdināt atlikumu 0,5 mililitros olbaltuma šķīdināšanas buferšķīduma (4.6.).

6.2. **Urīnvielu saturošu poliakrilamīda gelu pagatavošana**

Lai atdalītu dažus pilienus ūdens, izrullē gela nesējloksni (5.2.) uz stikla plates (5.1.), noņemot visu lieko ūdeni ar papīra dvieli vai salveti. Tādā pašā veidā izrullē segloksni (5.3.) ar starplikām (0,25 mm) uz citas stikla plates. Atstāj plati horizontāli uz līmeņota galda.

Pievieno 10 µl *Temed* (4.1.3.1.), lai sagatavotu un atgaisotu gela šķīdumu (4.1.2.), samaisa un pievieno 10 µl PER šķīduma (4.1.3.2.), kārtīgi samaisa un tūlīt vienmērīgi izlej segloksnes centrā. Liek vienu gela nesējplates stūri (loksnes virsma uz leju) uz segloksnes plates un lēnām laiž lejā, lai starp loksnēm veidotos gela kārta, kas klājas vienmērīgi un bez burbuļiem (3. attēls). Izmantojot lāpstiņu, gela nesējplati uzmanīgi nolaiž pilnībā un smagumam uz tās noliek trīs vai vairāk stikla plašu. Kad polimerizācija ir pabeigta (pēc apmēram 60 minūtēm), atstāj gelu polimerizēties uz gela nesējloksnes visā garumā ar segloksni, kurai uzliktas stikla plates. Rūpīgi notīra nesējloksnes otru pusi, noņemot gela atliekas un urīnvielu. Ierullē kārtaino gelu folijā un uzglabā ledusskapī (ne ilgāk par sešām nedēļām).

Piezīme. Segloksni ar starplikām var izmantot atkārtoti. Poliakrilamīda gelu var sagriezt mazāku, tas ir ieteicams, ja ir vairāki paraugi vai ja izmanto automātisko elektroforēzes ierīci (divi geli, izmēri 4,5 × 5 cm).

6.3. **Izolelektriskā fokusēšana**

Noregulē atdzesēšanas termostatu uz 12 °C. Noslauka gela nesējloksnes otru pusi ar petroleju, tad iepilina dažus pilienus petrolejas (4.2.) dzesēšanas bloka centrā. Pēc tam uz tā izrullē kārtaino gelu ar nesējpusi uz leju, raugoties, lai neveidotos burbuļi. Noslauka visu lieko petroleju un noņem nesējloksni. Samērcē elektrodu plāksnes ar elektrodu šķīdumiem (4.3. un 4.4.), sagriež gelu gareniski un noliek paredzētajā stāvoklī (attālums starp elektrodiem 9,5 cm).

▼B

Izoelektriskās fokusēšanas nosacījumi

6.3.1. *Gela izmēri 265 × 125 × 0,25 mm*

Posms	Laiks (min)	Sprieguma (V)	Strāva (mA)	Jauda (W)	Voltstundas (Vh)
1. Priekšfokusēšana	30	Maksimums 2 500	Maksimums 15	Konstanta 4	c. 300
2. Parauga fokusēšana (1)	60	Maksimums 2 500	Maksimums 15	Konstanta 4	c. 1 000
3. Galīgā fokusēšana	60	Maksimums 2 500	Maksimums 5	Maksimums 20	c. 3 000
	40	Maksimums 2 500	Maksimums 6	Maksimums 20	c. 3 000
	30	Maksimums 2 500	Maksimums 7	Maksimums 25	c. 3 000

(1) Parauga aplicēšana: pēc priekšfokusēšanas (1. solis) ar pipeti uzpilina 18 µl paraugšķīduma un standartšķīduma uz parauga aplikatoriem (10 × 5 mm), novieto tos uz gela ar 1 mm atstarpi vienam no otra un garenvirzienā 5 mm attālumā no anoda un viegli piespiež. Fokusēšanu veic iepriekšminētajos apstākļos, 60 minūtes pēc parauga fokusēšanas uzmanīgi noņemot parauga aplikatoru.

Piezīme. Ja maina gela kārtas biezumu vai platumu, attiecīgi jāpielāgo strāvas stiprums un jauda (piemēram, jādivkāršo strāvas stiprums un jauda, ja izmanto gelu, kura izmēri ir 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. *Sprieguma programmas piemērs automātiskajai elektroforēzes ierīcei (divi 5,0 × 4,5 cm geli), elektrodus bez plāksnēm liek tieši gelā*

Posms	Spriegums	Strāva	Jauda	Temperatūra	Voltstundas
1. Priekšfokusēšana	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Parauga fokusēšana	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusēšana	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusēšana	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Parauga aplikatoru 2. posmā novieto tad, ja ir 0 Vh.

Parauga aplikatoru 2. posmā noņem tad, ja ir 30 Vh.

6.4. **Olbaltumvielu iekrāsošana**

6.4.1. *Olbaltumvielu fiksēšana*

Tiklīdz pārtrauc strāvas padevi, elektrodu plāksnes noņem, un tūlīt liek gelu iekrāsošanas/atkrāsošanas šķīvī, kurā iepildīti 200 ml fiksatora (4.9.); atstāj tajā 15 minūtes un nepārtraukti krata.

6.4.2. *Gela plates mazgāšana un iekrāsošana*

Kārtīgi notecina fiksatoru un mazgā gela plati divreiz pa 30 sekundēm, katru reizi ar 100 ml atkrāsošanas šķīduma (4.10.). Nolej atkrāsošanas šķīdumu un piepilda šķīvi ar 250 ml iekrāsošanas šķīduma (4.11.3.); viegli kratot, ļauj iekrāsoties 45 minūtes.

6.4.3. *Gela plates atkrāsošana*

Nolej iekrāsošanas šķīdumu, divreiz mazgā gela plati, katru reizi izmantojot 100 ml atkrāsošanas šķīduma (4.10.), tad 15 minūtes krata kopā ar 200 ml atkrāsošanas šķīduma un atkārto atkrāsošanas procedūru vismaz divas vai trīs reizes, līdz pamats ir tīrs un bezkrāsains. Pēc tam noskalo gela plati ar destilētu ūdeni (2 × 2 minūtes) un žāvē gaisā (2 līdz 3 stundas) vai ar fēnu (10 līdz 15 minūtes).

▼B

1. piezīme. Fiksēšanu, mazgāšanu, iekrāsošanu un atkrāsošanu veic 20 °C temperatūrā. Nedarīt to augstākā temperatūrā.

2. piezīme. Ja dod priekšroku precīzākai iekrāsošanai ar sudrabu (piemēram, *Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code No 17–1150–01*), ar plazmīnu apstrādātie paraugi jāatšķaida līdz 5 mg/ml.

7. NOVĒRTĒŠANA

Vērtēšanu veic, salīdzinot nezināma parauga olbaltumvielu paraugus ar references standartiem uz tā paša gela. Govs piena noteikšanu sieros, kas gatavoti no aitas piena, kazas piena un bifeļu piena vai aitas, kazas un bifeļu pienu maisījumiem, veic ar γ_3- un γ_2-kazeīniem, kuru izoelektriskie punkti izvietojas starp pH 6,5 un pH 7,5 (4.a, 4.b un 5. attēls). Noteikšanas robeža ir mazāka par 0,5 %.

7.1. **Vizuālā vērtēšana**

Lai veiktu govs piena daudzuma vizuālo vērtēšanu, ieteicams pielāgot paraugu un standartu koncentrācijas, lai aitas, kazas un/vai bifeļu γ_2- un γ_3-kazeīnu intensitāte būtu tāda pati (skat. "γ_2 E,G,B" un "γ_3 E,G,B" 4.a, 4.b un 5. attēlā). Pēc tam par govs piena daudzumu (mazāks par 1 %, vienāds ar 1 % vai lielāks par 1 %) nezināmā paraugā var spriest tieši, salīdzinot liellopu γ_3- un γ_2-kazeīnu koncentrāciju (skat. "γ_3 C" un "γ_2 C" 4.a, 4.b un 5. attēlā) references standartos, kur tas ir 0 % un 1 % (aitas, kazas piens), vai laboratorijas pagaidu standartos (bifeļu piens).

7.2. **Densimetriskā novērtēšana**

Lai noteiktu liellopu γ_2- un γ_3-kazeīnu signālu laukumu attiecību pret aitas, kazas un/vai bifeļu piena γ_2- un γ_3-kazeīnu signālu laukumiem (skat. 5. attēlu), ja iespējams, veic densimetriju (5.19.). Salīdzina šo lielumu ar 1 % tā references standarta (aitas, kazas piens) vai tā laboratorijas pagaidu standarta (bifeļu piens) γ_2- un γ_3-kazeīna signālu laukuma attiecību, kurš analizēts uz tā paša gela.

Piezīme. Šī metode ir apmierinoša, ja iegūst skaidri pozitīvu rezultātu par abiem liellopu γ_2- un γ_3-kazeīniem 1 % references standartā, bet ne 0 % standartparaugā. Ja tā nav, tad uzlabo procedūru, precīzāk ievērojot metodes nosacījumus.

Paraugu novērtē kā pozitīvu, ja abu liellopu γ_2- un γ_3-kazeīnu vai atbilstīgo signālu laukumu attiecības ir 1 % vai lielākas par 1 % no daudzuma references standartā.

8. ATSAUCES

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).*

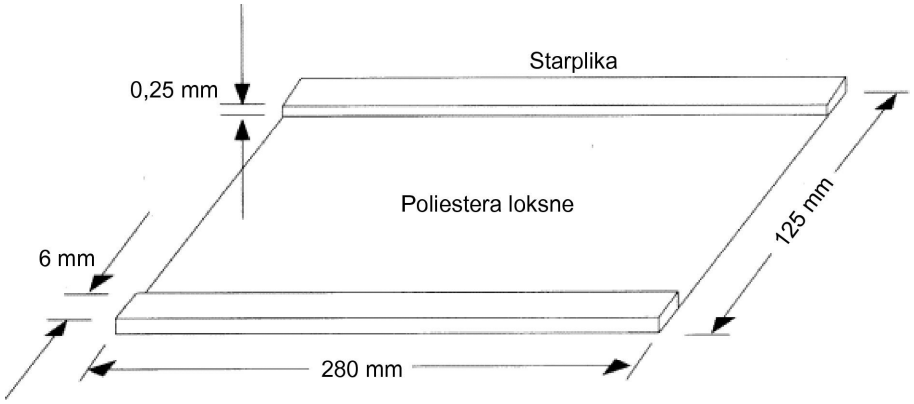
4. *Krause É., Belitz H.–D., Kaiser K.–P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195–199 (1982).*

▼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).*

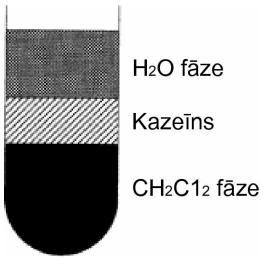
1. attēls

Segloksnes shematisks zīmējums



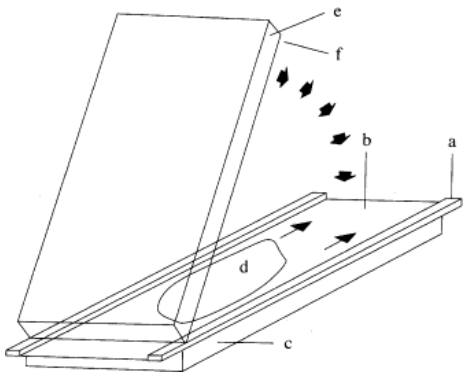
2. attēls

Kazeīna slānis, kas pēc centrifugēšanas atrodas starp ūdens fāzi un organisko fāzi



3. attēls

Noliekšanas paņēmiens ultraplāno poliakrilamīda gelu noliešanai

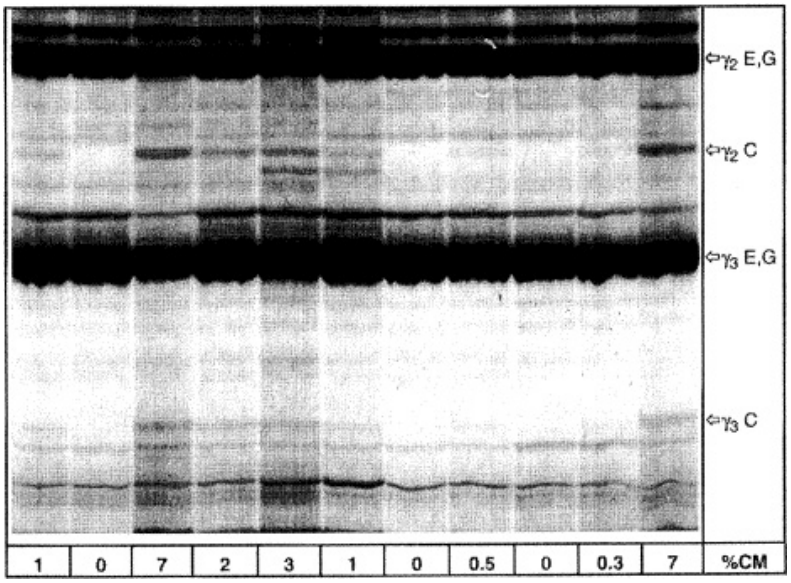


a = starplika (0,25 mm); b = segloksne (5.3.); c, e = stikla plates (5.1.); d = gela šķīdums (4.1.2.); f = gela nesējloksne (5.2.)

▼B

4.a attēls

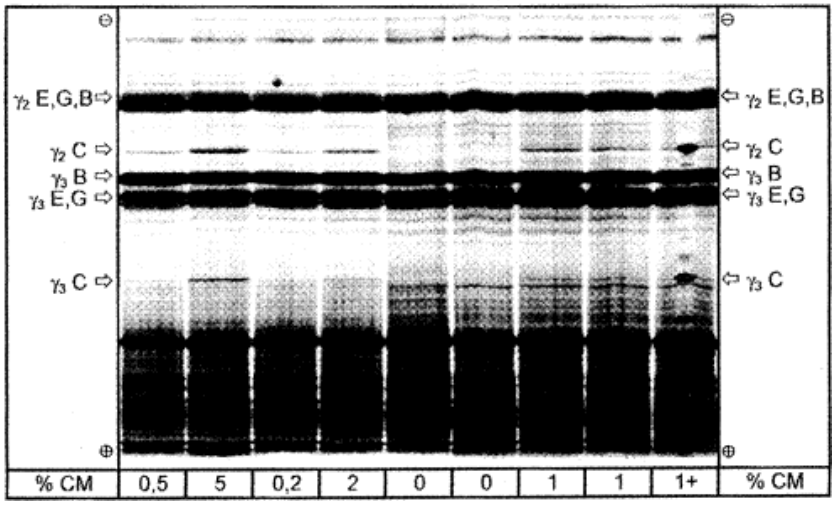
Izoelektriskā fokusēšana ar plazmīnu apstrādātiem kazeīniem no aitas un kazas piena sieriem, kas satur dažādus govs piena daudzumus



% CM = govs piena procentuālais daudzums, C = govs, E = aita, G = kaza
Parādīta IEF gela augšējā daļa.

4.b attēls

Izoelektriskā fokusēšana ar plazmīnu apstrādātiem kazeīniem no sieriem, kas gatavoti no aitas, kazas un bifeļu piena, kurš satur dažādus govs piena daudzumus

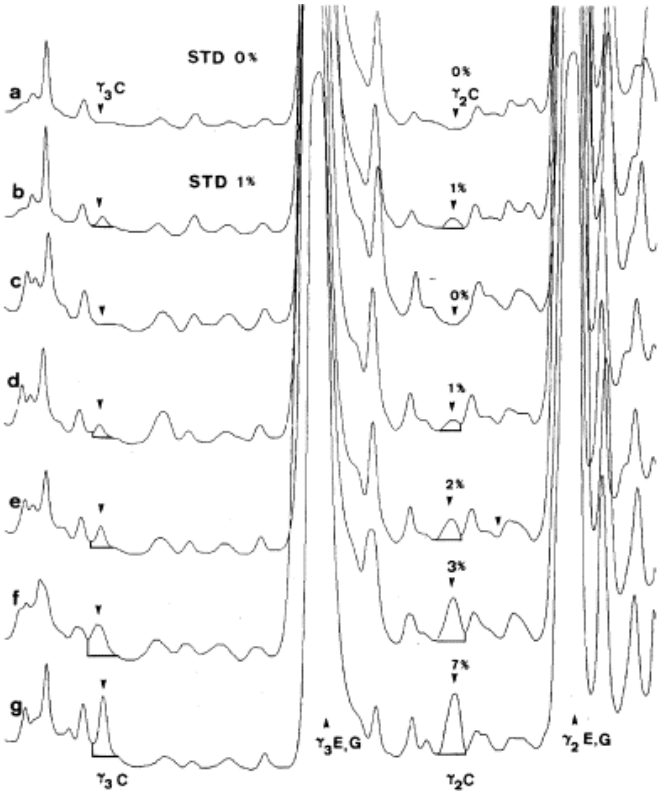


% CM = govs piena procentuālais daudzums; 1 + = paraugs, kas satur 1 % govs piena un tīru liellopu kazeīnu, kas parādās joslas vidū. C = govs, E = aita, G = kaza, B = bifeļmāte
Parādīts IEF gela kopējais separācijas attālums.

▼B

5. attēls

Standartu un siera paraugu, kas iegūti no aitas un kazas piena maisījumiem, densitogrammu (STD) superpozīcija pēc izoelektriskās fokusēšanas



a, b = standarti, kas satur 0 un 1 % govs piena; c–g = siera paraugi, kas satur 0, 1, 2, 3 un 7 % govs piena. C = govs, E = aita, G = kaza.
IEF gela augšējā daļa skenēta, ja *lambda* = 634 nm.

▼B

X PIELIKUMS

(7. pants)

STANDARTMETODE KOLIBAKTĒRIJU KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANAI SVIESTĀ, VĀJPIENA PULVERĪ, KAZEĪNĀ UN KAZEINĀTOS

1. PARAUGU SAGATAVOŠANA

   ISO standarts 8261.

2. PROCEDŪRA

   ISO standarts 4831.

   Barotnē inokulē paraugus, kas atbilst 1 g sviesta vai 0,1 g vājpiena pulvera vai kazeīna/kazeināta.

   Katram paraugam inokulē trīs mēģenes.

3. REZULTĀTI

   Ja trīs mēģenēs iegūst 3 negatīvus rezultātus, rezultāts ir "atbilstīgs".

   Ja trīs mēģenēs iegūst 2 vai 3 pozitīvus rezultātus, rezultāts ir "neatbilstīgs".

   Ja trīs mēģenēs iegūst 2 negatīvus rezultātus, analīzi divreiz atkārto (divās mēģenēs).

   — Ja 2 rezultāti ir negatīvi, rezultāts ir "atbilstīgs".

   — Ja vismaz 1 rezultāts ir pozitīvs, rezultāts ir "neatbilstīgs".

▼B

XI PIELIKUMS

(8. pants)

LAKTOZES NOTEIKŠANA KOMBINĒTAJĀ LOPBARĪBĀ

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Laktozes noteikšana kombinētajā lopbarībā.

2. ATSAUCE

Laktozes saturu izsaka masas procentos, ko nosaka, kā paredzēts aprakstītajā procedūrā.

3. DEFINĪCIJA

Bezūdens laktozes saturs ir izteikts gramos uz 100 g.

4. PRINCIPS

Kombinēto lopbarību atšķaida ar ūdeni. Lai atdalītu taukus un olbaltumvielu frakcijas no kombinētās lopbarības, atšķaidītai svērtai alikvotai daļai pievieno Bigsa (*Biggs*) šķīdumu. Paraugu filtrē (vai centrifugē), un filtrātu (jeb centrifugātu) inžektē katjonu apmaiņas *HPCL* kolonnā svina formā, izmantojot *HPCL* tīrības ūdeni kā kustīgo fāzi. Eluēto laktozi nosaka ar diferenciālu refraktometru ([i]).

5. REAĢENTI

5.1. **Vispārēja informācija**

Ja nav norādīts citādi, lietojiet vienīgi atzītas analītiskas tīrības reaģentus un degazētu *HPCL* tīrības ūdeni.

5.2. **Laktoze**

D-laktozes monohidrāts ($(C_{12}H_{22})O_{11}\cdot H_2O$) spēj uzsūkt papildu mitrumu. Pirms lietošanas izmēra patieso ūdens daudzumu ar Karla-Fišera metodi vai noņem papildu mitrumu, ievietojot laktozi termostatā 105 °C temperatūrā uz 8 stundām (šādi apstrādājot, laktoze nezaudē savu kristālisko ūdeni).

5.3. **Koncentrēts Bigsa/Sijārto šķīdums** ([ii])

Izšķīdina 9,10 g cinka acetāta dihidrāta ($Zn(CH_3COOH)_2\cdot 2H_2O$) un 5,46 g fosformolibdēnskābes monohidrāta ($H_3[P(W_3O_{10})_4\cdot xH_2O]$) aptuveni 70 mililitros *HPCL* tīrības ūdens (6.8.) 100 ml mērkolbā.

