

KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO REGLAMENTAS (ES) 2018/150**2018 m. sausio 30 d.****kuriuo dėl pieno ir pieno produktų, atitinkančių valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui reikalavimus, analizės ir kokybės vertinimo metodų iš dalies keičiamas Įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240**

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2013 m. gruodžio 17 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (ES) Nr. 1306/2013 dėl bendros žemės ūkio politikos finansavimo, valdymo ir stebėsenos, kuriuo panaikinami Tarybos reglamentai (EEB) Nr. 352/78, (EB) Nr. 165/94, (EB) Nr. 2799/98, (EB) Nr. 814/2000, (EB) Nr. 1290/2005 ir (EB) Nr. 485/2008 ⁽¹⁾, ypač į jo 62 straipsnio 2 dalies i punktą,

kadangi:

- (1) Komisijos deleguotajame reglamente (ES) 2016/1238 ⁽²⁾ ir Komisijos įgyvendinimo reglamente (ES) 2016/1240 ⁽³⁾ nustatytos valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui taisyklės. Komisijos reglamente (EB) Nr. 273/2008 ⁽⁴⁾ nustatyti metodai, taikytini vertinant, ar pienas ir pieno produktai atitinka tuose reglamentuose dėl valstybės intervencijos ir privačiam sandėliavimui taikamai paramai nustatytus atitikties reikalavimus;
- (2) atsižvelgiant į pieno ir pieno produktų analizei ir kokybės vertinimui taikomos metodikos techninę pažangą, taip pat siekiant supaprastinti nuostatas ir pateikti atnaujintas nuorodas į ISO standartus, reikėtų padaryti reikšmingų pakeitimų. Siekiant aiškumo ir veiksmingumo ir atsižvelgiant į Reglamento (EB) Nr. 273/2008 nuostatų pakeitimų mastą ir techninį pobūdį, atitinkamos to reglamento nuostatos turėtų būti įtrauktos į Įgyvendinimo reglamentą (ES) 2016/1240;
- (3) siekiant užtikrinti, kad naujų standartų ir metodų būtų vienodai laikomasi visose valstybėse narėse, laboratorijoms turėtų būti suteikta pakankamai laiko, kad jos galėtų peržiūrėti procedūras ir pradėti taikyti atnaujintus metodus;
- (4) Įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas;
- (5) siekiant teisinio aiškumo Reglamentas (EB) Nr. 273/2008 turėtų būti panaikintas;
- (6) šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka Bendro žemės ūkio rinkų organizavimo komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240 iš dalies keičiamas taip:

1) 4 straipsnis iš dalies keičiamas taip:

a) 1 dalis iš dalies keičiama taip:

i) d punktas pakeičiamas taip:

„d) sviesto: šio reglamento IV priedo I ir Ia dalyse;“;

ii) e punktas pakeičiamas taip:

„e) nugriebto pieno miltelių: šio reglamento V priedo I ir Ia dalyse.“;

⁽¹⁾ OL L 347, 2013 12 20, p. 549.⁽²⁾ 2016 m. gegužės 18 d. Komisijos deleguotasis reglamentas (ES) 2016/1238, kuriuo papildomos Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 1308/2013 nuostatos dėl valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui (OL L 206, 2016 7 30, p. 15).⁽³⁾ 2016 m. gegužės 18 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240, kuriuo nustatomos Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 1308/2013 nuostatų dėl valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui taikymo taisyklės (OL L 206, 2016 7 30, p. 71).⁽⁴⁾ 2008 m. kovo 5 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 273/2008, nustatantis išsamias Tarybos reglamento (EB) Nr. 1255/1999 taikymo taisykles, susijusias su pieno ir pieno produktų analizės bei kokybės vertinimo metodais (OL L 88, 2008 3 29, p. 1).

b) 2 dalis pakeičiama taip:

„2. Metodai, naudojami siekiant nustatyti atitinkamai I, IV ir V prieduose nurodytos valstybės intervencijos reikalavimus atitinkančių grūdų, sviesto ir nugriebto pieno miltelių kokybę, turi būti atitinkamų Europos arba tarptautinių standartų naujausiose redakcijose nustatyti atitinkami metodai, galiojantys ne trumpiau kaip 6 mėnesius iki pirmosios valstybės intervencijos laikotarpio, apibrėžto Reglamento (ES) Nr. 1308/2013 12 straipsnyje, dienos.“

2) Įterpiamas 60a straipsnis:

„60a straipsnis

Specialios nuostatos dėl patikrų, susijusių su pieno ir pieno produktų valstybės intervencija ir parama privačiam sandėliavimui

1. Sviesto, nugriebto pieno miltelių ir sūrio atitiktis paramos privačiam sandėliavimui reikalavimams nustatoma remiantis atitinkamai VI, VII ir VIII prieduose nustatytais metodais.

Tie metodai nustatomi atsižvelgiant į konkrečiu atveju (ne trumpiau kaip 6 mėnesius iki pirmosios valstybės intervencijos laikotarpio, dienos, kaip apibrėžta Reglamento (ES) Nr. 1308/2013 12 straipsnyje) galiojančias naujausias atitinkamų Europos arba tarptautinių standartų versijas.

2. Patikrų, atliktų taikant šiame reglamente nustatytus metodus, rezultatai vertinami remiantis IX priedu.“

3) Priedai iš dalies keičiami pagal šio reglamento priedą.

2 straipsnis

Reglamentas (EB) Nr. 273/2008 panaikinamas.

3 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja septintą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2018 m. sausio 30 d.

Komisijos vardu

Pirmininkas

Jean-Claude JUNCKER

PRIEDAS

Igyvendinimo reglamento (ES) 2016/1240 priedai iš dalies keičiami taip:

1) IV priedas iš dalies keičiamas taip:

a) I dalies 2 punkto antroji pastraipa pakeičiama taip:

„Kiekvienas mėginys vertinamas atskirai. Mėginių ėmimo ir vertinimo kartoti negalima.“;

b) įterpiama ši Ia dalis:

„IA DALIS

Valstybės intervencijai pateikiamo nesūdyto sviesto analizės metodai

Parametras	Metodas
Riebalai ⁽¹⁾	ISO 17189 arba ISO 3727 3 dalis
Vanduo	ISO 3727 1 dalis
Sausosios neriebalinės medžiagos	ISO 3727 2 dalis
Riebalų rūgštingumas	ISO 1740
Peroksidų skaičius	ISO 3976
Ne pieno riebalai	ISO 17678
Juslinės charakteristikos	ISO 22935 2 ir 3 dalys ir toliau pateikta balų lentelė.

⁽¹⁾ Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra.

Balų lentelė

Išvaizda		Konsistencija		Kvapą ir skonis	
Balai	Pastabos	Balai	Pastabos	Balai	Pastabos
5	<i>Labai gera</i> Puiki Aukščiausios kokybės (vienodai sausa)	5	<i>Labai gera</i> Puiki Aukščiausios kokybės (tepasi tolydžiai)	5	<i>Labai geras</i> Puikus Aukščiausios kokybės (absoliučiai grynas, puikus kvapas)
4	<i>Gera</i> (be akivaizdžių defektų)	4	<i>Gera</i> (be akivaizdžių defektų)	4	<i>Geras</i> (be akivaizdžių defektų)
1, 2 arba 3	Yra defektų	1, 2 arba 3	Yra defektų	1, 2 arba 3	Yra defektų“

2) V priede įterpiama ši Ia dalis:

„IA DALIS

Valstybės intervencijai pateikiamų nugriebto pieno miltelių analizės metodai

Parametras	Metodas
Baltymai	ISO 8968 1 dalis
Riebalai	ISO 1736
Vanduo	ISO 5537
Rūgštingumas	ISO 6091
Laktatai	ISO 8069
Fosfatazės tyrimas	ISO 11816 1 dalis
Netirpumo indeksas	ISO 8156
Suskrudusios dalelės ⁽¹⁾	ADPI (Amerikos pienininkystės institutas)
Mikroorganizmai	ISO 4833 1 dalis
Pasukos	I priedėlis
Fermentinės išrūgos ⁽²⁾	II ir III priedėliai
Rūgščiosios išrūgos ⁽³⁾	ISO 8069 arba patikros vietoje
Jutiminės patikros ⁽⁴⁾	ISO 22935 2 ir 3 dalys

⁽¹⁾ Suskrudusių dalelių analizę galima vykdyti sistemingai. Tačiau tokią analizę būtina atlikti, jei neatliekamos jutiminės patikros.

⁽²⁾ Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra (vieną arba abu metodus).

⁽³⁾ Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra.

⁽⁴⁾ Jutiminės patikros atliekamos, jei atlikus mokėjimo agentūros patvirtintą rizikos analizę manoma, kad tai būtina.

I priedėlis

NUGRIEBTO PIENO MILTELIAL KIEKYBINIS FOSFATIDILSERINO IR FOSFATIDILETANOLAMINO
NUSTATYMAS**Metodas – atvirkštinių fazių efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC)**

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Šio metodo apraše apibūdinama fosfatidilserino (FS) ir fosfatidiletanolamino (FE) kiekybinio nustatymo nugriebto pieno milteliuose (NPM) procedūra, kuri tinka NPM esančioms pasukų sausosioms medžiagoms nustatyti.

2. APIBRĖŽTIS

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

3. METODO ESMĖ

Aminofosfolipidai, esantys iš pieno miltelių gautame piene, ekstrahuojami metanoliu. FS ir FE, kaip *o*-ftalio rūgšties dialdehido (OFA) dariniai, aptinkami atvirkštinių fazių (RP) HPLC, naudojant fluorescencinį detektorių. FS ir FE kiekis mėginyje nustatomas pagal etaloninį mėginį, kuriame yra žinomas DPFE kiekis.

4. REAGENTAI

Naudojami tik patvirtinti analiziškai grynai reagentai. Jei nenurodyta kitaip, naudojamas distiliuotas arba bent tokio pat grynumo vanduo.

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

Pastaba. Etaloninė medžiaga laikoma – 18 °C temperatūroje.

