

KOMISSION TÄYTÄNTÖÖNPANOASETUS (EU) 2018/150,**annettu 30 päivänä tammikuuta 2018,****täytäntöönpanoasetuksen (EU) 2016/1240 muuttamisesta julkiseen interventioon ja yksityisen varastoinnin tukeen kelpoisten maidon ja maitotuotteiden analysointi- ja laadunarviointimenetelmien osalta**

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon yhteisen maatalouspolitiikan rahoituksesta, hallinnoinnista ja seurannasta ja neuvoston asetusten (ETY) N:o 352/78, (EY) N:o 165/94, (EY) N:o 2799/98, (EY) N:o 814/2000, (EY) N:o 1290/2005 ja (EY) N:o 485/2008 kumoamisesta 17 päivänä joulukuuta 2013 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EU) N:o 1306/2013 ⁽¹⁾ ja erityisesti sen 62 artiklan 2 kohdan i alakohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Komission delegoidussa asetuksessa (EU) 2016/1238 ⁽²⁾ ja komission täytäntöönpanoasetuksessa (EU) 2016/1240 ⁽³⁾ vahvistetaan julkista interventiota ja yksityisen varastoinnin tukea koskevat säännöt. Komission asetuksessa (EY) N:o 273/2008 ⁽⁴⁾ vahvistetaan menetelmät sen arvioimiseksi, ovatko maito ja maitotuotteet mainituissa asetuksissa säädettyjen julkiseen interventioon ja yksityisen varastoinnin tukeen liittyvien kelpoisuusvaatimusten mukaiset.
- (2) Ottaen huomioon maidon ja maitotuotteiden analyyseissä ja laadunarvioinnissa käytettyjen menetelmien tekninen kehitys menetelmiin olisi tehtävä merkittäviä muutoksia niiden yksinkertaistamiseksi ja ISO-standardiviitteiden päivittämiseksi. Koska asetuksen (EY) N:o 273/2008 säännöksiin tehtäviä muutoksia on lukuisia ja ne ovat teknisiä, kyseisen asetuksen asiaan liittyvät säännökset olisi sisällytettävä täytäntöönpanoasetukseen (EU) 2016/1240.
- (3) Jotta voitaisiin varmistaa uusien standardien ja menetelmien yhdenmukainen noudattaminen kaikissa jäsenvaltioissa, laboratorioille olisi annettava riittävästi aikaa menettelyjen tarkistamiseksi ja päivitettyjen menetelmien soveltamiseksi.
- (4) Sen vuoksi täytäntöönpanoasetusta (EU) 2016/1240 olisi muutettava.
- (5) Asetus (EY) N:o 273/2008 olisi oikeusvarmuuden vuoksi kumottava.
- (6) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat maatalouden yhteisen markkinajärjestelyn komitean lausunnon mukaiset,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan täytäntöönpanoasetus (EU) 2016/1240 seuraavasti:

1) Muutetaan 4 artikla seuraavasti:

a) muutetaan 1 kohta seuraavasti:

i) korvataan i alakohdan d alakohta seuraavasti:

”d) vain osalta tämän asetuksen liitteessä IV oleva I ja I a osa”;

ii) korvataan e alakohta seuraavasti:

”e) rasvattoman maitojauheen osalta tämän asetuksen liitteessä V oleva I ja I a osa”;

⁽¹⁾ EUVL L 347, 20.12.2013, s. 549.

⁽²⁾ Komission delegoitu asetus (EU) 2016/1238, annettu 18 päivänä toukokuuta 2016, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EU) N:o 1308/2013 täydentämisestä julkisen intervention ja yksityisen varastoinnin tuen osalta (EUVL L 206, 30.7.2016, s. 15).

⁽³⁾ Komission täytäntöönpanoasetus (EU) 2016/1240, annettu 18 päivänä toukokuuta 2016, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EU) N:o 1308/2013 soveltamissäännöistä julkisen intervention ja yksityisen varastoinnin tuen osalta (EUVL L 206, 30.7.2016, s. 71).

⁽⁴⁾ Komission asetus (EY) N:o 273/2008, annettu 5 päivänä maaliskuuta 2008, neuvoston asetuksen (EY) N:o 1255/1999 soveltamista koskevista yksityiskohtaisista säännöistä maidon ja maitotuotteiden analysointi- ja laadunarviointimenetelmien osalta (EUVL L 88, 29.3.2008, s. 1).

b) korvataan 2 kohta seuraavasti:

”2. Menetelmät, joita käytetään julkiseen interventioon kelpoisen liitteessä I tarkoitetun viljan, liitteessä IV tarkoitetun voin ja liitteessä V tarkoitetun rasvattoman maitojauheen laadun määrittämiseen, ovat ne, jotka vahvistetaan asiaa koskeissa tuoreimmista joko eurooppalaisissa tai kansainvälisissä standardeissa, jotka ovat voimassa vähintään kuusi kuukautta ennen asetuksen (EU) N:o 1308/2013 12 artiklassa vahvistettua julkisen interventiojakson ensimmäistä päivää.”

2) Lisätään 60 a artikla seuraavasti:

”60 a artikla

Maidon ja maitotuotteiden julkiseen interventioon ja yksityisen varastoinnin tukeen liittyviä tarkastuksia koskeva erityinen säännös

1. Voin, rasvattoman maitojauheen ja juuston kelpoisuus yksityisen varastoinnin tukeen selvitetään liitteissä VI, VII ja VIII esitettyjen menetelmien mukaisesti.

Menetelmät vahvistetaan sellaisten asiaa koskevien tuoreimpien joko eurooppalaisten tai kansainvälisten standardien perusteella, jotka ovat voimassa vähintään kuusi kuukautta ennen asetuksen (EU) N:o 1308/2013 12 artiklassa vahvistettua julkisen interventiojakson ensimmäistä päivää.

2. Tässä asetuksessa esitetyt menetelmiä soveltaen tehtyjen tarkastusten tulokset arvioidaan liitteen IX mukaisesti.”

3) Muutetaan liitteet tämän asetuksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

Kumotaan asetus (EY) N:o 273/2008.

3 artikla

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

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

Tehty Brysselissä 30 päivänä tammikuuta 2018.

Komission puolesta
Puheenjohtaja
Jean-Claude JUNCKER

LIITE

Muutetaan täytäntöönpanoasetuksen (EU) 2016/1240 liitteet seuraavasti:

1) Muutetaan liite IV seuraavasti:

a) korvataan I osan 2 kohdan toinen alakohta seuraavasti:

”Kukin näyte on arvioitava erikseen. Näytteenoton tai arvioinnin uusiminen ei ole sallittua.”

b) Lisätään I a osa seuraavasti:

”I A OSA

Julkiseen interventioon tarkoitettun suolattoman voin analyysimenetelmät

Parametri	Menetelmä
Rasva ⁽¹⁾	ISO 17189 tai ISO 3727 osa 3
Vesi	ISO 3727 osa 1
Rasvaton kuiva-aine	ISO 3727 osa 2
Rasvan happoisuus	ISO 1740
Peroksidiluku	ISO 3976
Muu kuin maitorasva	ISO 17678
Aistinvaraiset ominaisuudet	ISO 22935 osat 2 ja 3 sekä seuraavat tulostaulukot

⁽¹⁾ Maksajaviraston on hyväksyttävä sovellettava menetelmä.