Pievieno 5,81 ml ledus etiķskābes (CH_3COOH). Atšķaida līdz 100 ml atzīmei ar *HPCL* tīrības ūdeni (6.8.) un samaisa. Šķīdumu var uzglabāt istabas temperatūrā 1 gadu.

5.4. **Atšķaidīts Bigsa/Sijārto šķīdums**

Atšķaida mērkolbā 25 ml koncentrēta Bigsa/Sijārto šķīduma (5.3.) ar ūdeni līdz 500 ml. Šķīdumu var uzglabāt istabas temperatūrā 1 mēnesi.

5.5. ***HPCL* tīrības ūdens pagatavošana**

Ultratīru ūdeni (6.8.) filtrē ar vakuuma filtrēšanas iekārtu (6.9.). Lai uzlabotu sūkņa darbību un iegūtu stabilu bāzes līniju, kustīgo fāzi katru dienu degazē ar kādu no pieejamām metodēm, piemēram, barbotējot ar hēliju, izmantojot ultraskaņu, vakuumu vai plūsmas degazēšanas iekārtu.

Piezīme. Lai paildzinātu kolonnas ekspluatācijas laiku, būtiski ir, lai eluentā ir pēc iespējas mazāks oglekļa dioksīda saturs un lai būtu novērsta atpakaļsaiste.

▼B

6. APARATŪRA

Parastā laboratorijas aparatūra un jo īpaši šāda:

6.1. ***HPCL* jonapmaiņas sveķu kolonna**

Kolonnas pildījums: 8 % sašūta polistiroldivinilbenzola kopolimērs ar katjonu apmaiņas funkcionālajām grupām svina jonu formā.

Kolonnas izmēri: augstums 300 mm, iekšējais diametrs aptuveni 8 mm.

Var izmantot cita diametra kolonnas, ja attiecīgi tiek noregulēts plūsmas ātrums.

6.2. **Aizsargkolonna**

Aizsargkolonna ir atsevišķa katjonu apmainītāja (H^+) un atsevišķa anjonu apmainītāja (CO_3-) apvienojums, kurā katrs ir iepildīts kolonnās aptuveni 30 mm × 4,6 mm (L × ID) lielumā (piem., mikroaizsargkolonnas mikroaizsargturētājā) un savienots slāņos vai jaukta slāņa formā, kas sastāv no *AG 50W–X4*, – daļiņu izmērs 400 (H^+) un AG3-X4A, daļiņu izmērs 200–400 (OH-) attiecībā 35:65 (m/m), kas ir manuāli iepildīts kolonnā, kuras izmērs ir aptuveni 20 × 9 mm (L × ID).

6.3. **Kolonnas termostats**

Termostats, kas spēj uzturēt temperatūru 85 °C ± 1 °C.

6.4. ***HPCL* sūknis**

Sūknis, kas spēj ģenerēt pastāvīgu plūsmas ātrumu (< 0,5 % fluktuāciju) 0,2–1,0 m/min.

6.5. ***HPCL* inžekcijas ierīce**

Automātisks paraugu sagatavotājs, kas spēj iesmidzināt 25 µl ar atkārtojamību < 0,5 %.

Alternatīvi var izmantot manuālu ierīci (tādas pašas prasības kā attiecībā uz automātisko paraugu gatavotāju).

6.6. ***HPCL* detektors**

Augsti jutīgs refrakcijas rādītāja detektors ar trokšņa līmeni < $5{,}10^{-9}$ RI vienības.

6.7. **Integrators**

Programmatūra vai integrators datu ieguvei, apstrādei un signālu laukumu un augstumu ģenerēšanai, kurus var pārvērst laktozes koncentrācijās.

6.8. **Ūdens attīrīšanas modulis**

Ierīce, kas spēj piegādāt ultratīru ūdeni (1. tipa), kura pretestība > 14 MΩ ·cm.

6.9. **Šķīdinātāja filtrēšanas modulis**

Ierīce, kas filtrē ūdeni caur membrānu filtru ar poru izmēru 0,45 µm.

Piezīme. Daudziem ūdens attīrīšanas moduļiem (6.8.) ir iebūvēti filtri ar poru izmēru 0,45 vai 0,2 µm. Ja ūdeni izmanto uzreiz, papildu filtrēšana nav nepieciešama.

6.10. **Analītiskie svari**

Svari ar rādījumu iedaļām 0,1 mg.

6.11. **Ūdens vanna**

Ūdens vanna, kurā var uzturēt 40 °C (±0,5).

6.12. **Centrifūga**

Spēj griezties ar ātrumu vismaz 3 000 g, ja lieto Ependorfa mēģenes vai ekvivalentas, vai arī lielākas mēģenes.

▼B

6.13. **Mērkolbas, 50 ml.**

Ietilpība 50 ml, A klase.

Piezīme. Ņemot vērā tilpuma koeficientu, var izmantot arī citas ietilpības kolbas.

6.14. **Mērkolbas, 100 ml**

Ietilpība 100 ml, A kategorija.

6.15. **Mērpipete**

Mērpipetes, 10 ml

Piezīme. Alternatīvi var izmantot rokas pipetētāju ar tilpumu 5 ml, pievienojot divkāršu 5 ml tilpumu reaģenta (5.3.).

7. PARAUGU ŅEMŠANA

Svarīgi, lai laboratorija saņemtu patiesi reprezentatīvus paraugus atbilstīgi ISO 707/IDF 50 ([iii]), kas nav bojāti vai izmainīti transportēšanas vai uzglabāšanas laikā.

8. LAKTOZES STANDARTŠĶĪDUMA GATAVOŠANA

8.1. **1. standarts**

Izšķīdina precīzi nosvērtu (ar rādījumu precizitāti 0,1 mg) daudzumu 50 mg laktozes monohidrāta (5.2.) mērkolbā ar tilpumu 100 ml (6.14.) un uzpilda ar ūdeni līdz atzīmei.

8.2. **2. standarts**

Izšķīdina precīzi nosvērtu (ar rādījumu precizitāti 0,1 mg) daudzumu 100 mg laktozes monohidrāta (5.2.) mērkolbā ar tilpumu 100 ml (6.14.) un uzpilda ar ūdeni līdz atzīmei.

Piezīme. Standarta šķīdumus var uzglabāt ne ilgāk par 1 nedēļu 5 °C temperatūrā.

9. TESTA PARAUGA SAGATAVOŠANA

9.1. **Parauga atšķaidīšana**

Iesver aptuveni 5 g pulvera 50 ml kolbā (6.13.) un pieraksta svaru ar precizitāti līdz 1 mg (W_1, (11.)). Pievieno 50 ml ūdens un pieraksta svara pieaugumu (W_2 (11.)) ar 0,01 g precizitāti. Noslēgto kolbu ievieto ūdens vannā (6.11.) uz 30 minūtēm, šajā laikā vairākas reizes to apvēršot. Ļauj atdzist līdz istabas temperatūrai.

9.2. **Parauga apstrāde**

Ņem aptuveni 1 g šā šķīduma un ievieto 50 ml mērkolbā (6.13.), pieraksta svaru ar 1 mg precizitāti (W_3 (11.)), pievieno 20 ml ūdens, pēc tam vēl 10 ml atšķaidīta Bigsa/Sijārto reaģenta (5.4.), uzpilda līdz atzīmei ar ūdeni. Pirmo 30 minūšu laikā 5 reizes lēni apvērš kolbu.

Pēc 1 stundas paņem alikvoto daļu un centrifugē (6.12.) ar 3 000 g 10 minūtes (ja izmanto lielāku ātrumu (g), centrifugē īsāku laiku). *HPCL* analīzei ņem centrifugāta alikvoto daļu.

10. HPCL NOTEIKŠANA

10.1. **HPCL iepriekšēja sagatavošana**

10.1.1. *Kolonnas un aizsargkolonnas uzstādīšana*

Uzstāda aizsargkolonnu (6.2.) ārpus kolonnas termostata (6.3.), bet kolonnu (6.1.) termostatā.

Piezīme. Ja termostatam nav cauruļu eluenta iepriekšējai uzsildīšanai, eluents jālaiž cauri aptuveni 15 cm garai nerūsējoša tērauda caurulei, kas ir termostatā pirms ievades kolonnā (eluents pirms ievades kolonnā obligāti jāuzsilda, pretējā gadījumā būs vērojama signāla paplašināšanās).

▼B

10.1.2. *Detektors un sākotnējā plūsma*

Lai iegūtu stabilu bāzes līniju, ieslēdz detektoru (6.6.) vismaz 24 stundas pirms analīzes sākuma. Iestata detektora iekšējo temperatūru 35 °C. Iestata plūsmas ātrumu 0,2 ml/min (6.4.) vismaz uz 20 minūtēm, bet kolonnas termostatu (6.3.) iestata istabas temperatūrā.

10.1.3. *Kolonnas krāsniņa un beigu plūsmas ātrums*

Iestata kolonnas termostatu (6.3.) uz 85 °C. Kad temperatūra ir sasniegta, pēc 30 minūtēm pakāpeniski palielina plūsmas ātrumu no 0,2 ml/min līdz 0,6 ml/min (6.4.). Ļauj iekārtai ar šādu plūsmas ātrumu un 85 °C temperatūru izlīdzināties 2 stundas vai kamēr iegūta stabila bāzes līnija.

10.1.4. *Integrēšana*

Rūpīgi izvēlas ieguves un integrācijas parametrus (6.7.) – datu ieguves ātrumu, jutīgumu, laika konstanti, signāla platumu un sliekšņa vērtību.

Laktozes izdalīšanās laiks ir aptuveni 11 min.

Piezīme. Daudzas datu ieguves programmas (6.7.) ļauj viegli izmērīt teorētisko plašu skaitu. Regulāri mēra 1. standarta (8.1.) teorētisko plašu skaitu, un, kad plašu skaits ir par 25 % mazāks nekā jaunas kolonnas sākotnējā tilpuma vērtība, nomaina kolonnu (6.1.).

10.1.5. *Aizsargkolonnas tests*

Regulāri pārbauda (vismaz vienu reizi katrai sērijai) aizsargkolonnas (6.2.) spēju eliminēt sāļus no parauga, injicējot 25 µl 0,05 % nātrija hlorīda šķīduma. Ikreiz, kad parādās signāli, aizsargkolonna ir jānomaina.

10.2. **Standartu apstrāde**

Katras analīžu sērijas sākumā ievada 25 µl (6.5.) 1. standarta (8.1.), pēc tam ievada 2. standartu (8.2.). Atkārto šo procedūru ik pēc 10–20 paraugiem, kā arī sērijas beigās.

10.3. **Paraugu apstrāde**

Ievada 25 µl parauga centrifugāta (9.2.).

11. APRĒĶINS UN REZULTĀTU IZTEIKŠANA

11.1. **Kalibrēšana**

Parasti rezultātu aprēķināšanai izmanto signālu augstumus, taču, ja signāliem ir pārāk daudz trokšņu, var izmantot signālu laukumus (kvantitatīvā satura noteikšanu ar signāla augstumu mazāk ietekmē zemas koncentrācijas komponentu signālus, kuri ir daļēji, bet nepietiekami atdalīti no laktozes signāla).

Datorprogrammai (6.7.) būtu jāaprēķina lineārā kalibrācijas līkne, kas iet caur sākumpunktu. Pārbauda iespējamo līknes nelinearitāti (acīmredzamu nelinearitāti, visticamāk, izraisa 1. (8.1.) vai 2. (8.2.) standarta pagatavošanas kļūdas, slikta integrācija, mazāk ticami – nepareizi funkcionējošs inžektors).

Ievadei izmanto aprēķinātās 1. (8.1.) un 2. (8.2.) standarta laktozes koncentrācijas mg/ml kā bezūdens laktozi.

Kalibrācijas līknes slīpumu (RF) nosaka kā laukuma attiecību pret koncentrāciju (mg/ml).

11.2. **Paraugi**

Analīzes rezultātus izsaka g/100 g un aprēķina, izmantojot datorprogrammu (6.7.) vai šādu formulu:

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

▼B

kur:

C: laktozes koncentrācija kā g/100 g pulvera

H: laktozes parauga signāla augstums

RF: kalibrācijas diagrammas atsauces koeficients (jeb slīpums) kā mV/mg/ml

W_1: pulvera parauga svars g (9.1.)

W_2: pulvera paraugam pievienotā ūdens svars g (9.1.)

W_3: atšķaidītā pulvera šķīduma parauga svars g (9.2.)

50: (9.2.) izmantotās mērkolbas tilpums

0,1: koeficients rezultātu konversijai par g/100 g

12. PRECIZITĀTE

Lielumus, kas iegūti starplaboratoriju pārbaudē, drīkst piemērot tikai minētajiem analizējamo vielu koncentrācijas diapazoniem un matricēm. Atkārtojamības un reproducējamības lielumus atvasina no starplaboratoriju testa rezultātiem, kas veikti atbilstīgi ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Atkārtojamība**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi, ar identisku testa materiālu, tajā pašā laboratorijā, tam pašam operatoram izmantojot to pašu iekārtu neilgā laika posmā, pārsniedz xxx (nosakāms kopīgos pētījumos) ([v]) ne vairāk kā 5 % gadījumu.

12.2. **Reproducējamība**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi, ar identisku testa materiālu, dažādās laboratorijās, dažādiem operatoriem izmantojot atšķirīgu iekārtu, pārsniedz 0,5 g/100 g (nosakāms kopīgos pētījumos) ne vairāk kā 5 % gadījumu.

13. ATSAUCES

([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. (Piens un piena produkti. Paraugu ņemšanas metodes).

([iv]) ISO 5725–1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results (Mērījumu metožu un rezultātu pareizība (ticamība un precizitāte); 1. daļa).

([v]) ISO 5725–2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. daļa A basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (Mērījumu standartmetodes atkārtojamības un reproducējamības noteikšanas pamatmetode; 2. daļa).

▼B

XII PIELIKUMS

(9. pants)

SIERA SŪKALU KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANA VALSTS REZERVĒM PAREDZĒTAJĀ SAUSAJĀ VĀJPIENĀ AR KAZEĪNMAKROPEPTĪDU NOTEIKŠANU AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJĀ (HPCL)

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Ar šo metodi var noteikt siera sūkalu klātbūtni sausajā vājpienā, kas paredzēts valsts rezervju krājumiem, nosakot kazeīnmakropeptīdus.

2. ATSAUCE

Starptautiskais standarts ISO 707 "Piens un piena produkti – paraugu ņemšanas vadlīnijas" atbilstīgi I pielikuma 2. punkta c) apakšpunkta pēdējās daļas norādījumiem.

3. DEFINĪCIJA

Siera sūkalu sausnas saturu izsaka masas procentos, ko nosaka pēc kazeīnmakropeptīdu satura, kā paredzēts aprakstītajā procedūrā.

4. PRINCIPS

— Sausā vājpiena pulvera atšķaidīšana, tauku un olbaltumvielu atdalīšana ar trihloretiķskābi, pēc tam centrifugēšana vai filtrēšana.

— Kazeīnmakropeptīdu (KMP) daudzuma noteikšana centrifugātā ar augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju (*HPCL*).

— To rezultātu novērtēšana, kuri iegūti, paraugus salīdzinot ar standartparaugiem, kas sastāv no sausā vājpiena, kam ir vai nav pievienota zināma daļa sauso sūkalu.

5. REAĢENTI

Visiem reaģentiem jābūt ar atzītu analītisko tīrību. Jāizmanto destilēts ūdens vai ūdens ar vismaz līdzvērtīgu tīrību.

5.1. **Trihloretiķskābes šķīdums**

Izšķīdina 240 g trihloretiķskābes (CCI_3COOH) ūdenī un uzpilda līdz 1 000 ml. Šķīdumam būtu jābūt pilnīgi dzidram un bezkrāsainam.

5.2. **Eluenta šķīdums, pH 6,0**

Apmēram 700 mililitros ūdens izšķīdina 1,74 g dikālija hidrogēnfosfāta (K_2HPO_4), 12,37 g kālija dihidrogēnfosfāta (KH_2PO_4) un 21,41 g nātrija sulfāta (Na_2SO_4). Vajadzības gadījumā noregulē pH uz 6,0, izmantojot fosforskābes vai kālija hidroksīda šķīdumu.

Uzpilda ar ūdeni līdz 1 000 ml un homogenizē.

Piezīme. Eluenta sastāvu iespējams atjaunināt, lai tas atbilstu standartu sertifikātiem vai kolonnu pildījuma materiāla ražotāju ieteikumiem.

Eluenta šķīdumu pirms izmantošanas filtrē caur membrānas filtru, kura poru diametrs ir 0,45 μm.

5.3. **Skalošanas šķīdinātājs**

Sajauc vienu daļu acetonitrila (CH_3CN) ar deviņām daļām ūdens. Maisījumu pirms izmantošanas filtrē ar membrānas filtru, kura poru diametrs ir 0,45 μm.

▼B

Piezīme. Skalošanai var izmantot jebkuru citu skalošanas šķīdinātāju ar baktericīdu iedarbību, kas nepasliktina kolonnas izšķirtspējas efektivitāti.

5.4. **Standartparaugi**

5.4.1. *Šīs regulas nosacījumiem (proti, [0]) atbilstīgs vājpiena pulveris.*

5.4.2. *Tas pats vājpiena pulveris, kas ir sajaukts ar 5 % (m/m) siera fermenta tipa sūkalu pulveri ar standarta sastāvu (piem., [5]).*

6. APARATŪRA

6.1. Analītiskie svari

6.2. Centrifūga, kas spēj sasniegt centrbēdzes spēku 2 200 g un kas aprīkota ar aizbāžamām centrifūgas mēģenēm, kuru ietilpība ir aptuveni 50 ml

6.3. Mehāniskais kratītājs

6.4. Magnētiskais maisītājs

6.5. Stikla piltuves, diametrs aptuveni 7 cm

6.6. Filtrpapīrs ar aptuveni 12,5 cm diametru vidēji ātrai filtrēšanai

6.7. Stikla filtrēšanas ierīce ar membrānas filtru, kura poru diametrs ir 0,45 μm

6.8. Mērpipetes, ar kurām var iepildīt 10 ml (ISO 648, A klase vai ISO/R 835), vai ierīce, ar ko divās minūtēs var pārnest 10,0 ml

6.9. Izdales iekārta, kas spēj izdalīt 20,0 ml aptuveni 50 °C karsta ūdens

6.10. Termostatējama ūdens vanna, noregulēta uz 25 ±0,5 °C

6.11. *HPCL* iekārta, kurai ir šādas sastāvdaļas:

6.11.1. Sūknis

6.11.2. Rokas vai automātiskais inžektors ar 15 līdz 30 μl tilpumu

6.11.3. Divas TSK 2 000-SW kolonnas virknē (garums 30 cm, iekšējais diametrs 0,75 cm vai līdzvērtīgas kolonnas)(piem., TSK 2 000-SWxl, viena Agilent Technologies Zorbax GF 250) un aizsargkolonna (3 cm x 0,3 cm), piepildīta ar I 125 vai līdzvērtīgas efektivitātes materiālu.

6.11.4. Kolonnas termostats, kas noregulēts uz 35 ± 1 °C.

6.11.5. Maināma viļņu garuma UV detektors, kas ļauj veikt mērījumus 205 nm diapazonā ar jutību 0,008 A.

6.11.6. Integrators, ar ko var veikt nepilnīgi sadalītu signālu integrāciju.

Piezīme. Ir iespējams strādāt ar kolonnām istabas temperatūrā, bet to izšķirtspēja ir nedaudz mazāka. Šādā gadījumā temperatūrai nevajadzētu atšķirties vairāk kā par ± 5 °C katrā atsevišķā analīžu kārtā.

7. PARAUGU ŅEMŠANA

7.1. Paraugi jāpaņem saskaņā ar Starptautiskajā standartā ISO 707 noteikto procedūru. Tomēr dalībvalstis var izmantot citu paraugu ņemšanas metodi ar nosacījumu, ka šī metode atbilst principiem, kas izklāstīti iepriekš minētajā standartā.

7.2. Paraugu glabā apstākļos, kas nepieļauj nekādu produkta bojāšanos vai sastāva izmaiņas.

8. PROCEDŪRA

▼B

8.1. **Testa parauga sagatavošana**

Sauso pienu ieber traukā, kura ietilpība ir apmēram divreiz lielāka par pulvera tilpumu un kas aprīkots ar hermētisku vāku. Trauku tūlīt aiztaisa. Sauso pienu labi sajauc, vairākkārt apvēršot trauku.

8.2. **Analizējamais paraugs**

Centrifūgas mēģenē (6.2.) vai piemērotā noslēdzamā mēģenē (50 ml) ieber 2,000 ±0,001 g testa parauga.

