

32001R0213

7.2.2001.

EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS

L 37/1

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 213/2001

(2001. gada 9. janvāris),

ar ko nosaka sīki izstrādātus noteikumus par to, kā piemērot Padomes Regulu (EK) Nr. 1255/1999 attiecībā uz piena un piena produktu analīžu un kvalitātes vērtēšanas metodēm un groza Regulu (EK) Nr. 2771/1999 un Regulu (EK) Nr. 2799/1999

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

šāda sausā vājpiena pārdošanu^(?), būtu jāgroza tā, lai minēto regulu pielikumus par analīzes metodēm varētu iekļaut šajā regulā.

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

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

ņemot vērā Padomes 1999. gada 17. maija Regulu (EK) Nr. 1255/1999 par piena un piena produktu tirgus kopīgo organizāciju⁽¹⁾, un jo īpaši tās 10. un 15. pantu, 26. panta 3. punktu, 29. panta 1. punktu un 31. panta 14. punktu,

- (3) Šādu pārbauzu references metodes bieži publicē tādas starptautiskas organizācijas kā CEN, IDF, ISO un AOAC *International*, un šīs organizācijas minētās metodes regulāri atjaunina. Dažos gadījumos Kopienas references metode ir noteikta, tomēr citos gadījumos Kopienas noteikumos references metode nav precizēta. Lai nodrošinātu, ka references metodes tiek piemērotas vienādi, katru gadu būtu jāstādā references metožu saraksts, un jāpiemēro tikai sarakstā ietvertās metodes.

tā kā:

- (1) Ar Komisijas Regulām (EEK) Nr. 1216/68, (EEK) Nr. 3942/92, (EK) Nr. 86/94, (EK) Nr. 2721/95, (EK) Nr. 1080/96, (EK) Nr. 1081/96, (EK) Nr. 1082/96, (EK) Nr. 1854/96, (EK) Nr. 880/98 un (EK) Nr. 1459/98, kuru pilnas atsauces sniegtas šīs regulas XXVI pielikumā, ir noteiktas references metodes un rutīnas metodes piena un piena produktu analīzēm un kvalitātes novērtēšanai, kā arī ir noteikta joma un noteikumi šo metožu piemērošanai. Skaidrības labad un lai nodrošinātu nozarē nodarbinātos ar vienu metožu kopumu un to piemērošanas noteikumiem, iepriekšminētās regulas būtu jāpārstrādā un jāapkopo vienotā dokumentā. Šajā pašā nolūkā Komisijas 1999. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 2771/1999, ar ko nosaka sīki izstrādātus noteikumus Padomes Regulas (EK) Nr. 1255/1999 piemērošanai attiecībā uz intervenci sviesta un krējuma tirgū⁽²⁾, un Padomes 1999. gada 17. decembra Regula (EK) Nr. 2799/1999, ar ko nosaka sīki izstrādātus noteikumus Regulas (EK) Nr. 1255/1999 piemērošanai attiecībā uz atbalsta piešķiršanu par dzīvnieku barībai paredzēto vājpienu un sauso vājpienu un attiecībā uz
- (4) Nevajadzētu izslēgt rutīnas metožu izmantojums. Tādēļ jāprecizē to izmantošanas nosacījumi.
- (5) Būtu jāizveido kopējas metodes, lai nodrošinātu vienādu praksi analīžu rezultātu vērtēšanā, attiecīgā produkta sensorajā vērtēšanā un apstrīdēto rezultātu pārskatīšanā.
- (6) Attiecībā uz dažām analīzēm pašlaik nepastāv starptautiski atzītas references metodes, kas ir apstiprinātas, un tādēļ nav pieejama informācija par analītisko rezultātu atšķirībām dažādās laboratorijās. Tādēļ būtu jānosaka Kopienas metodes, kas apstiprinātas saskaņā ar starptautiski izstrādātiem noteikumiem un ko piemērotu kā references metodes.

⁽¹⁾ OV L 160, 26.6.1999., 48 lpp.⁽²⁾ OV L 333, 24.12.1999., 11 lpp.^(?) OV L 340, 31.12.1999., 3 lpp.

- (7) Komisijas 1997. gada 15. decembra Regulā (EK) Nr. 2571/97 par sviesta pārdošanu par pazeminātām cenām un atbalsta piešķiršanu par krējumu, sviestu un iebiezinātu sviestu, ko paredzēts izmantot mīklas izstrādājumu, saldējuma un citu pārtikas produktu ražošanā⁽¹⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 635/2000⁽²⁾, paredzēts noteiktos apstākļos iezīmēt krējumu, sviestu un iebiezinātu sviestu, lai nodrošinātu pareizu šo produktu galīgo izmantojumu. Tā kā iezīmēšana ir svarīga, lai sistēma darbotos pareizi un lai nodrošinātu vienādu attieksmi pret personām, kas tajā piedalās, būtu jāizstrādā kopējas metodes, ar ko noteikt dažus attiecīgos marķierus.
- (8) Saskaņā ar Komisijas 1985. gada 11. novembra Regulu (EEK) Nr. 3143/85 par iebiezinātsviesta veidā tiešam patēriņam paredzēta intervences sviesta pārdošanu par pazeminātām cenām⁽³⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 101/1999⁽⁴⁾, Komisijas 1990. gada 20. februāra Regulu (EEK) Nr. 429/90 par atbalsta piešķiršanu uzaicinājuma uz konkursu veidā par iebiezinātu sviestu, kas paredzēts tiešam patēriņam Kopienā⁽⁵⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 124/1999⁽⁶⁾, pie iebiezināta sviestu, attiecībā uz kuru veic uzraudzību, jābūt pievienotiem marķieriem. Atbilstība iezīmēšanas prasībām attiecībā uz iebiezinātu sviestu ir stingri jāīsteno, lai nodrošinātu, ka produkti netiek novirzīti citur. Tādēļ būtu jāparedz kopēja metode šādu marķieru klātbūtnes noteikšanai.
- (9) Saskaņā ar Regulas (EK) Nr. 1255/1999 9. pantu par sieriem, kas gatavoti no aitas piena, var piešķirt privātās uzglabāšanas atbalstu. Īpašu kompensāciju par šiem pašiem produktiem var piešķirt saskaņā ar minētās regulas 31. pantu. Sierus, kas gatavoti no aitas piena, kazas piena, bifeļmātes piena un aitas, kazas un bifeļmātes piena maisījumiem, no konkrētām trešām valstīm var importēt Kopienā saskaņā ar labvēlības režīmu. Ņemot vērā iepriekšminētos noteikumus, ir vajadzīgas atbilstīgas pārbaudes, lai nodrošinātu, ka attiecīgajiem produktiem netiek piejaukts govs piens. Tādēļ, neskarot rutīnas metožu izmantošanu un ar nosacījumu, ka tās atbilst noteiktiem kritērijiem, jāparedz Kopienas references metode govs piena klātbūtnes noteikšanai.
- (10) Ievērojot Komisijas 1990. gada 10. oktobra Regulu (EEK) Nr. 2921/90 par atbalsta piešķiršanu par sauso vājpienu, ko izmanto kazeīna un kazeinātu ražošanai⁽⁷⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 2654/1999⁽⁸⁾, jānosaka, vai produkti nesatur koli-
- baktērijas. Starptautiski pieņemta references metode kolibaktēriju klātbūtnes noteikšanai pienā un piena produktos ir Starptautiskais Standarts IDF 73A:1985. Tomēr minētais standarts kolibaktēriju klātbūtnes noteikšanai konkrētā produkta daudzumā ir piemērojams tikai modificētā veidā. Tādēļ, pamatojoties uz iepriekšminēto standartu, jānosaka Kopienas references metode kolibaktēriju klātbūtnes noteikšanai.
- (11) Padomes 1987. gada 23. jūlija Regulā (EEK) Nr. 2658/87 par tarifu un statistikas nomenklatūru un kopīgo muitas tarifu⁽⁹⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 254/2000⁽¹⁰⁾, paredzētas dažādas muitas nodokļa likmes par kombinēto lopbarību, uz ko attiecas muitas tarifu pozīcija Nr. 2309, atkarībā no piena produktu satura tajā. Lai nodrošinātu minēto noteikumu vienotu piemērošanu, visās dalībvalstīs kā obligāti piemērojama būtu jānosaka vispāratzīta metode laktozes satura analīzei.
- (12) Saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1255/1999 sviestam un sausajam vājpienam, kas paredzēts intervencei, vai sausajam vājpienam, kuru paredzēts izmantot kā dzīvnieku lopbarību, jāatbilst noteiktām kvalitātes prasībām. Būtu jānosaka references metodes, ar ko pārbauda, vai šīs prasības ir ievērotas.
- (13) Dažām no šīm metodēm, kas pirmoreiz ieviestas ar šo regulu, būs vajadzīgs pielāgošanas periods. Tādēļ šo metožu piemērošana būtu jāatliek.
- (14) Piena un piena produktu pārvaldības komiteja tās priekšsēdētāja noteiktajā termiņā nav sniegusi atzinumu,

IR PIENĒMUSI ŠO REGULU.

I NODAĻA

Vispārīgi noteikumi

1. pants

Piemērošanas joma un nozare

Šajā regulā izklāstīti noteikumi par to, kā attiecībā uz pienu un piena produktiem piemērojamas ķīmisko, fizikālo un mikrobioloģisko analīžu metodes un sensorā vērtēšana, kas jāizmanto saskaņā režīmu, kurš paredzēts piena un piena produktu tirgus kopīgai organizācijai, kas izveidota ar Regulu (EK) Nr. 1255/1999. Tā nosaka arī dažas attiecīgās metodes.

⁽¹⁾ OV L 350, 20.12.1997., 3 lpp.

⁽²⁾ OV L 76, 25.3.2000., 9 lpp.

⁽³⁾ OV L 298, 12.11.1985., 9 lpp.

⁽⁴⁾ OV L 11, 16.1.1999., 14 lpp.

⁽⁵⁾ OV L 45, 21.2.1990., 8 lpp.

⁽⁶⁾ OV L 16, 21.1.1999., 19 lpp.

⁽⁷⁾ OV L 279, 11.10.1990., 22 lpp.

⁽⁸⁾ OV L 325, 17.12.1999., 10 lpp.

⁽⁹⁾ OV L 256, 7.9.1987., 1 lpp.

⁽¹⁰⁾ OV L 28, 3.2.2000., 16 lpp.

2. pants

Metožu saraksts

1. Šīs regulas I pielikumā ietverts to references metožu saraksts, kas piemērojamas analīzēm, kā minēts 1. pantā.
2. Komisija atjauno šo sarakstu vismaz vienreiz gadā saskaņā ar kārtību, kas noteikta Regulas (EK) Nr. 1255/1999 42. pantā.

3. pants

Rutīnas metodes

Rutīnas metodes var izmantot analīzēm, kas paredzētas Kopienas noteikumos, ar noteikumu, ka šīs metodes pienācīgi kalibrētas un regulāri pārbaudītas, salīdzinot ar references metodēm.