Tulostaulukko

Ulkonäkö		Koostumus		Tuoksu ja maku	
Pisteet	Huomautukset	Pisteet	Huomautukset	Pisteet	Huomautukset
5	<i>Erittäin hyvä</i> Ihanteellinen Paras laatu (tasaisen kuiva)	5	<i>Erittäin hyvä</i> Ihanteellinen Paras laatu (tasaisen levittyvä)	5	<i>Erittäin hyvä</i> Ihanteellinen Paras laatu (ehdottoman puhdas, hienoin tuoksu)
4	<i>Hyvä</i> (ei selviä virheitä)	4	<i>Hyvä</i> (ei selviä virheitä)	4	<i>Hyvä</i> (ei selviä virheitä)
1, 2 tai 3	Jokin virhe	1, 2 tai 3	Jokin virhe	1, 2 tai 3	Jokin virhe”

2) Lisätään liitteeseen V I a osa seuraavasti:

"I A OSA

Julkiseen interventioon tarkoitettun rasvattoman maitojauheen analyysimenetelmät

Parametri	Menetelmä
Proteiini	ISO 8968 osa 1
Rasva	ISO 1736
Vesi	ISO 5537
Happoisuus	ISO 6091
Laktaatit	ISO 8069
Fosfataasikoe	ISO 11816 osa 1
Liukenemattomuusindeksi	ISO 8156
Palaneet osaset ⁽¹⁾	ADPI
Mikro-organismit	ISO 4833 osa 1
Kirnapuimä	Lisäys I
Herajuoksete ⁽²⁾	Lisäykset II ja III
Hapanhera ⁽³⁾	ISO 8069 tai tarkastukset tuotantolaitoksessa
Aistinvaraiset tarkastukset ⁽⁴⁾	ISO 22935 osat 2 ja 3

⁽¹⁾ Palaneita osasia koskevia analyysijä voidaan tehdä järjestelmällisesti. Tällainen analyysi on kuitenkin tehtävä aina, jos ei tehdä aistinvaraisia tarkastuksia.

⁽²⁾ Maksajaviraston on hyväksyttävä sovellettava menetelmä (yksi tai molemmat).

⁽³⁾ Maksajaviraston on hyväksyttävä sovellettava menetelmä.

⁽⁴⁾ Aistinvaraisia tarkastuksia on tehtävä silloin kun se katsotaan maksajaviraston hyväksymän riskianalyysin perusteella tarpeelliseksi.

Lisäys I

RASVATON MAITOUJAUHE: FOSFATIDYYLISERIININ JA FOSFATIDYYLIETANOLIAMIININ MÄÄRITYS**Menetelmä: käänteisfaasi-HPLC-menetelmä**

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

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

2. MÄÄRITELMÄ

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

3. MENETELMÄN PERIAATE

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

4. REAGENSIT

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

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

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

4.2 **Reagenssit standardinäytteen ja testinäytteen valmistamiseksi**4.2.1 *metanoli, HPLC-laatua*4.2.2 *kloroformi, HPLC-laatua*4.2.3 *tryptamiinimonohydrokloridi*4.3 **Reagenssit o-ftaalialdehydijohdannaisien valmistamiseen**4.3.1 *natriumhydroksidi, 12 M vesiliuos*4.3.2 *boorihappo, 0,4 M vesiliuos, pH säädettyä arvoon 10,0 natriumhydroksidin (4.3.1) avulla*4.3.3 *2-merkaptoetanoli*4.3.4 *o-ftaalialdehydi (OFA)*4.4 **HPLC-eluointiliuottimet**4.4.1 *Eluointiliuottimet on valmistettava HPLC-laatuista reagensseja käyttäen.*4.4.2 *vesi, HPLC-laatua*4.4.3 *metanoli, puhtaus tutkittu fluorometrillä*4.4.4 *tetrahydrofuraani*4.4.5 *natriumdivetyfosfaatti*4.4.6 *natriumasettaatti*4.4.7 *etikkahappo*

5. LAITTEET JA TARVIKKEET

5.1 **Analyysivaaka, tarkkuus 1 mg, luettavuus 0,1 mg**

5.2 **Dekanterilaseja, tilavuus 25 ja 100 ml**

5.3 **Pipettejä, tilavuudet 1 ja 10 ml**

5.4 **Magneettisekoitin**

5.5 **Mittapipettejä, joilla voi pipetoida tilavuudet 0,2, 0,5 ja 5 ml**

5.6 **Mittapulloja, tilavuus 10, 50 ja 100 ml**

5.7 **Injektioruiskuja, tilavuus 20 ja 100 µl**

5.8 **Ultraäänihaude**

5.9 **Sentrifugi, 27 000 × g**

5.10 **Lasipulloja, tilavuus noin 5 ml**

5.11 **Mittalasi, tilavuus 25 ml**

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

5.13 **HPLC-laite**

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

5.13.2 *automaattinen näytteenkäsittelijä, jossa voi valmistaa johdannaisia*

5.13.3 *kolonniuuni, joka pysyy lämpötilassa 30 °C ± 1 °C*

5.13.4 *fluoresenssidetektor, joka toimii heräteallonpituudella 330 nm ja emissioallonpituudella 440 nm*

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

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

6. NÄYTTEENOTTO

Näytteet otetaan ISO-standardin 707 mukaisesti.

7. SUORITUS

7.1 Sisäisen standardiliuoksen valmistus

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

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

7.2 Näyteliuoksen valmistus

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

7.2.2 Pipetoidaan 0,2 ml (5.5) ennastettua maitoa 10 ml:n mittapulloon (5.6), lisätään injektioruiskulla (5.7) 100 µl 0,15 mM:n tryptamiiniliuosta (7.1) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1). Sekoitetaan huolellisesti käännellen ja käsitellään ultraäänellä (5.8) 15 minuutin ajan.

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

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

7.3 Ulkoisen standardiliuoksen valmistus

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

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

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

7.4 Derivointireagenssin valmistus

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

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

7.5 Määrittäminen HPLC:llä

7.5.1 Eluointiliuottimet (4.4)

Liuotin A: 0,3 mM natriumdivetyfosfaattiliuos ja 3mM natriumasetaatiliuos (pH säädettyä etikkahapolla arvoon $6,5 \pm 0,1$): metanoli:tetrahydrofuraani = 558:440:2 (v/v/v).

Liuotin B: metanoli

7.5.2 Ehdotettu eluointigradietti:

Aika (min)	Liuotin A (%)	Liuotin B (%)	Virtausnopeus (ml/min)
Alku	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

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

Kolonnin lämpötila: 30 °C .

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

7.5.4 *Kolonnin tasapainotus*

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

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

7.5.5 *Määritetään näytteen FS + FE -pitoisuus*

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

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

7.6 **Integrointimenetelmä**

7.6.1 *FEDP-piikki*

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

7.6.2 *Tryptamiinipiikki*

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

7.6.3 *FS- ja FE-piikkiryhmät*

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

8. TULOSTEN LASKEMINEN JA ILMOITTAMINEN

Näyteliuoksen FS + FE -pitoisuus lasketaan seuraavasti:

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

jossa:

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

A₁ = standardinäyteliuoksen (7.3) FEDP-piikin pinta-ala

A₂ = näyteliuoksen (7.2) FS- tai FE-piikin pinta-ala

T₁ = standardinäyteliuoksen (7.3) tryptamiinipiikin pinta-ala

T₂ = näyteliuoksen (7.2) tryptamiinipiikin pinta-ala

9. MENETELMÄN TARKKUUS

Huomautus: Toistettavuusarvot on laskettu kansainvälisen IDF-standardin (*) mukaisesti.