8.3. **Tauku un olbaltumvielu atdalīšana**

8.3.1. Analizējamam paraugam pievieno 20,0 g silta ūdens (50 °C). Pulveri izšķīdina, piecas minūtes kratot ar mehānisko kratītāju (6.3.). Mēģeni liek ūdens vannā (6.10.) un ļauj temperatūrai stabilizēties līdz 25 °C.

8.3.2. Pakāpeniski 2 minūšu laikā pievieno 10,0 ml trihloretiķskābes 25 °C (5.1.), rūpīgi maisot ar magnētisko maisītāju (6.4). Ieliek mēģeni ūdens vannā (6.10.) un atstāj uz 60 minūtēm.

8.3.3. Centrifugē (6.2.) 10 minūtes ar 2 200 g vai filtrē ar filtrpapīru (6.6.), izmetot pirmos 5 ml filtrāta.

8.4. **Hromatogrāfiskā noteikšana**

8.4.1. Iesmidzina 15 līdz 30 mikrolitrus precīzi nomērīta centrifugāta vai filtrāta (8.3.3.) HPCL iekārtā (6.11.), darbojoties ar plūsmas ātrumu – 1,0 ml eluenta šķīduma (5.2.) minūtē.

1. piezīme. Atkarībā no lietoto kolonnu iekšējā diametra vai kolonnu ražotāja instrukcijām var izmantot citu plūsmas ātrumu.

2.piezīme. Glabājiet eluenta šķīdumu (5.2.) 85 °C temperatūrā visu hromatogrāfiskās analīzes laiku, lai saglabātu eluentu degazētu un aizkavētu baktēriju vairošanos. Var veikt citus līdzīgus piesardzības pasākumus.

3. piezīme. Katrā pārtraukumā izskalo kolonnas ar ūdeni. Nekad neatstājiet tajās eluenta šķīdumu (5.2.).

Pirms katra vairāk nekā 24 stundu ilga pārtraukuma kolonnas skalo ar ūdeni, tad vismaz trīs stundas mazgā ar šķīdumu (5.3.), kura plūsmas ātrums ir 0,2 ml minūtē.

8.4.2. Testa parauga [E] hromatogrāfiskās analīzes rezultātā iegūst hromatogrammu, kurā katru signālu pēc tās izdalīšanās laika (RT) identificē šādi:

II signāls:	Hromatogrammas otrais signāls ar RT aptuveni 12,5 minūtes
III signāls:	Hromatogrammas trešais signāls ar RT aptuveni 15,5 minūtes, kas atbilst KMP

Kolonnu kvalitāte var ietekmēt atsevišķo signālu izdalīšanas laikus.

Integrators (6.11.6.) automātiski aprēķina katra signāla laukumu A:

A_{II}:	II signāla laukums
A_{III}.:	III signāla laukums

Pirms kvantitatīvas interpretācijas ir svarīgi novērtēt katras hromatogrammas izskatu, lai atklātu jebkuras novirzes iekārtas vai kolonnu nepareizu darbību vai analizējamā parauga izcelsmes vai īpašību dēļ.

Ja rodas šaubas, analīzi atkārto.

▼B

8.5. **Kalibrēšana**

8.5.1. Standartparaugiem (5.4.) precīzi piemēro procedūru, kas aprakstīta no 8.2. apakšpunkta līdz 8.4.2. apakšpunktam.

Izmanto svaigi sagatavotus šķīdumus, jo KMP noārdās 8 % trihloretiķskābes vidē. Zudumus novērtē kā 0,2 % stundā, ja temperatūra ir 30 °C.

8.5.2. Pirms paraugu hromatogrāfiskās noteikšanas kolonnas kondicionē, atkārtoti iesmidzinot standarta paraugu (5.4.2.) šķīdumā (8.5.1.), kamēr KMP atbilstīgā signāla laukums un izdalīšanas laiks kļūst konstants.

8.5.3. Nosaka reakcijas koeficientus R, iesmidzinot tādu pašu filtrāta (8.5.1.) tilpumu, kāds izmantots paraugiem.

9. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

9.1. **Aprēķina metode un formulas**

9.1.1. *Reakcijas koeficientu R aprēķināšana:*

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

kur:

R_{II} = II signāla reakcijas koeficients;

A_{II} [0] = atbilstīgi 8.5.3. apakšpunktam iegūtā standartparauga [0] II signālu laukumi.

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

kur:

R_{III} = III signāla reakcijas koeficients;

A_{III} [0] and A_{III} [5] = attiecīgi standartparaugu [0] un [5], kas iegūti, kā noteikts 8.5.3. apakšpunktā, III signālu laukumi;

W = sūkalu daudzums standartparaugā (5. punkts).

9.1.2. *Relatīvo signālu laukumu aprēķināšana paraugā [E]:*

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

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

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

kur:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = parauga [E] attiecīgi II, III un IV signāla relatīvie laukumi;

A_{II} [E], A_{III} [E] = saskaņā ar 8.4.2. iegūtā parauga [E] attiecīgi II un III signāla laukumi;

R_{II}, R_{III} = atbilstīgi 9.1.1 aprēķinātie reakcijas koeficienti.

9.1.3. *Parauga [E] III signāla relatīvā izdalīšanas laika aprēķins:* $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$,

kur:

RRT_{III} [E] = parauga [E] III signālas relatīvais izdalīšanas laiks;

RT_{III} [E] = atbilstīgi 8.4.2. iegūtā parauga [E] III signāla izdalīšanas laiks;

▼B

RT_{III} [5] = atbilstīgi 8.5.3. iegūtā kontrolparauga [5] III signāla izdalīšanas laiks.

9.1.4. Eksperimenti pierādīja, ka starp III signāla relatīvo izdalīšanas laiku, proti, RRT_{III} [E], un līdz 10 % pievienotā sūkalu pulvera procentuālo saturu ir lineāra sakarība

— RRT_{III} [E] ir < 1,000, ja sūkalu saturs ir > 5 %;

— RRT_{III} [E] ir < 1,000, ja sūkalu saturs ir > 5 %.

Pieļaujamās RRT_{III} lielumu svārstības ir ± 0,002.

Parasti RRT_{III} [0] lielums mazliet novirzās no 1,034. Atkarībā no kolonnu stāvokļa, lielums var tuvoties 1,000, tomēr tam vienmēr jābūt lielākam.

9.2. Sauso siera sūkalu procenta aprēķins paraugā:

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

kur:

W = siera sūkalu procentuālā daļa m/m paraugā [E];

S_{III} [E] = atbilstīgi 9.1.2. iegūtā testa parauga [E] III signāla relatīvais laukums;

1,3 = atspoguļo III signāla vidējo relatīvo laukumu, ko izsaka piena sūkalu gramos uz 100 g dažādas izcelsmes neatšķaidīta vājpiena pulvera. Šis skaitlis tika iegūts eksperimentāli;

S_{III} [0] = atspoguļo III signāla, kas ir vienāds ar $R_{III} \times A_{III}$ [0], relatīvo laukumu. Šīs vērtības tika iegūtas attiecīgi atbilstīgi 9.1.1. un 8.5.3.;

(S_{III} [0] – 0,9) = atspoguļo korekciju, kas jāveic vidējam relatīvajam laukumam 1,3, ja S_{III} [0] nav vienāds ar 0,9. Eksperimentāli noteiktais kontrolparauga [0] III signāla vidējais relatīvais laukums ir 0,9.

9.3. **Procedūras precizitāte**

9.3.1. *Atkārtojamība*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, vienam un tam pašam analītiķim veicot divas noteikšanas vienlaikus vai uzreiz vienu pēc otras identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu to pašu aparatūru, nepārsniedz 0,2 % m/m.

9.3.2. *Reproducējamība*

Starpība starp diviem atsevišķiem un neatkarīgiem rezultātiem, kas iegūti, divās dažādās laboratorijās analizējot identisku testa materiālu, nepārsniedz 0,4 % m/m.

9.4. **Interpretācija**

9.4.1. Pieņem, ka paraugā nav sūkalu, ja relatīvais III signāla laukums S_{III} [E], kas izteikts gramos siera sūkalu uz 100 g produkta, ir ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), kur

2,0 = maksimālā atļautā vērtība III signāla relatīvajam laukumam, ņemot vērā III signāla relatīvo laukumu, proti, 1,3, nenoteiktību, kas rodas vājpiena pulvera sastāva mainīguma dēļ, un metodes reproducējamību (9.3.2);

(S_{III} [0] – 0,9) = ir korekcija, kas jāveic, ja laukums S_{III} [0] nav 0,9 (skatīt 9.2. apakšpunktu).

9.4.2. Ja III signāla relatīvais laukums S_{III} [E] ir > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) un II signāla relatīvais laukums S_{II} [E] ≤ 160, tad siera sūkalu saturu nosaka, kā norādīts 9.2. punktā.

▼B

9.4.3. Ja III signāla relatīvais laukums S_{III} [E] ir > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) un II signāla relatīvais laukums S_{II} [E] ≤ 160, nosaka kopējo proteīnu daudzumu (P %); pēc tam novērtē 1. un 2. grafiku.

9.4.3.1. Dati, kas iegūti, analizējot tādus sausā vājpiena paraugus bez piemaisījumiem, kuriem ir augsts kopējais olbaltumvielu saturs, ir apkopoti 1. un 2. grafikā.

Nepārtrauktā līnija attēlo lineāro regresiju, kuras koeficienti ir aprēķināti ar mazāko kvadrātu metodi.

Pārtrauktā līnija norāda III signāla relatīvā laukuma augstāko robežu ar varbūtību, ka tā 90 % gadījumu netiek pārsniegta.

1. un 2. grafika pārtraukto taisno līniju vienādojumi attiecīgi ir:

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

kur attiecīgi:

S_{III} = ir III signāla relatīvais laukums, ko aprēķina kā kopējo proteīnu saturu vai saskaņā ar signāla relatīvo laukumu S_{II} [E];

P % = ir kopējais proteīnu daudzums, kas izteikts svara procentos;

(S_{II} [E] = ir parauga relatīvais laukums, kas aprēķināts atbilstīgi 9.1.2. punktam.

Šie vienādojumi ir ekvivalenti skaitlim 1,3, kas minēts 9.2. punktā.

Neatbilstību (T_1 un T_2) starp noteikto relatīvo laukumu S_{III} [E] un relatīvo laukumu S_{III} izsaka šādi: $T_1 = S_{III}[E] – [(0,376\ P\ \% –10,7) + (S_{III}[0] – 0,9)]T_2 = S_{III}[E] – [(0,0123\ S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] – 0,9)]$

9.4.3.2.

Ja T_1 un/vai T_2 ir nulle vai mazāks, siera sūkalu klātbūtni nevar noteikt.

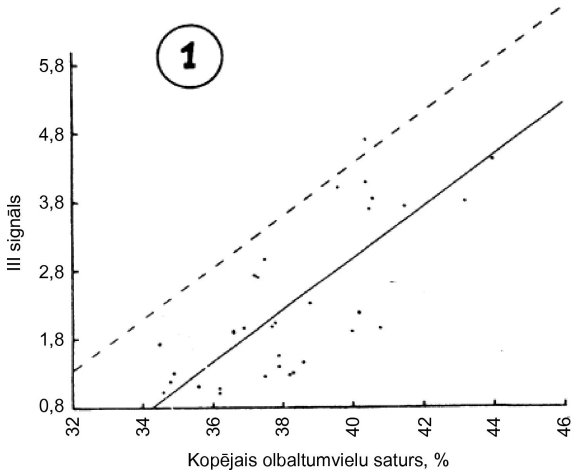
Ja T_1 un T_2 ir lielāks par nulli, siera sūkalas ir paraugā.

Siera sūkalu daudzumu aprēķina saskaņā ar šādu formulu: $W = T_2 + 0,91$,

kur:

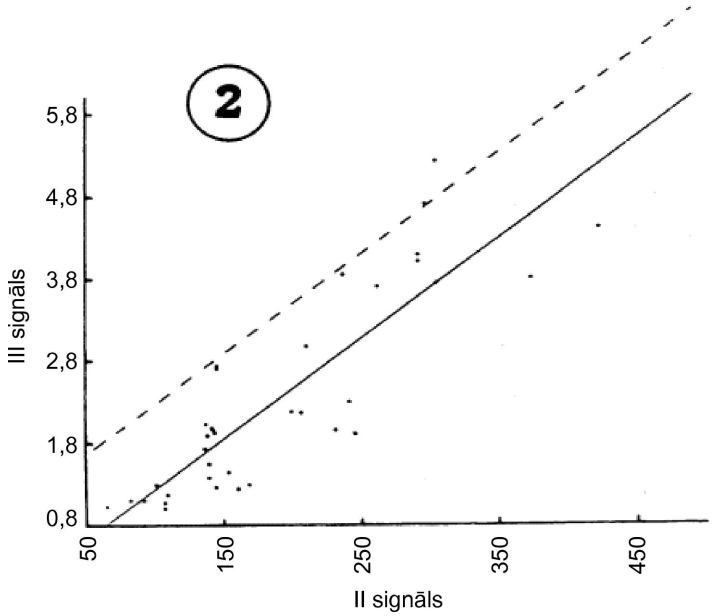
0,91 ir attālums uz vertikālās ass starp nepārtraukto un pārtraukto taisno līniju.

Sausais vājpiens



▼B

Sausais vājpiens



▼B

XIII PIELIKUMS

(9. pants)

SIERA SŪKALU SAUSNAS NOTEIKŠANA SAUSĀ VĀJPIENA PULVERĪ UN MAISĪJUMOS, KAS MINĒTI REGULĀ (EK) Nr. 2799/1999

1. MĒRĶIS: SIERA SŪKALU SAUSNAS KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANA:

a) sausā vājpiena pulverī, kas definēts Regulas (EK) Nr. 2799/1999 2. pantā; un

b) maisījumos, kas definēti Regulas (EK) Nr. 2799/1999 4. pantā.

2. ATSAUCES: STARPTAUTISKAIS STANDARTS ISO 707

3. DEFINĪCIJA

Siera sūkalu sausnas saturu izsaka masas procentos, ko nosaka pēc kazeīnmakropeptīdu satura, kā paredzēts aprakstītajā procedūrā.

4. PRINCIPS

Kazeīnmakropeptīdu saturu nosaka saskaņā ar XII pielikumu. Paraugiem, kam iegūti pozitīvi rezultāti, ar apgrieztās fāzes šķidruma hromatogrāfijas procedūru (*HPCL* procedūra) nosaka A kazeīnmakropeptīdus. Alternatīvi paraugus var tieši analizēt ar apgrieztās fāzes *HPCL* procedūru. Rezultātu novērtē pret standartparaugiem, kas sastāv no sausā vājpiena pulvera ar zināmu procentuālo daļu sauso sūkalu un bez tām. Rezultāti, kas pārsniedz 1 % (m/m), norāda uz siera sūkalu sausnas klātbūtni.

5. REAĢENTI

Visiem reaģentiem jābūt ar atzītu analītisko tīrību. Jāizmanto destilēts ūdens vai ūdens ar vismaz līdzvērtīgu tīrību. Acetonitrilam jābūt ar spektroskopisku vai *HPCL* tīrību.

Procedūrai vajadzīgie reaģenti ir aprakstīti šīs regulas XII pielikumā.

Reaģenti apgrieztās fāzes *HPCL*.

5.1. **Trihloretiķskābes šķīdums**

Izšķīdina ūdenī 240 g trihloretiķskābes (CCl_3COOH) un papildina līdz 1 000 ml. Šķīdumam būtu jābūt pilnīgi dzidram un bezkrāsainam.

5.2. **Eluenti A un B**

Eluents A: 1 000 ml mērkolbā ielej 150 ml acetonitrila (CH_3CN), 20 ml izopropanola ($CH_3CHOHCH_3$) un 1,00 ml trifluoretiķskābes (TFA, CF_3COOH). Uzpilda ar ūdeni līdz 1 000 ml.

Eluents B: 1 000 ml mērkolbā ielej 550 ml acetonitrila, 20 ml izopropanola un 1,00 ml TFA. Uzpilda ar ūdeni līdz 1 000 ml. Eluenta šķīdumu pirms izmantošanas filtrē caur membrānas filtru, kura poru diametrs ir 0,45 μm.

5.3. **Kolonnas uzglabāšana**

Pēc analīžu veikšanas kolonnu skalo ar eluentu B (izmantojot gradientu) un pēc tam skalo ar acetonitrilu (30 minūtes, izmantojot gradientu). Kolonnu uzglabā acetonitrilā.

5.4. **Standartparaugi**

5.4.1. Sausā vājpiena pulveris, kas atbilst prasībām attiecībā uz valsts rezerves krājumiem (t. i., [0]).

▼B

5.4.2. Tas pats sausā vājpiena pulveris, kas ir sajaukts ar 5 % (m/m) siera fermenta tipa sūkalu pulveri ar standarta sastāvu (piem., [5]).

5.4.3. Tas pats sausā vājpiena pulveris, kas ir sajaukts ar 50 % (m/m) siera fermenta tipa sūkalu pulveri ar standarta sastāvu (piem., [50]) ([1]).

6. APARATŪRA

Procedūrai vajadzīgā aparatūra ir aprakstīta šīs regulas XII pielikumā.

6.1. Analītiskie svari

6.2. Pēc izvēles centrifūga, kas spēj sasniegt centrbēdzes spēku 2 200 g un aprīkota ar aizbāžamām centrifūgas mēģenēm, kuru ietilpība ir aptuveni 50 ml

6.3. Mehāniskais kratītājs

6.4. Magnētiskais maisītājs

6.5. Stikla piltuves, diametrs aptuveni 7 cm

6.6. Filtrpapīrs ar aptuveni 12,5 cm diametru vidēji ātrai filtrēšanai

6.7. Stikla filtrēšanas ierīce ar membrānas filtru, kura poru diametrs ir 0,45 μm

6.8. Mērpipetes, ar kurām var iepildīt 10 ml (ISO 648, A klase vai ISO/R 835), vai ierīce, ar ko divās minūtēs var padot 10,0 ml

6.9. Izdales iekārta, kas spēj izdalīt 20,0 ml aptuveni 50 °C karsta ūdens

6.10. Ūdens vanna ar regulējamu temperatūru, kas noregulēta uz 25 ± 0,5 °C

6.11. HPCL iekārta, kurai ir šādas sastāvdaļas:

6.11.1. bināra gradientu sūknēšanas sistēma

6.11.2. rokas vai automātiskais inžektors ar 100 μl tilpumu

6.11.3. Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 kolonna (garums 25 cm, iekšējais diametrs 0,46 cm) vai līdzvērtīga lielporu silikagela apgrieztās fāzes kolonna

6.11.4. kolonnas termostats, kas noregulēts uz 35 ± 1 °C

6.11.5. mainīga viļņu garuma UV detektors, kas ļauj veikt mērījumus, ja viļņu garums ir 210 nm (vajadzības gadījumā var izmantot lielāku viļņu garumu līdz 220 nm) ar 0,02 Å jutību

6.11.6. integrators, kuru var iestatīt integrācijai ar kopējo bāzes līniju vai divu nepilnīgi atšķirtu signālu integrācijai

Piezīme. Kolonnas darbība istabas temperatūrā ir iespējama ar nosacījumu, ka telpas temperatūra nesvārstās vairāk kā par 1 °C, pretējā gadījumā rodas pārāk daudz GMP_A izdalīšanas laika variāciju.

7. PARAUGU ŅEMŠANA

7.1. Paraugi jāpaņem saskaņā ar Starptautiskajā standartā ISO 707 noteikto procedūru. Tomēr dalībvalstis var izmantot citu paraugu ņemšanas metodi ar nosacījumu, ka šī metode atbilst principiem, kas izklāstīti iepriekš minētajā standartā.

7.2. Paraugu glabā apstākļos, kas nepieļauj nekādu produkta bojāšanos vai sastāva izmaiņas.

8. PROCEDŪRA

([1]) Tādas sausās sūkalas ar siera fermentu, kurām ir standarta sastāvs, un arī sauso vājpienu ar piemaisījumiem var iegādāties no *NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL-6710 BA Ede*. Tomēr var izmantot arī tādus sausos produktus, kas ir līdzvērtīgi minētajiem *NIZO* sausajiem produktiem.

▼B

8.1. **Testa parauga sagatavošana**

Sauso pienu ieber traukā, kura ietilpība ir apmēram divreiz lielāka par pulvera tilpumu un kas aprīkots ar hermētisku vāku. Trauku tūlīt aiztaisa. Sauso pienu labi sajauc, vairākkārt apvēršot trauku.

8.2. **Analizējamais paraugs**

Centrifūgas mēģenē (6.2.) vai piemērotā noslēdzamā mēģenē (50 ml) iesver 2,00 ± 0,001 g testa parauga.

Piezīme. Maisījumu gadījumā nosveriet tādu testa parauga daudzumu, kurā attaukotā parauga daļa atbilst 2,00 g.