Procedūru, kas aprakstīta II pielikumā, var piemērot, lai pārbaudītu rezultātus, kas iegūti ar rutīnas metodēm un kas ir tuvu robežām, kuras precizētas attiecīgajās regulās.

Strīdu gadījumos izšķirīgie ir rezultāti, kas iegūti ar references metodi.

4. pants

References metožu apstiprināšana

1. References metodes apstiprina, ja tās atbilst iepriekšnoteiktiem precizitātes kritērijiem attiecībā uz atkārtotamību un sakritības robežu.
2. Ja attiecīgajās regulās noteikto references metodi neapstiprina, tad dalībvalstis nosaka provizorisku sakritības robežu.

Minēto robežu nosaka saskaņā ar III pielikuma b) iedaļā aprakstīto procedūru. Tomēr pirmajos 18 mēnešos pēc šīs regulas stāšanās spēkā dalībvalstis var izmantot līdzvērtīgu procedūru.

Atbilstību minētajai robežai pārbauda vismaz vienreiz gadā.

3. Ja ar apstiprinātām references metodēm vai ar provizorisks precizitātes parametru metodēm iegūtie rezultāti rāda, ka robeža ir pārsniegta, tad analīžu rezultātus var novērtēt ar IV pielikumā aprakstīto metodi, lai noteiktu kritisko starpību ar attiecīgo robežu.

5. pants

Analīžu rezultātu pieņemamība

1. Analīzes veic laboratorijās, kas izmanto iekšējo kvalitātes kontroles procedūru saskaņā ar V pielikuma a) iedaļā aprakstīto vai līdzvērtīga standarta procedūru.

Piemērotās procedūras sīki izklāstītam aprakstam konsultatīviem nolūkiem jābūt pieejamam laboratorijā.

2. Laboratorijas visām metodēm nosaka savas iekšējās precizitātes normas attiecībā uz analīžu sēriju, ievērojot:

- a) procedūru, kas aprakstīta V pielikuma b) iedaļā, vai
- b) publicētu, apstiprinātu procedūru ar noteiktu atkārtotamību.

Atbilstība sakritības robežai jāpārbauda vismaz vienreiz gadā, izmantojot III pielikuma a) iedaļā aprakstīto procedūru.

Otro daļu neattiecinā uz laboratorijām, kas gada laikā piedalījušās kvalifikācijas testu programmā.

3. Laboratorijas ziņojumos par analīžu rezultātiem jāietver pietiekama informācija par rezultātu novērtējumu, kas jāveic saskaņā ar IV un VIII pielikumu.

4. Analīžu rezultātus uzskata par pieņemamiem, ja tie iegūti saskaņā ar pieņemamības kritērijiem, kas aprakstīti 1. punktā minētajā iekšējā kvalitātes kontroles procedūrā, un saskaņā ar 2. punktā minētajām iekšējām precizitātes normām.

6. pants

Sensorā vērtēšana

1. Lai pārbaudītu vērtētāju sniegumu un rezultātu ticamību, attiecībā uz sviestu piemēro VI pielikumā aprakstītās procedūras. Procedūru, kas aprakstīta VII pielikumā, piemēro kā sensorās vērtēšanas references metodi.

2. Attiecībā uz pienu un piena produktiem, izņemot sviestu, dalībvalstu piemērotā references metode ir vai nu IDF standarts 99C/1997, vai citas salīdzināmas metodes, ko dalībvalstis paziņo Komisijai.

Lai pārbaudītu vērtētāju darbu un rezultātu ticamību, var izmantot VI pielikumā aprakstītās procedūras.

7. pants

Paraugu ņemšana un strīdi par analīžu rezultātiem

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

2. Procedūru, kas aprakstīta VIII pielikumā, izmanto gadījumos, kad attiecīgais tirgus dalībnieks nepieņem analīžu rezultātus.

II NODAĻA

ANALĪZES METODES

8. pants

Ūdens/beztauku sausnas/tauku saturs sviestā

1. Lai noteiktu ūdens saturu sviestā, kā references metodi izmanto analīzes metodi, kas aprakstīta IX pielikumā.
2. Lai noteiktu beztauku sausnas saturu sviestā, kā references metodi izmanto analīzes metodi, kas aprakstīta X pielikumā.
3. Lai noteiktu tauku saturu sviestā, kā references metodi izmanto analīzes metodi, kas aprakstīta XI pielikumā.

9. pants

Marķieri

1. Lai noteiktu vaniļīnu iebiezinātā sviestā, sviestā un krējumā, kā references metodi izmanto analīzes metodi, kas aprakstīta XII pielikumā.
2. Lai noteiktu beta-apo-8' karotēnskābes etilestera saturu iebiezinātā sviestā un sviestā kā references metodi izmanto analīzes metodi, kas aprakstīta XIII pielikumā.
3. Lai noteiktu β -sitosterīna vai stigmastēra saturu sviestā un iebiezinātā sviestā, kā references metodi izmanto analīzes metodi, kas aprakstīta XIV pielikumā.
4. Iebiezinātais sviests, sviests un krējums ir iezīmēti atbilstīgi attiecīgiem Kopienas noteikumiem, ja iegūtie rezultāti ir saskaņā ar 1., 2. un 3. punktā minēto pielikumu 8. iedaļas specifikācijām.

10. pants

Govs piena kazeīna klātbūtnes noteikšana

1. Analīžu references metodi, kas aprakstīta XV pielikumā, izmanto, lai nodrošinātu, ka siers, kam jābūt gatavotam tikai no aitas, kazas vai bifelēmātes piena, faktiski nesatur govs piena kazeīnu.

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

2. Lai noteiktu govs piena kazeīnu sieros, kā minēts 1. punktā, rutīnas metodes var izmantot ar noteikumu, ka:

- a) noteikšanas robeža ir 0,5 % vai zemāka;
- b) nevar iegūt pozitīvus rezultātus kļūdas pēc;

- c) govs piena kazeīns ir nosakāms ar vajadzīgo precizitāti pat pēc ilgstošas nogatavināšanas, kas var gadīties parastos tirdzniecības apstākļos.

Ja b) apakšpunktā noteiktās prasības nav ievērotas, jāveic analīzes visiem pozitīvajiem paraugiem ar references metodi.

Ja c) apakšpunktā noteiktās prasības nav ievērotas attiecībā uz vienu no siera veidiem, kas minēti 1. punktā, jāveic analīzes minētajam sieram ar references metodi.

11. pants

Kolibaktēriju klātbūtnes noteikšana

1. Analīžu references metodes, kas aprakstītas XVI pielikumā, izmanto, lai noteiktu kolibaktēriju klātbūtni sviestā, sausajā vājpienā, kazeīnā un kazeinātos.
2. Lai noteiktu kolibaktēriju klātbūtni, var izmantot rutīnas metodes ar noteikumu, ka iegūtie rezultāti ir salīdzināmi ar rezultātiem, kas iegūti ar minētajā pielikumā aprakstīto references metodi. Rutīnas metodēm jābūt jo īpaši ar atbilstīgu klātbūtnes noteikšanas robežu. Nedrīkst iegūt pozitīvus rezultātus kļūdas pēc. Ja nevar izslēgt to, ka pozitīvu rezultātu iegūst kļūdas pēc, tad katrs pozitīvais rezultāts jāapstiprina ar references metodi.

12. pants

Laktozes saturs

Metode, ar ko nosaka laktozes saturu produktiem, uz kuriem attiecas KN kods 2309, aprakstīta XVII pielikumā.

13. pants

Siera sūkalu klātbūtnes noteikšana

1. Metode siera sūkalu klātbūtnes noteikšanai sausajā vājpienā, kas paredzēts intervences krājumiem, ir aprakstīta XVIII pielikumā.
2. Metode siera sūkalu klātbūtnes noteikšanai dzīvnieku lopbarībai paredzētajā sausajā vājpienā un maisījumos ir aprakstīta XIX pielikumā.

14. pants

Paniņu klātbūtnes noteikšana

Metode paniņu klātbūtnes noteikšanai sausajā vājpienā aprakstīta XX pielikumā.

15. pants

Inhibitoru atliekas

Metode antibiotiku un sulfonamīdu/dapsona atlieku noteikšanai sausajā vājpienā ir aprakstīta XXI pielikumā.

16. pants

Sausā vājpiena saturs

Metode sausā vājpiena satura noteikšanai lopbarības maisījumos ir aprakstīta XXII pielikumā.

17. pants

Cietes noteikšana

Metode cietes klātbūtnes noteikšanai sausajā vājpienā, denaturētā sausajā pienā un lopbarības maisījumos ir aprakstīta XXIII pielikumā.

18. pants

Mitruma saturs skābkrējuma sausajās paniņās

Metode mitruma satura noteikšanai skābkrējuma sausajās paniņās, ko paredzēts izmantot dzīvnieku barībai, ir aprakstīta XXIV pielikumā.

19. pants

Svešas izcelsmes tauku klātbūtnes noteikšana

Metode svešas izcelsmes tauku klātbūtnes noteikšanai piena taukos ir aprakstīta XXV pielikumā.

III nodaļa

NOBEIGUMA NOTEIKUMI

20. pants

Grozījumi Regulā (EK) Nr. 2771/1999

Regulu (EK) Nr. 2771/1999 groza šādi.

- Ar šādu tekstu aizstāj 4. panta 1. punkta pirmo teikumu: "Kompetentas iestādes pārbauda sviesta kvalitāti ar metodēm, kas aprakstītas I pielikumā, ņemot paraugus saskaņā ar IV pielikumā izklāstītajiem noteikumiem."
- Regulas I pielikumā 2. zemsvītras piezīmi aizstāj ar šādu: "Skat. Regulas (EK) Nr. 213/2001 I pielikumu."
- Svītro II un III pielikumu.

- Regulas IV. pielikuma 2. iedaļas pēdējā teikumā vārdus "ar III pielikumu" aizstāj ar vārdiem "ar Regulas (EK) Nr. 213/2001 VII pielikumu".

21. pants

Grozījumi Regulā (EK) Nr. 2799/1999

Regulu (EK) Nr. 2799/1999 groza šādi.

- Regulas 20. panta 1., 2., 3. un 4. punktu aizstāj ar šādu tekstu:
 - Sausā vājpiena saturu maisījumos un kombinētajā lopbarībā nosaka, vismaz divreiz veicot katra parauga testu ar analīzes metodi, kas aprakstīta Regulas (EK) Nr. 231/2001 XXII pielikumā, papildus veicot pārbaudes, kas paredzētas šīs regulas 17. panta 3. punktā. Ja šajās pārbaudēs iegūtie rezultāti ir atšķirīgi, tad par izšķirīgo uzskata rezultātu, kas iegūts, veicot inspekciju uz vietas.
 - Siera sūkalu neesamību pārbauda ar metodi, kas aprakstīta Regulas (EK) Nr. 213/2001 XIX pielikumā.
 - Cietes saturu kombinētajā lopbarībā nosaka, veicot šīs regulas 17. panta 3. punktā paredzētās pārbaudes, kas jāpapildina ar analīzēm, kuru metode aprakstīta Regulas (EK) Nr. 213/2001 XXIII pielikumā.
 - Mitruma saturu skābkrējuma sausajās paniņās nosaka ar analīzes metodi, kas aprakstīta Regulas (EK) Nr. 213/2001 XXIV pielikumā."
- Svītro III, IV, V un VI pielikumu.