9.1 **Toistettavuus**

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

9.2 Uusittavuus

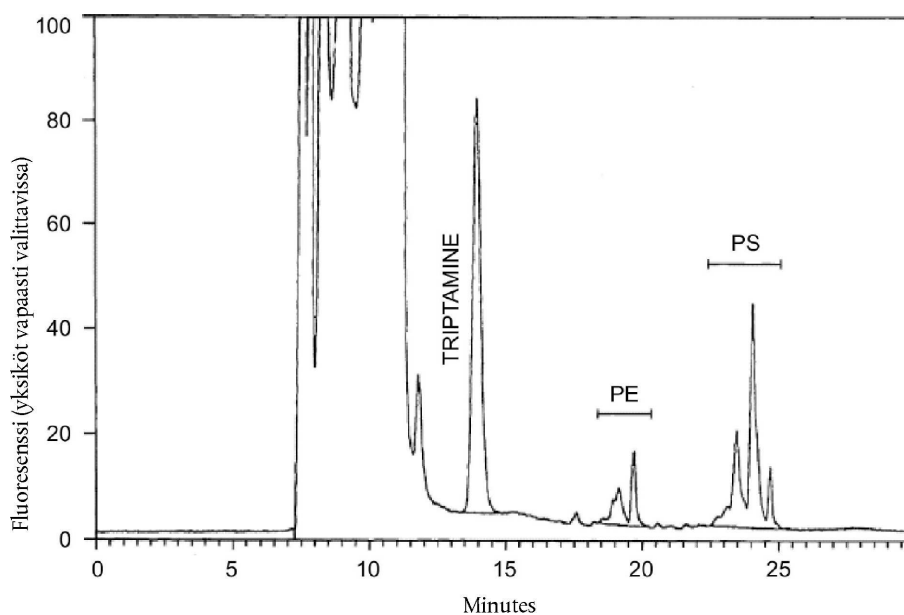
Kun eri henkilöt tekevät eri laboratorioissa eri välineistöillä ja eri olosuhteissa määrykset samasta näytteestä, näiden kahden tuloksen välinen suhteellinen ero saa olla enintään 11 % tulosten aritmeettisesta keskiarvosta.

10. VIITTEET

- 10.1 Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids." *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 39,395 (1988).

Kuva 1

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



Lisäys II

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

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

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

2. VIITE

Kansainvälinen standardi ISO 707 – Maito ja maitotuotteet – Näytteenotto-menetelmät.

3. MÄÄRITELMÄ

Kuiva herajuoksetepitoisuus ilmoitetaan massaprosentteina ja määritetään kaseiinimakropeptidipitoisuutena tässä esitetyllä menetelmällä.

4. PERIAATE

- Rasvattoman maitojauheen ennastus, rasvojen ja proteiinien poisto trikloorietikkahapolla ja sentrifugointi tai suodatus.
- Supernatantissa esiintyvien kaseiinimakropeptidien (CMP) määrän määrittäminen suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC).
- Saadun tuloksen arviointi suhteessa rasvattoman maitojauheen standardinäytteisiin, joissa ei ole tai joihin on lisätty tunnettu prosenttimäärä herajauhetta.

5. REAGENSIT

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

5.1 **Trikloorietikkahappoliuos**

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

5.2 **Eluointiliuos, pH 6,0**

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

Täytetään 1 000 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan.

Huomautus: Eluointiliuoksen koostumusta voidaan ajantasaisesti standardista annetun todistuksen tai kolonnin-pakkausmateriaalin valmistajan suositusten mukaisesti.

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

5.3 **Pesuliuos**

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

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

5.4 **Standardinäytteet**

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

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

6. LAITTEET JA TARVIKKEET
- 6.1 **Analyysivaaka**
- 6.2 **Sentrifugi, jolla voidaan saavuttaa 2 200 g:n keskipakovoima, varustettuna noin 50 ml:n sentrifugi-putkilla, joissa on tulppa tai korkki**
- 6.3 **Mekaaninen ravistelijä**
- 6.4 **Magneettisekoitin**
- 6.5 **Lasisuppiloita, halkaisija noin 7 cm**
- 6.6 **Suodatinpapereita, keskinopea suodatus, halkaisija noin 12,5 cm**
- 6.7 **Lasinen suodatuslaite, varustettuna huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimella**
- 6.8 **Mittapipettejä, joilla voidaan annostella 10 ml (ISO 648, luokka A tai ISO/R 835) tai laite, jolla voidaan annostella 10,0 ml kahdessa minuutissa**
- 6.9 **Laite, jolla voidaan annostella 20,0 ml vettä noin 50 °C:ssa**
- 6.10 **Vesihaude säädettyinä termostaatilla 25 ± 0,5 °C:seen**
- 6.11 **HPLC-laitteisto, johon kuuluu:**
- 6.11.1 *pumppu*
- 6.11.2 *käsi­käyttöinen tai automaattinen injektori, jonka injektio­tilavuus on 15–30 µl*
- 6.11.3 *kaksi TSK 2 000 SW -kolonnia sarjassa (pituus 30 cm, sisähalkaisija 0,75 cm) tai tehokkuudeltaan vastaavat kolonnit (esim. yksi TSK 2 000-SWxl, yksi Agilent Technologies Zorbax GF 250) ja esikolonne (3 cm × 0,3 cm) pakattuna I 125:llä tai tehokkuudeltaan vastaavalla materiaalilla*
- 6.11.4 *kolonniuuni, jonka lämpötila on säädetty termostaatilla 35 ± 1 °C:seen*
- 6.11.5 *aallonpituudeltaan säädettävissä oleva UV-detektori, jolla voidaan suorittaa mittauksia 205 nm:ssä 0,008 Å:n herkkyydellä*
- 6.11.6 *integraattori, jolla voidaan integroida laaksosta laaksoon.*
- Huomautus:* Huoneenlämpötilassa olevilla kolonneilla voidaan työskennellä, mutta niiden erotuskyky on hieman heikompi. Tässä tapauksessa lämpötilan muutosten saman analyysisarjan aikana täytyy olla alle ± 5 °C.
7. NÄYTTEENOTTO
- 7.1 Näytteet otetaan kansainvälisessä ISO-standardissa 707 kuvatun menettelyn mukaisesti. Jäsenvaltiot voivat kuitenkin käyttää muuta näytteenottomenetelmää, jos se on edellä mainitun standardin periaatteiden mukainen.
- 7.2 Näyte on säilytettävä olosuhteissa, joissa näyte ei pilaannu eikä sen koostumus muutu.
8. SUORITUS
- 8.1 **Testinäytteen esikäsittely**
- Maitojauhe siirretään astiaan, joka on siihen verrattuna tilavuudeltaan noin kaksinkertainen ja jossa on ilmatiivis kansi. Astia suljetaan välittömästi. Maitojauhe sekoitetaan käännellen astiaa toistuvasti ympäri.
- 8.2 **Testinäyte**
- Punnitaan 2,000 ± 0,001 g näytettä sentrifugiputkeen (6.2) tai suljettuun pulloon (50 ml).
- 8.3 **Rasvan ja proteiinien poisto**
- 8.3.1 *Lisätään näytteeseen 20,0 ml lämmintä vettä (50 °C). Liuotetaan jauhe ravistaen 5 minuutin ajan ravistelijalla (6.3). Asetetaan putki vesihauteeseen (6.10) ja annetaan putken lämpötilan tasaantua 25 °C:ksi.*

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

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

8.4 Kromatografinen määrittäminen

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

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

Huomautus 2. Jokaisen keskeytyksen aikana kolonnit on huuhdeltava vedellä. Eluointiliuosta (5.2) ei saa koskaan jättää niihin.