4.2. Reagentai etaloniniam ir tiriamajam mėginiam ruošti

4.2.1. HPLC grynumo metanolis

4.2.2. HPLC grynumo chloroformas

4.2.3. Triptamino monohidrochloridas

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

4.3.1. Natrio hidroksidas, 12 mol/l vandeninis tirpalas

4.3.2. Boro rūgštis, 0,4 mol/l vandeninis tirpalas, natrio hidroksidu pašarmintas iki pH 10,0 (4.3.1)

4.3.3. 2-merkaptoetanolis

4.3.4. *o*-ftalio rūgšties dialdehidas (OFA)

4.4. HPLC eliuavimo tirpikliai

4.4.1. Eliuavimo tirpikliai ruošiami naudojant HPLC grynumo reagentus.

4.4.2. HPLC grynumo vanduo

4.4.3. Fluorimetriniu detektoriumi patikrinto grynumo metanolis

4.4.4. Tetrahidrofuranas

4.4.5. Natrio dihidrofosfatas

4.4.6. Natrio acetatas

4.4.7. Acto rūgštis.

5. APARATŪRA

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

5.2. **Cheminės stiklinės, 25 ir 100 ml talpos**

5.3. **Pipetės, 1 ir 10 ml**

5.4. **Magnetinė maišyklė**

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

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

5.7. **Švirkštai, 20 ir 100 µl talpos**

5.8. **Ultragarsinė vonelė**

5.9. **Centrifuga, galinti išvystyti 27 000 g išcentrinę jėgą**

5.10. **Stikliniai buteliukai, maždaug 5 ml talpos**

5.11. **Graduotas cilindras, 25 ml talpos**

5.12. **pH-metras, kurio tikslumas 0,1 pH vieneto**

5.13. HPLC įranga

5.13.1. *Judančiosios fazės gradiento formavimo sistema, kurios našumas 1,0 ml/min., esant 200 barų slėgiui*

5.13.2. *Automatinis ėmiklis, kuriame galima sintetinti darinius*

5.13.3. *Kolonėlės šildytuvai, kuriuo galima palaikyti 30 °C ± 1 °C kolonėlės temperatūrą*

5.13.4. *Fluorescencinis detektorius, galintis veikti esant 330 nm sužadavimo bangos ilgiui ir 440 nm emisijos bangos ilgiui*

5.13.5. *Integratorius arba duomenų apdorojimo programinė įranga smailės plotui išmatuoti*

5.13.6. *Kolonėlė „LiChrospher® – 100“ (250 × 4,6 mm) arba lygiavertė kolonėlė, įkrova – oktadecilsilanas (C 18), dalelių dydis – 5 µm.*

6. MĖGINIŲ ĖMIMAS

Mėginiai imami laikantis ISO 707 standarto.

7. PROCEDŪRA**7.1. Vidinio etaloninio tirpalo ruošimas**

7.1.1. Į 100 ml matavimo kolbą (5.6) pasverama 30,0 ± 0,1 mg triptamino monohidrochlorido (4.2.3) ir praskiedžiama metanolio (4.2.1) iki žymės.

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

7.2. Tiriamojo mėginio tirpalo ruošimas

7.2.1. Į 25 ml cheminę stiklinę (5.2) pasverama 1,000 g ± 0,001 g NPM mėginio. Pipete (5.3) įpilama 10 ml iki 40 °C ± 1 °C pašildyto distiliuoto vandens ir 30 min. maišoma magnetine maišykle (5.4), kad neliktų jokių neištirpusių gumuliukų.

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

7.2.3. Centrifuguojama (5.9) 10 min., esant 27 000 g, ir supernatantas supilamas į stiklinį buteliuką (5.10).

Pastaba. Tiriamojo mėginio tirpalas iki HPLC analizės turi būti laikomas 4 °C temperatūroje.

7.3. Išorinio etaloninio tirpalo ruošimas

- 7.3.1. Į 50 ml matavimo kolbą (5.6) pasverama 55,4 mg DPFE (4.1) ir graduotu cilindru (5.11) įpilama apie 25 ml chloroformo (4.2.2). Kolba užkemšama kamščiu ir pašildoma iki $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, tada atsargiai maišoma tol, kol ištirpsta DPFE. Kolba atvėsinama iki $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, įpilama metanolio (4.2.1) iki žymės ir, vartant kolbą, sumaišoma.
- 7.3.2. 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 100 ml matavimo kolbą (5.6) ir skiedžiama metanolio (4.2.1) iki žymės. 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.6), įšvirkščijama (5.7) 100 μl 0,15 mmol/l triptamino tirpalo (7.1) ir skiedžiama metanolio (4.2.1) iki žymės. Vartant kolbą, tirpalas sumaišomas.

Pastaba. Iki HPLC analizės etaloninis tirpalas turi būti laikomas $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

7.4. Reagento dariniui gauti ruošimas

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

Pastaba. Reagentas dariniui gauti turėtų būti laikomas rudo stiklo butelyje $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir išlieka stabilus vieną savaitę.

7.5. Nustatymas HPLC metodu**7.5.1. Eliuavimo tirpikliai (4.4)**

Tirpiklis A: 0,3 mmol/l natrio dihidrofosfato ir 3 mmol/l natrio acetato tirpalas (acto rūgštimi parūgštintas iki pH $6,5 \pm 0,1$); metanolis: tetrahydrofuranas = 558: 440: 2 (tūrio dalimis).

Tirpiklis B: metanolis.

7.5.2. Rekomenduojamas išplovimo gradientas:

Laikas (min)	Tirpiklis A (%)	Tirpiklis B (%)	Srautas (ml/min.)
Pradinis	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Pastaba. Norint gauti 1 paveiksle pavaizduotą skyrą, išplovimo gradientą gali tekti šiek tiek pakeisti.

Kolonėlės temperatūra: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

7.5.4. Kolonėlės išlyginimas

Kasdien paleidžiant sistemą kolonėlė 15 min. plaunama grynu tirpikliu B, tada nustatomas A:B = 40:60 santykis ir lyginama 15 min. (srautas – 1 ml/min.). Atliekamas tuščiasis bandymas įšvirkščiant metanolio (4.2.1).

Pastaba. Jei kolonėlė nebus naudojama ilgesnį laiką, ji 30 min. plaunama metanolio ir chloroformo mišiniu, kurio santykis 80: 20 (tūrio dalimis).

7.5.5. FS + FE kiekio nustatymas tiriamajame mėginyje

7.5.6. Vienodai sulaikymo trukmei gauti vienodais laiko tarpais atliekamos kelios chromatografinės analizės iš eilės. Kas 5–10 tiriamųjų mėginių tirpalų švirkštimų įšvirkščiamas išorinio etalono tirpalas (7.3) atsako koeficientui apskaičiuoti.

Pastaba. Atlikus 20–25 analizes kolonėlė mažiausiai 30 min. plaunama grynu tirpikliu B (7.5.1).

7.6. Integravimo būdas

7.6.1. DPFE smailė

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

7.6.2. Tryptamino smailė

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

7.6.3. FS ir FE smailių grupės

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

8. SKAIČIAVIMAI IR REZULTATŲ PATEIKIMAS

FS ir FE kiekis tiriamajame mėginyje apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia:

C – FS arba FE kiekis tiriamajame mėginyje (mg/100 g miltelių),

A₁ – etaloninio tirpalo (7.3) DPFE smailės plotas,

A₂ – tiriamojo mėginio tirpalo (7.2) FS arba FE smailės plotas,

T₁ – etaloninio tirpalo (7.3) triptamino smailės plotas,

T₂ – tiriamojo mėginio tirpalo (7.2) triptamino smailės plotas.

9. METODO TIKSLUMAS

Pastaba. Pakartojamumo vertės apskaičiuotos pagal tarptautinį IDF standartą (*).

9.1. Pakartojamumas

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

9.2. Atkuriamumas

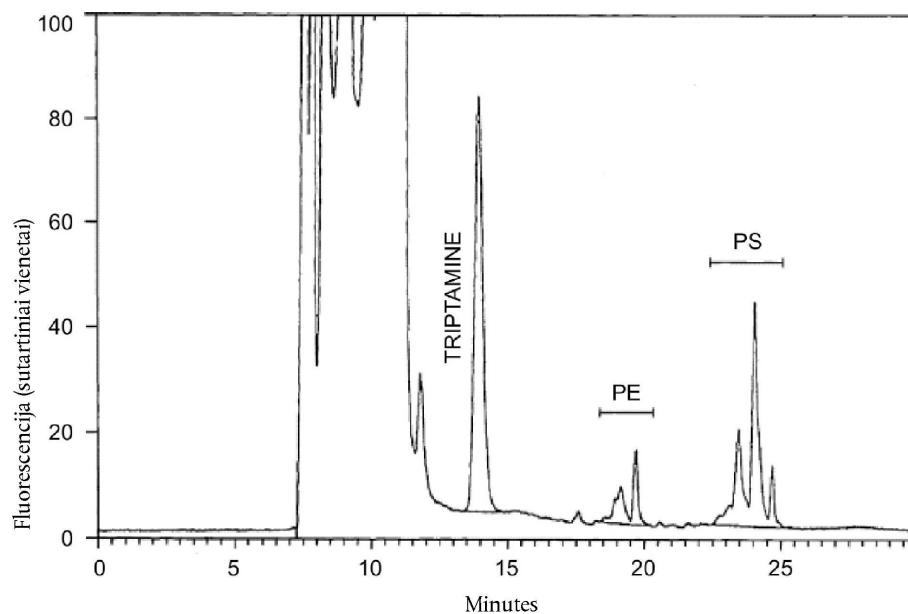
Jei skirtingose laboratorijose, naudodami skirtingą aparatūrą skirtingomis to paties mėginio analizės sąlygomis, analitikai gavo du rezultatus, santykinis jų skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 11 % rezultatų aritmetinio vidurkio.

10. NUORODOS

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

1 paveikslas

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



II priedėlis

FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ APTIKIMAS VIEŠAJAM SANDĖLIAVIMUI SKIRTUOSE NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE NUSTATANT KAZEINO MAKROPEPTIDŲ KIEKĮ EFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS (HPLC) METODU

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatant kazeino makropeptidų kiekį galima aptikti fermentines išrūgas viešajam sandėliavimui skirtuose nugriebto pieno milteliuose.

2. NUORODA

Tarptautinis standartas ISO 707 „Pienas ir pieno produktai. Mėginių ėmimo nurodymai“.

3. APIBRĖŽTIS

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

4. METODO ESMĖ

- Nugriebto pieno miltelių ištirpinimas, riebalų ir baltymų nusodinimas trichloracto rūgštimi ir atskyrimas centrifuguojant arba filtruojant.
- Kazeino makropeptidų (CMP) kiekio nustatymas supernatante efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC).
- Tiriant mėginius gautų rezultatų įvertinimas, lyginant juos su etaloniniais mėginiais, gautais į nugriebto pieno miltelius pridedant žinomą procentinį kiekį išrūgų miltelių arba jų nepridedant.