22. pants

Atcelšanas

Atceļ Regulas (EEK) Nr. 1216/68, (EEK) Nr. 3942/92, (EK) Nr. 86/94, (EK) Nr. 2721/95, (EK) Nr. 1854/96, (EK) Nr. 1080/96, (EK) Nr. 1081/96, (EK) Nr. 1082/96, (EK) Nr. 880/98 un (EK) Nr. 1459/98.

Atsauces uz atceltajām regulām uzskata par atsaucēm uz šo regulu.

23. pants

Stāšanās spēkā

Šī regula stājas spēkā septītajā dienā pēc tās publicēšanas Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī.

Tomēr III pielikumā, IV pielikuma 4. iedaļā, V, VI un VIII pielikumā aprakstītās metodes piemēro 18 mēnešus pēc šīs regulas stāšanās spēkā.

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

Briselē, 2001. gada 9. janvārī

Komisijas vārdā —
Komisijas loceklis
Franz FISCHLER

I PIELIKUMS

(2. pants)

REFERENCES METOŽU SARAKSTS

Indekss.

min. = minimums maks. = maksimums, pielikums = citētās regulas pielikums BS = beztauku sausna BTS = brīvās taukskābes PV = peroksīda vērtība I = izskats G/S = garša vai smarža, K = konsistence, KBS = kopējais baktēriju skaits, term. = termofilo baktēriju skaits, DV = dalībvalsts, IDF = Starptautiskā piensaimniecības federācija, ISO = Starptautiskā standartu organizācija, IUPAC = Starptautiskā tīrās un lietišķās ķīmijas savienība, ADPI = Amerikas Piena produktu institūts, SIP = saldināts iebiezināts piens, IPK = iztvaicēts piens vai krējums, PBS = piena beztauku sausna

A DAĻA

Komisijas Regula	produkts	parametrs	robeža	references metode	piezīme
Regula (EK) Nr. 2771/1999 Intervences krājumi (OV L 333, 24.12.1999., 110. lpp.)	nesālīts sviests	piena tauki ūdens BS BTS (maks.) PV (maks.) kolibaktērijas tauki, kas nav piena tauki sterīna marķieri citi marķieri: — vanilīns — karotēnskābes etilesteris — enānskābes triglicerīdi organoleptiskās īpašības ūdens dispersija	min. 82 % līdz 16 % līdz 2 % 1,2 mmol/100 g tauku 0,3 mekv. skābeklis/1 000 g tauki klātbūtne nav nosakāma 1 g klātbūtne nav nosakāma ar triglice- rīdu analīzi klātbūtne nav nosakāma klātbūtne nav nosakāma klātbūtne nav nosakāma klātbūtne nav nosakāma attiecībā uz A,G un C – vismaz 4 no 5 punktiem vismaz 4 punkti	XI pielikums IX pielikums X pielikums IDF Standarts 6B:1989 IDF Standarts 74A:1991 (angļu valodas redakcija) XVII pielikums XXVI pielikums XIV pielikums XII pielikums XIII pielikums IUPAC 2.301 sub 5 VII pielikums IDF Standarts 112A:1989	1. piezīme 3. piezīme
Regula (EK) Nr. 2771/1999 Privātā uzglabāšana	nesālīts sviests	piena tauki ūdens	min. 82 % līdz 16 %	XI pielikums IX pielikums	6. piezīme
Regula (EK) Nr. 2771/1999 Privātā uzglabāšana	sālīts sviests	piena tauki ūdens sāls	min. 80 % līdz 16 % līdz 2 %	XI pielikums IX pielikums IDF Standarts 12B:1988	6. piezīme

Komisijas Regula	produkts	parametrs	robeža	references metode	piezīme
Regula (EK) Nr. 2571/97 (OV L 350, 20.12.1997., 3. lpp.)	nesālīts sviests	piena tauki ūdens marķieri: — sterīni — vanilīns — karotēnskābes etilesteris — enānskābes triglicerīdi	min. 80 % līdz 16 %	XI pielikums IX pielikums XIV pielikums XII pielikums XIII pielikums IUPAC 2.301 sub 5	
Regula (EK) Nr. 2571/97	sālīts sviests	piena tauki ūdens sāls marķieri: sterīni vanilīns karotēnskābes etilesteris enānskābes triglicerīdi	min. 80 % līdz 16 % līdz 2 %	XI pielikums IX pielikums IDF Standarts 12B:1988 XIV pielikums XII pielikums XIII pielikums IUPAC 2.301 sub 5	
Regula (EK) Nr. 2571/97	iebiezināts sviests	piena tauki mitrums un PBS BTS PV (maks.) tauki, kas nav piena tauki garša smarža citi marķieri: — sterīni — vanilīns — karotēnskābes etilesteris — enānskābes triglicerīdi	min. 99,8 % līdz 0,2 % līdz 0,35 % (oleīnskābe) 0,5 mekv. skābekļa/1 000 g tauku nav tīra nav svešas izcelsmes aromātu nesatur neitralizējošas vielas, anti- oksidantus un konservantus	IDF Standarts 24:1964 IDF Standarts 23A:1988 (mitrums) IDF Standarts 24:1964 (PBS) IDF Standarts 6B:1989 IDF Standarts 74A:1991 (angļu valodas redakcija) XXV pielikums XIV pielikums XII pielikums XIII pielikums IUPAC 2.301 sub 5	1. piezīme

Komisijas Regula	produkts	parametrs	robeža	references metode	piezīme
Regula (EK) Nr. 2571/97	krējums	tauki marķieri: — sterīni — vanilīns — karotēnskābes etilesteris — enānskābes triglicerīdi	35%	IDF Standarts 16C:1987 kompetentās iestādes apstiprinātas metodes XII pielikums kompetentās iestādes apstiprinātas metodes IUPAC 2.301 sub 5	2. piezīme 2. piezīme
Regula (EEK) Nr. 429/90 (OV L 45, 21.2.1990., 8. lpp.)	iebiezināts sviests	piena tauki BS marķieri: — stigmasterīns (95%) — stigmasterīns (85%) — enānskābes triglicerīdi — sviestskābes etilesteris un stigmasterīns — lecitīns (E 322) NaCl BTS PV (maks.) Garša smarža citi	min. 96 % līdz 2 % 15 g/100 kg iebiezināta sviesta 17 g/100 kg iebiezināta sviesta 1,1 kg/100 kg iebiezināta sviesta skat. pielikumu, 1.c punktu līdz 0,5 % līdz 0,75 % līdz 0,35 % (oleīnskābe) Līdz 0,5 mekv. skābekļa/1 000 g tauku Tīra nav svešas izcelsmes aromātu nesatur neitralizējošas vielas, antioksidantus un konservantus	kompetentās iestādes apstiprinātas metodes kompetentās iestādes apstiprinātas metodes XIV pielikums XIV pielikums IUPAC 2.301 sub 5 XIV pielikums IDF Standarts 12B:1988 IDF Standarts 6B:1989 IDF Standarts 74A:1991 (angļu valodas redakcija)	2. piezīme 2. piezīme 2. piezīme 2. piezīme 1. piezīme
Regula (EK) Nr. 2191/81 (OV L 213, 1.8.1981., 20. lpp.)	nesālīts sviests	piena tauki ūdens	min. 82 % līdz 16 %	XI pielikums IX pielikums	

Komisijas Regula	produkts	parametrs	robeža	references metode	piezīme
Regula (EEK) Nr. 2191/81	sālīts sviests	piena tauki ūdens sāls	min. 80 % līdz 16 % līdz 2 %	XI pielikums IX pielikums IDF Standarts 12B:1988	
Regulas (EK) Nr. 1255/1999 9. pants un II sadaļa	no aitas un/vai kazas piena gatavots siers	govs piens	< 1 %	XV pielikums	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	I pielikums – Skābais kazeīns	ūdens tauki brīvas skābes	līdz 12,00 % līdz 1,75 % līdz 0,30 % (pienskābes)	IDF Standarts 78C:1991 IDF Standarts 127A:1988 IDF Standarts 91:1979	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	I pielikums – Siera fermenta kazeīns	ūdens tauki pelni	līdz 12,00 % līdz 1,00 % min. 7,50 %	IDF Standarts 78C:1991 IDF Standarts 127A:1988 IDF Standarts 90:1979	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	I pielikums – Kazeināti	ūdens piena olbaltumvielas tauki un pelni	līdz 6,00 % min. 88,00 % līdz 6,00 %	IDF Standarts 78C:1991 IDF Standarts 92:1979 IDF Standarts 127A:1988 IDF Standarts 89:1979 vai IDF Standarts 90:1979	
Regula (EEK) Nr. 2921/90	II pielikums – Skābais kazeīns	ūdens tauki brīvas skābes KBS (maks.) kolibaktērijas term. (maks.)	līdz 10,00 % līdz 1,50 % līdz 0,20 % (pienskābes) 30 000 l/g nav 0,1 g 5 000 l/g	IDF Standarts 78C:1991 IDF Standarts 127A:1988 IDF Standarts 91:1979 IDF Standarts 100B:1991 XVI pielikums IDF Standarts 100B:1991	3. piezīme 3. piezīme 3. un 4. piezīme
Regula (EEK) Nr. 2921/90	II pielikums – Siera fermenta kazeīns	ūdens tauki pelni KBS (maks.) kolibaktērijas term. (maks.)	līdz 8,00 % līdz 1,00 % min. 7,50 % 30 000 l/g nav 0,1 g 5 000 /g	IDF Standarts 78C:1991 IDF Standarts 127A:1988 IDF Standarts 90:1979 IDF Standarts 100B:1991 XVI pielikums IDF Standarts 100B:1991	3. piezīme 3. piezīme 3. un 4. piezīme