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

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

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

Kolonnien valinta voi vaikuttaa merkittävästi eri piikkien retentioaikoihin.

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

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

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

Jos esiintyy epäilyjä, määrittäminen on toistettava.

8.5 Kalibrointi

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

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

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

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

9. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

9.1 Laskutapa ja kaavat

9.1.1 Vastekertoimen R laskeminen:

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

jossa:

R_{II} = piikin II vastekertoimet

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

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

jossa:

- R_{III} = piikin III vastekerroin
 $A_{III}[0]$ ja $A_{III}[5]$ = kohdassa saadut standardinäytteiden [0] ja [5] piikin III pinta-alat
 W = standardinäytteessä [5] esiintyvän heran määrä eli 5.

9.1.2 Näytteen [E] piikkien suhteellisen pinta-alan laskeminen

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

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

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

jossa:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = näytteen [E] piikkien II, III ja IV suhteelliset pinta-alat
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = kohdassa 8.4.2 saadut näytteen [E] piikkien II ja III pinta-alat
 R_{II} , R_{III} = kohdassa lasketut vastekertoimet

9.1.3 Näytteen [E] piikin III suhteellisen retentioajan laskeminen:

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

jossa:

- $RRT_{III}[E]$ = näytteen [E] piikin III suhteellinen retentioaika
 $RT_{III}[E]$ = kohdassa 8.4.2 saatu näytteen [E] piikin III retentioaika
 $RT_{III}[5]$ = kohdassa 8.5.3 saatu vertailunäytteen [5] piikin III retentioaika

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

- $RRT_{III}[E]$ on < 1,000, kun herapitoisuus on > 5 %,
- $RRT_{III}[E]$ on \geq 1,000, kun herapitoisuus on \leq 5 %.

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

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

9.2 Näytteessä esiintyvän herajuoksetejauheen prosenttiosuuden laskeminen:

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

jossa:

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

9.3 Menetelmän tarkkuus

9.3.1 Toistettavuus

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

9.3.2 Uusittavuus

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

9.4 Tulkinta

9.4.1 Todetaan herattomuus, jos piikin III suhteellinen pinta-ala S_{III} [E], grammoina herajuoksetta 100:aa tuotegrammaa kohti ilmaistuna, on $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$,

jossa

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

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

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

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

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

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

Kuvien 1 ja 2 katkoviivalla kuvattujen suorien yhtälöt ovat

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

jossa

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

P % on kokonaisproteiinipitoisuus painoprosentteina ilmaistuna,

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

Nämä yhtälöt vastaavat 9.2 kohdassa mainittua lukua 1,3.

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

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

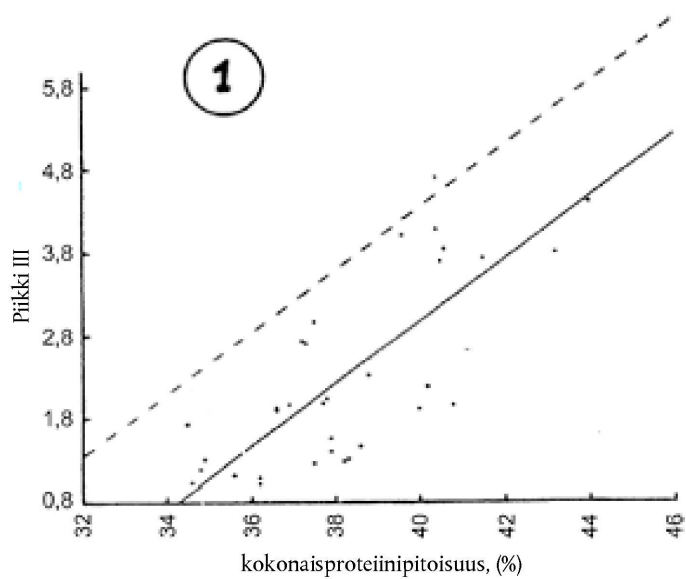
Jos T_1 ja/tai T_2 ovat suurempia kuin nolla, herajuoksetta todetaan esiintyvän.

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

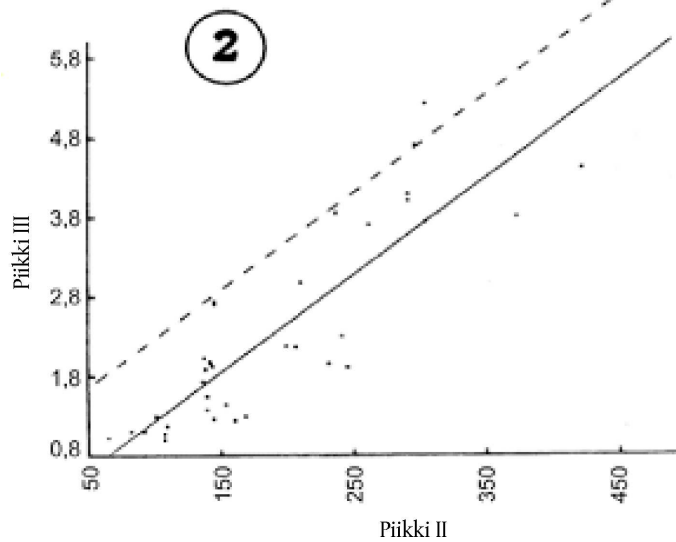
jossa:

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

Rasvaton maitojauhe



Rasvaton maitojauhe



Lisäys III

RASVATTOMASSA MAITOUJAUHEESSA OLEVAN KUIVAN HERAJUOKSETTEEN MÄÄRITYS

1. TARKOITUS: RASVATTOMAAN MAITOUJAUHEESEEN LISÄTYN KUIVAN HERAJUOKSETTEEN HAVAITSEMINEN

2. VIITTEET: KANSAINVÄLINEN ISO-STANDARDI 707

3. MÄÄRITELMÄ

Kuiva herajuoksetepitoisuus ilmoitetaan massaprosentteina ja määritetään kaseiinimakropeptidipitoisuutena tässä esitetyllä menetelmällä.

4. PERIAATE

Näytteistä määritetään kaseiinimakropeptidi A suuren erotuskyvyn nestekromatografialla käänteisfaasimenetelmällä (HPLC). Tulos arvioidaan vertaamalla sitä rasvatonta maitojauhetta sisältäviin standardinäytteisiin, joista toisiinsa on ja toisiinsa ei ole lisätty herajauhetta. Jos tulos on yli 1 % (m/m), näytteessä on kuivaa herajuoksetta.