5. REAGENTAI

Naudojami tik patvirtinti analiziškai grynai reagentai. Naudojamas distiliuotas ar bent tokio paties grynumo vanduo.

5.1. **Trichloracto rūgšties tirpalas**

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

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

1,74 g dikalto hidrofosfato (K_2HPO_4), 12,37 g kalio dihidrofosfato (KH_2PO_4) ir 21,41 g natrio sulfato (Na_2SO_4) ištirpinama maždaug 700 ml vandens. Jei reikia, fosforo rūgšties arba kalio hidroksido tirpalu pH sureguliuojamas iki 6,0.

Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml ir sumaišoma.

Pastaba. Eliuento sudėtis gali būti keičiama, kad atitiktų standartų sertifikatą arba kolonėlės įkrovos medžiagos gamintojo rekomendacijas.

Prieš naudojimą eliuentų tirpalai filtruojami per membralinį filtrą, kurio porų skersmuo 0,45 μm .

5.3. **Plovimo tirpiklis**

Maišoma viena acetonitrilo (CH_3CN) tūrio dalis ir devynios vandens tūrio dalys. Prieš naudojant mišinys filtruojamas per membralinį filtrą, kurio porų skersmuo – 0,45 μm .

Pastaba. Gali būti naudojamas ir kitas baktericidinis plovimo tirpiklis, jei jis neblogina kolonėlės skiriamosios gebos.

5.4. **Etaloniniai mėginiai**

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

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

6. APARATŪRA**6.1. Analizinės svarstyklės**

6.2. **Bet kokio tipo centrifuga, kuria galima išvystyti 2 200 g išcentrinę jėgą, su maždaug 50 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėliais su kamšteliais arba dangteliais**

6.3. Mechaninė purtyklė**6.4. Magnetinė maišyklė****6.5. Stikliniai piltuvai, skersmuo – apie 7 cm****6.6. Filtravimo popierius, vidutinio tankio, skersmuo – apie 12,5 cm****6.7. Filtravimo per stiklinį filtrą įrangą su 0,45 µm porų skersmens membraniniu filtru**

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

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

6.10. **Termostatinė vandens vonelė, palaikanti 25 ± 0,5 °C temperatūrą**

6.11. HPLC įranga, kurią sudaro:

6.11.1. Siurblys

6.11.2. *Injektorius, rankinis arba automatinis, 15–30 µl talpos*

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

6.11.4. *Termostatinė kolonelių krosnis, palaikanti 35 ± 1 °C temperatūrą*

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

6.11.6. *Integratorius, kuriuo galima integruoti tarp įdubų*

Pastaba. Dirbti su kolonėlėmis, kurios laikomos kambario temperatūroje, galima, tačiau jų skiriamoji geba bus šiek tiek mažesnė. Tokiu atveju atliekant bet kurią analizę seriją, temperatūra neturėtų svyruoti daugiau kaip ± 5 °C.

7. MĖGINIŲ ĖMIMAS

7.1. Mėginiai imami laikantis tarptautiniame standarte ISO 707 nustatytos procedūros. Tačiau valstybės narės gali taikyti kitą mėginių ėmimo metodą, jei jis atitinka nurodyto standarto principus.

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

8. PROCEDŪRA**8.1. Tiriamojo mėginio ruošimas**

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

8.2. Tiriamoji mėginio dalis

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

8.3. Riebalų ir baltymų pašalinimas

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

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

8.3.3. Centrifuguojama (6.2) esant 2 200 g išcentrinei jėgai 10 minučių arba filtruojama per filtravimo popierių (6.6). Pirmieji 5 ml filtrato išpilami.

8.4. Chromatografinis nustatymas

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

1 pastaba. Atsižvelgiant į naudojamų kolonėlių vidinį skersmenį arba į kolonėlės gamintojo instrukcijas gali būti nustatomas kitoks srautas.

2 pastaba. Darant pertrauką, kolonėlės reikia praplauti vandeniu. Jokiu būdu negalima palikti jose eliuento tirpalo (5.2).

Darant ilgesnę nei 24 valandų pertrauką, kolonėlės reikia praplauti vandeniu, po to mažiausiai tris valandas plauti plovimo tirpalu (5.3), nustačius 0,2 ml per minutę srautą.

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

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

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

Integratorius (6.11.6) automatiškai apskaičiuoja kiekvienos smailės plotą A:

A_{II} –	II smailės plotas,
A_{III} –	III smailės plotas.

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

Jei kyla abejonų, analizę kartojama.

8.5. Kalibravimas

8.5.1. Etaloniniams mėginiams (5.4) tiksliai taikoma 8.2–8.4.2 punktuose aprašyta procedūra.

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

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

8.5.3. Atsako koeficientai R nustatomi įšvirkščiant tokį pat tūrį filtratų (8.5.1), kaip ir naudotas mėginių tūris.

9. REZULTATŲ PATEIKIMAS

9.1. Apskaičiavimo metodas ir formulės

9.1.1. Atsako koeficientų R apskaičiavimas:

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

čia:

R_{II} – II smailių atsako koeficientai,

$A_{II} [0]$ – etaloninio mėginio [0] II smailių plotai, gauti vykdant 8.5.3. punktą.

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

čia:

- R_{III} – III smailės atsako koeficientai,
 $A_{III}[0]$ ir $A_{III}[5]$ – etaloninių mėginių [0] ir [5] III smailės plotai, gauti vykdant 8.5.3 punktą,
 W – išrūgų kiekis etaloniniame mėginyje [5], t. y. 5.

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

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

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

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

čia:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ – mėginio [E] atitinkamų II, III ir IV smailių santykiniai plotai,
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ – mėginio [E] atitinkamų II ir III smailių plotai, gauti vykdant 8.4.2 punktą,
 R_{II} , R_{III} – atsako koeficientai, apskaičiuoti pagal 9.1.1 punktą.

9.1.3. *Mėginio [E] III smailės santykinės sulaikymo trukmės apskaičiavimas:*

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

čia:

- $RRT_{III}[E]$ – mėginio [E] III smailės santykinė sulaikymo trukmė,
 $RT_{III}[E]$ – mėginio [E] III smailės sulaikymo trukmė, gauta vykdant 8.4.2 punktą,
 $RT_{III}[5]$ – kontrolinio mėginio [5] III smailės sulaikymo trukmė, gauta vykdant 8.5.3 punktą.

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

- $RRT_{III}[E]$ yra $< 1,000$, kai išrūgų kiekis > 5 %,
 — $RRT_{III}[E]$ yra $\geq 1,000$, kai išrūgų kiekis ≤ 5 %.

RRT_{III} vertėms leidžiama neapibrėžtis yra $\pm 0,002$.

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

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

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

čia:

- W – fermentinių išrūgų kiekis mėginyje [E] masės procentais,
 $S_{III}[E]$ – mėginio [E] III smailės santykinis plotas, gautas vykdant 9.1.2 punktą,
 1,3 – atitinka vidutinį santykinį II smailės plotą, išreikštą fermentinių išrūgų gramais 100 g miltelių ir nustatytą įvairios kilmės nefalsifikuotiems nugriebto pieno milteliams. Šis skaičius nustatytas bandymais,
 $S_{III}[0]$ – atitinka III smailės santykinį plotą, kuris yra lygus $R_{III} \times A_{III}[0]$. Šios vertės gaunamos vykdant atitinkamai 9.1.1 ir 8.5.3 punktus,
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ – atitinka pataisą, kuri turi būti padaryta santykiniam vidutiniam plotui 1,3, kai $S_{III}[0]$ nėra lygus 0,9. Bandymais nustatyta, kad vidutinis santykinis kontrolinio mėginio [0] III smailės plotas lygus 0,9.

9.3. Procedūros tikslumas

9.3.1. Pakartojamumas

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

9.3.2. Atkuriamumas

Dviejų atskirų nepriklausomų rezultatų, gautų tą pačią bandomąją medžiagą tiriant dviejose skirtingose laboratorijose, skirtumas neturi būti didesnis kaip 0,4 % (masės).

9.4. Aiškinimas

- 9.4.1. Jei III smailės santykinis plotas S_{III} [E], išreikštas fermentinių išrūgų gramais 100 g produkto, yra $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$, daroma prielaida, kad išrūgų nėra.

Čia:

2,0	didžiausias galimas santykinis III smailės plotas, atsižvelgiant į santykinį vidutinį III smailės plotą, t. y. 1,3, neapibrėžtumą dėl nugriebto pieno miltelių sudėties kitimo ir metodo atkuriamumą (9.3.2),
$(S_{III}[0] - 0,9)$	pataisa, kuri daroma, kai plotas $S_{III}[0]$ nėra lygus 0,9 (žr. 9.2 punktą).

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

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

- 9.4.3.1. 1 ir 2 grafikuose apibendrinti duomenys, gauti išanalizavus nefalsifikuotus didelį suminį baltymų kiekį turinčių nugriebto pieno miltelių mėginius.

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

Punktyrinė tiesi linija žymi viršutinę III smailės santykio ploto ribą, kuri 90 % atvejų nebus viršyta.

1 ir 2 grafikuose punktyrinės tiesios linijos nubrėžtos pagal šias formules:

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

čia atitinkamai:

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

P % – suminis baltymų kiekis masės procentais,

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

Šios formulės atitinka 9.2 punkte aptartą skaičių 1,3.