Komisijas Regula	produkts	parametrs	robeža	references metode	piezīme
Regula (EEK) Nr. 2921/90	II pielikums – Kazeināti	ūdens piena olbaltumvielas tauki un pelni KBS (maks.) kolibaktērijas term. (maks.)	līdz 6,00 % min. 88,00 % līdz 6,00 % 30 000 l/g nav 0,1 g 5 000 l/g	IDF Standarts 78C:1991 IDF Standarts 92:1979 IDF Standarts 127A:1988 IDF Standarts 89:1979 vai 90:1979 IDF Standarts 100B:1991 XVI pielikums IDF Standarts 100B:1991	 3. piezīme 3. piezīme 3. un 4. piezīme
Regula (EEK) Nr. 2921/90	III pielikums – Kazeināti	ūdens piena olbaltumvielas tauki laktoze pelni KBS (maks.) kolibaktērijas term. (maks.)	līdz 6,00 % min. 85,00 % līdz 1,50 % līdz 1,00 % līdz 6,50 % 30 000 l/g nav 0,1 g 5 000 l/g	IDF Standarts 78C:1991 IDF Standarts 92:1979 IDF Standarts 127A:1988 IDF Standarts 106:1982 IDF Standarts 89:1979 vai 90:1979 IDF Standarts 100B:1991 XVI pielikums IDF Standarts 100B:1991	 3. piezīme 3. piezīme 3. un 4. piezīme
Regula (EK) Nr. 2799/1999 (OV L 340, 31.12.1999., 3. lpp.)	kombinētā lopbarība un sausais vājpiens (SV) (izmantošanai lopbarībā)	ūdens (skābkrējuma sausās paniņas) olbaltumvielas ūdens (SV) tauki (SV) siera sūkalas (SV) ciete (SV) ūdens (maisījumi) tauki (maisījumi) siera sūkalas (maisījumi) SV saturs (galaproduktā) tauki (galaproduktā) ciete (galaproduktā) varš (galaproduktā)	līdz 5 % 31,4% (min.) no beztauku sausnas līdz 5 % līdz 11 % nav nav līdz 5 % no beztauku sausnas — nav min. 50 % min. 2,5 % vai 5 % min. 2 % 25 ppm	IDF Standarts 20B:1993 IDF Standarts 26A:1993 IDF Standarts 9C:1987 XIX pielikums XXIII pielikums IDF Standarts 26A:1993 Komisijas Direktīva 84/4/EEC (OV L 15, 18.1.1984., 28. lpp.) XIX pielikums XXII pielikums Komisijas Direktīva 84/4/EEC XXIII pielikums Komisijas Direktīva 78/633/EEC (OV L 206, 26.7.1987., 43. lpp.)	 7. piezīme 7. piezīme 8. piezīme 9. piezīme

Komisijas Regula	produkts	parametrs	robeža	references metode	piezīme
Regula (EK) Nr. 322/96 (OV L 45, 23.2.96., 5. lpp.)	SV (strūkla)	tauki	līdz 1 %	IDF Standarts 9C:1987	
		olbaltumvielas	31,4% (min.) no beztauku sausnas	IDF Standarts 20B:1993	
		ūdens	līdz 3,5 %	IDF Standarts 26A:1993	
		skābums (n/10 NaOH)	līdz 19,5 ml	IDF Standarts 86:1981	
		laktāti	līdz 150 mg/100 g	IDF Standarts 69B:1987	
		Fosfāts	negatīvs	ISO Standarts 3356:1975	
		Šķīdība	līdz 0,5 ml 24° C temperatūrā	IDF Standarts 129A:1988	
		Piedegušās daļiņas	B disks min. (15,0 mg)	ADPI: 1990	
		KBS	40 000/1 g	IDF Standarts 100B:1991	3. piezīme
		kolibaktērijas	negatīvs/0,1 g	XVI pielikums	3. piezīme
		paniņas	negatīvs	XX pielikums	
		siera sūkalas	negatīvs	XVIII pielikums	
		skābās sūkalas	negatīvs	kompetentās iestādes apstiprināta metode	2. piezīme
		inhibitori		XXI pielikums	

B DAĻA

B daļā uzskaitītās references metodes var izmantot, lai veiktu analīzes produktiem, uz ko attiecas kāda no 1. ailē uzskaitītajām Regulām

Komisijas Regula	produkts	KN kods	parametrs	robeža	references metode	piezīme
Regula (EEK) Nr. 2658/87 (OV L 256, 7.9.1987., 1. lpp.) Regula (EK) Nr. 2414/98 (OV L 299, 10.11.1998., 7. lpp.) Regula (EK) Nr. 1347/98 (OV L 185, 30.6.1998., 21. lpp.) Regula (EK) Nr. 2508/97 (OV L 345, 16.12.1997., 31. lpp.) Regula (EK) Nr. 174/1999 (OV L 20, 27.1.1999., 8. lpp.)	piens un krējums, kas nav iebiezināts un kam nav pievienots cukurs vai cits saldinātājs	0401	tauki (≤ 6 %)	izmanto robežas, kas noteiktas KN koda aprakstā konkrētajam produktam, attiecīgā gadījumā tās turpmāk precizētas Komisijas Regulā (EEK) Nr. 3846/87 (OV L 366, 24.12.1987., 1. lpp.),	IDF Standarts 1D:1996	
tauki (> 6 %)			IDF Standarts 16C:1987			

Komisijas Regula	produkts	KN kods	parametrs	robeža	references metode	piezīme
	piens un krējums, kas iebiezināts vai kam pievienots cukurs vai cits saldinātājs	0402	tauki (šķidrā veidā) tauki (cietā veidā) olbaltumvielas saharoze (normāls saturs) saharoze (zems saturs)		IDF Standarts 13C:1987 IDF Standarts 9C:1987 IDF Standarts 20B:1993 IDF Standarts 35A:1992 Kompetentās iestādes apstiprinātas metodes	2. piezīme
	paniņas, fermentēts piens vai piens un krējums ar paaugstinātu skābumu, kas ir vai nav iebiezināts un kam pievienots cukurs vai citi saldinātāji	0403	tauki olbaltumvielas saharoze (normāls saturs) saharoze (zems saturs) ūdens (skābkrējuma sausās paniņas) ūdens (saldkrējuma sausās paniņas) sausna (citi produkti)		IDF standarti – 1D:1996, 9C:1987, 16C:1987, 22B:1987, 126A:1988 IDF Standarts 20B:1993 IDF Standarts 35A:1992 kompetentās iestādes apstiprinātas metodes XXIV pielikums IDF Standarts 26A:1993	2. piezīme
	sūkalas, kas ir vai nav iebiezinātas vai kam ir pievienots cukurs vai cits saldinātājs; produkti, kuru sastāvā ir dabīgas piena sastāvdaļas	0404	tauki olbaltumvielas saharoze (normāls saturs) saharoze (zems saturs)		IDF standarti – 9C:1987, 16C:1987, 22B:1987 IDF Standarts 20B:1993 IDF Standarts 35A:1992 kompetentās iestādes apstiprinātas metodes	2. piezīme
		0404 90	olbaltumvielas ūdens sausna (iebiezināti/koncentrēti produkti)		IDF Standarts 20B:1993 IDF Standarts 26A:1993 IDF Standarts 15B:1991 IDF Standarts 21B:1987	
	sviests un svešas izcelsmes tauki, kas iegūti no piena; ziežamie piena pārstrādes produkti	0405	tauki ūdens		XI pielikums IX pielikums	
		sviests	BS NaCl		X pielikums IDF Standarts 12B:1998	
		sviesta eļļa	tauki ūdens (ja tauki < 99 %)		IDF Standarts 24:1964 IDF Standarts 23A:1988	

Komisijas Regula	produkts	KN kods	parametrs	robeža	references metode	piezīme
	siers un rūgušpiena biezmasa	0406	tauki sausna sausna (Ricotta) NaCl laktoze		IDF Standarts 5B:1986 IDF Standarts 4A:1982 IDF Standarts 58:1970 IDF Standarts 88A:1988 IDF Standarts 79B:1991	
Regula (EEK) Nr. 2658/87	kombinētā lopbarība	2309	laktoze		XVII pielikums	

Piezīmes attiecībā uz Eiropas Savienības references metožu sarakstu

1. *piezīme:* Piens tauku izolēšana, kā aprakstīts *IDF* Standartā 6B:1989 (aizsardzība no gaismas).
2. *piezīme:* References metode nav noteikta.
3. *piezīme:* Paraugs jāgatavo saskaņā ar *IDF* Standartu 122C:1996 vai *IDF* Standartu 73A:1985.
4. *piezīme:* Inkubācija notiek 48 stundas 55 °C temperatūrā, nepieļaujot barotnes izžūšanu.
5. *piezīme:* BS % = sausnas % - tauku %.
6. *piezīme:* Sviestam jāatbilst dalībvalsts produkcijas kvalitātes šķirai, kas minēta Komisijas Regulas (EK) Nr. 2771/1999 V pielikumā.
7. *piezīme:* Komisijas Direktīva 84/8/EEC.
8. *piezīme:* Komisijas Regula (EK) Nr. 1758/94 (OV L 183, 19.7.1994., 14. lpp.).
9. *piezīme:* Komisijas Direktīva 78/633/EEC.

II PIELIKUMS

(3. pants)

REGULĀS PAR SASTĀVA UN KVALITĀTES PRASĪBĀM PRECIZĒTO AR RUTĪNAS METODĒM IEGŪTO ROBEŽĀM TUVO REZULTĀTU PĀRBAUDE

Ja m_o ir to sastāva un kvalitātes prasību robeža, kuras noteiktas kādā regulā, tad šķīrējpunkts (L) ir

$$L = m_o$$

ja $R_{Rout}/R_{Ref} \leq 1$

R_{Rout} : rutīnas metodes sakritības robeža

R_{Ref} : references metodes sakritības robeža

Ja m_o ir apakšējā robeža un $R_{Rout}/R_{Ref} > 1$, tad šo šķīrējpunktu iegūst, izmantojot šādu formulu:

$$L = m_o - [(R_{Rout}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

Ja ar tādiem pašiem nosacījumiem m_o ir apakšējā robeža, tad šķīrējpunktu iegūst, izmantojot šādu formulu:

$$L = m_o + [(R_{Rout}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

kur CrD_{95} ir references metodes kritiskā starpība (skat. IV pielikumu).

Ja m_o ir apakšējā robeža, tad galarezultāts, kas pārsniedz šķīrējpunktu, kurš iegūts ar rutīnas metodi, jāaizstāj ar galarezultātu, kas iegūts ar references metodi. Šim galarezultātam jābālistās uz vismaz tādu pašu analīžu/paraugu skaitu kā galarezultātam, kas iegūts ar rutīnas metodi.

Ja m_o ir apakšējā robeža, tad šī pati procedūra jāievēro arī attiecībā uz galarezultātu, kurš iegūts ar rutīnas metodi un nepārsniedz šķīrējpunktu.

Piezīme

Turpmāk aprakstītā procedūra jāievēro, ja matricas efekti nav nosakāmi. Matricas efektus var noteikt šādi: katram kalibrēšanā izmantotajam paraugam nosaka ar references metodi un rutīnas metodi iegūto rezultātu starpību (w_i).

Standartnovirzi aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$s = \sqrt{(\sum w_i^2)/2m}$$

m: kalibrēšanai izmantoto paraugu skaitusalīdzina ar references metodes un rutīnas metodes atkārtojamības standartnovirzes vidējo aritmētisko lielumu:

$$s_r = \sqrt{(s_{r(ref)}^2 + s_{r(rout)}^2)/2}$$

Matricas efektu nevar izslēgt, ja

$$m \bullet s^2/s_r^2 > Chi_{f1-\alpha}^2$$

kur

f = m (f: brīvības pakāpes skaitlis)

α = kļūdas iespējamība; $\alpha = 0,05$.