5. REAGENSIT

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

5.1 Trikloorietikkahappoliuos

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

5.2 Eluointiliuokset A ja B

Eluointiliuos A: Mitataan 1 000 ml:n mittapulloon 150 ml asetoniitriiliä (CH_3CN), 20 ml isopropanolia ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) ja 1,00 ml trifluoretikkahappoa (TFA, CF_3COOH). Täytetään 1 000 ml:aan vedellä.

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

5.3 Kolonnin säilytys

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

5.4 Standardinäytteet

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

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

5.4.3 *Sama rasvaton maitojauhe sekoitettuna 50-prosenttiseksi (m/m) juoksetetyypisellä, koostumukseltaan standardilla herajauheella eli [5].*

6. LAITTEET JA TARVIKKEET

6.1 Analyysivaaka

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

6.3 **Mekaaninen ravistelija**

6.4 **Magneettisekoitin**

6.5 **Lasisuppiloita, halkaisija noin 7 cm**

- 6.6 **Suodatinpapereita, keskinopea suodatus, halkaisija noin 12,5 cm**
- 6.7 **Lasinen suodatuslaite, varustettuna huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimella**
- 6.8 **Mittapipettejä, joilla voidaan annostella 10 ml (ISO 648, luokka A tai ISO/R 835) tai laite, jolla voidaan annostella 10,0 ml kahdessa minuutissa**
- 6.9 **Laite, jolla voidaan annostella 20,0 ml vettä noin 50 °C:ssa**
- 6.10 **Vesihaude säädettyinä termostaatilla 25 ± 0,5 °C:seen**
- 6.11 **HPLC-laitteisto, johon kuuluu:**
- 6.11.1 *kaksikanavainen gradienttipumppu*
- 6.11.2 *käsiikäyttöinen tai automaattinen injektor, tilavuus 100 µl*
- 6.11.3 *Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 -kolonni (pituus 25 cm, sisähalkaisija 0,46 cm) tai vastaava käänteisfaasikolonni, silikapohjainen, suurihuokoinen*
- 6.11.4 *kolonniuuni, jonka lämpötila on säädetty termostaatilla 35 ± 1 °C:seen*
- 6.11.5 *aallonpituudeltaan muunneltavissa oleva UV-detektor, jolla voidaan mitata 210 nm:ssä (tarvittaessa voidaan käyttää suurempaa aallonpituutta aina 220 nm:iin asti), herkkyys 0,02 Å*
- 6.11.6 *integraattori, jolla voidaan integroida yhteiseen perusviivaan tai laaksosta laaksoon*

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

7. NÄYTTEENOTTO

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

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

8. SUORITUS

8.1 Testinäytteen esikäsittely

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

8.2 Testinäyte

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

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

8.3 Rasvan ja proteiinien poisto

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

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

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

8.4. Kromatografinen määrittäminen

8.4.1 Käänteisfaasi-HPLC-menetelmää käytettäessä happaman kirnupiimäjauheen esiintymisestä johtuvien väärin positiivisten tulosten mahdollisuus on poissuljettu.

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

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

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

Taulukko 1

Gradientin viiteolosuhteet kromatografian optimoimiseksi

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

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

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

jossa

RT_{cmpA} : CMP_A :n retentioaika viitegradientissa

10: viitegradientin B % alussa

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

13,5: 13,5 viitegradientin keskikohdan ajankohta

26: CMP_A :lle vaadittu retentioaika

6: viitegradientin ja normaaligradien kulmakertoimien suhde

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

27: viitegradientin ajoaika

8.4.3 Näytteiden injektointi

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

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

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

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

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

- 8.4.4. Näytteen (E) kromatografisen määrittelyn tulokset saadaan kromatogrammista, jossa CMP_A -piikki tunnustetaan sen retentioajasta, joka on noin 26 minuuttia.

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

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

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

8.5 Kalibrointi

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

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

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

- 8.5.2 Ennen näytteiden kromatografista määrittelyä injektoidaan 100 µl standardinäytettä, joka ei sisällä herajuoksetta [0] (5.4.1).

Kromatogrammissa ei saa esiintyä piikkiä CMP_A -piikin retentioajan kohdalla.

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

9. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

9.1 Laskutapa ja kaavat

- 9.1.1 Vastekertoimen R laskeminen:

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

jossa

R = CMP_A -piikin vastekerroin

H = CMP_A -piikin korkeus

W = standardinäytteen [5] sisältämän heran määrä

9.2 Näytteessä esiintyvän herajuoksetejauheen prosenttiosuuden laskeminen

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

jossa

$W(E)$ = näytteen (E) herajuoksetteen prosenttiosuus m/m

R = CMP_A -piikin vastekerroin (9.1.1)

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

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

9.3 Menetelmän tarkkuus

9.3.1 Toistettavuus

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

9.3.2 Uusittavuus

Ei määritetty.

9.3.3 Lineaarisuus

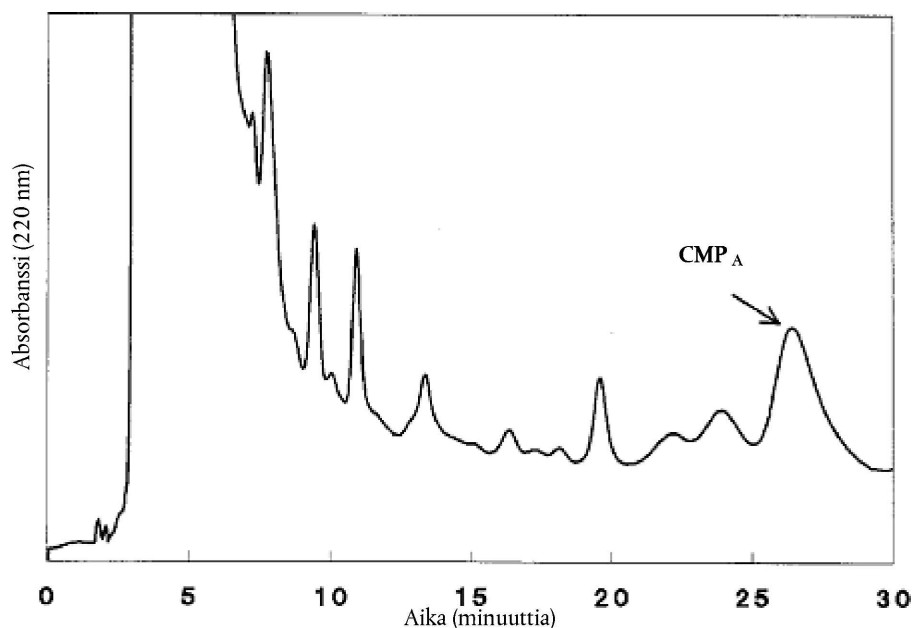
Kuvaajan on oltava lineaarinen herajuoksetteen pitoisuusalueella 0–16 %, ja korrelaatiokertoimen on oltava > 0,99.

9.4 Tulkinta

1 %:n raja sisältää uusittavuudesta johtuvan epävarmuuden.

Kuva 1

Ni—4.6 standardi



(*) Kansainvälinen IDF-standardi 135B/1991. Maito ja maitotuotteet. Tunnusmerkit analyttisten menetelmien tarkkuudelle. Yhteenvedo kollaboratiivisesta tutkimusmenettelystä.”