Nustatyto santykio ploto S_{III} [E] ir santykio ploto S_{III} skirtumas (T_1 ir T_2) išreiškiamas formulėmis: $T_1 = S_{III} [E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$; $T_2 = S_{III} [E] - [(0,0123 S_{II} [E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

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

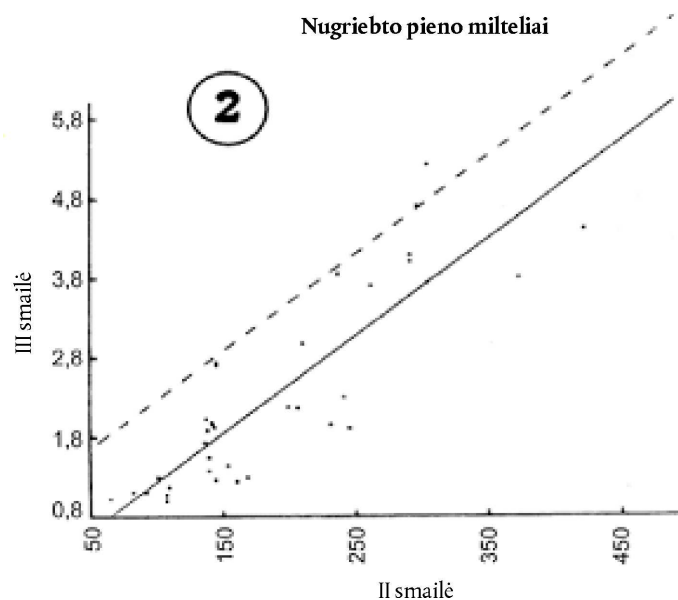
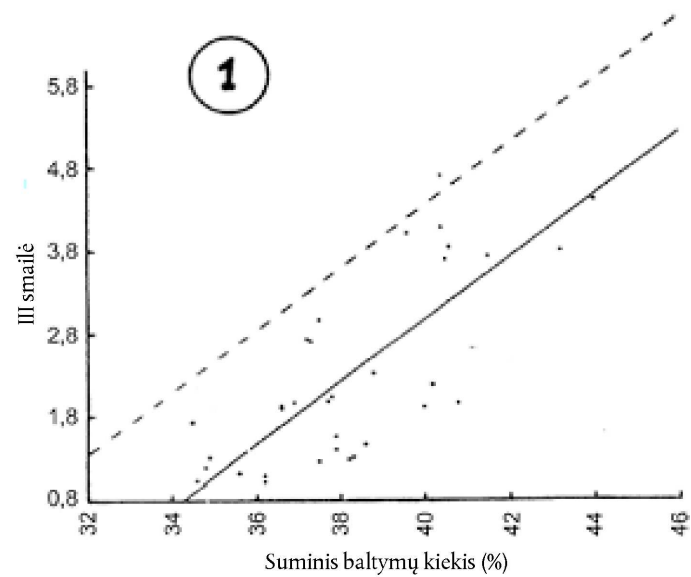
Jei T_1 ir T_2 yra didesni už nulį, fermentinių išrūgų yra.

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

Čia:

0,91 – atstumas vertikaloje ašyje tarp ištisinės ir punktyrinės linijų.

Nugriebto pieno milteliai



III priedėlis

FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ SAUSŲJŲ MEDŽIAGŲ KIEKIO NUSTATYMAS NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE

1. TIKSLAS: APTIKTI, AR Į NUGRIEBTO PIENO MILTELIUS BUVO PRIDĖTA FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ SAUSŲJŲ MEDŽIAGŲ
2. NUORODOS: TARPTAUTINIS STANDARTAS ISO 707

3. APIBRĖŽTIS

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

4. METODO ESMĖ

Mėginiai analizuojami taikant atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos procedūrą (HPLC procedūrą), siekiant nustatyti kazeino makropeptido A kiekį. Rezultatai vertinami lyginant su etaloniniais mėginiais, kuriuos sudaro vien tik nugriebto pieno milteliai, kuriuose yra žinomas ir nežinomas procentinis išrūgų miltelių kiekis. Didesnis kaip 1 % (masės) rezultatas rodo, kad produkte yra fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų.

5. REAGENTAI

Naudojami tik patvirtinti analiziškai grynai reagentai. Naudojamas distiliuotas ar bent tokio paties grynumo vanduo. Acetonitrilas turėtų būti spektroskopijai arba HPLC tinkamo grynumo.

- 5.1. **Trichloracto rūgšties tirpalas**

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

- 5.2. **A ir B eliuantai**

Eliuentas A: į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 150 ml acetonitrilo (CH_3CN), 20 ml izopropilo alkoholio ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) ir 1,00 ml trifluoracto rūgšties (TFA, CF_3COOH). Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml.

Eliuentas B: į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 550 ml acetonitrilo, 20 ml izopropilo alkoholio ir 1,00 ml TFA. Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml. Prieš naudojimą eliuentų tirpalai filtruojami per membraninį filtrą, kurio porų skersmuo 0,45 μm .

- 5.3. **Kolonėlės laikymas**

Baigus analizę, kolonėlė praplaunama eliuentu B (naudojant gradientą) ir po to plaunama acetonitrilu (30 minučių naudojant gradientą). Kolonėlė laikoma acetonitrile.

- 5.4. **Etaloniniai mėginiai**

- 5.4.1. Viešojo sandėliavimo reikalavimus atitinkantys nugriebto pieno milteliai (t. y. [0]).
- 5.4.2. Tokie patys nugriebto pieno milteliai, falsifikuoti 5 % (masės) etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y. [5]).
- 5.4.3. Tokie patys nugriebto pieno milteliai, falsifikuoti 50 % (masės) etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y. [50]).

6. APARATŪRA

- 6.1. **Analizinės svarstyklės**

- 6.2. **Bet kokio tipo centrifuga, kuria galima išvystyti 2 200 g išcentrinę jėgą, su maždaug 50 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėliais su kamšteliais arba dangteliais**

- 6.3. **Mechaninė purtyklė**

- 6.4. **Magnetinė maišyklė**

- 6.5. **Stikliniai piltuvai, skersmuo – apie 7 cm**

- 6.6. **Filtravimo popierius, vidutinio tankio, skersmuo – apie 12,5 cm**
- 6.7. **Filtravimo per stiklinį filtrą įrangą su 0,45 µm porų skersmens membraniniu filtru**
- 6.8. **10 ml talpos graduotos pipetės (ISO 648 A klasės arba ISO/R 835) arba dozavimo sistema, galinti tiekti 10,0 ml per dvi minutes**
- 6.9. **Dozavimo sistema, galinti tiekti 20,0 ml maždaug 50 °C temperatūros vandens**
- 6.10. **Termostatinė vandens vonelė, nustatyta palaikyti 25 ± 0,5 °C temperatūrą**
- 6.11. **HPLC įranga, kurią sudaro:**
 - 6.11.1. *Dviejų tirpiklių gradientinė siurbimo sistema*
 - 6.11.2. *Injektorius, rankinio arba automatinio valdymo, 100 µl talpos*
 - 6.11.3. *Kolonėlė „Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3“ (ilgis – 25 cm, vidinis skersmuo – 0,46 cm) arba lygiavertė atvirkštinių fazių kolonėlė su stambiaporio silikagelio įkrova*
 - 6.11.4. *Termostatinė kolonėlių krosnis, nustatyta palaikyti 35 ± 1 °C temperatūrą*
 - 6.11.5. *Keičiamo bangos ilgio UV detektorius, kuriuo būtų galima matuoti esant 210 nm bangos ilgiui (prireikus galima naudoti didesnį bangos ilgį iki 220 nm) ir 0,02 Å jautriui*
 - 6.11.6. *Integratorius, kuriuo galima integruoti pagal bendrąją bazinę liniją arba tarp įdubų*

Pastaba. Kolonėlę galima naudoti kambario temperatūroje, jeigu ji nesvyruoja daugiau kaip 1 °C, kitaip gaunami per dideli CMP_A sulaikymo trukmės svyravimai.

7. MĖGINIŲ ĖMIMAS

- 7.1. **Mėginiai imami laikantis tarptautiniame standarte ISO 707 nustatytos procedūros. Tačiau valstybės narės gali taikyti kitą mėginių ėmimo metodą, jei jis atitinka nurodyto standarto principus.**
- 7.2. **Mėginiai laikomi tokiomis sąlygomis, kuriomis jie nebūtų sugadinti arba nepakistų jų sudėtis.**

8. PROCEDŪRA

8.1. Tiriamojo mėginio ruošimas

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

8.2. Tiriamoji mėginio dalis

Į centrifugavimo mėgintuvėlį (6.2) arba į tinkamą užkemšamą kolbą (50 ml) pasveriamas $2,00 \pm 0,001$ g mėginio.

Pastaba. Jei analizuojami mišiniai, sveriamas toks mėginio kiekis, kad mėginio, iš kurio pašalinti riebalai, masė atitiktų 2,00 g.

8.3. Riebalų ir baltymų pašalinimas

- 8.3.1. *Į tiriamąjį mėginį įpilama 20,0 ml šilto (50 °C) vandens. Milteliai ištirpinami purtant penkias minutes mechanine purtykle (6.3). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonelę (6.10) 25 °C pusiausvyrinei temperatūrai pasiekti.*
- 8.3.2. *Per dvi minutes pastovia sparta supilama maždaug 25 °C temperatūros 10,0 ml trichloracto rūgšties tirpalo (5.1), stipriai maišant magnetine maišykle (6.4). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonelę (6.10) ir paliekamas 60 min.*
- 8.3.3. *Centrifuguojama (6.2) 10 min, esant 2 200 g išcentrinei jėgai, arba filtruojama per filtravimo popierių (6.6). Pirmieji 5 ml filtrato išpilami.*

8.4. Chromatografinis nustatymas

8.4.1. Taikant atvirkštinių fazių HPLC, dėl sudėtyje esančių rūgščiųjų pasukų miltelių nėra galimybės gauti klaidingai teigiamų rezultatų.

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

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

Į HPLC aparatą, veikiantį 1 lentelėje pateiktomis tiriamojo gradiento sąlygomis, įšvirkščijama 100 µl supernatanto arba filtrato (8.3.3).

1 lentelė

Tiriamojo gradiento sąlygos chromatografiniai analizei optimizuoti

Trukmė (min.)	Srautas (ml/min.)	% A	% B	Kreivė
Pradinė	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	Tiesinė
32	1,0	10	90	Tiesinė
37	1,0	10	90	Tiesinė
42	1,0	90	10	Tiesinė

Lyginant abi chromatogramas turėtų paaiškėti CMP_A smailės vieta.

Pagal šią formulę galima apskaičiuoti naudotiną pradinio tirpalo sudėtį, kuri atitinka normalų gradientą (žr. 8.4.3): $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 1,11$.

Čia:

- RT_{cmpA} – CMP_A sulaikymo trukmė, atitinkanti paieškų gradientą
- 10 – pradinė % B dalis, atitinkanti paieškų gradientą
- 2,5 – normalaus gradiento viduriniojo taško % B dalis minus pradinė % B dalis
- 13,5 – vidurinių tašką atitinkanti trukmė, esant tiriamajam gradientui
- 26 – reikiama CMP_A sulaikymo trukmė
- 6 – tiriamojo ir normalaus gradiento nuolydžių santykis
- 30 – % B esant pradinei trukmei minus % B 27-ą tiriamojo gradiento minutę
- 27 – tiriamojo gradiento trukmė.