Šajā gadījumā, iekams var noteikt šķīrējpunktu, vajadzīgi turpmāki pētījumi.

III PIELIKUMS

(4. un 5. pants)

a) **Procedūra, kādā nosaka atbilstību noteiktajai sakritības robežai (ķīmiskās analīzes).**

Atbilstību sakritības robežai pārbauda, salīdzinot laboratorijas rezultātus ar rezultātiem, kas iegūti, laboratorijā ar pieredzi ⁽¹⁾ veicot identiska parauga analīzi. Abās laboratorijās veic dubultu noteikšanu, un rezultātus novērtē, izmantojot formulu:

$$\text{CrD}_{95}(|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

kur

CrD₉₅: kritiskā starpība (P = 0,95) \bar{y}_1 : 1. laboratorijā iegūto rezultātu vidējais aritmētiskais lielums, \bar{y}_2 : 2. laboratorijā iegūto rezultātu vidējais aritmētiskais lielums,

R: sakritības robeža: jānosaka ar interpolāciju,

r: atkārtojamības robeža: ja precizitāte mainās atkarībā no daudzuma.

Ja kritiskā starpība ir pārsniegta, nākamo divu mēnešu laikā jāveic cits eksperiments. Ja otrā eksperimenta rezultāti neatbilst sakritības robežai, tad kompetentajām iestādēm jāveic vajadzīgie pasākumi.

b) **Procedūra, kādā iegūst provizorisku sakritības robežu (ķīmiskās analīzes)**

Provizorisku sakritības robežu (R_{prov}) iegūst, izmantojot šādu vienādojumu:

$$R_{\text{prov}} = \sqrt{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

kur

 \bar{y}_1 : 1. laboratorijā iegūto divu rezultātu vidējais aritmētiskais lielums, \bar{y}_2 : 2. laboratorijā iegūto divu rezultātu vidējais aritmētiskais lielums (skat. III.a pielikumu),

r: sakritības robeža vai provizoriska sakritības robeža.

Piezīmes

1. R_{prov} var izmantot, lai aprēķinātu kritisko starpību (skat. VI pielikumu).
2. R_{prov} ir noteikta kā 2r, ja R_{prov} aprēķinātais lielums ir mazāks par 2r.
3. Ja aprēķinātais lielums ir lielāks par 3r vai vairāk nekā divreiz pārsniedz lielumu R, kas noteikts pēc Horvica vienādojuma (*), ja R_{prov} ir nepieņemami liels un to nevar izmantot, lai aprēķinātu kritisko starpību.
4. R_{prov} būtu jānosaka vismaz vienreiz gadā, pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti divās laboratorijās (skat. IV pielikumu).
5. R_{prov} vidējais aritmētiskais lielums jāizmanto kritiskās starpības aprēķināšanai. Noteikumus, kas paredzēti 2. un 3. punktā, piemēro attiecībā uz R_{prov} vidējo aritmētisko lielumu.

(*) Horvica vienādojums:

$$\text{RSD}_R\% = 2^{1-0.5 \log_{10} C}$$

c: kur: RSN_R: sakritības relatīvā standartnovirze
koncentrācija, kas izteikta kā daļskaitlis (piemērs: 10 g/100 g = 0,1). *Norāde:*

Peeler, J.T., Horwitz, W. and Albert, R. J.Ass. Off. Anal. Chem. 72(5), 784-806 (1989).

⁽¹⁾ Laboratorija ar pieredzi parasti ir laboratorija, kas ar panākumiem piedalījusies vai nu testa metodes apstiprināšanā, vai kvalifikācijas testā.

Sakritības robežu (lielumu R) no aprēķinātā lieluma RSN_R iegūst šādi:

$$R = 0.0283 \bar{x} RSN_R$$

\bar{x} : iegūto rezultātu vidējais aritmētiskais lielums.

Daži aprēķinātie lielumi RSN_R (piemēri)

koncentrācija	RSN_R (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

Ja analizējamā viela ir 1 g/100 g koncentrācijā, tad

$$R = 0.0283 * 1 * 4 = 0.11 \text{ g/100 g.}$$

IV PIELIKUMS

(4. pants)

AR APSTIPRINĀTĀM METODĒM IEGŪTO ANALĪZU REZULTĀTU VĒRTĒŠANA

Ja analīžu rezultāti rāda, ka robeža ir pārsniegta, tad aprēķina divu vai vairāku rezultātu vidējo aritmētisko lielumu. Jāievēro šāda procedūra.

1. Gadījumos, kad analīzes rezultāts pārstāv vienu rezultātu, ar atkārtotām nosacījumiem jāveic otra analīze. Ja ar atkārtotām nosacījumiem nevar veikt divas analīzes, tad ar atkārtotām nosacījumiem veic atkārtotu analīzi un izmanto tās rezultātus, lai novērtētu kritiskās starpības atbilstību.
2. Ar atkārtotām nosacījumiem iegūto rezultātu vidējā aritmētiskā lieluma un robežas starpības absolūtais lielums ir noteikts. Ja starpības absolūtais lielums pārsniedz kritisko starpību, tas nozīmē, ka analizētais paraugs neatbilst prasībām.

Kritisko starpību nosaka, izmantojot šādu formulu:

$$\text{CrD}_{95}(|\bar{y} - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

kur:

\bar{y} : iegūto rezultātu vidējais aritmētiskais lielums,

m_0 : robeža,

n : analīžu/paraugu skaits.

Ja precizitāte mainās atkarībā no daudzuma, var būt nepieciešams noteikt r un R , izmantojot interpolāciju.

Parasti galarezultātiem, kas paziņoti par paraugu, jāparāda, ka robeža ir ievērota.

Galarezultāti

— starp m_0 un $m_0 + \text{CrD}_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, ja robeža ir maksimālā,

— starp m_0 un $m_0 - \text{CrD}_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, ja robeža ir minimālā,

tādējādi iegūstami vienīgi izņēmuma kārtā.

Galarezultāti minētajos intervālos pieņemami tikai tad, ja tie negadās biežāk kā vienreiz starp katriem pieciem paraugiem, ko analizē no sūtījuma. Ja no sūtījuma analizē mazāk nekā piecus paraugus, tad ir pieņemams, ja minētajam intervālam atbilst viens rezultāts. Tomēr, ja ražotājs atkārtoti piedāvā sūtījumus, jāievēro noteikums par to, ka no pieciem analizētajiem paraugiem tikai viens rezultāts atbilst minētajam intervālam.

3. Ja galarezultātu x aprēķina, izmantojot formulu $x = y_1 \pm y_2$ (piemēram, ūdens + sviesta beztauku sausna, lai aprēķinātu tauku saturu), kur y_1 un y_2 ir viena veida analīžu galarezultāti, tad galarezultātu kopējo atkārtotām robežu r_x un kopējo sakritības robežu R_x aprēķina kā

$$r_x = \sqrt{r_1^2 + r_2^2}$$

$$R_x = \sqrt{R_1^2 + R_2^2}$$

kur r_1 un r_2 ir atkārtotām robežas un R_1 un R_2 attiecīgi y_1 un y_2 sakritības robežas.

Lielumu x salīdzina ar robežu m_0 , ievērojot noteikumus, kas paredzēti 1. un 2. punktā. Kritisko starpību nosaka, izmantojot šādu formulu:

$$\text{CrD}_{95}(|x - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

kur x ir iegūto x_1 rezultātu vidējais aritmētiskais lielums.

4. Ja galarezultātu aprēķina, izmantojot formulu

$$x = \frac{y_1}{y_2}$$

(piemēram, tauki siera sausnā),

kur y_1 un y_2 ir viena veida analīžu galarezultāti, tad kopējo atkārtojamības robežu r_x un sakritības robežu R_x var aprēķināt kā:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{*1}^2 + r_{*2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{*1}^2 + R_{*2}^2}$$

$$\mu_x = \mu_1 | \mu_2$$

μ_1 : : y_1 robeža jeb mērķa lielums (piemēram, tauki)
 μ_2 : : y_2 robeža jeb mērķa lielums (piemēram, sausna);

$$r_{*1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0.15 \qquad r_{*2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

kur

r_1 : : atkārtojamības robeža y_1
 r_2 : : atkārtojamības robeža y_2 ;

$$R_{*1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0.15 \qquad R_{*2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

kur

R_1 : : sakritības robeža, y_1 ,
 R_2 : : sakritības robeža, y_2 .

Procedūra r_x un R_x aprēķināšanai ir piemērojama tikai tad, ja relatīvās atkārtojamības un sakritības robežas (r_{*1} , r_{*2} ; R_{*1} ; R_{*2}) ir mazākas par 0,15 vai vienādas ar 0,15.

Lielumu x salīdzina ar robežu μ_x , ievērojot noteikumus, kas precizēti 1. un 2. punktā. Kritisko starpību nosaka, izmantojot šādu formulu:

$$CrD_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

kur ir hronoloģiskā secībā iegūto \bar{x} rezultātu vidējais aritmētiskais lielums (*).

(*) *Piezīme.* Piemēram, ja ir iegūti rezultāti y_{11} , y_{12} , y_{21} un y_{22} , tad jāaprēķina y_{11}/y_{21} un y_{12}/y_{22} vidējais aritmētiskais lielums.

V PIELIKUMS

IEKŠĒJĀ KONTROLE

(5. pants)

a) Iekšējās kvalitātes kontroles (IKK) procedūra (ķīmiskās analīzes)

Kontroles materiāla definīcija

Uz materiālu, ko izmanto IKK mērķiem, attiecināta to pašu procedūru vai daļēji to pašu procedūru, kuru attiecināta uz materiāliem, kuriem veic testus.

Kontroles materiāls var būt:

- sertificēts references materiāls,
- iekšējais references materiāls,
- materiāls, kas apstiprināts starplaboratoriju testā,
- bagātināts materiāls.

Procedūra IKK izveidei

Laboratorijai būtu jāievieš IKK, ievērojot procedūru, kas aprakstīta IUPAC dokumentā "Saskaņotas vadlīnijas par iekšējo kvalitātes kontroli analītiskās laboratorijās" (1).

IKK ietver kontroles materiālu analīžu secību vai testa parauga atkārtotas analīzes. Kontroles materiālu ķīmiskajam sastāvam jābūt līdzīgam testa paraugu ķīmiskajam sastāvam un pienācīgi stabilam attiecīgajā laikā. Jāpierāda, ka to var piemēroti sadalīt identiskās analīžu porcijās un ka analizējamās vielas koncentrācija tajā atbilst attiecīgajam diapazonam.

Katrā analīzē sērijā vismaz vienreiz jāveic kontroles materiāla analīze un iegūtais lielums jāatzīmē kontroles diagrammā, lai izmērītu ilgtermiņa kļūdas. Turklāt laboratorijai periodiski katrā sērijā būtu jāpierāda atbilstība atkārtojamības nosacījumiem. To var izdarīt ar kontroles un/vai testa materiālu atkārtotām analīzēm. Šo analīžu rezultāti jāsalīdzina ar visām publicētajām atkārtojamības robežām un esošajiem datiem par iekšējo precizitāti.