8.3. **Tauku un olbaltumvielu atdalīšana**

8.3.1. Analizējamam paraugam pievieno 20,0 g silta ūdens (50 °C). Izmantojot mehānisko kratītāju (6.3.), izšķīdina pulveri, kratot piecas minūtes vai – skābkrējuma paniņu gadījumā – 30 minūtes. Mēģeni liek ūdens vannā (6.10.) un ļauj temperatūrai stabilizēties līdz 25 °C.

8.3.2. Pakāpeniski 2 minūšu laikā pievieno 10,0 ml trihloretiķskābes 25 °C (5.1.), rūpīgi maisot ar magnētisko maisītāju (6.4.). Ieliek mēģeni ūdens vannā (6.10.) un atstāj uz 60 minūtēm.

8.3.3. Centrifugē (6.2.) 10 minūtes ar 2 200 g vai filtrē ar filtrpapīru (6.6.), izmetot pirmos 5 ml filtrāta.

8.4. **Hromatogrāfiskā noteikšana**

8.4.1. Veic HPLC analīzi, kā aprakstīts XII pielikumā. Ja iegūst negatīvu rezultātu, analizētais paraugs nosakāmajos daudzumos nesatur siera sūkalu sausnu. Ja rezultāts ir pozitīvs, jāpiemēro turpmāk aprakstītā apgrieztās fāzes HPCL procedūra. Alternatīvi var uzreiz lietot apgrieztās fāzes HPCL metodi. Ja paraugā ir skābkrējuma paniņu pulveris, ar XII pielikumā aprakstīto metodi var iegūt nepatiesi pozitīvus rezultātus. Apgrieztās fāzes HPCL metode izslēdz šādu iespēju.

8.4.2. Pirms apgrieztās fāzes HPCL analīzes veikšanas gradienta nosacījumi būtu jāoptimizē. GMP_A izdalīšanas laiks 26 ± 2 minūtes ir optimāls gradientu sistēmām ar apmēram 6 ml sajaukšanās tilpumu (tilpums no punkta, kurā šķīdinātāji saplūst kopā līdz parauga cilpas tilpumam, to ieskaitot). Gradientu sistēmās ar mazāku sajaukšanās tilpumu (piemēram, 2 ml) optimālajam izdalīšanas laikam vajadzētu būt 22 minūtēm.

Ņem standarta paraugu šķīdumus (5.4.) bez siera sūkalām un ar 50 % siera sūkalām.

Iesmidzina 100 µl centrifugāta jeb filtrāta (8.3.3.) HPCL iekārtā, kas darbojas atbilstīgi 1. tabulā paredzētajiem testa gradienta nosacījumiem.

1. tabula

Testa gradienta nosacījumi hromatogrāfijas optimizēšanai

Laiks (min)	Plūsma (ml/min)	% A	% B	Līkne
Sākotnējais	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lineāra
32	1,0	10	90	lineāra
37	1,0	10	90	lineāra
42	1,0	90	10	lineāra

Divu hromatogrammu salīdzinājumam jāatklāj GMP_A signāla atrašanās vieta.

▼B

Sākotnējo šķīdinātāja sastāvu, kuru jāizmanto normālgradientam, izmantojot turpmāk doto formulu (skatīt 8.4.3.) var aprēķināt kā % B = 10–2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 1,11,

kur:

RT_{KmpA}: KMP_A izdalīšanas laiks testa gradientam;

10: testa gradienta sākotnējais % B;

2,5: % B viduspunktā mīnus % B sākumā normālgradientā;

13,5: testa gradienta viduspunkta laiks;

26: KMP_A vajadzīgais izdalīšanas laiks;

6: testa un normālgradienta kāpumu attiecība;

30: % B sākumā mīnus % B testa gradienta 27 minūtēs

27: testa gradienta ilgums.

8.4.3. Ņem testa paraugu šķīdumus:

Iesmidzina 100 µl precīzi nomērīta centrifugāta jeb filtrāta (8.3.3.) HPCL iekārtā, kas darbojas ar plūsmas ātrumu 1,0 ml eluenta šķīduma (5.2.) minūtē.

Eluenta sastāvu analīžu sākumā nosaka, kā paredzēts 8.4.2. apakšpunktā. Parasti tas ir tuvu A:B = 76:24 (5.2.). Tūlīt pēc iesmidzināšanas novērojams lineārais gradients, tā rezultātā pēc 27 minūtēm B procentuālā daļa kļūst lielāka par 5 %. Pēc tam, kad novērots lineārais gradients, piecās minūtēs eluenta sastāvā B daudzumu palielina līdz 90 %. Šādu sastāvu saglabā piecas minūtes, pēc tam piecu minūšu laikā ar lineāro gradientu to maina līdz sākotnējam sastāvam. Atkarībā no sūknēšanas sistēmas iekšējā tilpuma nākamo iesmidzināšanu var veikt 15 minūtes pēc tam, kad sasniegti sākotnējie apstākļi.

1. piezīme. KMP_A izdalīšanas laikam vajadzētu būt 26 ± 2 minūtes. To var panākt, mainot pirmā gradienta sākotnējos un beigu apstākļus. Tomēr % B starpībai pirmā gradienta sākuma un beigu apstākļos jāpaliek 5 % B.

2. piezīme. Eluentiem vajadzētu būt pietiekami atgāzētiem, un tiem arī būtu jāpaliek atgāzētiem. Tas ir būtisks nosacījums pareizai gradientu sūknēšanas sistēmas darbībai. KMP_A signāla izdalīšanas laika standartnovirzei vajadzētu būt mazākai par 0,1 minūti (n = 10).

3. piezīme. Pēc katriem pieciem paraugiem (5.) būtu jāiesmidzina references paraugs un jāizmanto, lai aprēķinātu jauno atsauces koeficientu R (9.1.1.).

8.4.4. Testa parauga [E] hromatogrāfiskās analīzes rezultātus iegūst kā hromatogrammu, kurā KMP_A signālu nosaka pēc tās izdalīšanās laika, kas ir apmēram 26 minūtes.

Integrators (6.11.6.) automātiski aprēķina KMP_A signāla augstumu H. Katrā hromatogrammā jāpārbauda bāzes līnijas atrašanās vieta. Ja bāzes līnija atrodas nepareizā vietā, tad analīze vai integrācija ir jāatkārto.

▼B

Piezīme. Ja KMP_A signāls ir labi atdalīts no pārējiem signāliem, būtu jālieto nepilnīgi atdalītu signālu bāzes līnijas novietojums; pretējā gadījumā lieto uz kopējo bāzes līniju krītošos perpendikulārus, kuru sākumpunktam būtu jābūt KMP_A signāla tuvumā (tā nav, ja t = 0 min!). Izmanto viena veida integrācijas tipu standartparaugam un testa paraugiem, un kopējās bāzes līnijas gadījumā pārbauda tās atbilstību paraugiem un standartam.

Pirms kvantitatīvas interpretācijas ir svarīgi novērtēt katras hromatogrammas izskatu, lai atklātu jebkuras novirzes iekārtas vai kolonnu nepareizas darbības vai analizētā parauga izcelsmes dēļ. Ja rodas šaubas, analīzi atkārto.

8.5. **Kalibrēšana**

8.5.1. Standarta paraugiem (5.4.1. līdz 5.4.2.) piemēro tieši to procedūru, kas ir izklāstīta no 8.2. punkta līdz 8.4.4. punktam. Izmanto svaigi sagatavotus šķīdumus, tāpēc ka KMP_A istabas temperatūrā 8 % trihloretiķskābes klātbūtnē noārdās. Šķīdums saglabā stabilitāti 24 stundas 4 °C temperatūrā. Ja tiek veiktas garas analīžu virknes, automātiskajā inžektorā vēlams izmantot atdzesētu paraugu paplāti.

Piezīme. 8.4.2. apakšpunktu var izlaist, ja % B sākotnējos apstākļos ir zināmi no iepriekšējām analīzēm.

References parauga [5] hromatogrammai vajadzētu būt analogai 1. attēlā parādītajai. Šajā attēlā pirms KMP_A signāla ir divi mazi signāli. Ir būtiski iegūt līdzīgu atdalīšanos.

8.5.2. Pirms paraugu hromatogrāfiskās noteikšanas iesmidzina 100 µl standartparauga bez siera sūkalām [0] (5.4.1.).

Hromatogrammai nebūtu jāuzrāda signāla KMP_A signāla izdalīšanas laikā.

8.5.3. Nosaka reakcijas koeficientus R, iesmidzinot tādu pašu filtrāta (8.5.1.) tilpumu, kāds izmantots paraugiem.

9. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

9.1. **Aprēķina metode un formulas**

9.1.1. *Atsauces koeficienta R aprēķināšana:*

KMP_A signāls: R = W/H,

kur:

R = KMP_A signāla atsauces koeficients;

H = KMP_A signāla augstums;

W = sūkalu daudzums standartparaugā [5].

9.2. **Sauso siera sūkalu procenta aprēķins paraugā**

W(E) = R × H(E),

kur:

W(E) = siera sūkalu procentuālā daļa m/m paraugā [E];

R = KMP_A signāla atsauces koeficients (9.1.1.);

H(E) = parauga (E) KMP_A signāla augstums.

Ja W(E) ir lielāks par 1 % un starpība starp tā izdalīšanas laiku un standartparauga [5] izdalīšanas laiku ir mazāka par 0,2 minūtēm, tad ir konstatēta siera sūkalu sausnas klātbūtne.

9.3. **Procedūras precizitāte**

9.3.1. *Atkārtojamība*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, vienam un tam pašam analītiķim veicot divas noteikšanas vienlaikus vai uzreiz vienu pēc otras identiskiem testa materiāliem, izmantojot vienu un to pašu aparatūru, nepārsniedz 0,2 % m/m.

▼B

9.3.2. *Reproducējamība*

Nav noteikta.

9.3.3. *Linearitāte*

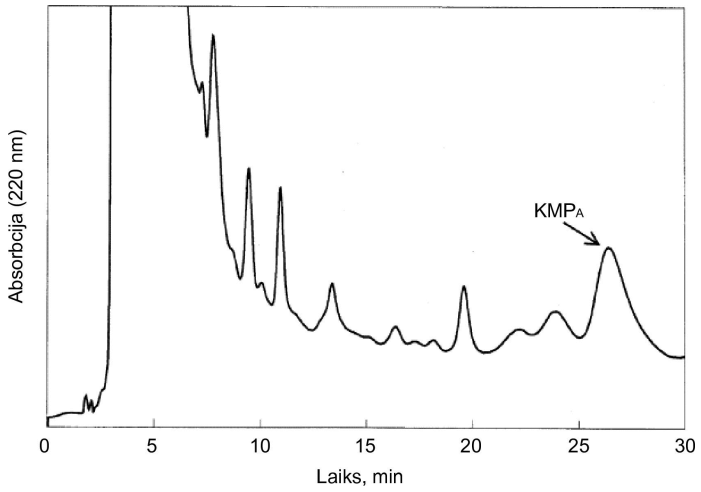
No 0 līdz 16 % siera sūkalu jāiegūst lineāra attiecība ar korelācijas koeficientu > 0,99.

9.4. **Interpretācija**

1 % robeža ir noteikta saskaņā ar Regulas (EEK) Nr. 214/2001 XIX pielikuma 9.2. un 9.4.1. punkta nosacījumiem, un tā ietver nenoteiktību reproducējamības dēļ.

1. tabula

Ni –4,6. standarts



▼B

XIV PIELIKUMS

(10. pants)

VĀJPIENA PULVERIM: FOSFATIDILSERĪNA UN FOSFATIDILETANOLAMĪNA KVANTITATĪVA NOTEIKŠANA

Metode: apgrieztās fāzes HPCL

1. MĒRĶIS UN PIEMĒROŠANAS JOMA

Ar šo metodi apraksta procedūru fosfatidilserīna (PS) un fosfatidiletanolamīna (PE) daudzuma noteikšanai sausajā vājpienā (SV) un paniņu sausnas klātbūtnes noteikšanai SV.

2. DEFINĪCIJA

PS + PE saturs: vielas masas daļa, ko nosaka, izmantojot šeit aprakstīto procedūru. Rezultātu izsaka fosfatidiletanolamīndipalmitoila (*PEDP*) miligramos uz 100 g attiecīgā sausā produkta.

3. METODES PRINCIPS

Aminofosfolipīdu ekstrakcija ar metanolu no atšķaidīta sausā piena. PS un PE kā o-ftalskābes dialdehīda (OPA) atvasinājumu noteikšana ar apgrieztās fāzes *HPCL* (RP) un fluorescences noteikšana. PS un PE kvantitatīva noteikšana testa paraugā pret standartparaugu, kas satur zināmu daudzumu *PEDP*.

4. REAĢENTI

Visiem reaģentiem jābūt ar atzītu analītisko tīrību. Ūdenim jābūt destilētam vai ar vismaz līdzvērtīgu tīrību, ja vien nav noteikts citādi.

4.1. **Standartmateriāls: *PEDP* ar vismaz 99 % tīrību.**

Piezīme. Standartmateriāls jāuzglabā -18 °C temperatūrā.

4.2. **Reaģenti standartparaugu un testa paraugu sagatavošanai**

4.2.1. Metanols ar *HPCL* tīrības pakāpi

4.2.2. Hloroforms ar *HPCL* tīrības pakāpi

4.2.3. Triptamīna monohidrohlorīds

4.3. **Reaģenti o-ftalskābes dialdehīda atvasinājumu iegūšanai**

4.3.1. Nātrija hidroksīda 12 M šķīdums ūdenī

4.3.2. Borskābes 0,4 M šķīdums ūdenī, kuram ar nātrija hidroksīdu (4.3.1.) pH noregulēts uz 10,0

4.3.3. 2-merkaptoetanols

4.3.4. o-ftalskābes dialdehīds (OPA)

4.4. ***HPCL* eluēšanas šķīdinātāji**

4.4.1. Eluēšanas šķīdinātāji jāsagatavo, izmantojot reaģentus ar *HPCL* tīrības pakāpi.

4.4.2. Ūdens ar *HPCL* tīrības pakāpi

4.4.3. Metanols ar fluorimetriski testētu tīrību

4.4.4. Tetrahidrofurāns

4.4.5. Nātrija dihidrogēnfosfāts

4.4.6. Nātrija acetāts

4.4.7. Etiķskābe

5. APARATŪRA

5.1. Analītiskie svari, kuros var nosvērt ar 1 mg precizitāti un kuru rādījumu iedaļa ir 0,1 mg.

▼B

5.2. Mērglāzes ar 25 un 100 ml tilpumu

5.3. Pipetes, ar kurām var iepildīt 1 un 10 ml

5.4. Magnētiskais maisītājs

5.5. Mērpipetes, ar kurām var iepildīt 0,2, 0,5 un 5 ml

5.6. Mērkolbas ar 10, 50 un 100 ml tilpumu

5.7. Šļirces ar 20 un 100 µl tilpumu

5.8. Ultraskaņas vanna

5.9. Centrifūga, kuru var darbināt ar ātrumu 27 000 × g

5.10. Stikla mēģenes ar aptuveni 5 ml tilpumu

5.11. Mērcilindrs ar 25 ml tilpumu

5.12. pH metrs ar precizitāti līdz 0,1 pH vienībai

5.13. *HPCL* iekārta

5.13.1. Sūknēšanas sistēma ar gradientu, kas spēj darboties ar 1,0 ml/min 200 atmosfēru spiedienā

5.13.2. Automātisks paraugu noņēmējs ar derivatizācijas iespēju

5.13.3. Kolonnas termostats, kas spēj uzturēt kolonnā 30 °C ± 1 °C temperatūru

5.13.4. Fluorescences detektors, kas noregulēts uz 330 nm ierosas viļņu garumu un uz 440 nm emisijas viļņu garumu

5.13.5. Integrators vai datu apstrādes programmatūra, kas spēj izmērīt signālu laukumu

5.13.6. Lichrosphere–100 kolonna (250 × 4,6 mm) vai līdzvērtīgas kolonnas, kas pildītas ar oktadecilsilānu (C 18), kura daļiņu izmērs ir 5 µm.

6. PARAUGU ŅEMŠANA

Paraugu ņemšana jāveic saskaņā ar ISO standartu 707.

7. PROCEDŪRA

7.1. **Iekšējā standartšķīduma sagatavošana**

7.1.1. Mērkolbā ar 100 ml tilpumu (5.6.) iesver 30,0 ± 0,1 mg triptamīna monohidrohlorīda (4.2.3.) un uzpilda līdz atzīmei ar metanolu (4.2.1.).

7.1.2. Ar pipeti (5.3.) iepilina 1 ml šā šķīduma mērkolbā ar 10 ml tilpumu (5.6.) un uzpilda līdz atzīmei ar metanolu (4.2.1.), lai iegūtu 0,15 mM triptamīna koncentrāciju.

7.2. **Testa parauga šķīduma sagatavošana**

7.2.1. Vārglāzē ar 25 ml tilpumu (5.2.) iesver 1,000 ± 0,001 g SV parauga. Ar pipeti (5.3.) pievieno 10 ml destilēta ūdens, kura temperatūra ir 40 °C, un maisa ar magnētisko maisītāju (5.4.) 30 minūtes, lai izšķīdinātu visus gabaliņus.

7.2.2. Mērkolbā ar 10 ml tilpumu (5.6.) ar pipeti iepilina 0,2 ml (5.5.) atšķaidīta piena, pievieno 100 µl 0,15 mM triptamīna šķīduma (7.1.), izmantojot šļirci (5.7.), un uzpilda tilpumu ar metanolu (4.2.1.). Apgriežot otrādi ultraskaņas vannā, 15 minūtes rūpīgi maisa (5.8.).

7.2.3. Centrifugē (5.9.) 10 minūtes ar 27 000 × g un savāc centrifugātu stikla pudelītē (5.10.).

Piezīme. Līdz *HPCL* analīžu veikšanai, testa parauga šķīdums jāglabā 4 °C temperatūrā.

7.3. **Ārējā standartšķīduma sagatavošana**

▼B

7.3.1. Mērkolbā ar 50 ml tilpumu (5.6.) iesver 55,4 mg PEDP (4.1.) un, izmantojot mērcilindru (5.11.), pievieno apmēram 25 ml hloroforma (4.2.2.). Karsē noslēgto kolbu līdz 50 ± 1 °C un rūpīgi sajauc, līdz PEDP izšķīst. Atdzesē kolbu līdz 20 °C, uzpilda līdz tilpumam ar metanolu (4.2.1.) un maisa, apvēršot otrādi.

7.3.2. Mērkolbā ar 100 ml tilpumu (5.6.) ar pipeti iepilina 1 ml (5.3.) šā šķīduma un uzpilda tilpumu ar metanolu (4.2.1.). Mērkolbā ar 10 ml tilpumu (5.6.) ar pipeti iepilina 1 ml (5.3.) šā šķīduma, pievieno 100 µl (5.7.) 0,15 mm triptamīna šķīduma (7.1.) un uzpilda tilpumu ar metanolu (4.2.1.). Sajauc, apvēršot otrādi.

Piezīme. Līdz *HPCL* analīžu veikšanai, references parauga šķīdums ir jāuzglabā 4 °C temperatūrā.

7.4. **Atvasinājumu iegūšanas reaģenta sagatavošana**

Mērkolbā ar 10 ml tilpumu (5.6.) iesver 25,0 ± 0,1 mg OPA (4.3.4.), pievieno 0,5 ml (5.5.) metanola (4.2.1.) un rūpīgi sajauc, lai izšķīdinātu OPA. Uzpilda līdz atzīmei ar borskābes šķīdumu (4.3.2.) un ar šļirci (5.7.) pievieno 20 µl 2-merkaptoetanola (4.3.3.).

Piezīme. Atvasinājumu iegūšanas reaģents ir jāuzglabā 4 °C temperatūrā brūnā pudelē, un tas ir stabils vienu nedēļu.

7.5. **Noteikšana ar *HPCL***

7.5.1. *Eluēšanas šķīdinātāji (4.4.)*

Šķīdinātājs A: 0,3 mM nātrija dihidrogēnfosfāta un 3 mM nātrija acetāta šķīdums (kuram ar etiķskābi noregulēts pH 6,5 ± 0,1): metanols: tetrahirofurāns = 558:440:2 (v/v/v)

Šķīdinātājs B: metanols

7.5.2. *Ieteicamais eluēšanas gradients:*

Laiks (min)	Šķīdinātājs A (%)	Šķīdinātājs B (%)	Plūsmas ātrums (ml/min)
Sākotnējais	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

Piezīme. Iespējams, ka eluēšanas gradients mazliet jāmaina, lai sasniegtu izšķirtspēju, kas parādīta 1. attēlā.

Kolonnas temperatūra: 30 °C.