8.4.3. Tiriamųjų mėginių tirpalų ėmimas

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

Analizės pradžios eliuento sudėtis gaunama pagal 8.4.2 punktą. Paprastai ji artima santykiui A:B=76:24 (5.2). Iškart po išvirkštimo nustatomas tiesinis gradientas; jam esant po 27 minučių procentinė B dalis padidėja 5 %. Tada nustatomas tiesinis gradientas, kuriam esant per 5 minutes eliuento sudėtyje B dalis padidėja iki 90 %. Ši sudėtis nekeičiama 5 minutes, vėliau, naudojant tiesinį gradientą, per 5 minutes grįžtama iki pradinės sudėties. Priklausomai nuo įsiurbimo sistemos vidinio tūrio kitas išvirkštimas gali būti atliekamas 15 minučių po to, kai pasiekiamos pradinės sąlygos.

1 pastaba. CMP_A sulaikymo trukmė turėtų būti 26 ± 2 min. Tai gali būti pasiekama keičiant pradines ir galutines pirmojo gradiento sąlygas. Tačiau % B, esant pradinėms ir galutinėms pirmojo gradiento sąlygoms, skirtumas turi likti 5 % B.

2 pastaba. Iš eliuentų reikia pakankamai pašalinti dujas ir palaikyti tokią jų būseną. Tai svarbu siekiant, kad gradientinio eliuavimo siurbimo sistema tinkamai veiktų. CMP_A smailės sulaikymo trukmės standartinis nuokrypis turėtų būti mažesnis kaip 0,1 min. ($n = 10$).

3 pastaba. Kas penkis mėginius turėtų būti įšvirkščijama etaloninio mėginio [5] ir tuo pasinaudojant apskaičiuojamas naujas atsako koeficientas R (9.1.1).

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

Integratorius (6.11.6) automatiškai apskaičiuoja CMP_A smailės aukštį H . Reikia patikrinti kiekvienos chromatogramos bazinės linijos vietą. Jei bazinė linija nustatyta netinkamoje vietoje – analizę arba integravimą reikia pakartoti.

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

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

8.5. Kalibravimas

- 8.5.1. Etaloniniams mėginiais (5.4.1 ir 5.4.2 punktai) taikoma 8.2–8.4.4 punktuose aprašyta metodika. Naudojami tik kę paruošti tirpalai, nes kambario temperatūroje, 8 % trichloracto rūgšties tirpale esantys CMP skyla. 4 °C temperatūroje tirpalas išlieka stabilus 24 valandas. Atliekant labai daug analizių, automatiniam injektoriuje pageidautina naudoti šaldomą mėginių laikiklį.

Pastaba. 8.4.2. punktą galima praleisti, jeigu % B pradinėmis sąlygomis yra žinomas iš anksčiau atliktų analizių.

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

- 8.5.2. Prieš tiriant mėginius chromatografijos būdu įšvirkščijama 100 µl etaloninio mėginio be fermentinių išrūgų [0] (5.4.1)

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

- 8.5.3. Įšvirkščiant tokį pat tūrį filtrato (8.5.1), kaip ir naudotas mėginių tūris, nustatomi atsako koeficientai R .

9. REZULTATŲ PATEIKIMAS

9.1. Apskaičiavimo metodas ir formulės

- 9.1.1. Atsako koeficiento R apskaičiavimas:

$$CMP_A \text{ smailė: } R = W/H$$

Čia:

R – CMP_A smailės atsako koeficientas,

H – CMP_A smailės aukštis,

W – išrūgų kiekis etaloniniame mėginyje [5].

9.2. Fermentinių išrūgų miltelių procentinio kiekio mėginyje apskaičiavimas

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

Čia:

$W(E)$ – fermentinių išrūgų kiekis mėginyje (E) masės procentais,

R – CMP_A smailės atsako koeficientas (9.1.1),

$H(E)$ – mėginio (E) CMP_A smailės aukštis.

Jeigu $W(E)$ yra didesnis nei 1 %, o skirtumas tarp mėginio ir etaloninio mėginio [5] sulaikymo trukmės yra mažesnis nei 0,2 minutės, vadinasi fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų mėginyje yra.

9.3. Procedūros tikslumas

9.3.1. Pakartojamumas

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

9.3.2. Atkuriamumas

Nenustatytas.

9.3.3. Tiesiškumas

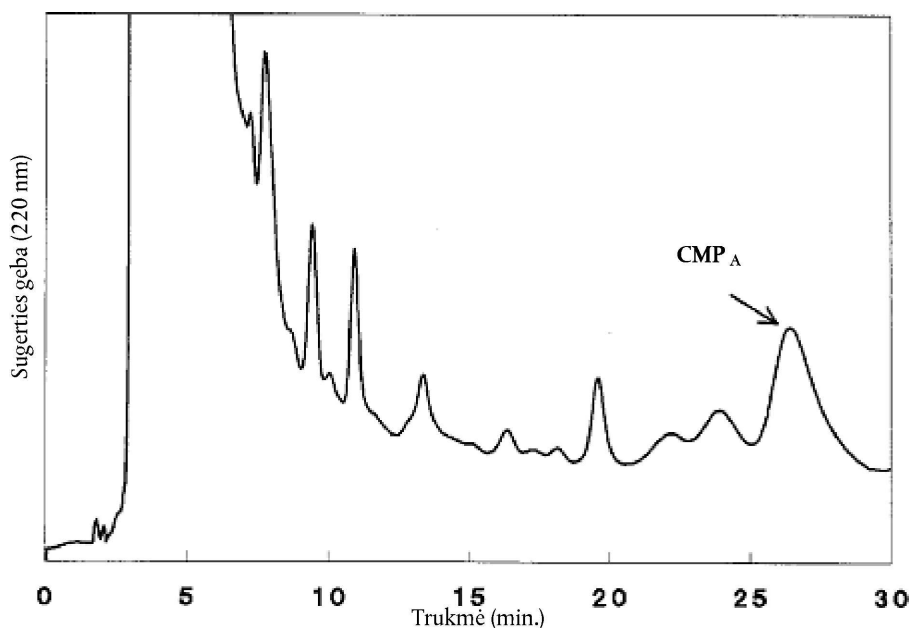
Kai fermentinių išrūgų yra nuo 0 iki 16 procentų, turėtų būti gaunama tiesinė priklausomybė, kurios koreliacijos koeficientas $> 0,99$.

9.4. Aiškinimas

Į 1 % ribinę vertę įeina neapibrėžtis dėl atkuriamumo.

1 paveikslas

Etalonas Ni-4.6



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

3) Pridedami šie priedai:

„VI PRIEDAS

Pagal privačiojo sandėliavimo sutartis sandėliuojamo sviesto analizės metodai

Parametras	Metodas
Riebalai ⁽¹⁾	ISO 17189 arba ISO 3727 3 dalis
Vanduo	ISO 3727 1 dalis
Sausosios neriebalinės medžiagos (išskyrus druską)	ISO 3727 2 dalis
Druska	ISO 15648

⁽¹⁾ Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra.

VII PRIEDAS

Pagal privačiojo sandėliavimo sutartis sandėliuojamų nugriebto pieno miltelių analizės metodai

Parametras	Metodas
Riebalai	ISO 1736
Baltymai	ISO 8968 1 dalis
Vanduo	ISO 5537

VIII PRIEDAS

Pagal privačiojo sandėliavimo sutartis sandėliuojamo sūrio analizės metodai

1. Priedėlyje aprašytas analizės metodas taikomas siekiant užtikrinti, kad sūryje, pagamintame tik iš avių, ožkų ar buivolių pieno arba iš avių, ožkų ir buivolių pieno mišinio, nebūtų karvių pieno kazeino.

Laikoma, kad karvių pieno kazeino yra, jei jo kiekis analizuojamame mėginyje yra lygus priedėlyje nurodytame etaloniniame mėginyje, kuriame yra 1 % karvių pieno, esančiam kiekiui arba už jį didesnis.

2. Karvių pieno kazeino aptikimo 1 dalyje nurodytuose sūriuose metodai gali būti taikomi tik jei atitinkamos visos šios sąlygos:

- a) aptikimo riba yra ne didesnė kaip 0,5 %;
- b) nėra klaidingai teigiamų rezultatų;
- c) karvių pieno kazeinas aptinkamas esant reikiamam jautrumui netgi po ilgų brandinimo laikotarpių, kaip gali pasitaikyti įprastinėmis prekybos sąlygomis.

Jei kuri nors iš pirmiau nurodytų sąlygų neišpildoma, taikomi priedėlyje nurodyti metodai.

Priedėlis

KARVIŲ PIENO IR KAZEINATO APTIKIMO SŪRIUOSE, PAGAMINTUOSE IŠ AVIŲ, OŽKŲ ARBA BUIVOLIŲ PIENO ARBA AVIŲ, OŽKŲ IR BUIVOLIŲ PIENO MIŠINIŲ, METODAS

1. ESMĖ

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

2. TAIKymo SRITIS

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

3. METODO ESMĖ

3.1. Kazeinų išskyrimas iš sūrio ir pamatinių etalonų

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

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

3.4. Nudažytų γ_3 ir γ_2 kazeinų frakcijų elektroforegramų įvertinimas (karvių pieno buvimo mėginyje įrodymas), lyginant tame pačiame gelyje gautas tiriamojo mėginio ir pamatinių etalonų, kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno, elektroforegramas.

4. REAGENTAI

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

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

Izoelektrinis fokusavimas

4.1. Reagentai poliakrilamido geliams su karbamidu gaminti

4.1.1. Pradinis gelio tirpalas

Vandenyje ištirpinama

4,85 g akrilamido,

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

48,05 g karbamido,

15,00 g glicerolio (87 % masės)

skiedžiama iki 100 ml ir laikoma tamsaus stiklo butelyje šaldytuve.