3) Lisätään liitteet seuraavasti:

"LIITE VI

Yksityisessä varastoinnissa olevan voin analyysimenetelmät

Parametri	Menetelmä
Rasva ⁽¹⁾	ISO 17189 tai ISO 3727 osa 3
Vesi	ISO 3727 osa 1
Rasvaton kuiva-aine (suola pois luettuna)	ISO 3727 osa 2
Suola	ISO 15648

⁽¹⁾ Maksajaviraston on hyväksyttävä sovellettava menetelmä.

LIITE VII

Yksityisessä varastoinnissa olevan rasvattoman maitojauheen analyysimenetelmät

Parametri	Menetelmä
Rasva	ISO 1736
Proteiini	ISO 8968 osa 1
Vesi	ISO 5537

LIITE VIII

Yksityisessä varastoinnissa olevan juuston analyysimenetelmät

1. Lisäyksessä esitettyä menetelmää sovelletaan sen varmistamiseksi, ettei juusto, joka on valmistettu yksinomaan lampaan-, vuohen- tai puhvelinmaidosta taikka lampaan-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksista, sisällä lehmänmaidon kaseiinia.

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

2. Lehmänmaidon kaseiinin osoittamiseksi 1 kohdassa tarkoitetuista juustoista voidaan käyttää menetelmiä seuraavin edellytyksin:
 - a) toteamisraja on enintään 0,5 prosenttia ja
 - b) vääriä positiivisia tuloksia ei esiinny ja
 - c) lehmänmaidon kaseiini on osoitettavissa vaaditulla herkkyydellä pitkienkin kypsytämisyksiköiden jälkeen, kuten voi tapahtua tavanomaisissa kaupallisissa olosuhteissa.

Jos jokin edellä mainituista edellytyksistä ei täyty, on käytettävä lisäyksessä esitettyjä menetelmiä.

Lisäys

MENETELMÄ LEHMÄNMAIDON JA KASEINAATIN OSOITTAMISEKSI LAMPAAN-, VUOHEN- TAI PUHVELINMAIDOSTA TAI LAMPAAN-, VUOHEN- JA PUHVELINMAIDON SEOKSISTA VALMISTETUISSA JUUSTOISSA

1. SOVELTAMISALA

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

2. SOVELTAMISALA

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

3. MENETELMÄN PERIAATE

3.1 Kaseiinien eristäminen juustosta ja vertailustandardeista

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

3.3 Plasmiinilla käsiteltyjen kaseiinien isoelektrinen fokuointi urean läsnäollessa ja proteiinien värjäys

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

4. REAGENSIT

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

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

Isoelektrinen fokuointi

4.1 Reagenssit ureaa sisältävien polyakryyliamidigeelien valmistamiseksi

4.1.1 Geelin kantaliuos

Liuotetaan

4,85 g akryyliamidia

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

48,05 g ureaa

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

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

Huomautus: Painoltaan määrättyjen hermomyrkyllisten akryyliamidien sijasta voi käyttää myös kaupallisesti saatavaa esisekoitettua akryyliamidi/BIS-liuosta. Kun tällainen liuos sisältää 30 % w/v akryyliamidia ja 0,8 % w/v BIS:ä, tätä on käytettävä 16,2 ml varastoliuokseen määrättyjen painojen sijaan. Varastoliuoksen säilyvyys on enintään 10 päivää; jos sen johtokyky on suurempi kuin $5 \mu\text{S}$, on suoritettava ioninpoisto sekoittamalla sitä 2 g:n Amberlite MB-3:n kanssa 30 minuutin ajan ja sitten suodatettava $0,45 \mu\text{m}$:n kalvon läpi.

4.1.2 Geeliliuos

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

9,0 ml varastoliuosta

24 mg de β -alaniinia

500 μ l amfolyyttiä, pH 3,5–9,5

250 μ l amfolyyttiä, pH 5-7

250 μ l amfolyyttiä, pH 6-8

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

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

4.1.3 Katalyyttiliuokset

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

4.1.3.2 40 % w/v ammoniumpersulfaatti (PER):

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

Huomautus: Aina on käytettävä juuri valmistettua PER-liuosta.

4.2 **Kontaktineste**

Petroli tai parafiiniöljy.

4.3 **Anodiliuos**

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

4.4 **Katodiliuos**

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

Näytteen valmistus

4.5 **Reagenssit proteiinien eristämiseksi**

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

4.5.2 *Dikloorimetaani*

4.5.3 *Asetoni*

4.6 **Proteiinia liuottava puskuriliuos**

Liuotetaan

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

24,03 g ureaa

250 mg ditiotreitolia

veteen ja täytetään 50 ml:aan.

Huomautus: Säilytetään jääkaapissa, säilyvyys enintään 1 viikko.

4.7 Reagenssit kaseiinien pilkkomiseksi plasmiiinilla

4.7.1 Ammoniumkarbonaattipuskuri

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

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

4.7.3 ϵ -Aminokapronihappoliuos entsyymi-inhibitiota varten

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

4.8 Standardit

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

4.8.2 Laboratorion välistandardien valmistaminen puhvelin juoksutetusta maidosta, joka sisältää 0 % ja 1 % lehmänmaitoa

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

Huomautus: On suositeltavaa tarkistaa puhvelinmaidon puhtaus plasmiiini-käsiteltyjen kaseiinien isoelektrisellä fokuosoinnilla ennen standardien valmistamista.

Reagenssit proteiinien värjäykseen

4.9 Kiinnitysaine

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

4.10 Väriinpoistoliuos

Laimennetaan 500 ml metanolia ja 200 ml jäätikkoa 2 000 ml:ksi tislattulla vedellä.

Huomautus: Tuore väriinpoistoliuos on valmistettava joka päivä; se voidaan valmistaa sekoittamalla yhtä suuret tilavuudet varastoliuoksia, 50 % (v/v) metanolia ja 20 % (v/v) jäätikkoa.