7.5.3. *Iesmidzināmais tilpums: 50 µl atvasinājumu veidošanas reaģenta un 50 µl parauga šķīduma.*

▼B

7.5.4. *Kolonnas izlīdzināšana*

Sākot ikdienas darbu, kolonnu 15 minūtes skalo ar 100 % šķīdinātāju B, tad iepilda A:B = 40:60 un 15 minūtes izlīdzina ar 1 ml/min. Darbina tukšgaitā, iesmidzinot metanolu (4.2.1.).

Piezīme. Pirms ilgtermiņa uzglabāšanas kolonnu 30 minūtes skalo ar metanolu:hloroformu = 80:20 (v/v).

7.5.5. *PS + PE satura noteikšana testa paraugā*

7.5.6. *Veic hromatogrāfiskās analīzes, saglabājot nemainīgu laiku starp analīžu sērijām, lai iegūtu konstantus izdalīšanas laikus. Uz katriem 5–10 testa paraugiem iesmidzina ārējo standartšķīdumu (7.3.), lai novērtētu atsauces koeficientu.*

Piezīme. Kolonna jātīra pēc katrām 20–25 analīzēm, skalojot vismaz 30 minūtes ar 100 % šķīdinātāju B (7.5.1.).

7.6. **Integrēšanas režīms**

7.6.1. *PEDP signāls*

PEDP eluē kā atsevišķs signāls. Nosaka signāla laukumu ar nepilnīgi sadalītu signālu integrāciju.

7.6.2. *Triptamīna signāls*

Triptamīns eluē kā atsevišķs signāls (1. attēls). Nosaka signāla laukumu ar nepilnīgi sadalītu signālu integrāciju.

7.6.3. *PS un PE signāluu grupas*

Aprakstītajos apstākļos (1. attēls) PS eluē kā divi nepilnīgi atdalīti galvenie signāli, pirms kuriem ir zemāks signāls. PE eluē kā trīs nepilnīgi atdalīti galvenie signāli. Nosaka katras signālu kopas kopējo laukumu, novietojot bāzes līniju, kā parādīts 1. attēlā.

8. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA UN IZTEIKŠANA

PS un PE saturu testa paraugā aprēķina šādi: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$,

kur:

C = PS vai PE saturs (mg/100 g pulvera) testa paraugā;

A_1 = standartparauga šķīduma (7.3.) PEDP signāla laukums;

A_2 = testa parauga šķīduma (7.2.) PS vai PE signāla laukums;

T_1 = standartparauga šķīduma triptamīna signāla laukums (7.3.);

T_2 = testa parauga šķīduma triptamīna signāla laukums (7.2.).

9. METODES PRECIZITĀTE

Piezīme. Atkārtojamības lielumi aprēķināti saskaņā ar IDF Starptautisko standardu ([1]). Provizoriskas reproducējamības robežas aprēķinātas saskaņā ar procedūru, kas noteikta šīs regulas III b) pielikumā.

([1]) Starptautiskais IDF standarts 135B/1991. Piens un piena produkti. Analītisko metožu precizitātes raksturojums. Kopēju pētījumu metodikas pamati.

▼B

9.1. **Atkārtojamība**

Atkārtojamības relatīvā standartnovirze, kas izsaka to neatkarīgo analītisko rezultātu mainīgumu, ko viens un tas pats laborants ieguvis ar to pašu testa paraugu, izmantojot to pašu aparatūru, tādos pašos apstākļos un īsā laika intervālā, nedrīkst pārsniegt 2 %. Ja divas noteikšanas ir veiktas ar šādiem nosacījumiem, relatīvā starpība starp diviem rezultātiem nedrīkst būt lielāka par 6 % no rezultātu vidējā aritmētiskā lieluma.

9.2. **Reproducējamība**

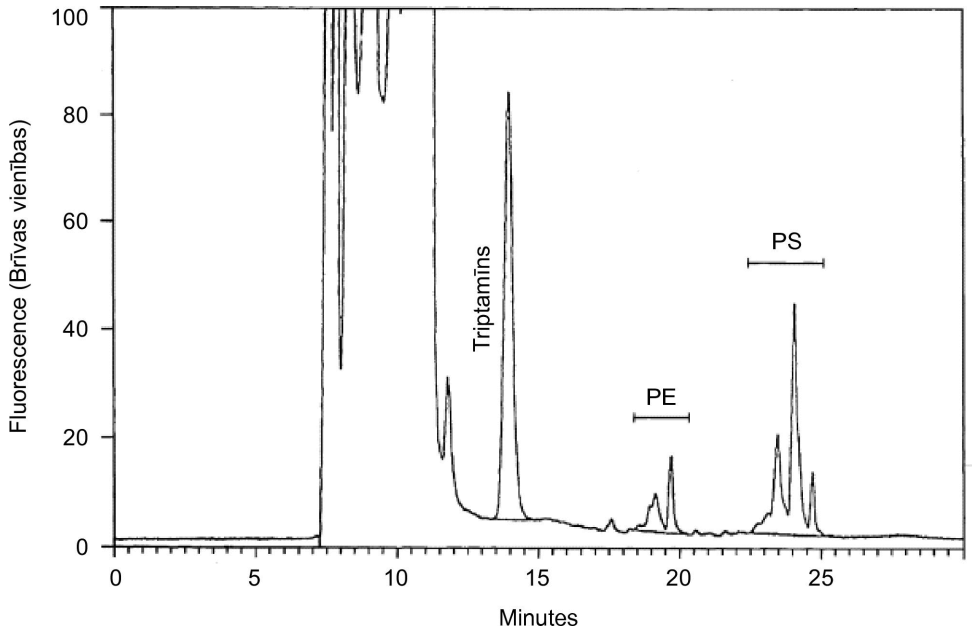
Ja laboranti dažādās laboratorijās vieniem un tiem pašiem testa paraugiem ar atšķirīgu aparatūru dažādos apstākļos veikuši divas noteikšanas, tad relatīvajai atšķirībai starp diviem rezultātiem nevajadzētu būt lielākai par 11 % no rezultātu vidējā aritmētiskā lieluma.

10. ATSAUCES

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. attēls

***HPCL* paraugs atšķaidīta sausā vājpiena fosfatidilserīna (PS) un fosfatidiletanolamīna (PE) OPA-atvasinājumiem metanola ekstraktā. Parādīts PS, PE un triptamīna (iekšējais standarts) signālu integrēšanas veids**



▼B

XV PIELIKUMS

(11. pants)

ANTIMIKROBIĀLU VIELU ATLIEKU NOTEIKŠANA VĀJPIENA PULVERĪ

Izmanto inhibitoru skrīninga testu ar *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis*, kas deponēts ar numuru ATCC 10149 (identisks celmam C953) kā testa mikroorganismu un ar pietiekamu jutīgumu, lai kilogramā pienā noteiktu 4 µg benzilpenicilīna un 100 µg sulfadimidīna klātbūtni. Pieejami komerciāli testu komplekti, un tos var izmantot, ja tiem piemīt benzilpenicilīna un sulfadimidīna noteikšanai vajadzīgais jutīgums.

Testam izmanto atšķaidītu sauso vājpienu (1 g pulvera +9 ml destilēta ūdens). Testu veic atbilstīgi standartam ISO/TS 26844:2006 "Piens un piena produkti – Antimikrobiālu vielu atlieku noteikšana – Kapilāru difūzijas tests *IDF*" (*Bulletin No 258/1991, section 1, Chapter 2*) vai atbilstīgi testa komplekta ražotāja instrukcijām ([1]).

Pozitīvus rezultātus interpretē šādi:

1. Beta-laktāmu klātbūtni var apstiprināt, testu atkārtojot, pievienojot testa sistēmai penicilināzi ([2]).

   Negatīvs rezultāts: inhibitorviela ir beta-laktāma antibiotika.

   Joprojām pozitīvs rezultāts: ar šo procedūru nevar identificēt inhibitoru. Turpina 2. soli.

2. Sulfonamīdu klātbūtni var apstiprināt, testu atkārtojot, pievienojot testa sistēmai p-aminobenzoskābi.

   Negatīvs rezultāts: inhibitorviela ir sulfonamīds.

   Joprojām pozitīvs rezultāts: ar šo procedūru nevar identificēt inhibitoru. Turpina 3. soli.

3. Sulfonamīda un beta-laktāmu kombinācijas klātbūtni var apstiprināt, testu atkārtojot, pievienojot testa sistēmai penicilināzi un p-aminobenzoskābi.

   Negatīvs rezultāts: inhibitorvielas ir beta-laktāmu antibiotika un sulfonamīds.

   Pozitīvs rezultāts: ar šo procedūru nevar identificēt inhibitoru.

([1]) Svarīga piezīme: analizējot sauso vājpienu, var iegūt kļūdaini pozitīvus rezultātus. Tas ir svarīgi tādēļ, lai pārbaudītu, vai izmantotā testa sistēma nedod kļūdaini pozitīvus rezultātus.

([2]) Daži beta-laktāmi ir mazāk jutīgi pret beta-laktamāzi. Šādos gadījumos ieteicama parauga papildu priekšapstrāde (1 ml testa paraugam pievieno 0,3 ml penāzes koncentrāta un iztur 37 °C 2 stundas).

▼B

XVI PIELIKUMS

(12. pants)

SAUSĀ VĀJPIENA KVANTITATĪVA NOTEIKŠANA KOMBINĒTAJĀ LOPBARĪBĀ AR PARAKAZEĪNA FERMENTATĪVĀS KOAGULĀCIJAS METODI

1. MĒRĶIS

Sausā vājpiena kvantitatīva noteikšana kombinētajā lopbarībā ar parakazeīna fermentatīvās koagulācijas metodi.

2. PIEMĒROŠANAS JOMA

Šo metodi piemēro kombinētajai lopbarībai, kas satur vismaz 10 % sausā vājpiena; daudz paniņu un/vai dažas olbaltumvielas, kas nav piena olbaltumvielas, var radīt traucējumus.

3. METODES PRINCIPS

3.1. Kazeīna, ko satur kombinētā lopbarība, šķīdināšana, ekstrahējot ar nātrija citrāta šķīdumu.

3.2. Kalcija jona koncentrācijas koriģēšana līdz vajadzīgajam līmenim, lai izgulsnētu parakazeīnu; pievienojot himozīnu.

3.3. Slāpekļa saturu parakazeīna nogulsnēs nosaka ar Kjeldāla metodi, kā aprakstīts ISO standartā 8968–2:2001/IDF 20–2:2001; sausā vājpiena daudzumu aprēķina, pamatojoties uz 27,5 % minimālo kazeīna saturu (skat. 8.1.).

4. REAĢENTI

Izmantotajiem reaģentiem jābūt ar analītisku tīrības pakāpi. Jāizmanto destilētais ūdens vai ūdens ar vismaz līdzvērtīgu tīrību. Visiem reaģentiem un šķīdumiem, izņemot himozīnu (4.5.), jābūt bez slāpekli saturošām vielām.

4.1. Trinātrija citrāta dihidrāts (1 % m/V šķīdums)

4.2. Kalcija hlorīds (aptuveni 5 M šķīdums)

Izšķīdina kratot 75g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 100 ml-os destilēta ūdens (jāievēro piesardzība, tā ir eksotermiska reakcija). Atstāj šķīdumu pa nakti un pēc tam filtrē. Šķīdumu glabā ledusskapī.

4.3. 0,1 n nātrija hidroksīds

4.4. 0,1 n sālsskābe

4.5. Šķidrs teļu kuņģa himozīns (stiprums aptuveni 100 IMCU/ml atbilstīgi ISO standartam 11815/IDF 157). Glabā ledusskapī no 4 līdz 6 °C temperatūrā.

4.6. Reaģenti slāpekļa kvantitatīvai noteikšanai pēc Kjeldāla metodes, kā aprakstīts standartā ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001.

5. APARATŪRA

Parasta laboratorijas aparatūra, tostarp:

5.1. Piesta vai homogenizētājs

5.2. Analītiskie svari, kuros var nosvērt ar 1 mg precizitāti un kuru rādījumu iedaļa ir 0,1 mg

5.3. Galda centrifūga (500 g vai no 2 000 līdz 3 000 apgr./min) ar 50 ml mēģenēm un 2 000 g

5.4. Magnētiskais maisītājs ar (10 līdz 15 mm) magnētiskajiem stienīšiem

5.5. 150 līdz 200 ml vārglāzes

5.6. 250 un 500 ml kolbas

▼B

5.7. Stikla piltuves ar 60 līdz 80 mm diametru

5.8. Ātri filtrējoši bezpelnu filtri ar 150 mm diametru (*Whatman* Nr. 41 vai ekvivalenti)

5.9. Pipetes ar dažādiem nominālajiem tilpumiem

5.10. Termostatējama ūdens vanna, 37 ± 1 °C

5.11. pH metrs ar precizitāti līdz 0,1 pH vienībai

5.12. Termometrs, ar 1 °C precizitāti.

6. PROCEDŪRA

6.1. **Parauga sagatavošana**

Lai iegūtu viendabīgu maisījumu, 10 līdz 20 g parauga samaļ piestā vai homogenizē dzirnaviņās.

6.2. **Sausā piena šķīdināšana un nešķīstošā atlikuma atdalīšana**

6.2.1. Tieši 50 ml centrifūgas mēģenē iesver 1,000 ± 0,002 g labi sasmalcinātas kombinētās lopbarības (6.1.). Pievieno 30 ml trinātrija citrāta šķīduma (4.1.), kas iepriekš uzsildīts līdz 45 ± 2 °C. Ar magnētisko maisītāju maisa vismaz piecas minūtes vai enerģiski krata ar roku.

6.2.2. Centrifugē 10 minūtes ar 500 g (2 000 līdz 3 000 apgr./min) un dekantē tīro ūdens centrifugātu 150 līdz 200 ml vārglāzē, raugoties, lai nekas nepārlītu.

6.2.3. Saskaņā ar to pašu procedūru atlikumam veic vēl divas ekstrakcijas, pievienojot iegūtos ekstraktus pirmajam.

6.2.4. Ja virskārtā veidojas eļļas slānis, atdzesē ledusskapī, līdz tauki sacietē un ar lāpstiņu noņem cieto slāni.

6.3. **Kazeīna koagulēšana ar siera ierauga fermentiem**

6.3.1. Nepārtraukti maisot, kopējam ūdens ekstraktam (apmēram 100 ml) pa pilienam pievieno 3,4 ml piesātināta kalcija hlorīda šķīduma (4.2.). Ar NaOH (4.3.) vai HCl (4.4.) noregulē pH līdz 6,4–6,5. Liek termostatējamā ūdens vannā 37 ± 1 °C temperatūrā uz 15 līdz 20 minūtēm, lai iegūtu sāļu līdzsvaru. Tas kļūst uzskatāmāks, veidojoties vieglam duļķojumam.

6.3.2. Pārnes šķidrumu vienā centrifūgas mēģenē un centrifugē pie 2 000 g 10 minūtes, lai atdalītu izgulsnējušos vielu. Nesaskalojot nogulsnes, pārnes centrifugātu otrā centrifūgas mēģenē.

6.3.3. Atdzesē centrifugātu līdz 37 ± 1 °C temperatūrai. Maisot ekstraktu, pa pilienam pievieno 0,5 ml šķidrā siera ierauga (4.5.). Koagulācija notiek divās minūtēs.

6.3.4. Atkal ieliek paraugu ūdens vannā un uz 15 minūtēm atstāj 37 ± 1 °C temperatūrā. Izņem paraugu no vannas un maisot sajauc koagulātu. Centrifugē pie 2 000 g 10 minūtes. Filtrē centrifugātu caur piemērotu filtrpapīru (5.8.). Filtrpapīru saglabā. Mazgā nogulsnes centrifūgas mēģenē ar 50 ml ūdens apmēram 35 °C temperatūrā, maisot nogulsnes.

Atkal centrifugē pie 2 000 g 10 minūtes. Centrifugātu filtrē ar iepriekš saglabāto filtrpapīru.

6.4. **Kazeīna slāpekļa noteikšana**

6.4.1. Pēc mazgāšanas, izmantojot destilēto ūdeni, kvantitatīvi pārnes nogulsnes uz filtrpapīru, kas saglabāts no 6.3.4. apakšpunktā minētās darbības. Izžāvētu filtrpapīru liek Kjeldāla mēģenē. Nosaka slāpekli pēc Kjeldāla metodes, kā aprakstīts standartā ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001.

▼B

7. TUKŠĀ PARAUGA ANALĪZE

7.1. Tukšā parauga analīze jāveic regulāri, veicot mineralizāciju pēc Kjeldāla metodes, kas aprakstīta standartā ISO 8968–2:2001/IDF 20–2:2001. Bezpelnu filtrpapīru (5.8.), kas samitrināts ar maisījumu, kurš sastāv no 90 ml (4.1.) nātrija citrāta šķīduma, 2 ml kalcija hlorīda šķīduma (4.2.), 0,5 ml šķidrā ierauga (4.5.), mazgā ar 3 × 15 ml destilēta ūdens.

7.2. Skābes tilpums tukšā parauga analīzē jāatņem no skābes tilpuma (4.4.), kas izmantots parauga titrēšanai.

8. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

8.1. Sausā vājpiena procentuālo saturu kombinētajā lopbarībā aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

N ir parakazeīna slāpekļa procentuālais saturs;

27,5 ir koeficients noteiktā kazeīna pārvēršanai sausā vājpiena procentos;

2,81 un 0,908 ir korekcijas koeficienti, kas iegūti regresijas analīzēs.

9. METODES PRECIZITĀTE

9.1. **Atkārtojamība**

Vismaz 95 % izpētīto gadījumu viena un tā paša parauga atkārtotās analīzēs, ko veic tas pats laborants tajā pašā laboratorijā, iegūto rezultātu atšķirībām jābūt ne lielākām kā 2,3 g sausā vājpiena 100 grammos kombinētās lopbarības.

9.2. **Reproducējamība**

Vismaz 95 % izpētīto gadījumu viena un tā paša parauga analīzēs, ko veic divās laboratorijās, iegūto rezultātu atšķirībām jābūt ne lielākām par 6,5 g sausā vājpiena 100 grammos kombinētās lopbarības.

10. PIEZĪMES

10.1. Ja pievienots liels procentuālais daudzums zināmu olbaltumvielu, kas nav piena olbaltumvielas, un jo īpaši ja tās ir sojas olbaltumvielas, tad, karsējot kopā ar sauso vājpienu, var iegūt pārāk augstus rezultātus piena parakazeīnu līdzgulsnēšanās dēļ.

10.2. Ja pievieno paniņas, var iegūt mazliet pazeminātus skaitļus, jo nosaka tikai beztauku daļu. Ja pievienots zināms daudzums skābkrējuma paniņu, var iegūt ievērojami samazinātus skaitļus nepilnīgas izšķīšanas citrāta šķīdumā dēļ.

10.3. 0,5 % vai lielāka lecitīna daudzuma pievienošana arī var dot pazeminātus rezultātus.

10.4. Augstā temperatūrā karsēta sausā vājpiena pievienošana var dot pārāk lielus skaitļus saistībā ar atsevišķu noteiktu sūkalu olbaltumvielu līdzgulsnēšanos ar piena parakazeīnu.

▼B

XVII PIELIKUMS

(13. pants)

CIETES NOTEIKŠANA VĀJPIENA PULVERĪ, DENATURĒTA PIENA PULVERĪ UN KOMBINĒTAJĀ LOPBARĪBĀ

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Šī metode paredzēta tam, lai noteiktu cietes klātbūtni, kas denaturētā sausajā pienā pievienota kā marķieris.

Noteikšanas robeža pēc šīs metodes ir aptuveni 0,05 g cietes uz 100 g paraugu.

2. PRINCIPS

Reakcija balstās uz jodometrijā izmantoto reakciju:

— brīvā joda fiksēšana ar koloīdiem ūdens šķīdumā,

— absorbcija cietes micellās un krāsojuma veidošanās.

3. REAĢENTI

3.1. Joda šķīdums:

— jods: 1,0 g,

— kālija jodīds: 2,0 g,

— destilēts ūdens: 100 ml,

— izšķīdina 1,0 g joda un 2,0 g kālija jodīda ūdenī 100 ml mērkolbā. Atšķaida ar ūdeni līdz 100 ml atzīmei un sajauc.

4. APARATŪRA

4.1. Analītiskie svari

4.2. Verdoša ūdens vanna

4.3. Testa mēģenes, 25 mm × 200 mm.

5. PROCEDŪRA

Nosver 1,0 g parauga ar precizitāti līdz 0,1 g un pārnes to testa mēģenē (4.3.).

Pievieno 20 ml destilēta ūdens un krata, lai disperģētu paraugu.

Liek verdošā ūdens vannā (4.2.) un atstāj uz piecām minūtēm.

Izņem no vannas un atdzesē līdz istabas temperatūrai.

Pievieno 0,5 ml joda šķīduma (3.1.), sakrata un novēro izveidojušos krāsu.

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Zils krāsojums norāda uz dabīgās cietes klātbūtni paraugā.

Ja paraugs satur modificētu cieti, krāsa var nebūt zila.