Ja izmanto kontroles materiālus, tad iegūtos lielumus kontroles materiāla starpsēriju analīzēm jāatzīmē Ševharta [Shewhart] diagrammā (ISO 8258 (1991)) ar attiecīgām kontroles robežām. Rīcības robežas jānosaka šādi:

$$x \pm 3s_t,$$

kur s_t ir kopējā standartnovirze,

brīdinājuma robežas

$$x \pm 2s_t$$

Kopējā standartnovirze:

$$s_t = \sqrt{s_b^2 + s_w^2/n}$$

kur

s_b : starpsēriju standartnovirze,

s_w : sērijas standartnovirze,

n : noteikšanas reižu skaits.

Gadījumos, kad neizmanto kontroles materiālus (piemēram, tādēļ, ka nav stabilitātes), vismaz viens no testa materiāliem katrā sērijā jāanalīzē divreiz.

Absolūto starpību, kas iegūta atkārtotās analīzēs vienā sērijā (skat. III pielikumu) jāatzīmē diagrammā. Viduslīnija ir $1,128 s_w$, apakšējā robeža ir 0, augšējā robeža (rīcības robeža) ir $3,686 s_w$, ja s_w ir sērijas standartnovirze.

Ja koncentrācijas diapazons ir plašs, tad kontrole būtu jāattiecinā uz materiāliem, kuros analizējamās vielas daudzums ir liels un kuros - mazs.

(1) M. Thompson and R. Wood: "Pure and Applied Chemistry" 67 (4), 649-666 (1995).

Ja testa materiāli aptver plašu analizējamo vielu koncentrācijas diapazonu, tad laboratorijai jānosaka precizitātes un daudzuma attiecība. Ja precizitāte ir proporcionāla daudzumam, tad turpmākai kontrolei būtu jābalstās uz relatīvu precizitāti (t.i., absolūto starpību procentos no vidējā aritmētiskā lieluma).

Analīžu sistēmas uzticamības zudums norāda, ka noticis kaut kas no turpmāk uzskaitītā:

- A. kārtējais noteiktais rezultāta lielums grafikā ir ārpus rīcības robežām,
- B. kārtējais noteiktais lielums un iepriekšējais noteiktais lielums ir ārpus brīdinājuma robežām, tomēr iekšpus rīcības robežām,
- C. ja izmanto kontroles materiālu, tad viduslīnijas vienā pusē atrodas deviņi secīgi lielumi.

Laboratorijai būtu jāreaģē uz analīžu sistēmas uzticamības zudumu:

- A. pārtraucot analīžu veikšanu, līdz tiek veikti diagnosticējoši testi un pasākumi stāvokļa izlabošanai, un
- B. noraidot attiecīgās sērijas rezultātus un veicot atkārtotu testa materiālu analīzi.

b) Procedūra iekšējās kontroles materiālu atlasei un "iekšējo" precizitātes robežu noteikšanai (ķīmiskās analīzes)

Datus par laboratorijas iekšējo precizitāti var iegūt, veicot kontroles materiālu atkārtotas analīzes un/vai atkārtotas testa paraugu analīzes.

Laboratorijām būtu jāievēro šāda procedūra, lai noteiktu precizitātes parametru sērijas un starpsēriju variācijām turpmākam izmantojumam, sastādot kontroles diagrammas. Laboratorijas var pieņemt alternatīvu procedūru ar noteikumu, ka tās var atbilstīgi pierādīt, ka iespējams iegūt uzticamus precizitātes datus.

1. Kontroles materiālu atlase

Ja laboratorijai ir pieņemami izmantot kontroles materiālu, tad vispirms jāsavāc dati, lai noteiktu robežas. Ja iespējams, būtu jāizmanto apstiprināti references materiāli (ASM). Iespējamie kontroles materiāli būtu jāanalizē vienā analīžu sērijā ar atkārtojamības nosacījumiem, ietverot piemērotus ASM ar replikāciju un randomizāciju. Ja šī pieeja nav iespējama, tad laboratorijām būtu jāmeklē iespēja piedalīties kvalifikācijas testos un noteikt standartlielumus (piešķirtos lielumus), ko var uzskatīt par patiesu standartlielumu ar lielām novirzēm. Patieso lielumu piešķiršanu ar formulas izteiksmi un krājumos esošo kontroles materiālu izmantojumu ietver citas procedūras.

Turklāt, ja laboratorija regulāri veic šādas analīzes un ir jau izveidojusi statistisko kontroli, tad visiem jaunajiem kontroles materiāliem (piemēram, kad krājumi ir izsīkuši) jābūt iegūtiem pret analīzēm, ko, izmantojot esošos materiālus, veic saistībā ar kontroli.

2. Robežu piešķiršana

Kad ir atlasīts kontroles materiāls, laboratorijai tas būtu jāizmanto, lai noteiktu analīžu sēriju un starpsēriju precizitāti skaitļos.

Obligāta prasība, lai noteiktu starpsēriju precizitāti, ir tāda, ka kontroles materiāls būtu jāanalizē atkārtoti 12 gadījumos. Atkārtotas analīzes jāveic ar atkārtojamības nosacījumiem, t.i., to veic tas pats laborants, izmanto tos pašus reaģentus utt. Analīžu sērijā jāveic kontroles materiāla atkārtoto analīžu randomizācija. Katra atkārtotā analīze būtu jāveic atsevišķā dienā laika posmā tā, lai atspoguļotu pieņemamas atšķirības starp sērijām, ņemot vērā parastās atšķirības, piemēram, reaģentus, instrumentu atkārtotu kalibrēšanu un vajadzības gadījumā dažādus analītiķus.

Piezīme: Ja izmantos datus, kas attiecībā uz atšķirībām starp sērijām nav pilnībā reprezentatīvi, var notikt nevajadzīga analīžu replikācija, jo ir noteiktas pārāk tuvas robežas. Pretēji tam - ja laboratorija piedāvā precizitātes datus, kas ir pārāk neprecīzi, tad iespējams, ka tā nespēs ievērot noteiktās robežas references metodēs un salīdzinājumā ar līdzīgām laboratorijām tās sniegums būs vājš, un tā nesniegs datus, kas ir noderīgi paredzētajam mērķim.

2.1. Precizitātes noteikšana analīžu sērijā

2.1.1. Analīžu sērijas precizitāte, ja ir pieejams kontroles materiāls

Attiecībā uz atkārtotiem datiem (vismaz 12 atkārtojumu) vispirms veic Kohrana [Cochran] maksimālās dispersijas testu. Tas ietver dubultanalīžu maksimumu kvadrātu salīdzināšanu ar intervāla kvadrātu summu.

$$c = \frac{d^2_{\max}}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

kur

d_i = atšķirība starp atkārtojumiem.

Kohrana kritērija lielumu C salīdzina ar tabulā norādītajiem lielumiem (ISO 5725 (1994)). Ja lielumu var klasificēt kā novirzi vai izteiktu novirzi, tad rezultāts būtu jāiesniedz izpētei, lai gūtu izskaidrojumu, piemēram, tehniska kļūme, kļūda aprēķinos, kļūme, veicot testu, nepareiza parauga analīze. Ja tehniskās kļūmes izskaidrojums ir tāds, ka izrādās neiespējami aizstāt apšaubāmo rezultātu, tas jāatmet kā pilnīga novirze. Ja kādu novirzi vai izteiktu novirzi nevar izskaidrot, tad novirzi saglabā kā pareizu, bet statistiskās izteiktās novirzes atmet. Laboratorijai būtu jācenšas iegūt aizstājējlielumus.

Ja laboratorija ir nodrošinājusi, ka iegūtajos datos nav noviržu, tad sērijas standartnovirzi s_w iegūst šādi:

katram atkārtoto p datu pārim x_{i1} , x_{i2} , atkārtojumu summu

$$s_i = x_{i1} + x_{i2}$$

un atkārtojumu starpību

$$d_i = x_{i2} - x_{i1}$$

aprēķina un summē:

$$A = \sum_{i=1}^p s_i$$

$$B = \sum_{i=1}^p d_i^2$$

$$C = \sum_{i=1}^p s_i^2$$

Sērijas standartnovirzes vērtējums ir

$$s_w = \sqrt{\frac{B}{2p}}$$

Iekšējā precizitātes robeža ir $2,8 s_w$.

Ja izmanto references metodi, tad iekšējā precizitātes robeža jāsalīdzina ar publicēto atkārtojamības robežu. Laboratorijai būtu jāievēro references metodes prasība. Neatbilstība šai prasībai jāizmeklē.

Noteiktās robežas būtu jāuzskata par provizoriskām un var tikt pārskatītas.

2.1.2. Analīžu sērijas precizitāte, ja nav pieejams kontroles materiāls

Laboratorija var izvēlēties noteikt iekšējās precizitātes robežu ar reprezentatīvu testa paraugu atkārtotām analīzēm (vismaz 12 atkārtotas analīzes). Gadījumos, kad nav iespējams izmantot kontroles materiālus, piemēram, nestabilitātes dēļ, ar šo metodi jāuzkrāj atkārtoti dati.

Piezīme: Pieņem, ka analīzes aptver relatīvi šauru lielumu diapazonu un tādēļ vienu lielumu var attiecināt uz visiem paraugiem. Gadījumos, kas rezultātu diapazons ir plašāks, piemēram, pārsniedz paredzēto lielumu, un precizitāte ir atkarīga no daudzuma, laboratorijām būtu jāizpēta relatīvo standartnoviržu izmantojums.

Attiecībā uz datiem būtu jāveic Kohrana tests tāpat, kā noteikts 2.1.1. iedaļā. Ja laboratorija ir droša par to, ka datos nav noviržu, tad sērijas standartnovirzi un iekšējo precizitātes robežu var iegūt tāpat, kā noteikts 2.1.1. iedaļā.

Iekšējo sērijas standartnovirzi s_w var izmantot, lai konstruētu kontroles diagrammas (skat. II pielikumu). Noteiktās robežas būt jāuzskata par provizoriskām un var tikt pārskatītas.

2.2. Sērijas iekšējās precizitātes noteikšana

Aprēķina vidējo lielumu ($s_1/2$) katram pārim un veic tiem Grabsa testu (ISO 5725 (1994)). Noviržu vai izteiktu noviržu noraidīšanas/pienēmšanas kritēriji ir aprakstīti 2.1.1. iedaļā. Laboratorijai būtu jācenšas iegūt aizstājošu lielumu katram noraidītajam rezultātam. Ja laboratorija ir pārliecināta, ka iegūtajos datos nav noviržu, tad aprēķina starpsēriju standartnovirzi s_b .

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{4(p-1)} \left(C - \frac{p-1}{p} B - \frac{A^2}{p} \right)}$$

vai 0, ja izteiksme zem kvadrātsaknes ir negatīva.