4.11 Värjäysliuokset

4.11.1 Värjäysliuos (kantaliuos 1)

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

4.11.2 Värjäysliuos (kantaliuos 2)

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

4.11.3 Värjäysliuos (työskentelyliuos)

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

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

5. LAITTEET JA TARVIKKEET
- 5.1 Lasilevyjä (265 × 125 × 4 mm); kumitela (leveys 15 cm); vaakatasopöytä
- 5.2 Kantaja-arkki geelille (265 × 125 mm)
- 5.3 Peitearkki (280 × 125 mm). Kiinnitetään teippinauha (280 × 6 × 0,25 mm) kummallekin pitkälle sivulle (ks. kuva 1).
- 5.4 Elektrofokusoitinkammio, jossa on jäähdytyslevy (esim. 265 × 125 mm) ja sopiva virtalähde ($\geq 2,5$ kV) tai automaattinen elektroforeesilaitte
- 5.5 Kiertokryostaatti, säädetty termostaatilla lämpötilaan $12 \pm 0,5$ °C
- 5.6 Sentrifugi, säädettävissä nopeuteen 3 000 g
- 5.7 Elektrodiliuskat (pituus ≥ 265 mm)
- 5.8 Muovisia tippapulloja anodi- ja katodiliuksille
- 5.9 Näyteapplikaattoreita (10 × 5 mm, viskoosia tai suodatinpaperia, joka ei absorboi proteiineja)
- 5.10 Ruostumatonta terästä olevia tai lasisia värjäys- ja värinpoistoastioita (esim. 280 × 150 mm instrument-titarjottimia)
- 5.12 Säädettävissä oleva sauvahomogenisaattori (varren halkaisija 10 mm), rpm alueella 8 000–20 000
- 5.13 Magneettisekoitin
- 5.14 Ultraäänihauhe
- 5.15 Kalvojen saumaukseen sopiva laite
- 5.16 Mikropipettejä, 25 μ l
- 5.17 Tyhjiöhaidutin tai kylmäkuivain
- 5.18 Vesihauhe, joka on termostaatilla säädeltävissä lämpötiloihin 35 ja 40 ± 1 °C, ravistelijalla varustettuna
- 5.19 Tiheysmittari, luettavissa aallonpituudella $\lambda = 634$ nm
6. SUORITUS
- 6.1 Näytteen valmistus
- 6.1.1 Kaseiinien eristäminen

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

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

- 6.1.2 β -kaseiinien pilkkominen plasmiinilla γ -kaseiinin vahvistamiseksi

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

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

6.2 Urea sisältävien polyakryyliamidigeelien valmistus

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

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

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

6.3 Isoelektrinen fokusointi

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

Isoelektrisen fokusoinnin olosuhteet:

6.3.1 Geelikoko 265 × 125 × 0,25 mm

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

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

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

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

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

Asetetaan näyteapplikaattori vaiheessa 2, kun volttitunnit ovat 0 Vh.

Poistetaan näyteapplikaattori vaiheessa 2, kun volttitunnit ovat 30 Vh.

6.4 Proteiinien värjäys

6.4.1 Proteiinien kiinnitys

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

6.4.2 Geelilevyn pesu ja värjäys

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

6.4.3 Geelilevyn väriinpoisto

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

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

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

7. ARVIOINTI

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

7.1 Silmämääräinen arviointi

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

7.2 Tiheysmittaukseen perustuva arviointi

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

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

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

8. VIITTEET

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).

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).

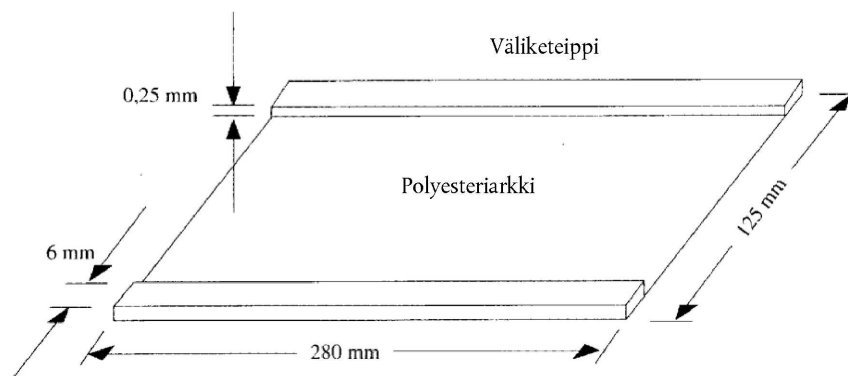
Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393,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

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

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

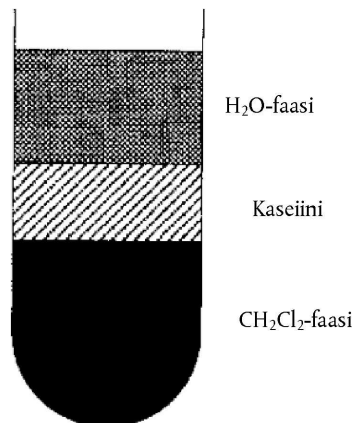
Kuva 1

Kuva peitearkista



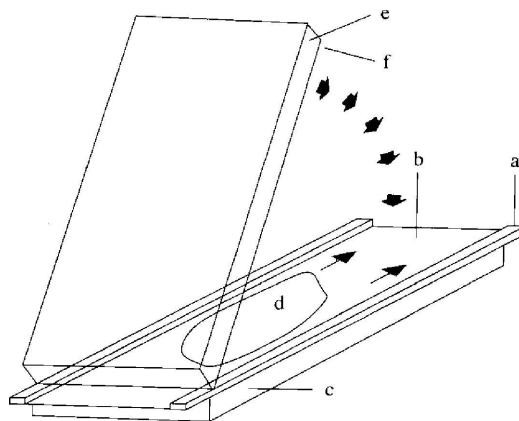
Kuva 2

Vesifaasin ja orgaanisen faasin välissä kelluva kaseiinkerros sentrifugoinnin jälkeen



Kuva 3

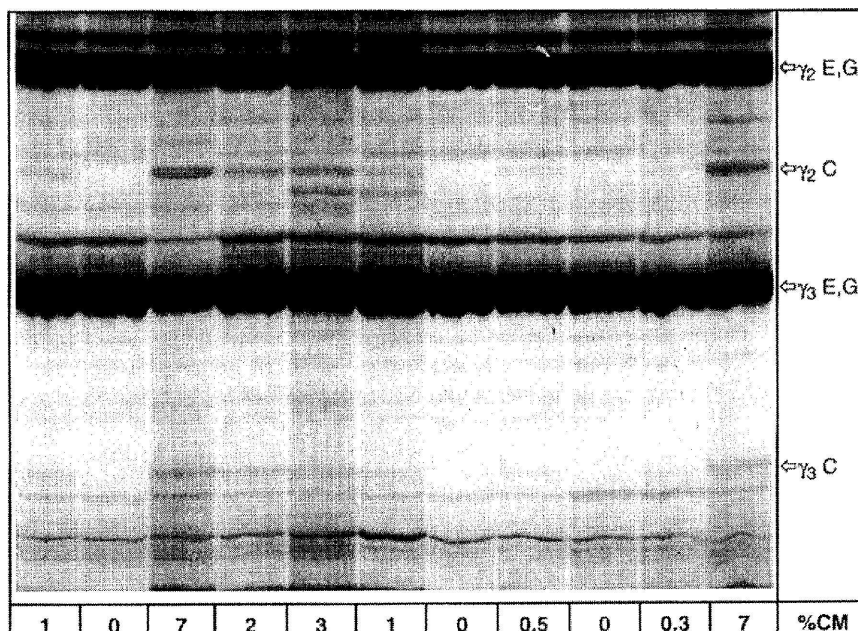
Sulkemistekniikka erittäin ohuiden polyakryyliamidigeelien valmistamiseksi



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

Kuva 4 a

Lampaan- ja vuohenmaidosta valmistetun, eri määriä lehmänmaitoa sisältävän juuston plasmiiinilla käsitellyjen kaseiinien isoelektrinen fokusointi