7. PIEZĪMES

Krāsa, krāsas intensitāte un cietes izskats mikroskopā var mainīties atkarībā no dabīgās cietes izcelsmes (piemēram, kukurūzas vai kartupeļu) un modificētās cietes, kas ir paraugā.

Modificētas cietes klātbūtnē iegūtā krāsa kļūst violeta, sarkana vai brūna atkarībā no dabīgās cietes kristāliskās struktūras modifikācijas pakāpes.

▼B

XVIII PIELIKUMS

(14. pants)

MITRUMA SATURA NOTEIKŠANA KRĒJUMA PULVERĪ

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Šajā pielikumā ir noteikta metode mitruma satura noteikšanai krējuma pulverī.

2. TERMINI UN DEFINĪCIJAS

Šajā pielikumā piemēro šādu definīciju.

Mitrums ir masas zudums, kas noteikts ar šajā starptautiskajā standartā norādīto metodi.

To izsaka masas procentos.

3. PRINCIPS

Analizējamo paraugu žāvē 102 ± 2 °C temperatūrā, līdz iegūst konstantu masu, un sver, lai noteiktu masas zudumu.

4. APARATŪRA

Parastā laboratorijas aparatūra, un jo īpaši šāda:

4.1. Analītiskie svari, kuros var nosvērt ar 1 mg precizitāti un kuru rādījumu iedaļa ir 0,1 mg.

4.2. Ventilācijas tipa žāvēšanas skapis ar labu velkmi, kur visā telpā iespējams uzturēt 102 ± 2 °C temperatūru.

4.3. Eksikators, kurā ievietots svaigi žāvēts silikagels ar higrometrisku indikatoru vai cits efektīvs žāvēšanas līdzeklis.

4.4. Plakandibena trauki, aptuveni 25 mm dziļi, ar aptuveni 50 mm diametru, kas izgatavoti no piemērota materiāla (piemēram, stikla, nerūsējošā tērauda, niķeļa vai alumīnija) un kuriem ir cieši noslēdzams, bet viegli noņemams vāks.

4.5. Pudeles ar šlifa aizbāžņiem laboratorisko paraugu sajaukšanai

5. PARAUGU ŅEMŠANA

Svarīgi, lai laboratorija saņemtu patiesi reprezentatīvus paraugus, kas nav bojāti vai izmainīti transportēšanas un uzglabāšanas laikā.

Paraugu ņemšana nav šajā starptautiskajā standartā noteiktās metodes sastāvdaļa. Ieteikumi paraugu ņemšanai ir atrodami standartā ISO 707IDF 50.

Paraugs jāuzglabā tā, lai tas nebojātos un nemainītos tā sastāvs.

6. PARAUGA SAGATAVOŠANA

Rūpīgi sajauc testa paraugu, trauku atkārtoti kratot un apvēršot (ja nepieciešams, pēc tam, kad visi testa paraugi ir ievietoti pietiekamas ietilpības hermētiski noslēgtā tvertnē, lai ir iespējams šo darbību izpildīt).

Ja šajā procedūrā neiegūst pilnīgu homogenitāti, ņem analizējamos paraugus (divām atsevišķām analīzēm) no divām pēc iespējas tālāk esošām sagatavotā testa parauga punktiem.

7. PROCEDŪRA

7.1. **Trauka sagatavošana**

7.1.1. Karsē vaļēju trauku un vāku (4.4.) vismaz 1 stundu žāvēšanas skapī (4.2.) 102 ± 2 °C temperatūrā.

7.1.2. Uzliek traukam vāku un ievieto noslēgto trauku eksikatorā (4.3.), ļauj tam atdzist līdz svaru telpas temperatūrai, pēc tam nosver ar precizitāti līdz 1 mg un pieraksta svaru ar precizitāti līdz 0,1 mg.

▼B

7.2. **Analizējamais paraugs**

Ievieto traukā apmēram no 1 līdz 3 g sagatavotā testa parauga (6.), uzliek vāku un nosver ar precizitāti līdz 1 mg, pieraksta svaru ar precizitāti līdz 0,1 mg.

7.3. **Noteikšana**

7.3.1. Atver trauku, un ievieto vaļējo trauku un vāku uz 2 stundām žāvēšanas skapī (4.2.) 102 ± 2 °C temperatūrā.

7.3.2. Uzliek atkal vāku un ievieto noslēgto trauku eksikatorā, ļauj tam atdzist līdz svaru telpas temperatūrai, pēc tam nosver ar precizitāti līdz 1 mg un pieraksta svaru ar precizitāti līdz 0,1 mg.

7.3.3. Atkal atver trauku, un karsē trauku un vāku žāvēšanas skapī 1 stundu. Pēc tam atkārto darbību 7.3.2.

7.3.4. Atkārto karsēšanu un svēršanu tikmēr, kamēr masa samazinās par 1 mg vai mazāk vai palielinās starp divām secīgām svēršanām.

Aprēķiniem izmanto mazāko pierakstīto masu.

8. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA UN IZTEIKŠANA

8.1. **Aprēķināšana**

Mitrums, ko izsaka kā g/100 g ir vienāds ar:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

kur:

m_0 ir trauka un vāka (7.1.2.) masa gramos;

m_1 ir trauka, vāka un analizējamā parauga masa gramos pirms žāvēšanas (7.2.);

m_2 ir trauka, vāka un analizējamā parauga masa gramos pēc žāvēšanas (7.3.4.).

Rezultātu izsaka līdz otrajai zīmei aiz komata.

9. PRECIZITĀTE

Piezīme. Atkārtojamības un reproducējamības vērtības ir iegūtas starplaboratoriju testu rezultātā (skatīt *Steiger, G. Bulletin of IDF No 285/1993, p. 21–28*), kas veikti atbilstīgi standartam IDF 135B:1991. "Piens un piena produkti – Analītisko metožu precizitātes raksturlielumi – Kopdarbības pētījumu procedūras izklāsts".

9.1. **Atkārtojamība**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi ar identisku testa materiālu, tajā pašā laboratorijā, tam pašam operatoram izmantojot to pašu iekārtu neilgā laika posmā, nepārsniedz 0,20 g mitruma uz 100 gramiem produkta ne vairāk kā 5 % gadījumu.

9.2. **Reproducējamība**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi ar identisku testa materiālu, dažādās laboratorijās, dažādiem operatoriem izmantojot atšķirīgu iekārtu, nepārsniedz 0,40 g mitruma uz 100 g produkta ne vairāk kā 5 % gadījumu.

10. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatānorāda:

— visu informāciju, kas vajadzīga parauga pilnīgai identifikācijai,

— izmantoto parauga ņemšanas metodi, ja tā ir zināma,

— testa metodi, kas izmantota ar atsauci uz šo starptautisko standartu,

▼B

— visus datus par darbu, kas nav norādīti šajā starptautiskajā standartā vai tiek uzskatīti par neobligātiem, kā arī datus par visiem starpgadījumiem, kas var būt ietekmējuši rezultātus,

iegūtie testa rezultāti un, ja ir pārbaudīta atkārtojamība, galīgais iegūtais rezultāts.

▼B

XIX PIELIKUMS

(15. pants)

MITRUMA SATURA NOTEIKŠANA SKĀBKRĒJUMA SAUSAJĀS PANIŅĀS

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Noteikt mitruma saturu skābkrējuma sausajās paniņās, kas paredzēts dzīvnieku barībai.

2. PRINCIPS

Paraugu žāvē vakuumā. Masas zudumus nosaka sverot.

3. APARATŪRA

3.1. Analītiskie svari, kuros var nosvērt ar 1 mg precizitāti un iespējams nolasīt 0,1 mg.

3.2. Trauki no nerūsējoša metāla vai stikla ar vākiem, kas nodrošina hermētisku noslēgšanu; darba virsma, kas ļauj izklāt testa paraugu aptuveni 0,3 g/cm^2 slānī.

3.3. Regulējams elektrisks vakuuma žāvēšanas skapis ar eļļas sūkni un mehānismu karsta gaisa pūšanai cauri kolonnai, kas satur, piemēram, kalcija oksīdu vai kalcija sulfātu (kas satur mitruma indikatoru).

3.4. Eksikators ar efektīvu žāvēšanas līdzekli.

3.5. Termostatējams ventilācijas tipa žāvēšanas skapis, kas noregulēts uz 102 ± 2 °C.

4. PROCEDŪRA

Karsē trauku (3.2.) ar vāku žāvēšanas skapī (3.5.) vismaz vienu stundu. Traukam uzliek vāku, un tūlīt ieliek to eksikatorā (3.4.), atļauj atdzist līdz istabas temperatūrai un nosver ar precizitāti līdz 1 mg, pierakstot masu ar precizitāti līdz 0,1 mg.

Atver trauku un ievieto tajā aptuveni 5 g parauga, nosver ar precizitāti līdz 1 mg, pierakstot masu ar precizitāti līdz 0,1 mg. Trauku ar vāku novieto vakuuma žāvēšanas skapī (3.3.), kas ir iepriekš uzkarsēts līdz 83 °C. Lai novērstu žāvēšanas skapja krāsns temperatūras pārmērīgu samazināšanos, trauku ievieto pēc iespējas ātri.

Palielina spiedienu līdz 100 toriem (13,3 kPa) un ļauj izžūt šajā spiedienā karsta, sausa gaisa plūsmā līdz konstantam svaram (aptuveni 4 stundas).

Žāvēšanas laiku skaita no brīža, kad temperatūra žāvēšanas skapī atkal sasniegusi 83 °C. Žāvēšanas skapī uzmanīgi atjauno atmosfēras spiedienu. Žāvēšanas skapi atver, traukam tūlīt uzliek vāku, izņem trauku no žāvēšanas skapja, 30 līdz 45 minūtes atdzesē eksikatorā (3.4.) un nosver ar precizitāti līdz 1 mg, pierakstot masu ar precizitāti līdz 0,1 mg. Vēl 30 minūtes žāvē vakuuma žāvēšanas skapī (3.3.) 83 °C temperatūrā un vēlreiz nosver. Atkārto karsēšanu un svēršanu, līdz trauka ar vāku svars samazinās par 1 mg vai mazāk, vai palielinās starp divām secīgām svēršanām. Aprēķiniem izmanto mazāko pierakstīto masu.

5. APRĒĶINĀŠANA

% mitruma = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %,

kur:

m_0 ir trauka un vāka masa;

m_1 ir trauka, vāka un analizējamā parauga masa pirms žāvēšanas;

m_2 ir trauka, vāka un analizējamā parauga masa pēc žāvēšanas.

Rezultātu pieraksta ar precizitāti 0,1 g/100 g.

▼B

6. PRECIZITĀTE

6.1. **Atkārtojamības robeža**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi ar identisku testa materiālu, tajā pašā laboratorijā, tam pašam operatoram izmantojot to pašu iekārtu neilgā laika posmā, nepārsniedz 0,4 g ūdens uz 100 gramiem sauso paniņu ne vairāk kā 5 % gadījumu.

6.2. **Reproducējamības robeža**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi ar identisku testa materiālu, dažādās laboratorijās, dažādiem operatoriem izmantojot atšķirīgu iekārtu, nepārsniedz 0,6 g ūdens uz 100 g sauso skābkrējuma paniņu ne vairāk kā 5 % gadījumu.

6.3. **Precizitātes datu avots**

Precizitātes datus noteica eksperimentā, ko veica 1995. gadā, aptverot astoņas laboratorijas un 12 paraugus (sešas aklās dubultanalīzes).

▼B

XX PIELIKUMS

(16. pants)

PIENA TAUKU TĪRĪBAS NOTEIKŠANAS STANDARTMETODE, IZMANTOJOT TRIGLICERĪDU GĀZU HROMATOGRĀFIJAS ANALĪZI – 2. VERSIJA

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Šis standarts nosaka piena tauku tīrības noteikšanas standartmetodi, izmantojot triglicerīdu gāzu hromatogrāfisko analīzi. Iespējams noteikt gan augu izcelsmes taukus, gan dzīvnieku izcelsmes taukus, piemēram, liellopu taukus un cūku taukus.

Piena tauku homogenitāti nosaka, izmantojot zināmas triglicerīdu sakarības. Galvenokārt šo metodi piemēro lielam govs piena tilpumam vai tā produktiem, neatkarīgi no lopu barošanas, šķirnes vai laktācijas apstākļiem. Kļūdainus pozitīvus rezultātus var dot vienīgi liela daudzuma tīru augu izcelsmes eļļu, piemēram, rapšu eļļas, iebarošana. Arī piena produkti, kas iegūti no atsevišķu govju piena, var būt kļūdainu pozitīvu rezultātu cēlonis.

Šī metode ir īpaši piemērojama taukiem, kas ekstrahēti no piena produktiem, kuriem vajadzētu saturēt tīrus, neizmainīta sastāva piena taukus, piemēram, no sviesta, krējuma, piena un piena pulvera. Kļūdainus pozitīvus rezultātus var dot arī piena tauku tehnoloģiskā apstrāde, piemēram, holesterīna atdalīšana vai frakcionēšana. Tas pats attiecas arī uz piena taukiem, kas iegūti no vājpiena vai paniņām. Šo metodi nevar piemērot visiem no siera ekstrahētiem taukiem, jo siera nogatavināšanas process var tādā mērā ietekmēt tauku sastāvu, ka iegūst kļūdainus pozitīvus rezultātus.

1. piezīme. Sviestskābe (n-butānskābe) (C_4) ietilpst vienīgi piena taukos un ļauj kvantitatīvi novērtēt mazu vai vidēju piena tauku daudzumu augu vai dzīvnieku izcelsmes taukos. Lielas C_4 mainības dēļ masas frakcijas aptuvenā procentuālajā diapazonā no 3,1 % līdz 3,8 % tomēr ir grūti noteikt svešas izcelsmes tauku kvalitatīvo un kvantitatīvo saturu piena tauku masas frakcijās līdz 20 %[1].

2. piezīme. Praksē nav iespējams atvasināt kvantitatīvos rezultātus no augu tauku sterīnu satura, jo tie ir atkarīgi no iegūšanas un apstrādes apstākļiem. Bez tam svešas izcelsmes tauku kvalitatīva noteikšana, izmantojot sterīnus, ir apšaubāma.

2. DEFINĪCIJA

Piena tauku tīrība: augu un dzīvnieku tauku neesamība, kas noteikta ar šajā standartā izklāstīto procedūru.

Piezīme. Tīrību nosaka, izmantojot *S*-vērtības, kuras aprēķina no triglicerīdu sastāva. Triglicerīdu masas daļas izsaka procentos.

3. METODES PRINCIPS

No piena vai piena produktiem ekstrahētos taukus analizē ar gāzu hromatogrāfiju, kurā izmanto pildītu vai īsu kapilāru kolonnu, lai noteiktu triglicerīdus (TGs), atdalot pēc kopējā oglekļa atomu skaita. *S*-vērtības aprēķina, ievietojot procentos izteiktu dažādu garumu (C_{24} līdz C_{54}, izmantojot tikai C skaita pāra skaitļus) tauku molekulu masas daļu piemērotos TG vienādojumos. Ja *S*-vērtības pārsniedz tīriem piena taukiem noteiktās robežvērtības, tad konstatē svešas izcelsmes tauku klātbūtni.

▼B

1. piezīme. Gan pildīto, gan kapilāro kolonnu piemērotība un līdzvērtība ir parādīta jau iepriekš [2–4].

2. piezīme. S-vērtība ir TG masas daļu summa, kas reizināta ar attiecīgi noteiktiem koeficientiem.

4. REAĢENTI

Visi reaģenti ir atzītas analītiskas tīrības.

4.1. Nesējgāze, slāpeklis vai, alternatīvi, hēlijs vai ūdeņradis ar tīrību vismaz 99,995 %.

4.2. Tauku standarti piena tauku standarta standartizācijai atbilstīgi 7.3.3. apakšpunktam.

4.2.1. Triglicerīdu standarti, piesātināti, piemēroti produkti ir nopērkami.

4.2.2. Holesterīna standarts

4.3. Bezūdens metanols (CH_3OH)

4.4. n-heksāns ($CH_3(CH_2)4CH_3$)

4.5. n-heptāns ($CH_3(CH_2)5CH_3$)

4.6. Citas gāzes – ūdeņradis ar tīrību vismaz 99,995 %, bez organisko vielu piemaisījumiem (C_nH_m < 1 µl/l); saspiests gaiss organisku vielu piemaisījumiem (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Bezūdens nātrija sulfāts (Na_2SO_4)

5. APARATŪRA

Parastā laboratorijas aparatūra, un jo īpaši šāda:

5.1. **Augstas temperatūras gāzu hromatogrāfs**

Augstas temperatūras gāzu hromatogrāfam jābūt piemērotam darbam vismaz 400 °C temperatūrā un aprīkotam ar liesmas jonizācijas detektoru (LJD). Inžektorā lietotajām blīvēm jāiztur augstas temperatūras, izrādot ļoti zemu "asiņošanas" (pakāpeniskas šķidrās fāzes samazināšanās) pakāpi. Kapilārajos gāzu hromātogrāfos lieto inžektoru kolonnā. Kolonnas, inžektora un/vai detektora starplikām (ja tādas lieto) savienojumos lieto grafīta blīvējumu.

5.2. **Hromatogrāfijas kolonna**

5.2.1. *Pakotā kolonna*

Izmanto stikla kolonnas ar iekšējo diametru 2 mm un garumu 500 mm, kas pildīta ar 3 % OV-1 uz 125 µm līdz 150 µm *Gas ChromQ* ([1]) (daļiņu izmērs 100 līdz 120) kā stacionāro fāzi. Pakotās kolonnas sagatavošana, silanizēšana, pildīšana un kondicionēšana aprakstīta A pielikumā.

Alternatīvi var izmantot kapilāro kolonnu (5.2.2.).

5.2.2. *Kapilārā kolonna*

Lieto īsu kapilāro kolonnu, piemēram, 5 m garu ar polāru stacionāro fāzi, kas spēj darboties 400 °C temperatūrā un augstākā ([2]). Kondicionē kolonnu, veicot 20 piena tauku šķīduma (7.2.) analīzes 2 līdz 3 dienu laikā, izmantojot 7.3.4.2. apakšpunktā dotos iestatījumus. Pēc tam atsauces koeficientiem (7.3.3.) jābūt tuvu 1, bet mazākiem par 1,20.

Piezīme. Var izmantot citu izmēru kolonnas un citu nepolāru, pret augstu temperatūru izturīgu fāzi, ja vien to efektivitāte atbilst šim standartam. Skatīt arī 7.3.4.2. apakšpunktu.

([1]) Piemērotu produktu piemēri ir nopērkami. Šī informācija ir tikai starptautiskā standarta lietotāju ērtībai, tā nav šī izstrādājuma atbalstīšana.

([2]) *CP-Ultimetal SimDist* (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) ir piemērota nopērkama izstrādājuma piemērs. Šī informācija ir tikai starptautiskā standarta lietotāju ērtībai, tā nav šī izstrādājuma atbalstīšana.

▼B

5.3. *Extrelut* kolonna ar tilpumu no 1 līdz 3 ml, pildīta ar silikagelu, nepieciešama vienīgi piena tauku ekstrakcijai atbilstīgi punktam 7.1.3.

5.4. Grafīta blīvējumi, kas iztur vismaz 400 °C temperatūru, lietojami GH kolonnas savienojumiem, kā arī inžektora un/vai detektora starplikām.

5.5. Ūdens vanna, kurā var uzturēt 50 °C ± 2 °C.

5.6. Termostats, kurā var uzturēt temperatūru 50 °C ± 2 °C un 100 °C ± 2 °C.

5.7. Mikropipete.

5.8. Graduēta pipete ar 5 ml tilpumu.

5.9. Apaļkolba ar 50 ml tilpumu.

5.10. Erlenmeijera kolba ar nominālo tilpumu 250 ml.

5.11. Piltuve.

5.12. Sīkporains filtrpapīrs.

5.13. Rotācijas ietvaicētājs

5.14. Ampulas ar nominālo tilpumu 1 ml, ar gofrētiem alumīnija vāciņiem ar politetrafluoretilēna oderējumu vai ar uzskrūvējamiem vāciņiem.

5.15. Injekciju šļirce ar virzuli, kas neaizsniedz adatas galu (pakoto kolonnu GH).

Piezīme. Ar šādām šļircēm iegūstami rezultāti ar labāku atkārtojamību.

5.16. Analītiskie svari, kuros var nosvērt ar 1 mg precizitāti un kuru rādījumu iedaļa ir 0,1 mg.

6. PARAUGU ŅEMŠANA

Uz laboratoriju būtu jāsūta reprezentatīvi paraugi. Tie nedrīkst būt bojāti vai izmainīti transportēšanas un uzglabāšanas laikā.

Paraugu ņemšana nav šajā starptautiskajā standartā noteiktās metodes sastāvdaļa. Ieteikumi paraugu ņemšanai ir atrodami standartā ISO 707IDF 50[5].