Kopējo standartnovirzi s_t izmanto, lai konstruētu kontroles diagrammas n vidējā aritmētiskā lieluma noteikšanai (skat. II pielikumu). Noteiktās robežas būtu jāuzskata par provizoriskām un var tikt pārskatītas.

3. Sākotnējo robežu pārskatīšana

Kontroles robežas, kas noteiktas, kā aprakstīts iepriekš, jāuzskata par sākotnējām aplēsēm.

Lai atjauninātu robežas, kas noteiktas, balstoties uz pieņemamu sērijas iekšējo precizitāti (2.1.2. iedaļa), jāsavāc turpmāki atkārtoti testa paraugu dati. Starplaiks līdz pārskatīšanai būs atkarīgs no analīžu biežuma. Kā noteikts, dati jāpārskata pēc tam, kad iegūti turpmākie 10 atkārtojumi. Tad attiecībā uz visiem datiem jāveic Kohrana tests un atkal jānosaka robežas, pamatojoties uz jauno standartnovirzes aprēķinu. Turpmākus lēmumus par kontroles robežu derīgumu pieņem, ņemot vērā papildu datus.

Sākotnējo starpsēriju precizitātei iegūto datu pārskatīšana arī atkarīga no analīžu veikšanas biežuma. Kā noteikts, pēc tam, kad no kontroles materiāla analīzēm iegūti desmit papildu datu punkti, ar biežumu viena analīze uz partiju būtu jāpārskata sākotnējie pieņēmumi, ko uzskata par standartnovirzi, un vidējais lielums.

Attiecībā uz visiem datiem būtu jāveic Grabsa tests, lai konstatētu izteiktas novirzes. Vidējā un standartnovirze būtu jāpārreķina, pamatojoties uz jaunajiem datiem.

Turklāt šajā posmā laboratorijai būtu jāizmanto kumulatīvās summas diagramma (BS S700: (1984) un grozījumi 5480 (1987)), lai izpētītu visas problēmas, kas var būt saistītas, piemēram, ar reaģentu novecošanu. Jāizpēta jebkurš atsevišķs rezultāts, kas ir ārpus kumulētās summas "V-maskas" robežām.

Jaunajām robežām (vidējā un standartnovirze) jāveic regulāras pārbaudes ar kumulētās summas metodi. Visas norādes par to, ka kontroles materiāla derīgums ir apšaubāms, ir rūpīgi izmeklējamas.

4. Precizitātes datu paziņošana

Laboratorijām jānosūta valsts kompetentajai iestādei šāda informācija:

- izmantotā metode,
- sērijas iekšējā standartnovirze s_w un iekšējā precizitātes robeža,
- starpsēriju standartnovirze s_b ,
- kopējā standartnovirze s_t ,
- ar precizitātes datu iegūšanu saistīto analīžu skaits.

VI PIELIKUMS

(6. pants)

VĒRTĒTĀJU NOVĒRTĒŠANA UN SENSORO ANALĪŽU REZULTĀTU UZTICAMĪBA

Ja izmanto punktu piešķiršanas metodes (*IDF Standard 99C/1997*), tad piemērojama šāda procedūra.

a) "Atkārtojamības indeksa" noteikšana

Eksperts 12 mēnešu laikā analizē vismaz desmit paraugus kā aklos dubultparaugus. Parasti tas notiks vairākās sesijās. Atsevišķa produkta īpašību rezultātus novērtē, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

w_1 : atkārtojamības indekss,

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

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

n : paraugu skaits.

Vērtējamajiem paraugiem būtu jāatspoguļo plašs kvalitātes diapazons. Lielumam w_1 nevajadzētu pārsniegt 1,5 (5 punktu skalā).

b) "Novirzes indeksa" noteikšana

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

Lai novērtētu rezultātus, izmanto šādu formulu:

$$D_1 = 1 + \frac{\sum [(x_{i1} - \bar{x}_{i1})^2 + (x_{i2} - \bar{x}_{i2})^2]}{2n}$$

kur:

x_{i1} ; x_{i2} : skat. a) iedaļu,

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

n : paraugu skaits (vismaz desmit 12 mēnešos).

Vērtējamajiem paraugiem būtu jāatspoguļo plašs kvalitātes diapazons. D_1 nedrīkst pārsniegt 1,5 (5 punktu skalā).

Dalībvalstīm jāpaziņo visas grūtības, kas radušās, piemērojot šo procedūru.

c) Dažādos dalībvalsts reģionos un dažādās dalībvalstīs iegūto rezultātu salīdzināšana

Ja iespējams, tests jāorganizē vismaz vienreiz gadā, lai salīdzinātu rezultātus, ko vērtētāji ieguvuši dažādos reģionos. Ja novērotas ievērojamas atšķirības, tad būtu jāveic pasākumi, kas vajadzīgi, lai noteiktu atšķirību iemeslus un iegūtu salīdzināmus rezultātus.

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

Dalībvalstīm šādas salīdzināšanas rezultāti būtu jāziņo Komisijai.

VII PIELIKUMS

(6. pants)

SVIESTA SENSORĀ VĒRTĒŠANA

1. Joma

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

2. Definīcijas

Sensorā vērtēšana (novērtēšana) nozīmē produktu īpašību pārbaudi ar maņu orgāniem.

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

Punktu piešķiršana nozīmē sensoro vērtēšanu, ko veic vērtētāju grupa, izmantojot skaitļu skalu. Jāizmanto defektu nomenklatūra.

Ranžēšana nozīmē klasificēšanu pēc kvalitātes, ko veic, balstoties uz piešķirtajiem punktiem.

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

3. Vērtēšanas telpa

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

3.2. Vērtēšanas telpai jābūt bez svešas izcelsmes aromātiem un viegli tīrāmai. Sienām jābūt gaišā krāsā.

3.3. Vērtēšanas telpai un apgaismojumam tajā jābūt tādām, lai neietekmētu vērtējamā produkta īpašības. Telpai jābūt aprīkotai ar atbilstīgu temperatūras kontroles iekārtu.

4. Vērtētāju atlase

Vērtējam jāpazīst sviesta produkti, un viņam jābūt kompetentam sensorās ranžēšanas veikšanā. Kompetentajai iestādei būtu regulāri (vismaz reizi gadā) jānovērtē viņa kompetence.

5. Prasības attiecībā uz vērtētāju grupu

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

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

- personas nedrīkst būt slimas ar slimībām, kas var ietekmēt to uzdevuma veikšanu. Tādos gadījumos attiecīgais vērtētājs vērtētāju grupā jāaizstāj ar citu,
- lai veiktu novērtēšanu, personām jāierodas laikus un jābūt pārliecinātām, ka viņām ir pietiekami daudz laika vērtēšanai,
- personas nedrīkst lietot vielas, kam ir stipra smarža, piemēram, parfimus, pēckūšanās losjonus, dezodorantus utt., un tām nevajadzētu būt ēdušām ēdienus ar stipru garšu (piemēram, ļoti vircotus) utt.,
- pusstundu pirms novērtēšanas personas nedrīkst smēķēt, ēst un nedrīkst neko dzert, izņemot ūdeni.

6. Katras īpašības novērtēšana

6.1. Sensorā vērtēšana jāveic attiecībā uz šādām trim īpašībām: izskats; konsistence; garša/smarža.

Izskats ietver šādas īpašības: krāsa, redzamā tīrība, pelējums un ūdens dispersija. Ūdens dispersiju analizē saskaņā ar IDF standartu 112A/1989.

Konsistence ietver šādas īpašības: viendabīgums un ziežamība.

Sviesta konsistences vērtēšanai var izmantot fizikālās metodes. Komisija paredz šīs metodes nākotnē saskaņot.

Garša/smarža ietver šādas īpašības: garša un smarža.

Nozīmīga novirze no ieteicamās temperatūras neļauj ticami novērtēt konsistenci un garšu/smaržu. Sevišķi svarīga ir temperatūra.

- 6.2. Katra īpašība atsevišķi sensori jānovērtē. Punktu piešķiršanu veic saskaņā ar 1. tabulu.
- 6.3. Pirms vērtēšanas ir vēlams, lai vērtētāji kopā piešķirtu punktus par izskatu, konsistenci un garšu/smaržu vienam vai vairākiem references paraugiem, lai panāktu vienādību.
- 6.4. Punktu skaits produkta pieņemšanai ir šāds:

		maksimālais skaits
	vajadzīgais skaits	
izskats	5	4
konsistence	5	4
garša/smarža	5	4

Ja nav iegūts vajadzīgais punktu skaits, jāsniedz defekta apraksts. Punktu skaits, ko katrs vērtētājs piešķir par katru īpašību, jāieraksta kontroles dokumentā. Produktu pieņem vai noraida, pamatojoties uz vairākuma lēmumu. Gadījumiem, kad atšķirības starp individuāliem katras īpašības vērtējumiem pārsniedz blakusesošos punktus, nevajadzētu būt biežiem (ne vairāk kā vienreiz uz 20 paraugiem). Pretējā gadījumā grupas vadītājam būtu jāpārbauda vērtētāju grupas kompetence.

7. Uzraudzība

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

8. Paraugu ņemšana un paraugu sagatavošana

- 8.1. — Vēlams, lai paraugu identitāte novērtēšanas laikā tiktu turēta noslēpumā nolūkā novērst jebkādu ietekmēšanas iespējamību.
- To vajadzētu organizēt vērtētāju grupas vadītājam pirms vērtēšanas un bez pārējo vērtētāju grupas locekļu klātbūtnes.
- 8.2. Ja sensoro vērtēšanu veic saldētavā, paraugu ņem, izmantojot sviesta taustu. Ja sensoro vērtēšanu veic vietā, kas nav saldētava, tad būtu jāņem vismaz 500 g liels paraugs.
- 8.3. Vērtēšanas laikā sviesta temperatūrai vajadzētu būt 10 līdz 12°C. Noteikti būtu jānovērš lielas novirzes.

9. Nomenklatūra

Atsaucas uz pievienoto 2. tabulu.