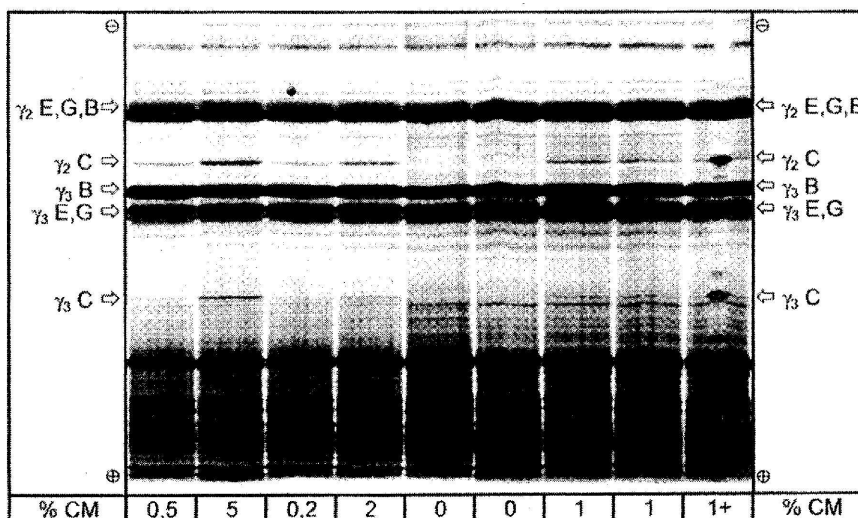


% CM = lehmänmaidon prosenttiosuus, C = lehmä, E = lammas, G = vuohi.

Kuvassa on esitetty IEF-geelin ylempi puolisko.

Kuva 4 b

Lampaan-, vuohen- ja puhvelinmaidon seoksista valmistetun, eri määriä lehmänmaitoa sisältävän juuston plasmiiinilla käsitellyjen kaseiinien isoelektrinen fokusointi

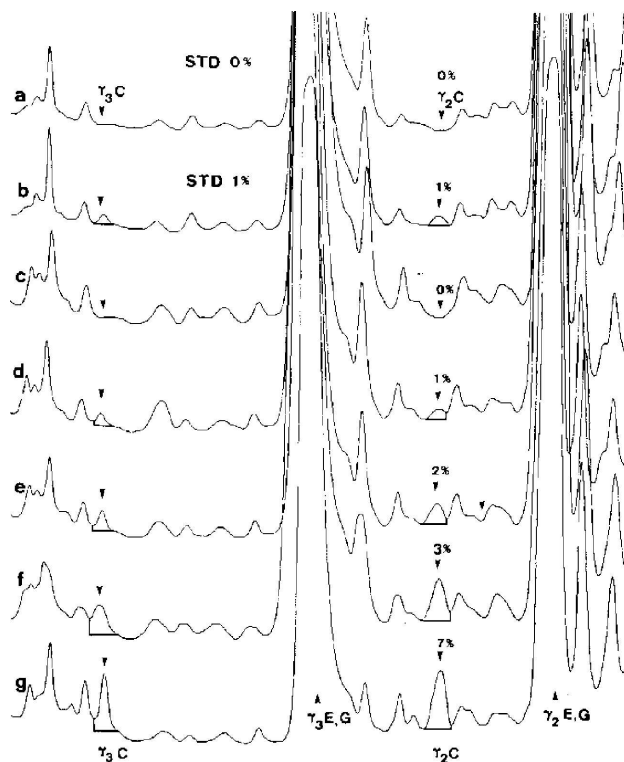


% CM = lehmänmaidon prosenttiosuus; 1 + = näyte, joka sisältää 1 % lehmänmaitoa ja johon on lisätty puhdasta naudan kaseiinia linjan keskellä. C = lehmä, E = lammas; G = vuohi, B = puhveli.

Kuvassa on esitetty IEF-geelin koko erotusetäisyys.

Kuvio 5

Standardin (STD) sekä lampaan- ja vuohenmaidon seoksesta valmistetun juuston näytteiden densitogrammit päällekkäin asetettuna isoelektrisen fokuosoinnin jälkeen



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

Ylempi puolisko IEF-geelistä tutkittiin aallonpituudella $\lambda = 634$ nm.

LIITE IX

Analyysien arviointi**1. Laadunvarmistus**

Analyysit on tehtävä laboratorioissa, jotka on nimetty asetuksen (EY) N:o 882/2004 (**) 12 artiklan mukaisesti tai jotka jäsenvaltion toimivaltaiset viranomaiset ovat nimenneet.

2. Näytteenotto ja analyysien tulosten kiistäminen

1. Näytteenotto on tehtävä asianomaista tuotetta koskevien säännösten mukaisesti. Jos näytteenotosta ei ole säädetty nimenomaisesti, sovelletaan standardia ISO 707 Milk and milk products – Guidance on sampling (Maito ja maitovalmisteet – Näytteenottoa koskevia ohjeita).
2. Analyysin tuloksista tehdyissä laboratorioraporteissa on oltava riittävästi tietoja, jotta tuloksia voidaan arvioida lisäyksen mukaisesti.
3. Unionin lainsäädännössä säädettyjen analyysien tekemiseksi on otettava kaksoisnäytteitä.
4. Jos tulokset kiistetään, maksajavirasto teettää kyseisestä tuotteesta tarvittavat testit uudelleen, ja häviävän osapuolen on maksettava tähän liittyvät kustannukset.

Edellä mainittu analyysi tehdään, jos tuotteesta on saatavilla sinetöityjä rinnakkaisnäytteitä ja jos ne on asianmukaisesti varastoitu toimivaltaisten viranomaisten tiloihin. Valmistajan on lähetettävä maksajavirastolle analyysintekopyyntö seitsemän työpäivän kuluessa ensimmäisen analyysin tulosten tiedoksiantamisesta. Maksajaviraston on tehtävä analyysi 21 työpäivän kuluessa pyynnön vastaanottamisesta.

5. Uusintatestin tulokset ovat lopulliset.
6. Jos valmistaja voi viiden työpäivän kuluessa näytteenotosta todistaa, ettei näytteenottoa suoritettu asianmukaisesti, on mahdollisuuksien mukaan otettava uudet näytteet. Jos uusia näytteitä ei voida ottaa, erä on hyväksyttävä.

Lisäys

Arviointi siitä, onko erä lakisäätteisten rajojen mukainen**1. Periaate**

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

2. Menetelmä on validoitu kansainvälisessä yhteistyössä

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

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

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

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

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

Erän katsotaan olevan lakisäätteen ylärajan UL vastainen, jos

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

muutoin sen katsotaan olevan ylärajan UL mukainen.

Erän katsotaan olevan lakisäätteen alarajan LL vastainen, jos

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

muutoin sen katsotaan olevan ylärajan LL mukainen.

3. Sisäinen validointimenettely, johon liittyy uusittavuuden sisäisen standardipoikkeaman laskeminen

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

Säännöt, joita on noudatettava lakisäätteen rajan noudattamisen määrittämiseksi, ovat 1 kohdassa esitetyt säännöt. Jos erän ei kuitenkaan katsota olevan lakisäätteen rajan mukainen, mittaukset on toistettava tässä asetuksessa esitetyn menetelmin ja tulos on arvioitava 1 kohdan mukaisesti.

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

(**) Rehu- ja elintarvikelainsäädännön sekä eläinten terveyttä ja hyvinvointia koskevien sääntöjen mukaisuuden varmistamiseksi suoritettua virallista valvonnasta 29 päivänä huhtikuuta 2004 annettu Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 882/2004 (EUVL L 165, 30.4.2004, s. 1)."