7. PROCEDŪRA

7.1. **Testa paraugu sagatavošana**

Testa parauga sagatavošanai izmanto vienu no trim šādām piena tauku ekstrakcijas metodēm.

7.1.1. *Izdalīšana no sviesta vai sviesta eļļas*

Izkausē ūdens vannā (5.5.) vai termostatā (5.6.) 50 °C temperatūrā no 50 g līdz 100 g testa parauga. Ievieto no 0,5 līdz 1,0 g nātrija sulfāta (4.7.) krokotā filtrpapīrā (5.12.). Termostatā (5.6.) 50 °C temperatūrā iepriekš sasilda 250 ml Erlenmeijera kolbu (5.10.) un piltuvi (5.11.), kurā ievietots filtrpapīrs. Turot iepriekš sasildīto kolbu, piltuvi un ievietoto filtrēšanas ierīci krāsnī, izfiltrē izkusušā parauga tauku slāni. Jāievēro piesardzība, lai nenolietu serumu.

Vienīgi tad, ja pieejams ierobežots testa paraugu daudzums, var lietot mazāku testa paraugu, un šādā gadījumā attiecīgi jāpielāgo procedūra. Tomēr mazāku analizējamo paraugu gadījumā ir lielāks risks, ka tiks iegūts nereprezentatīvs paraugs.

1. piezīme. Sviestu var iegūt no krējuma, kuļot un rūpīgi mazgājot iegūtos sviesta graudus.

2. piezīme. Ar 7.1.1. punktā aprakstīto procedūru iegūst piena taukus, kas gandrīz nesatur fosfolipīdus.

▼B

7.1.2. *Ekstrakcija ar Rozes-Gotlība gravimetrisko metodi*

Ekstrahē tauku frakciju no testa parauga ar gravimetrisko metodi, kas aprakstīta vienā no standartiem ISO 1211 IDF 001D, ISO 2450IDF 016C vai ISO 7328IDF 116A.

Piezīme. Ja iegūtajos piena taukos ir fosfolipīdi, iegūtās holesterīna signāla augstums būs par aptuveni 0,1 % lielāks. TG sastāvs, kas standartizēts līdz 100 %, ieskaitot holesterīnu, tādējādi tiek ietekmēts tikai neievērojami.

7.1.3. *Ekstrahēšana no piena ar silikagela kolonnām*

Ar mikropipeti (5.7.) ievada 0,7 ml testa parauga, kas atdzesēts līdz 20 °C, 1 līdz 3 ml *Extrelut* kolonnā (5.3.). Aptuveni 5 min ļauj tam vienmērīgi izklāties uz silikagela.

Lai denaturētu proteīnu–lipīdu kompleksus, ar graduētu pipeti (5.8.) *Extrelut* kolonnā ievada 1,5 ml metanola (4.3.). Pēc tam no testa parauga ekstrahē tauku frakciju ar 20 ml *n*-heksāna (4.4.). *n*-heksānu pievieno lēnām mazās devās. Savāc iztecināto šķīdinātāju 50 ml apaļkolbā (5.9.), kas iepriekš izžāvēta līdz konstantai, zināmai masai, kas nosvērta ar precizitāti līdz 1 mg, pierakstot masu ar precizitāti līdz 0,1 mg.

Ļauj kolonnai iztecēt, līdz tā ir tukša pēc ekstrakcijas. Rotācijas ietvaicētājā (5.13.), kura ūdens vanna iestatīta temperatūras diapazonā no 40 °C līdz 50 °C, atdestilē no eluāta šķīdinātājus. Pēc tam, kad šķīdinātāji ir atdestilēti, izžāvē un nosver apaļkolbu un tās saturu ar precizitāti līdz 1 mg, pieraksta masu ar precizitāti līdz 0,1 mg. Nosaka iegūto tauku masu, no iegūtās masas atņemot izžāvētas tukšas apaļkolbas masu.

Piezīme. Tauku ekstrakcijas ar Gerbera, Veibula-Berntropa, Šmīda-Bondzinska-Raclafa vai piena tauku izdalīšanas metodi, izmantojot deterģentus (*BDI* metode), nav piemērotas triglicerīdu analīzei, tādēļ ka šajās metodēs lielāks vai mazāks daudzums daļēju glicerīdu vai fosfolipīdu var nonākt tauku fāzē. Tādēļ šī starptautiskā standarta lietošana ir ierobežota attiecībā uz atsevišķiem produktiem, īpaši sieru.

7.2. **Parauga šķīduma sagatavošana**

Gāzu hromatogrāfijai pildītā kolonnā sagatavo 5 % (tilpuma daļa) tauku šķīdumu (iegūst, kā aprakstīts 7.1. apakšpunktā) *n*-heksānā (4.4.) vai *n*-heptānā (4.5.). Atkarībā no kolonnas izmēriem lieto 1 % koncentrāciju (ar 0,53 mm iekšējā diametra izmēru) vai mazāku koncentrāciju, ja injicēšana notiek kapilārajā kolonnā.

Pamatojoties uz izmantoto kolonnu un 7.1.3. punktā iegūto tauku masu, nosaka šķīdinātāja (4.4. vai 4.5.) daudzumu, kas jāpievieno testa parauga materiālam kolbā, sverot ar precizitāti līdz 1 g, un pieraksta masu ar precizitāti līdz 0,1 mg. Atlikumu pilnībā izšķīdina.

Pārnes aptuveni 1 ml parauga šķīduma uz ampulu (5.14.).

7.3. **Hromatogrāfiska triglicerīdu noteikšana**

7.3.1. *Bāzes līnijas pārbīde*

Lai samazinātu bāzes līnijas celšanos, kolonna jākondicionē, kā aprakstīts 5.2.2. punktā (kapilārā kolonna) vai A.4 pielikumā (pakotā kolonna).

Piezīme. Tā kā kolonnā ir augsta temperatūra, triglicerīdu analīze ir īpaši jutīga pret bāzes līnijas pacelšanos liela oglekļa atomu skaita diapazonā.

7.3.2. *Injekcijas paņēmiens*

▼B

7.3.2.1. Pakotā kolonna

Lai izvairītos no atšķiršanas sekām, izmanto karstās adatas paņēmienu, lai uzlabotu kvantitatīvo noteikšanu triglicerīdu komponentiem, kas vārās augstā temperatūrā. Piepilda adatu ar gaisu, ievelkot šļircē tauku šķīdumu. Ievieto adatu inžektorā. Pirms injekcijas uzsilda adatu aptuveni 3 sekundes. Pēc tam ātri injicē šļirces saturu.

7.3.2.2. Kapilārā kolonna

Izmantojot auksto injekciju kolonnā (7.3.4.2.), ievieto adatu šļircē un injicē nekavējoties. Adatas atrašanās laikam injekcijas vietā jābūt tādam, lai šķīdinātāja signālam nebūtu plats gals.

Piezīme. Adatas optimālais atrašanās laiks ir aptuveni 3 sekundes.

7.3.3. *Kalibrēšana*

7.3.3.1. Vispārēja informācija

Lai kalibrētu testa paraugus, katru dienu darbu sākumā veic divas vai trīs standartizētu piena tauku analīzes. Lai noteiktu TGs un holesterīna atsauces koeficientus RF_{si} (masas daļa/laukuma daļa), izmanto pēdējo standartizēto piena tauku analīzi un piemēro šos koeficientus turpmākajiem testa paraugiem (skatīt 9.1.).

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

kur

w_{si} ir procentos izteikta katra TG vai holesterīna masas daļa standartizētos piena taukos;

A_{si} ir katra TG vai holesterīna signāla laukuma skaitliskā vērtība standartizētos piena taukos.

Lai iegūtu standartizētus piena taukus ar zināmu TG sastāvu, rīkojas atbilstīgi 7.3.3.2 vai 7.3.3.3. apakšpunktam.

7.3.3.2. Komerciāli pieejams piena tauku standarts

Labākais veids, kā noteikt testa parauga katras sastāvdaļas atsauces koeficientu, ir lietot standartizētus piena taukus ar sertificētu TG sastāvu.

Piezīme. Piemērots standarts ir CRM 519 (bezūdens piena tauki), ko var iegūt References materiālu un mērījumu institūtā (*IRMM*), Gela, Beļģija ([1]).

7.3.3.3. Laboratorijas piena tauku standarts

Pagatavo aptuveni 1 g tauku standartu maisījuma (skatīt 4.2., kas satur vismaz piesātinātus TGs, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} un C_{54}, arī holesterīnu, plus, vēlams, C_{50} un C_{52}), nosverot ar precizitāti līdz 1 mg, pierakstot masu ar precizitāti līdz 0,1 mg, lai iegūtu relatīvo TG sastāvu, kas līdzīgs piena taukiem.

Atkārtoti analizē tauku standartu maisījuma šķīdumu *n*-heksānā (4.4.) vai *n*-heptānā (4.5.) atbilstīgi 7.3.4. punktam. Tādā pašā secībā atkārtoti analizē vidēja sastāva piena taukus.

Pēc tauku standartu maisījuma nosaka TG atsauces koeficientus. Maisījumā nepārstāvēto triglicerīdu atbilstības starpkoeficientus var aprēķināt ar matemātisku interpolāciju. Lai iegūtu standartizētu sastāvu, piemēro

([1]) Piemērotu produktu piemēri ir nopērkami. Šī informācija ir tikai starptautiskā standarta lietotāju ērtībai, tā nav šī izstrādājuma atbalstīšana.

▼B

piena taukiem iegūtos atsauces koeficientus. Šādi iegūtiem standartizētiem piena taukiem ir vairāku gadu uzglabāšanas laiks, ja tos glabā hermetiski zem slāpekļa temperatūrā, kas nav augstāka par -18 °C.

7.3.4. *Hromatogrāfijas apstākļi*

Piezīme. Gan pakotās, gan kapilārās kolonnas izmantošana visumā dod izšķirtspēju, kas līdzīga 1. attēlā attēlotajai. Parasti nenovēro pāra skaitļu triglicerīdu šķelšanos, no kādas ir jāizvairās.

7.3.4.1. Pakotā kolonna

a) Temperatūras programma: sākotnēji termostata temperatūru iestata uz 210 °C. Uztur šo temperatūru 1 minūti. Pēc tam palielina temperatūru ar ātrumu 6 °C/min līdz 350 °C. Uztur šo (galīgo) temperatūru 5 minūtes.

b) Detektora un inžektora temperatūra: abus iestata uz 370 °C.

c) Nesējgāze: lieto slāpekli ar pastāvīgu plūsmas ātrumu aptuveni 40 ml/min. Noregulē precīzi tādu gāzes plūsmu, kurā C_{54} eluējas temperatūrā 341 °C.

d) Analīzes ilgums: 29,3 min.

e) Injekcijas tilpums: injicē 0,5 µl 5 % (tilpuma daļa) parauga šķīduma.

Ja netiek veiktas TG analīzes, pastāvīgi, arī naktīs un nedēļu nogalēs, jāuztur termostata sākotnējā temperatūra, kāda norādīta a) apakšpunktā, detektora un inžektora temperatūra, kāda norādīta b) apakšpunktā, bet nesējgāzes plūsmas ātrums, kāds norādīts c) apakšpunktā. Tas nodrošina vislabāko kolonnas efektivitāti.

7.3.4.2. Kapilārā kolonna

a) Temperatūras programma: sākotnēji termostata temperatūru iestata uz 80 °C. Uztur šo temperatūru 0,5 minūti. Tad palielina temperatūru ar ātrumu 50 °C/min līdz 190 °C, bet pēc tam – ar ātrumu 6 °C/min līdz 350 °C. Uztur šo (galīgo) temperatūru 5 minūtes.

b) Detektora temperatūra: iestata uz 370 °C.

c) Nesējgāze: izmanto slāpekli ar pastāvīgu plūsmas ātrumu aptuveni 3 ml/min.

d) Analīzes ilgums: 34,4 min.

e) Injekcijas tilpums: injicē 0,5 µl 1 % (tilpuma daļa) parauga šķīduma.

Lai nodrošinātu vislabāko efektivitāti, uztur šos iestatījumus arī dīkstāves laikā (skatīt 7.3.4.1. apakšpunktu).

Analīžu iestatījumi, kas norādīti 7.3.4.2. apakšpunktā, ir piemēroti platai kolonnai (ar iekšējo diametru 0,53 mm), kas aprakstīta 5.2.2. apakšpunktā. Ja izmato citu izmēru kolonnu vai citu fāzi, var būt nepieciešami citi apstākļi.

8. ANALĪŽU REZULTĀTU INTEGRĒŠANA, NOVĒRTĒŠANA UN KONTROLE

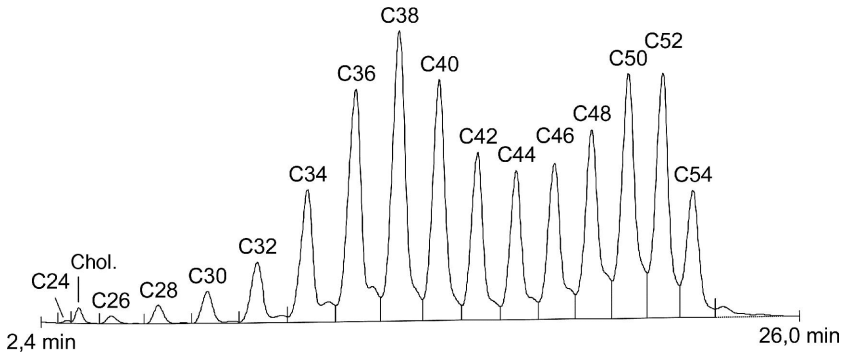
Hromatogrammas signālus novērtē, izmantojot integrēšanas sistēmu, kas spēj vilkt bāzes līniju un veikt reintegrēšanu. Pareizi integrēta hromatogramma ir redzama 1. attēlā, bet 2. attēlā redzama neregulāra kļūda bāzes līnijā, kas beidzas pēc C_{54}, ietekmējot visu triglicerīdu procentuālo lielumu. Tomēr no novērtēšanas jāizslēdz signāli, kas eluē pēc C_{54}.

Kombinē triglicerīdus ar nepāra skaitļa acil-C skaitu ($2n$ + 1) ar iepriekšējiem pāra skaitļa TG ($2n$). Neņem vērā zemo C_{56} saturu. Sareizina atlikušo triglicerīdu, ieskaitot holesterīnu, laukumu procentus ar attiecīgo standartizētu piena tauku (pēdējā kalibrācija) atsauces koeficientu un visu kopā normē līdz 100 % saskaņā ar 9.1. apakšpunktu.

▼B

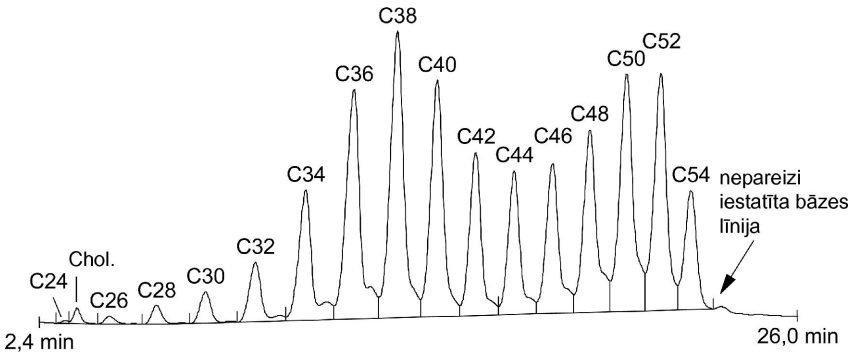
1. attēls

Piena tauku triglicerīdu hromatogrammas piemērs ar pareizi iestatītu bāzes līniju



2. attēls

Piena tauku triglicerīdu hromatogrammas piemērs ar nepareizi iestatītu bāzes līniju



Lai kontrolētu mērījumu apstākļus, salīdzina dažādus 1. tabulā dotos triglicerīdu variāciju koeficientus, CVs, kas izteiktas procentos un kuru pamatā tā paša piena tauku parauga 19 secīgas analīzes.

Ja CVs ir ievērojami augstākas par 1. tabulā dotajām vērtībām, hromatogrāfijas apstākļi nav pareizi.

Piezīme. 1. tabulā norādītās vērtības nav obligātas, bet orientējošas kvalitātes kontroles nolūkiem.

Tomēr, ja tiek akceptētas augstākas CVs vērtības, atbilstība 10. punktā dotajām atkārtojamības un reproducējamības robežām ir ievērota.

1. tabula

Triglicerīdu satura mainības koeficienti (19 secīgās analīzēs)

Triglicerīdi	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

Triglicerīdi	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. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA UN IZTEIKŠANA

9.1. **Triglicerīdu sastāvs**

9.1.1. *Aprēķināšana*

Aprēķina katra triglicerīda (ja 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} un C_{54}) plus holesterīna masas daļu, izsakot procentos w_i no kopējā triglicerīdu satura TG satura testa paraugā, pēc šāda vienādojuma:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

kur

A_i ir testa parauga katra TG laukuma skaitliskā vērtība;

RF_{si} ir ar kalibrāciju noteikts katra TG atsauces koeficients (7.3.3.).

9.1.2. *Rezultātu izteikšana*

Rezultātu izsaka līdz otrajai zīmei aiz komata.

9.2. ***S*-vērtības**

9.2.1. *Aprēķināšana*

9.2.1.1. Aprēķina *S*-vērtības, izsakot procentos, ievietojot piemēroto TG procentu aprēķināto w_i (9.1.1.) vienādojumos (3.) vai (7.). Izmanto visus vienādojumus neatkarīgi no svešu tauku izcelsmes avota.

9.2.1.2. Sojas, saulespuķu, rapšu sēklu, linsēklu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas sēklu un zivju eļļa

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Kokosriekstu un palmas augļu kodolu eļļa.

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Palmu eļļa un liellopu tauki

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Cūku tauki

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6. Kopā

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Rezultātu izteikšana*

Rezultātu izsaka līdz otrajai zīmei aiz komata.

9.3. **Svešas izcelsmes tauku klātbūtnes noteikšana**

Salīdzina piecas *S*-vērtības, kas iegūtas 9.2.1. punktā, ar 1. tabulā dotajām atbilstīgām *S*-robežvērtībām.

Testa paraugs uzskatāms par tīriem piena taukiem, ja visas piecas *S*-vērtības ietilpst 2. tabulā doto vērtību diapazonā. Ja kāda *S*-vērtība tomēr iziet ārpus attiecīgajām robežām, jāuzskata, ka paraugs satur svešas izcelsmes taukus.

Lai gan atsevišķie vienādojumi no (3.) līdz (6.) ir jutīgāki pret atsevišķiem svešas izcelsmes taukiem nekā kopējais vienādojums (7.) (skatīt B.1 tabulu), ja pozitīvais rezultāts iegūts tikai ar kādu no (3.) līdz (6.) vienādojumam, nevar izdarīt secinājumu par svešo tauku izcelsmi.

B pielikumā aprakstīta procedūra augu vai dzīvnieku izcelsmes tauku satura aprēķināšanai atšķaidītos piena taukos. Šī procedūra nav apstiprināta, tā ir tikai informatīva.

2. tabula

Tīru piena tauku *S*-robežas

Svešas izcelsmes tauki	Vienādojums	*S*-robežas [a]
Sojas, saulespuķu, rapšu sēklu, linsēklu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas sēklu un zivju eļļa	(3.)	98,05 līdz 101,95
Kokosriekstu un palmas augļu kodolu eļļa	(4.)	99,42 līdz 100,58
Palmu eļļa un liellopu tauki	(5.)	95,90 līdz 104,10
Cūku tauki	(6.)	97,96 līdz 102,04
Kopā	(7.)	95,68 līdz 104,32

[a] Aprēķinātas ar 99 % ticamību, tāpēc svešas izcelsmes tauku pievienojums tiek parādīts vienīgi tad, ja tiek pārsniegtas attiecīgā vienādojuma robežvērtības (skatīt B.1. tabulu).

10. PRECIZITĀTE

10.1. **Starplaboratoriju tests**

Atkārtojamības un reproducējamības vērtības tika noteiktas, pamatojoties uz vienādojumiem (3.) līdz (7.), analizējot tīrus piena taukus, un tās nevar piemērot citām matricēm, tikai dotajām.

10.2. **Atkārtojamība**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi ar identisku testa materiālu, tajā pašā laboratorijā, tam pašam operatoram izmantojot to pašu iekārtu neilgā laika posmā, nepārsniedz 3. tabulā dotās robežvērtības vairāk nekā 5 % gadījumu.

▼B

3. tabula

Atkārtojamības robežas r vienādojumiem (3.) līdz (7.)