Pastaba. Vietoje nurodytos masės neurotoksinių akrilamidų galima naudoti iš anksto sumaišytą akrilamido (BIS) tirpalą, kurio galima nusipirkti. Vietoj nurodytos masės akrilamido galima naudoti 16,2 ml jo tirpalo, jei jame yra 30 % (masės pagal tūrį) akrilamido ir 0,8 % (masės pagal tūrį) BIS. Pradinio tirpalo galiojimo trukmė – ne daugiau kaip 10 dienų; jeigu jo laidumas didesnis nei 5 μ S, tirpalą reikia naujai dejonizuoti 30 min. maišant su 2 g Amberlite MB-3, po to filtruojant per 0,45 μ m membraną.

4.1.2. *Gelio tirpalas*

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

9,0 ml pradinio tirpalo

24 mg β -alanino

500 μ l amfolito, pH 3,5–9,5

250 μ l amfolito, pH 5–7

250 μ l amfolito, pH 6–8

Gelio tirpalas sumaišomas ir dvi tris minutes ultragarso vonelėje arba vakuume iš jo šalinamos dujos.

Pastaba. Gelio tirpalas ruošiamas prieš pat jį liejant (žr. 6.2 punktą).

4.1.3. *Katalizatorių tirpalai*

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

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

800 mg PER ištirpinama vandenyje ir atskiedžiama iki 2 ml.

Pastaba. Visada naudojamas ką tik pagamintas PER tirpalas.

4.2. **Kontaktinis skystis**

Žibalas arba skystas parafinas

4.3. **Anodo tirpalas**

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

4.4. **Katodo tirpalas**

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

Mėginio ruošimas

4.5. **Reagentai baltymams išskirti**

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

4.5.2. *Dichlormetanas*

4.5.3. *Acetonas*

4.6. **Buferinis tirpalas baltymams tirpinti**

Vandenyje ištirpinama

5,75 g glicerolio (87 % masės),

24,03 g karbamido,

250 mg ditiotreitolio

ir atskiedžiama iki 50 ml.

Pastaba. Laikoma šaldytuve, maksimali laikymo trukmė – 1 savaitė.

4.7. Reagentai kazeinui skaidyti plazminu**4.7.1. Buferinis amonio karbonato tirpalas**

0,2 mol/l amonio hidrokarbonato tirpalas (1,58 g/100 ml vandens), kuriame yra 0,05 mol/l etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA, 1,46 g/100 ml), titruojamas 0,2 mol/l amonio karbonato tirpalu (1,92 g/100 ml vandens), kuriame yra 0,05 mol/l EDTA, kol jo pH pasiekia 8.

4.7.2. Galvijų plazminas (E.C.3.4.21.7), kurio aktyvumas ne mažesnis kaip 5 U/ml**4.7.3. ϵ -aminoheksano rūgšties tirpalas fermentams slopinti**

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

4.8. Etalonai**4.8.1. Sertifikuotus pamatinius sutraukto nugriebto avių ir ožkų pieno mišinių, kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno, etalonus galima gauti Komisijos etaloninių medžiagų ir matavimų institute (Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440, Geel, Belgija).****4.8.2. Laboratorinių etaloninių traukinto buivolių pieno tirpalų, kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno, paruošimas**

Nugriebtam pienui gauti žalias surinktinis buivolių arba karvių pienas 20 min., esant 2 500 g išscentrinei jėgai, centrifuguojamas 37 °C temperatūroje. Greitai atšaldžius mėgintuvėlį su jo turiniu iki 6–8 °C temperatūros, visiškai nuimamas viršutinis riebalų sluoksnis. 1 % etaloniniam tirpalui paruošti į 1 l talpos cheminę stiklinę įpilama 5,00 ml nugriebto karvių pieno, 495 ml nugriebto buivolių pieno ir praskiesta pieno rūgštimi (10 % masės) parūgštinama iki pH 6,4. Mišinys šildomas iki 35 °C, įpilama 100 μ l šliužo fermento (fermento aktyvumas 1:10 000, koncentracija 3 000 U/ml), maišoma 1 min. ir aliuminio folija uždengta stiklinė paliekama stovėti 35 °C temperatūroje vieną valandą, kad pienas susitrauktų. Susidarius varškei, visas sutrauktas pienas liofilizuojamas prieš tai jo nesumaišant ir nenupilant išrūgų. Po liofilizacijos produktas sumalamas į homogeniškus miltelius. 0 % etaloninis tirpalas ruošiamas atliekant tą pačią procedūrą su grynu nugriebtu buivolių pienu. Etaloniniai tirpalai laikomi – 20 °C temperatūroje.

Pastaba. Prieš gaminant etaloninius tirpalus patartina patikrinti buivolių pieno grynumą, izoelektriškai fokusuojant plazminu suskaldytus kazeinus.

Reagentai baltymams dažyti**4.9. Fiksavimo tirpalas**

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

4.10. Blukinimo tirpalas

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

Pastaba. Kiekvieną dieną gaminamas šviežias blukinimo tirpalas; jį galima gaminti lygiomis dalimis sumaišant pradinius 50 % (tūrio) metanolio ir 20 % (tūrio) ledinės acto rūgšties tirpalus.

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

3,0 g dažo Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) ištirpinama 1 000 ml 90 % (tūrio) metanolio, naudojant magnetinę maišyklę (apie 45 min.), ir išfiltruojama per du vidutinio tankumo sulankstytus filtrus.

4.11.2. Dažymo tirpalas (2-asis pradinis tirpalas)

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

4.11.3. Dažymo tirpalas (darbinis tirpalas)

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

Pastaba. Dažymo tirpalus reikėtų ruošti naudojimo dieną.

5. ĮRANGA

- 5.1. Stiklinės plokštelės (265 × 125 × 4 mm); guminis volelis (15 cm pločio); lyginamasis stalas.
- 5.2. Gelio nešiklio lapas (265 × 125 mm)
- 5.3. Dengiamasis lapas (280 × 125 mm). Ant kiekvieno išilginio lapo krašto priklijuojama lipni juostelė (280 × 6 × 0,25 mm) (žr. 1 paveikslą)
- 5.4. Elektrofokusavimo kamera su šaldomąja plokšte (pvz., 265 × 125 mm) ir tinkamas maitinimo šaltinis (≥ 2,5 kV) arba automatinis elektroforezės prietaisas
- 5.5. Reguliuojamos temperatūros cirkuliacinis kriostatas, nustatytas $12 \pm 0,5$ °C temperatūrai palaikyti
- 5.6. Centrifuga, reguliuojama iki 3 000 g
- 5.7. Elektrodo juostos (≥ 265 mm ilgio)
- 5.8. Plastikiniai anodo ir katodo tirpalų lašintuvai
- 5.9. Mėginių aplikatoriai (10 × 5 mm, viskozė arba filtravimo popierius, mažai adsorbuojantis baltymus)
- 5.10. Nerūdijančiojo plieno arba stikliniai dažymo ir blukinimo indai (pvz., 280 × 150 mm įrankių padėklai)
- 5.12. Reguliuojamas rotacinis maišiklis (veleno skersmuo – 10 mm), kurio greičių intervalas – 8 000–20 000 aps./min.
- 5.13. Magnetinė maišyklė
- 5.14. Ultragarsinė vonelė
- 5.15. Plėvelės sulydymo įtaisas
- 5.16. 25 µl mikropipetės
- 5.17. Vakuuminis koncentratorius arba sublimacinė džiovykla
- 5.18. Termostatinė vandens vonelė, kurioje galima nustatyti 35 ir 40 ± 1 °C temperatūrą, su purtytuvu
- 5.19. Densitometras, rodmenų skaitymo bangos ilgis $\lambda = 634$ nm

6. PROCEDŪRA

6.1. Mėginių ruošimas

6.1.1. Kazeinų išskyrimas

Į 100 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėlį pasveriamas 5 g sausos masės atitinkantis sūrio arba pamatinio etalono kiekis, įpilama 60 ml distiliuoto vandens ir homogenizuojama rotaciniu maišikliu (8 000–10 000 aps./min.). Praskiesta acto rūgštimi (4.5.1) parūgštinama iki pH 4,6 ir centrifuguojama (5 min., 3 000 g). Riebalai ir išrūgos dekantuojami, likutis homogenizuojamas (20 000 aps./min.) su 40 ml distiliuoto vandens, parūgštinto praskiesta acto rūgštimi (4.5.1) iki pH 4,5, įpilama 20 ml dichlormetano (4.5.2), dar kartą homogenizuojama ir centrifuguojama (5 min, 3 000 g). Tarp vandens ir organinio tirpiklio fazių susidaręs kazeino sluoksnis (žr. 2 paveikslą) nuimamas mentele, abi fazės dekantuojamos. Kazeinas vėl homogenizuojamas su 40 ml distiliuoto vandens (žr. pirmiau) ir 20 ml dichlormetano (4.5.2), vėl centrifuguojama. Ši procedūra kartojama tol, kol abi ekstrakto fazės tampa bespalvės (2–3 kartus). Baltymų likutis homogenizuojamas su 50 ml acetono (4.5.3) ir filtruojamas per sulankstytą vidutinio tankumo filtravimo popierių. Likutis du kartus, naudojant po 25 ml acetono, plaunamas ant filtro, paliekamas džiūti ore arba išdžiovinamas azoto srove ir sumalamas į miltelius grūstuvėje.

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

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

25 mg išskirtų kazeinų (6.1.1) ištirpinami 0,5 ml buferinio amonio karbonato tirpalo (4.7.1) ir homogenizuojami 20 min., pvz., ultragarsu. Gautas tirpalas pašildomas iki 40 °C temperatūros ir į jį pridedama 10 ml plazmino (4.7.2), sumaišoma ir laikoma 1 valandą 40 °C temperatūroje nuolat purtant. Fermentui slopinti įpilama 20 µl ε-aminokaprono rūgšties tirpalo (4.7.3), tada dedama 200 ml kieto karbamido ir 2 mg ditiotreitolio.

Pastaba. Norint gauti simetriškesnes fokusuoto kazeino juosteles, patartina, pridėjus ε-aminokaprono rūgšties, tirpalą liofilizuoti ir gautus likučius ištirpinti 0,5 ml baltymų tirpinimo buferio (4.6).