Svešas izcelsmes tauki	Vienādojums	r %
Sojas, saulespuķu, rapšu sēklu, linsēklu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas sēklu un zivju eļļa	(3.)	0,67
Kokosriekstu un palmas augļu kodolu eļļa	(4.)	0,12
Palmu eļļa un liellopu tauki	(5.)	1,20
Cūku tauki	(6.)	0,58
Kopā	(7.)	1,49

10.3. **Reproducējamība**

Absolūtā atšķirība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot vienu un to pašu metodi ar identisku testa materiālu, dažādās laboratorijās, dažādiem operatoriem izmantojot atšķirīgu iekārtu, nepārsniedz 4. tabulā dotās robežvērtības vairāk nekā 5 % gadījumu.

4. tabula

Reproducējamības robežas R vienādojumiem (3.) līdz (7.)

Svešas izcelsmes tauki	Vienādojums	R %
Sojas, saulespuķu, rapšu sēklu, linsēklu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas sēklu un zivju eļļa	(3.)	1,08
Kokosriekstu un palmas augļu kodolu eļļa	(4.)	0,40
Palmu eļļa un liellopu tauki	(5.)	1,81
Cūku tauki	(6.)	0,60
Kopā	(7.)	2,07

11. MĒRĪJUMU NENOTEIKTĪBA

S-vērtību paplašināto nenoteiktību var aprēķināt, izmantojot atkārtojamības vērtību *r* un reproducējamības vērtību *R*.

Paplašinātas nenoteiktības (pamatojoties uz dubultanalīzēm) iekļaušana 2. tabulas *S*-vērtībās dod palielinātas *S*-vērtības, kas ir dotas 5. tabulā.

5. tabula

Tīru piena tauku palielinātās *S*-robežvērtības, kurās ietverta paplašinātā nenoteiktība.

Svešas izcelsmes tauki	Vienādojums	Palielinātās *S*-robežvērtības
Sojas, saulespuķu, rapšu sēklu, linsēklu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas sēklu un zivju eļļa	(3.)	97,36 līdz 102,64
Kokosriekstu un palmas augļu kodolu eļļa	(4.)	99,14 līdz 100,86
Palmu eļļa un liellopu tauki	(5.)	94,77 līdz 105,23
Cūku tauki	(6.)	97,65 līdz 102,35
Kopā	(7.)	94,42 līdz 105,58

▼B

12. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā norāda:

— visu informāciju, kas vajadzīga parauga pilnīgai identifikācijai,

— izmantoto parauga ņemšanas metodi, ja tā ir zināma,

— testa metodi, kas izmantota ar atsauci uz šo starptautisko standartu,

— visus datus par darbu, kas nav norādīti šajā starptautiskajā standartā vai tiek uzskatīti par neobligātiem, kā arī datus par visiem starpgadījumiem, kas var būt ietekmējuši rezultātus,

— iegūtos testa(-u) rezultātus un, ja ir pārbaudīta atkārtojamība, galīgi noteikto iegūto rezultātu.

▼B

A PIELIKUMS

(normatīvs)

PAKOTĀS KOLONNAS SAGATAVOŠANA

A.1. REAĢENTI UN IEKĀRTA

A.1.1. **Toluols** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2. **Dimetildihlorsilāna** [$Si(CH_3)_2Cl_2$] šķīdums.

Izšķīdina 50 ml dimetildihlorsilāna 283 ml-os toluola (A.1.1.).

A.1.3. **Kakao sviesta** šķīdums ar 5 % kakao sviesta masas daļu n-heksānā (4.4.) vai n-heptānā (4.5.).

A.1.4. **Stacionārā fāze**, 3 % OV-1 uz 125 līdz 150 mikrometriem (daļiņu izmērs 100 līdz 120) *Gas ChromQ* ([1]).

Piezīme. Graudu norāde tika konvertēta mikrometros atbilstīgi BS 410 (visas daļas)[6].

A.1.5. **Stikla kolonna** ar iekšējo diametru 2 mm un garumu 500 mm, U-veida.

A.1.6. **Aparāts** pakotās kolonnas piepildīšanai.

A.1.6.1. *Kolonnas pildīšana*, ar uzskrūvētiem gala vākiem ar atzīmi, līdz kurai var piepildīt nepieciešamo stacionārās fāzes daudzumu.

A.1.6.2. *Smalks siets* ar acu izmēru apmēram 100 mikrometri ar skrūvējamu vāku, kas piemērots stikla kolonnas noslēgšanai saskaņā ar 3. zīmējumu.

A.1.6.3. *Silanēta stikla vate*, dezaktivēta.

A.1.6.4. *Vibrators* vienmērīgai stacionārās fāzes izkliedēšanai pildīšanas laikā.

A.1.6.5. *Silanēšanas ierīces* kolonnas stikla virsmas silanēšanai.

A.1.6.6. *Vulfa skalotne.*

A.1.6.7. *Ūdensstrūklas sūknis.*

A.2. SILANĒŠANA (STIKLA VIRSMAS DEZAKTIVĒŠANA)

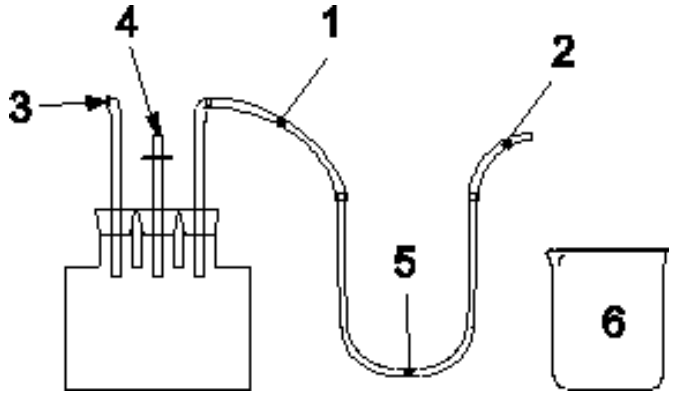
Pēc Vulfa skalotnes (A.1.6.6.) pievienošanas ūdensstrūklas sūknim (A.1.6.7.) iegremdē cauruli 2 (skatīt A.1. attēlu) dimetilhlorsilāna šķīdumā (A.1.2.). Piepilda kolonnu (A.1.5.) ar šo šķīdumu, noslēdzot krānu. Atver krānu vēlreiz un pēc tam noņem abas caurules. Nostiprina kolonnu statīvā. Pilnībā piepilda, ar pipeti ievadot dimetildihlorsilāna šķīdumu (A.1.2.).

([1]) Piemērotu produktu piemēri ir nopērkami. Šī informācija ir tikai starptautiskā standarta lietotāju ērtībai, tā nav šī izstrādājuma atbalstīšana, pamatojoties uz ISO vai IDF.

▼B

A.1. attēls

Silanēšanas aparāts



Skaidrojums

1 caurule 1

2 caurule 2

3 ūdensstrūklas sūknis

4 krāns

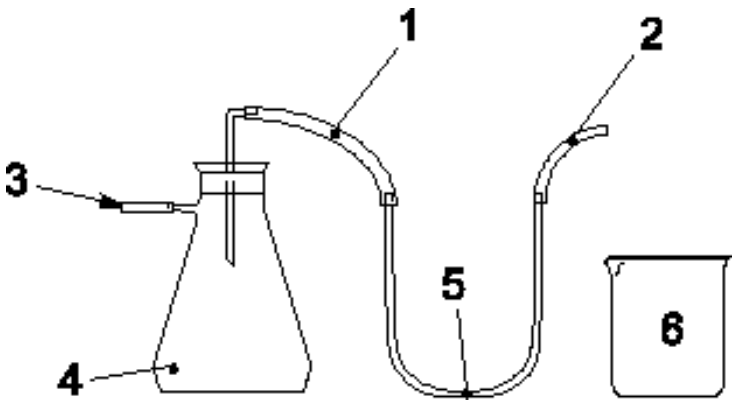
5 stikla kolonna

6 dimetildihlorsilāns un toluols

Ļauj kolonnai nostāvēties 20–30 minūtes. Pēc tam nomaina Vulfa skalotni ar filtrēšanas kolbu. Iztukšo kolonnu, pievienojot to ūdens sūcējsūknim (A.1.6.7.) (skatīt A.2. attēlu). Skalo iztukšoto kolonnu pēc kārtas ar 75 ml toluola (A.1.1.) un 50 ml metanola (4.3.), iegremdējot cauruli 2 šķīdinātājā. Žāvē 30 minūtes izskaloto kolonnu termostātā (5.6.), kas iestatīta uz 100 °C temperatūru.

A.2. attēls

Skalošanas aparāts



Skaidrojums

1 caurule 1

2 caurule 2

3 ūdensstrūklas sūknis

4 Bunzena kolba

5 stikla kolonna

6 skalošanas aģenti

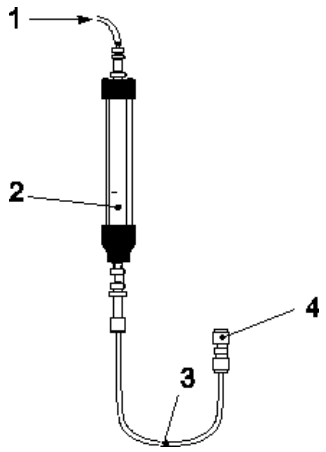
▼B

A.3. PILDĪŠANA

Piepilda kolonnu ar A.3. attēlā parādīto aparātu. Iepilda stacionāro fāzi (A.1.4.) pildīšanas kolonnā (A.1.6.1.) līdz atzīmei. Hermetizē piepildāmās stikla kolonnas apakšējo galu ar aptuveni 1 cm garu aizbāzni, kas izgatavots no silanētas, presētas stikla vates (A.1.6.3.). Noslēdz kolonnas galu ar smalku sietu (A.1.6.2.).

A.3. attēls

Stikla kolonnas pildīšana



Skaidrojums

1 slāpekļa ievads

2 pildīšanas kolonna, kas jāuzpilda ar OV-1 līdz atzīmei

3 piepildāmā stikla kolonna

4 uzskrūvējams vāks ar filtru, pret kuru tiek piespiesta stikla šķiedra un stacionārā fāze

Paaugstinātā spiedienā (300 kPa un slāpekļa plūsma) piepilda kolonnu ar stacionāro fāzi. Lai iegūtu viendabīgu, nepārtrauktu un blīvu pildījumu, gar stikla kolonnu pildīšanas laikā augšup un lejup pārvieto vibratoru. Pēc piepildīšanas iespiež silanētās stikla vates (A.1.6.3.) cieto aizbāzni pakotās kolonnas otrā galā. Nogriež liekos galus. Iespiež aizbāzni ar lāpstiņu dažu milimetru dziļumā kolonnā.

A.4. KONDICIONĒŠANA

Lai novērstu piesārņošanas, veicot a) līdz c) darbības, kolonnas galu nepievieno detektoram. Piepildīto kolonnu (A.3.) kondicionē šādi:

a) caur kolonnu 15 minūtes laiž slāpekli ar plūsmas ātrumu 40 ml/min un GH termostata iestatījumu uz 50 °C temperatūru;

b) karsē kolonnu ar ātrumu 1 °C/min līdz 355 °C ar slāpekļa plūsmu 10 ml/min;

c) iztur kolonnu pie 355 °C no 12 h līdz 15 h;

d) divreiz injicē 1 µl kakao sviesta šķīduma (A.1.3.), ievērojot pakotai kolonnai noteikto temperatūras programmu, kas dota 7.3.4.1. apakšpunktā;

Piezīme. Kakao sviests gandrīz pilnībā sastāv no augstas vārīšanās temperatūras C_{50} līdz C_{54} TGs, tādēļ samazinās kolonnas kondicionēšanas pūles ar attiecīgiem atsauces koeficientiem.

▼B

e) 20 reizes 2 vai 3 dienu laikā injicē pa 0,5 µl piena tauku šķīduma saskaņā ar 7.2.2. apakšpunktu, piemērojot 7.3.4.1. apakšpunktā dotos iestatījumus pakotai kolonnai.

— Testa paraugu analīzēm izmanto vienīgi tādas kolonnas, kuru atsauces koeficienti ir tuvu 1. Atsauces koeficienti nedrīkst būt lielāki par 1,20.

▼B

B PIELIKUMS

(informatīvs)

SVEŠAS IZCELSMES TAUKU SATURA DAUDZUMA NOTEIKŠANA

B.1. VISPĀRĒJA INFORMĀCIJA

B.1. tabulā dotas dažādas izcelsmes tauku noteikšanas robežvērtības, kas aprēķinātas ar 99 % ticamību. Vidējā slejā norādītas noteikšanas robežvērtības vislabākajiem atsevišķajiem vienādojumiem no (3.) līdz (6.).

Kopējā vienādojuma (7.) noteikšanas robežvērtības, kas ir parādītas labās puses slejā, ir mazliet augstākas. Vienādojums (7.) praktiski nepieciešams vienīgi svešas izcelsmes tauku daudzuma noteikšanai.

Dažādas svešas izcelsmes tauku kombinācijas var noteikt arī, izmantojot visus vienādojumus. Mainībai starp viena veida svešas izcelsmes tauku atsevišķo paraugu TG sastāviem nav būtiskas ietekmes uz noteikšanas robežvērtībām.

Izmantojot gan atsevišķos vienādojumus, gan kopējo vienādojumu, piemēro atsevišķo vienādojumu noteikšanas robežvērtības. Bet atsevišķos gadījumos (B.2.) daudzuma noteikšanai ir nepieciešamas kopējā vienādojuma *S*-vērtība.

B.1. tabula

Piena taukiem pievienoto svešas izcelsmes tauku 99 % robežvērtību noteikšana procentos

Svešas izcelsmes tauki	Atsevišķais vienādojums %	Kopējais vienādojums %
Sojas eļļa	2,1	4,4
Saulespuķu eļļa	2,3	4,8
Olīveļļa	2,4	4,7
Kokosriekstu eļļa	3,5	4,3
Palmu eļļa	4,4	4,7
Palmas augļu kodolu eļļa	4,6	5,9
Rapšu eļļa	2,0	4,4
Linsēklu eļļa	2,0	4,0
Kviešu dīgstu eļļa	2,7	6,4
Kukurūzas dīgstu eļļa	2,2	4,5
Kokvilnas sēklu eļļa	3,3	4,4
Cūku tauki	2,7	4,7
Liellopu tauki	5,2	5,4
Hidrogenēta zivju eļļa	5,4	6,1

B.2. APRĒĶINS

Svešas izcelsmes tauku daudzuma noteikšanu veic vienīgi tad, ja ir pārsniegta vismaz viena *S*-robežvērtība (2. vai 5. tabula). Lai iegūtu informāciju par daudzumu, testa paraugam aprēķina svešas izcelsmes tauku masas daļu vai maisījuma masas daļu w_f, kas izteikta procentos, izmantojot šādu vienādojumu:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(B. 1)}$$

▼B

kur

S ir rezultāts, kas iegūts, ievietojot vienā no vienādojumiem no (3.) līdz (7.) datus par piena taukiem, kuriem ir bijis pievienots svešas izcelsmes tauku maisījums;

S_f ir konstante, kas atkarīga no pievienoto tauku veida.

Ja nav zināms piena taukiem pievienoto svešas izcelsmes tauku veids, parasti izmanto S_f vērtību 7,46 (B.2 tabula). Vienmēr lieto vienādojumā (7.) iegūto *S*-vērtību, pat ja šīs *S*-vērtības nav pārsniegušas robežas, bet citu vienādojumu vērtības ir ārpus robežām.

Ja svešo tauku izcelsme ir zināma, ievieto to individuālās S_f-vērtības (B.2. tabula) vienādojumā (B.1.). Lai aprēķinātu *S*, lieto piemērotu svešas izcelsmes tauku vienādojumu no (3.) līdz (6.).

B.2. tabula

Dažādas izcelsmes tauku S_f-vērtības

Svešas izcelsmes tauki	S_f
Nav zināma	7,46
Sojas eļļa	8,18
Saulespuķu eļļa	9,43
Olīveļļa	12,75
Kokosriekstu eļļa	118,13
Palmu eļļa	7,55
Palmu augļu kodolu eļļa	112,32
Rapšu eļļa	3,30
Linsēklu eļļa	4,44
Kviešu dīgstu eļļa	27,45
Kukurūzas dīgstu eļļa	9,29
Kokvilnas sēklu eļļa	41,18
Cūku tauki	177,55
Liellopu tauki	17,56
Zivju eļļa	64,12

B.3. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Rezultātu izsaka līdz otrajai zīmei aiz komata.

Bibliogrāfija

1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. Milchwissenschaft, 52, 1987, pp. 82–85

2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. Chrompack News, 4, 1993, pp. 16–17

3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. Chromatographia, 39, 1994, pp. 265–270

4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. Chromatographia, 52, 2000, pp. 791–797

5) ISO 707IDF 50, Milk and milk products – Guidance on sampling

▼B

6) BS 410:1988, Test sieves – Technical requirements and testing

7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber., 43, 1991, pp. 219–242

8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. Fat Sci. Technol., 93, 1991, pp. 538–544

9) DIN 10336:1994, Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis]

10) Eiropas Kopienu Komisija: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93

11) Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, pp. 505–510.

▼B

XXI PIELIKUMS

(18. pants)

PIEMĒROJAMĀ PROCEDŪRA, APSTRĪDOT ANALĪZES REZULTĀTUS (ĶĪMISKĀ ANALĪZE)

1. Turpmākas analīzes veic citā kompetentās iestādes apstiprinātā laboratorijā, izmantojot pēc uzņēmēja pieprasījuma atbilstīgu metodi ar nosacījumu, ka pieejami aizzīmogoti produkta paraugu dublikāti un tos attiecīgi uzglabājušas kompetentās iestādes. Pieprasījums jāiesniedz 7 darba dienu laikā pēc pirmās analīzes rezultātu paziņošanas. Analīzi veic 21 darba dienas laikā pēc pieprasījuma saņemšanas. Kompetentā iestāde šos paraugus nosūta otrai laboratorijai pēc uzņēmēja lūguma un uz viņa rēķina. Otrai laboratorijai jābūt atļaujai veikt oficiālas analīzes, un tās kompetencei attiecībā uz minētajām analīzēm jābūt apstiprinātai.

2. 1. laboratorijā atkārtoto mērījumu $\overline{y}_1$ vidējā n_1 un 2. laboratorijā atkārtoto mērījumu $\overline{y}_2$ vidējā n_1 paplašinātās nenoteiktības (k = 2) ir

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ un $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ attiecīgi, kur

σ_r ir atbilstīgās metodes atkārtojamības standartnovirze un σ_R ir reproducējamības standartnovirze. Ja laboratoriju mērījumu gala rezultātu y aprēķina pēc formulas $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ vai $y = x_1/x_2$, lai iegūtu nenoteiktību, šajos gadījumos jāveic parastā standartnoviržu apvienošanas procedūra.

4. Lai pārbaudītu, vai divu laboratoriju rezultāti atbilst metodes reproducējamības standartnovirzei σ_R, aprēķina starpības $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$ paplašināto nenoteiktību:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Ja laboratorijas vidējo lielumu starpības absolūtā vērtība $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ nav lielāka par tās nenoteiktību $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$$

divu laboratoriju rezultāti atbilst reproducējamības standartnovirzeiσ_r un divu laboratoriju vidējo aritmētiskais vidējais

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2}$$

tiek paziņots kā galīgais rezultāts. Tā paplašinātā nenoteiktība ir

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Preču partija tiek noraidīta kā neatbilstīga augšējai normatīvajai robežvērtībai *UL*, ja

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL;$$

pretējā gadījumā tā tiek akceptēta kā atbilstīga *UL*.

Preču partija tiek noraidīta kā neatbilstīga apakšējai normatīvajai robežvērtībai *LL*, ja

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL;$$

pretējā gadījumā tā tiek akceptēta kā atbilstīga *LL*.

Ja laboratorijas vidējo starpības absolūtā vērtība $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ ir lielāka par tās neprecizitāti $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

Divu laboratoriju rezultāti neatbilst reproducējamības standartnovirzei.

Šajā gadījumā preču partija tiek noraidīta kā neatbilstīga, ja otrā analīze apstiprina pirmās rezultātu. Pretējā gadījumā preču partija tiek akceptēta kā atbilstīga.

Kompetentajai iestādei, tiklīdz iespējams, otrās analīzes rezultāti jāpaziņo uzņēmējam. Ja preču partiju noraida, tad otrās analīzes izmaksas jāsedz uzņēmējam.

▼B

XXII PIELIKUMS

ATBILSTĪBAS TABULA

Regula (EK) Nr. 213/2001	Šī regula
1. pants	1. pants
2. pants	1. pants
3. pants	2. pants
—	3. pants
4. pants	—
5. pants	—
6. pants	4. pants
7. pants	18. pants
8. pants	—
9. pants	5. pants
10. pants	6. pants
11. pants	7. pants
12. pants	8. pants
13. pants	9. pants
14. pants	10. pants
15. pants	11. pants
16. pants	12. pants
17. pants	13. pants
—	14. pants
18. pants	15. pants
19. pants	16. pants
	17. pants
	19. pants
20. pants	—
21. pants	—
22. pants	20. pants
23. pants	21. pants