6.2. Poliakrilamido gelių su karbamiu ruošimas

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

Į paruoštą gelio tirpalą (4.1.2), iš kurio pašalintos dujos, įpilama 10 μ l *Temed* (4.1.3.1), maišoma ir įpilama 10 μ l PER tirpalo (4.1.3.2), gerai sumaišoma ir iš karto išpilama tolygiai dengiamojo lapo viduryje. Plokštė su gelio nešiklio lapu vienu kraštu (lapu į apačią) padedama ant plokštės su dengiamuoju lapu ir lėtai nuleidžiama taip, kad tarp lapų susidarytų vienodai pasklidusi gelio plėvelė be oro burbuliukų (3 paveikslas). Naudojant ploną mentelę, plokštė su gelio nešiklio lapu iš lėto visiškai nuleidžiama ir prispaudžiama ant jos viršaus uždedant dar tris stiklines plokštes. Pasibaigus polimerizacijai (po maždaug 60 min.) ant gelio nešiklio lapo susipolimerizavęs gelis nuimamas kartu su dengiančiu lapu, paverčiant stiklines plokštes. Nuo gelio nešiklio lapo išorinės pusės gelio ir karbamiu likučiai gerai nuvalomi. Daugiasluoksniis gelis sulydomas į plėvelės vamzdį ir laikomas šaldytuve (ne ilgiau kaip šešias savaites).

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

6.3. Izoelektrinis fokusavimas

Šaldymo termostate nustatoma 12 °C temperatūra. Gelio nešiklio lapo išorinė pusė nuvaloma žibalu, keli žibalo lašai (4.2) užlašinami ant šaldymo bloko vidurio. Ant jo išvyniojamas gelis (gelio nešiklio puse žemyn), saugant, kad nesusidarytų oro burbuliukų. Žibalo perteklius nuvalomas ir nuimamas dengiamasis lapas. Elektrodo juostelės suvilgomos anodo ir katodo tirpalais (4.3, 4.4), juostelės atpjaunamos pagal gelio ilgį ir dedamos į numatytas vietas (atstumas tarp elektrodų 9,5 cm).

Izoelektrinio fokusavimo sąlygos:

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

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

⁽¹⁾ Mėginio įvedimas. Po parengiamojo fokusavimo (1 veiksmas), ant mėginio aplikatorių (10 × 5 mm) pipete užlašinama po 18 μ l mėginio ir etaloninio tirpalų, aplikatoriai dedami ant gelio 1 mm atstumu vienas nuo kito ir 5 mm išilginiu atstumu nuo anodo ir švelniai prispaudžiami. Fokusuojama pirmiau nurodytomis sąlygomis; praėjus 60 min. nuo mėginio fokusavimo pradžios, mėginio aplikatoriai atsargiai nuimami.

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

- 6.3.2. *Automatinio elektroforezės įtaiso įtampų programos pavyzdys (2 geliai, kurių dydžiai $5,0 \times 4,5$ cm), elektrodai be juostų dedami tiesiai ant gelio.*

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

Atliekant 2 veiksmą, mėginio aplikatorius uždedamas esant 0 Vh.

Atliekant 2 veiksmą, mėginio aplikatorius nuimamas esant 30 Vh.

6.4. Baltymų dažymas

6.4.1. Baltymų fiksavimas

Išjungus elektros srovę, elektrodo juostelės tuoj pat nuimamos ir gelis greitai įdedamas į dažymo / blukinimo indą, į kurį įpilta 200 ml fiksatyvo (4.9); laikoma 15 min., nuolat purtant.

6.4.2. Gelio plokštelės plovimas ir dažymas

Fiksavimo tirpalas gerai nusausinamas ir gelio plokštelė plaunama du kartus kiekvieną kartą po 30 sekundžių su 100 ml blukinimo tirpalo (4.10). Blukinimo tirpalas išpilamas ir į indą pripilama 250 ml dažymo tirpalo (4.11.3); dažoma 45 min., švelniai pakratant.

6.4.3. Gelio plokštelės blukinimas

Dažymo tirpalas išpilamas, gelio plokštelė plaunama du kartus, kiekvieną kartą sunaudojant po 100 ml blukinimo tirpalo (4.10), paskui gelio plokštelė 15 min. purtoma su 200 ml blukinimo tirpalo; ši procedūra kartojama mažiausiai du tris kartus tol, kol pagrindas tampa švarus ir bespalvis. Po to plokštelė nuplaunama distiliuotu vandeniu (du kartus po 2 min.) ir džiovinama ore (2–3 val.) arba plaukų džiovintuvu (10–15 min.).

1 pastaba. Fiksuojama, plaunama, dažoma ir blukinama 20 °C temperatūroje. Aukštesnėje temperatūroje nedirbama.

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

7. VERTINIMAS

Vertinama lyginant nežinomo mėginio ir pamatinio etalono baltymų elektroforegramas tame pačiame gelyje. Sūriuose iš avių, ožkų ir buivolių pieno ir iš avių, buivolių ir ožkų pieno mišinių esantis karvių pienas aptinkamas pagal γ_3 ir γ_2 kazeinus, kurių izoelektrinis taškas yra intervale nuo pH 6,5 iki pH 7,5 (4 a, b paveikslai ir 5 paveikslas). Aptikimo riba yra mažesnė kaip 0,5 %.

7.1. Vizualinis įvertinimas

Vizualiai įvertinant karvių pieno kiekį rekomenduojama pasirinkti tokias mėginių ir etaloninių tirpalų koncentracijas, kad avių, ožkų ir (arba) buivolių γ_2 ir γ_3 kazeinų frakcijų išsidėstymo juostelės būtų vienodo intensyvumo (žr. „ γ_2 E,G,B“ ir „ γ_3 E,G,B“ 4 a, b pav. ir 5 pav.). Tada karvių pieno kiekį (mažesnę ar didesnę už 1 % arba lygų 1 %) nežinomame mėginyje galima nustatyti iš karto, palyginant karvių pieno γ_3 ir γ_2 kazeinų juostelių intensyvumą (žr. „ γ_3 C“ ir „ γ_2 C“ 4 a, b pav. ir 5 pav.) su tų pačių kazeinų intensyvumu pamatiniuose etalonuose (avių, ožkų pieno) arba laikinuose laboratoriniuose etaloniniuose tirpaluose (buivolių pieno), kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno.

7.2. Densitometrinis įvertinimas

Karvių pieno γ_2 ir γ_3 kazeinų smailės ploto santykį su ožkų, avių ir (arba) buvolių pieno γ_2 ir γ_3 kazeinų smailių plotais galima nustatyti densitometrijos būdu (5.19) (žr. 5 pav.). Gauta vertė palyginama su 1 % pamatiniu etalonu (ožkų, avių pieno) arba laikinuoju laboratoriniu etaloniniu tirpalu (buvolių pieno), analizuotų ant to paties gelio, γ_2 ir γ_3 kazeinų smailių ploto santykiu.

Pastaba. Šis metodas yra pakankamai tikslus, jeigu karvių pieno γ_2 ir γ_3 kazeinų signalas yra aiškiai teigiamas matavimą atliekant su 1 % pamatiniu etalonu, bet toks nėra matuojant su 0 % pamatiniu etalonu. Jei taip nėra, procedūra optimizuojama tiksliai laikantis metodo nurodymų.

Vertinama, kad mėginyje karvių pieno yra, jeigu abiejų karvių pieno γ_2 ir γ_3 kazeinų frakcijų juostelių intensyvumas arba atitinkami smailių plotų santykiai yra lygūs 1 % pamatinio etalono vertei arba už ją didesni.

8. NUORODOS

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).

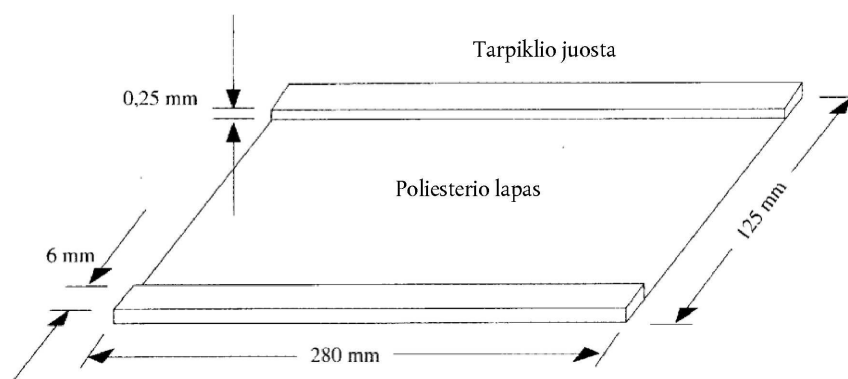
Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, 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 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

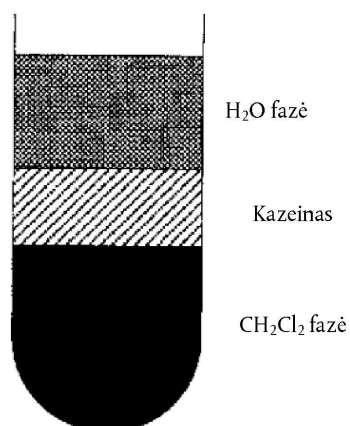
1 paveikslas

Scheminis dengiamojo lapo vaizdas



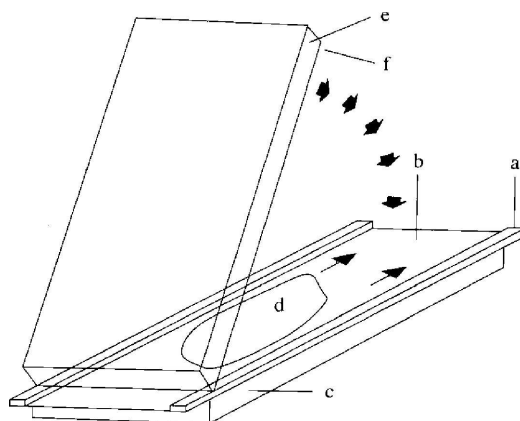
2 paveikslas

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



3 paveikslas

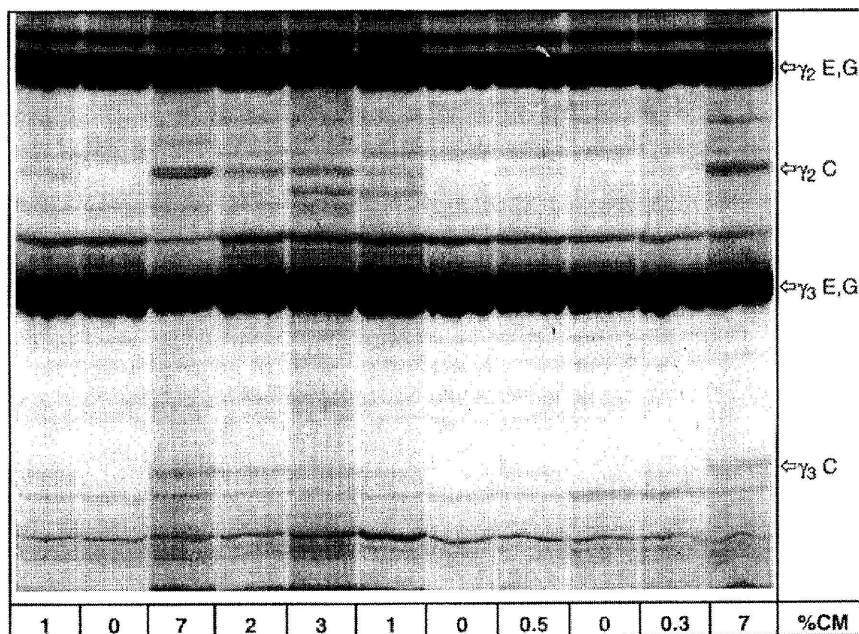
Labai plono poliakrilamido gelio sluoksnio liejimo prispaudimu būdas



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

4a paveikslas

Plazminu apdorotų kazeinų, gautų iš avių ir ožkų pieno sūrių, kuriuose yra skirtingas karvių pieno kiekis, izoelektrinis fokusavimas

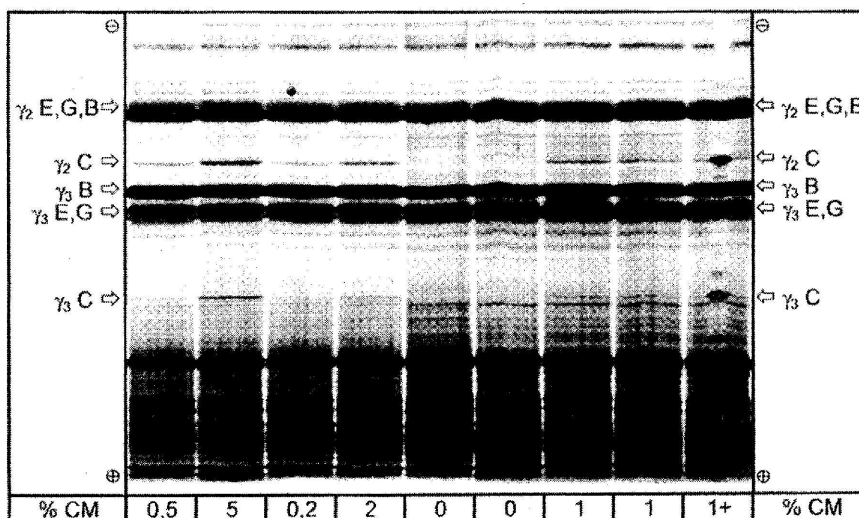


% CM – procentinis karvių pieno kiekis, C – karvių pienas, E – avių pienas, G – ožkų pienas

Pavaizduota viršutinė IEF gelio dalis.

4b paveikslas

Plazminu apdorotų kazeinų, gautų iš sūrių, pagamintų iš avių, ožkų ir buivolų pieno mišinių, kuriuose yra skirtingas karvių pieno kiekis, izoelektrinis fokusavimas

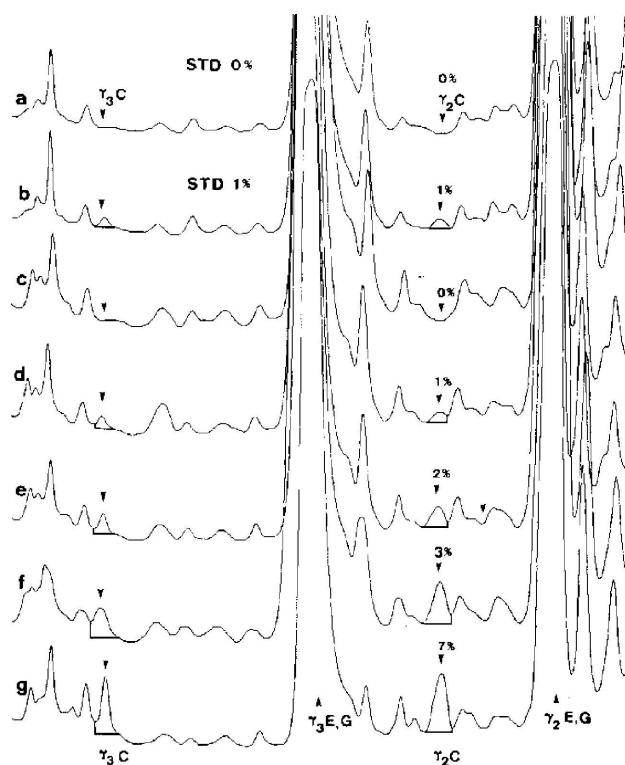


% CM – procentinis karvių pieno kiekis, 1+ – mėginys, kuriame yra 1 % karvių pieno ir kuris frakcijos juostelės viduryje pažymėtas grynu karvių kazeinu. C – karvių pienas, E – avių pienas, G – ožkų pienas, B – buivolų pienas.

Pavaizduotas visas atskyrimo ant IEF gelio atstumas.

5 paveikslas

Etaloninių tirpalų ir sūrio, pagaminto iš avių ir ožkų pieno mišinio, mėginių densitogramų po izoelektrinio fokusavimo sanklota



a, b – etaloniniai tirpalai, kuriuose yra 0 ir 1 % karvių pieno; c–g – sūrio mėginiai, kuriuose yra 0, 1, 2, 3 ir 7 % karvių pieno; C – karvių pienas, E – avių pienas; G – ožkų pienas.

Viršutinė IEF gelio dalis buvo skenuojama esant $\lambda = 634$ nm bangos ilgiui.

IX PRIEDAS

Analizių vertinimas**1. Kokybės užtikrinimas**

Analizės atlieka pagal Reglamento (EB) Nr. 882/2004 (**) 12 straipsnį arba valstybės narės kompetentingų institucijų paskirtos laboratorijos.

2. Mėginių ėmimas ir ginčai dėl analizės rezultatų

1. Mėginiai imami pagal atitinkamą nagrinėjamą produktą reglamentuojantį reglamentą. Jei jokių mėginių ėmimo nuostatų aiškiai nenurodyta, taikomos standarto ISO 707 „Pienas ir pieno gaminiai. Mėginių ėmimo nurodymai“ nuostatos.
2. Laboratorijos analizės rezultatų ataskaitose turi pakakti informacijos rezultatams pagal priedėlį įvertinti.
3. Pagal Sąjungos taisyklės atliekant analizę imama po du mėginius.
4. Kilus ginčui dėl rezultatų, mokėjimo agentūra reikiamą produkto, dėl kurio ginčijamasi, analizę atlieka dar kartą, o išlaidas padengia pralaimėjusi šalis.

Pirmiau nurodyta analizė atliekama su sąlyga, kad turima užplombuotų kartotinių produkto mėginių, kuriuos tinkamai saugojo kompetentinga institucija. Prašymą atlikti analizę mokėjimo agentūrai gamintojas išsiunčia per 7 darbo dienas po pranešimo apie pirmosios analizės rezultatus. Mokėjimo agentūra analizę atlieka per 21 darbo dieną po prašymo gavimo.

5. Apeliacinės analizės rezultatai – galutiniai.
6. Jei per penkias darbo dienas nuo mėginių paėmimo gamintojas gali įrodyti, kad mėginiai buvo netinkamai paimti, jie paimami iš naujo, jei tai įmanoma. Jei pakartotinai paimti mėginių neįmanoma, siunta priimama.

Priedėlis

Siuntos atitikties teisės aktais nustatytai ribinei vertei įvertinimas**1. Metodo esmė**

Jei teisės aktuose dėl valstybės intervencijos ir privačiojo sandėliavimo yra nustatytos išsamios mėginių ėmimo procedūros, jų reikia laikytis. Visais kitais atvejais naudojamas mėginys, gautas iš 3 atsitiktinai paimtų kontrolei pateiktos siuntos ėminių. Galima paruošti sudėtinį mėginį. Gautas rezultatas lyginamas su teisės aktuose nustatyta ribine verte, 95 % pasikliovimo intervalą apskaičiuojant pagal formulę $2 \times$ standartinis nuokrypis; čia atitinkamas standartinis nuokrypis priklauso nuo to, ar 1) metodas patvirtintas vykdant tarptautinį bendradarbiavimą, taikant σ_t ir σ_R vertes, ar 2) atliekant vidinį patvirtinimą buvo skaičiuojamas vidinis atkuriamumas. Šis pasikliovimo intervalas prilyginamas rezultato matavimo neapibrėžčiai.

2. Metodo tinkamumas patvirtinamas vykdant tarptautinį bendradarbiavimą

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

Apskaičiuojamas n kartotinių matavimų aritmetinis vidurkis $\bar{x}$.

$\bar{x}$ išplėstinė neapibrėžtis ($k = 2$) apskaičiuojama taip:

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

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

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

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

kitaip laikoma, kad ji UL atitinka.

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

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

kitaip laikoma, kad ji LL atitinka.

3. Vidinis tinkamumo patvirtinimas apskaičiuojant vidinio atkuriamumo standartinį nuokrypį

Jei taikomi šiame reglamente nenurodyti metodai, o preciziškumo matai nebuvo nustatyti, atliekamas vidinis metodo tinkamumo patvirtinimas. Išplėstinės neapibrėžties U apskaičiavimo formulėse vietoj σ_t ir σ_R naudojami atitinkamai standartinis vidinio pakartojamumo nuokrypis s_t ir standartinis vidinio atkuriamumo nuokrypis s_R .

Taisyklės, kurių reikia laikytis nustatant atitiktį teisės aktais nustatytai ribinei vertei, išdėstytos 1 punkte. Tačiau, jei nusprendžiama, kad siunta teisės aktais nustatytos ribinės vertės neatitinka, matavimai kartojami taikant šiame reglamente nurodytą metodą, o gautas rezultatas vertinamas pagal 1 punktą.

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

(**) 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 882/2004 dėl oficialios kontrolės, kuri atliekama siekiant užtikrinti, kad būtų įvertinama, ar laikomasi pašarus ir maistą reglamentuojančių teisės aktų, gyvūnų sveikatos ir gerovės taisyklių (OL L 165, 2004 4 30, p. 1).“