1. tabula. Punktu piešķiršana sviestam

izskats			konsistence			garša un smarža		
punkti	nr. (1)	piezīmes	Punkti (kvalitātes šķira)	nr. (1)	piezīmes	Punkti (kvalitātes šķira)	nr. (1)	piezīmes
5		ļoti labs ideāls augstākā kvalitāte (vienmērīgi sauss)	5		ļoti laba ideāls augstākā kvalitāte (labi ziežams)	5		ļoti laba ideāls augstākā kvalitāte (absolūti tīrs lielisks aromāts)
4		labs (2) nav izteiktu defektu	4	17 18	laba (2) ciets miksts	4		laba (2) nav izteiktu defektu
3	1 2 3 4 5 6 7 8	vidējs (nelieli defekti) ūdeņains nav viendabīgs, divkrāsains slāņains raibs, lāsumains plankumains izdalās eļļapārāk krāsotsirdens	3	14 15 16 17 18	vidēja (nelieli defekti) drupans, viegli lūstošs, trausls staiņpīgs, miklveidīgs, eļļains lipīgs ciets miksts	3	21 22 25 27 33 34 35	vidēja (nelieli defekti) neizteikta garša/smarža svešas izcelsmes garša/ smarža skābs kulinārās apstrādes piegarša, piedeguma piegarša lopbarības piegarša nepatīkama garša/smarža, rūgts pārsālīts
2	1 3 4 5 6 10 11 12	slikts (izteikti defekti) ūdeņains slāņains raibs, lāsumains plankumains izdalās eļļa ar ar neizšķīdušu sāli	2	14 15 16 17 18	slikta (izteikti defekti) drupans, viegli lūstošs, trausls staiņpīgs, miklveidīgs, eļļains lipīgs ciets miksts	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	slikta (izteikti defekti) neizteikta svešas izcelsmes garša/ smarža sastāvējies skābs oksidēšanās piegarša, metā- liska piegarša lopbarības piegarša nepatīkama garša/smarža, rūgts pārsālīts appelējis, smakojošs ķīmikāliju piegarša
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	ļoti slikts (ļoti izteikti defekti) ūdeņains slāņains raibs, lāsumains plankumains izdalās eļļa pārāk krāsots granulēts ar piemaisījumiem ar neizšķīdušu sāli	1	14 15 16 17 18	ļoti slikta (ļoti izteikti defekti) drupans, viegli lūstošs, trausls staiņpīgs, miklveidīgs, eļļains lipīgs ciets miksts	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	ļoti slikta (ļoti izteikti defekti) svešas izcelsmes garša/ smarža siera piegarša, pienskābā siera piegarša skābs rauga piegarša pelējuma piegarša sasmacis eļļas piegarša, zivju piegarša tauku piegarša oksidēšanās piegarša, metā- liska piegarša nepatīkama garša/smarža, rūgts appelējis, smakojošs iesala piegarša Ķīmikāliju piegarša

(1) 2. tabula

(2) defekti, kas minēti pie vērtējumi "labs", ir tikai ļoti nelielas novirzes no ideāla

2. tabula. Sviesta defektu tabula**I. Izskats**

1. ūdeņains;
2. neviendabīgs, divkrāsains;
3. slāņains;
4. raibs, lāsumains;
5. plankumains;
6. izdalās eļļa;
7. pārāk krāsots;
8. irdens;
9. graudains;
10. ar piemaisījumiem;
11. pelējis;
12. ar neizšķīdušu sāli.

II. Konsistence

14. drupans, trausls;
15. stāipīgs, mīklveidīgs, eļļains;
16. lipīgs;
17. ciets;
18. mīksts.

III. Garša/smarža, aromāts

20. bez garšas/smaržas;
21. neizteikta garša/smarža (!);
22. svešas izcelsmes garša/smarža;
23. sastāvējies;
24. siera piegarša, pienskābā siera piegarša;
25. skābs;
26. rauga piegarša;
27. a) kulinārās apstrādes piegarša,
b) piedeguma piegarša;
28. pelējuma piegarša;
29. sasmacis;
30. eļļas piegarša, zivju piegarša;
31. tauku piegarša;
32. a) oksidēšanās piegarša,
b) metāliska piegarša;
33. lopbarības piegarša;
34. nepatīkama garša smarža, rūgts;
35. pārsālīts;
36. appelējis, smakojošs;
37. iesala;
38. ķīmikāliju piegarša.

(!) Šis apzīmējums jāizmanto, cik reti vien iespējams un tikai tad, ja defektu nevar aprakstīt precīzāk

VIII PIELIKUMS

(7. pants)

ANALĪŽU REZULTĀTU APSTRĪDĒŠANAS GADĪJUMĀ PIEMĒROJAMĀ PROCEDŪRA (ķīmiskās analīzes)

1. Turpmākas analīzes var veikt pēc attiecīgā uzņēmēja pieprasījuma septiņu darba dienu laikā pēc pirmo analīžu rezultātu paziņošanas ar noteikumu, ka pieejami aizzīmogoti produkta paraugu dublikāti un tos attiecīgi uzglabājušas kompetentās iestādes.
2. Kompetentā iestāde nosūta tos otrai laboratorijai pēc uzņēmēja lūguma un uz viņa rēķina. Otrai laboratorijai jābūt atļaujai veikt oficiālas analīzes, un tās kompetencei attiecībā uz minētajām analīzēm jābūt apstiprinātai. Par kompetenci būtu vajadzīgs dokumentārs apliecinājums, t.i., apliecinājums par veiksmīgu piedalīšanos starplaboratoriju kopīgos pētījumos, kvalifikācijas testos vai starplaboratoriju salīdzinājumos. Otrajai laboratorijai jāizmanto references metode. Divu minēto laboratoriju iegūtie rezultāti jāvērtē šādi.

a) *Ja abas laboratorijas ievēro atkārtojamības prasību un sakritības prasību,*

tad abu laboratoriju iegūto testa rezultātu vidējo aritmētisko lielumu paziņo kā galarezultātu. Šo galarezultātu novērtē, ņemot vērā kritisko starpību un izmantojot šādu formulu:

$$\text{CrD}_{95}(|\bar{y} - m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

kur

\bar{y} : visu to rezultātu vidējais aritmētiskais lielums, kurus ieguvušas abas laboratorijas,

m_0 : robeža,

R: sakritība,

r: atkārtojamība,

n_1 : 1. laboratorijā iegūto rezultātu skaits,

n_2 : 2. laboratorijā iegūto rezultātu skaits.

Piezīme: Ja galarezultātu aprēķina, izmantojot formulu

$$x = y_1 \pm y_2 \text{ vai } x = y_1/y_2$$

(skat. attiecīgi IV pielikuma 3. un 4. iedaļu), tad R^2_x un r^2_x jāieliek formulā R^2 un r^2 vietā.

b) *Ja abas laboratorijas ievēro atkārtojamības prasību, tomēr neievēro sakritības prasību,*

gadījumā, kad otrās analīzes apstiprina pirmās, tad analizētais daudzums būtu jānoraida kā neatbilstīgs. Pretējā gadījumā daudzums jāpieņem.

c) *Ja tikai viena laboratorija ievēro atkārtojamības prasību,*

tad, lai izlemtu, vai pieņemt analizēto daudzumu, jāizmanto tās laboratorijas iegūtais galarezultāts, kura ievēro atkārtojamības prasību.

d) *Ja neviena laboratorija neievēro atkārtojamības prasību, tomēr ir ievērota sakritības prasība,*

tad piemēro a) iedaļu.

e) *Ja neviena laboratorija neievēro ne atkārtojamības prasību, ne sakritības prasību,*

tad analizētos daudzumus būtu jāpieņem, ja vienas laboratorijas iegūtie rezultāti ļauj izdarīt šādu secinājumu.

f) *Ja rezultāti ir iegūti ar neapstiprinātām metodēm,*

tad analizētos daudzumus būtu jāpieņem, ja vienas laboratorijas iegūtie rezultāti ļauj izdarīt šādu secinājumu.

3. Kompetentajai iestādei, tiklīdz iespējams, otrās analīzes rezultāti jāpaziņo uzņēmējam. Ja analizējamo daudzumu noraida, tad otrās analīzes izmaksas jāsedz uzņēmējam.
4. Ja piecu darba dienu laikā pēc paraugu ņemšanas uzņēmējs var pierādīt, ka paraugu ņemšana nav veikta pareizi, tad – ja vien iespējams – paraugu ņemšana jāatkārto. Ja paraugu ņemšanu nevar atkārtot, tad analizējamais daudzums jāpieņem.

IX PIELIKUMS

(8. pants)

ŪDENS SATURA NOTEIKŠANA SVIESTĀ

1. Piemērošanas joma un nozare

Ar šo references metodi nosaka metodi ūdens satura noteikšanai sviestā.

2. Atsauce

IDF standarts 50 C: 1995 – Piens un piena produkti – Paraugu ņemšanas metodes.

3. Definīcija

Ūdens saturs sviestā: masas zudums pēc minētajā standartā noteiktā karsēšanas procesa. To izsaka gramos uz 100 gramiem.

4. Princips

Ūdens iztvaicēšana no testa porcijas pumeka klātbūtnē 102°C temperatūrā žāvēšanas skapī.

5. Aparatūra un materiāli

Parastā laboratorijas aparatūra, un jo īpaši šāda:

- 5.1. Analītiskie svāri ar jutību 1 mg.
- 5.2. Eksikators, kurā ir mitrumu efektīvi uzsūcoša viela (piemēram, svaigi žāvēts silikagels ar higroskopisku indikatoru).
- 5.3. Ventilējams ar termostatu regulējams žāvēšanas skapis, kas darbojas 102 ± 2°C temperatūrā visā kopējā darba telpā.
- 5.4. Stikla, porcelāna vai nerūsējoša metāla šķīvji, kuru augstums 20 mm, diametrs 60 līdz 80 mm.
- 5.5. Granulēts, mazgāts pumeks ar 0,8-10 mm diametru.

6. Paraugu ņemšana

Skat. IDF 50 C: 1995

7. Procedūra**7.1. Testa parauga sagatavošana**

Laboratorijas paraugu noslēgtā stikla vai piemērotā plastmasas traukā, kam vajadzētu būt līdz pusei vai divām trešdaļām pilnam, uzsilda līdz temperatūrai, kurā paraugs būs pietiekami mīksts, lai atvieglotu tā pilnīgu sajaukšanu līdz viendabīgam stāvoklim (vai nu ar mehānisko kratītāju, vai ar roku). Maisīšanas temperatūrai parasti nevajadzētu pārsniegt 35°C. Paraugu atdzesē līdz telpas temperatūrai. Tiklīdz iespējams, pēc atdzesēšanas atver parauga trauku un pirms svēršanas ātri samaisa (ne ilgāk kā 10 sekundes) ar piemērotu rīku, piemēram, karoti vai lāpstīņu.

7.2. Ūdens satura noteikšana

- 7.2.1. Šķīvī (5.4. iedaļa) ieliek apmēram 10 g pumeka.
- 7.2.2. Pumeku, kas ielikts šķīvī, vismaz vienu stundu žāvē žāvēšanas skapī (5.3. iedaļa) 102 ± 2°C temperatūrā.

Piezīme: žāvēšanas laiku, kas minēts 7.2.2., 7.2.5. un 7.2.7. iedaļā, sāk skaitīt tad, kad temperatūra žāvēšanas skapī sasniedz 102 ± 2 °C.

- 7.2.3. Ļauj šķīvī atdzist eksikatorā (5.2. iedaļā) līdz svaru telpas temperatūrai un nosver ar precizitāti līdz 1 mg.

- 7.2.4. Ar precizitāti līdz 1 mg šķīvi nosver apmēram 5 g testa parauga.
- 7.2.5. Ieliek šķīvi žāvēšanas skapī 102 ± 2 °C temperatūrā un atstāj uz trim stundām.
- 7.2.6. Ļauj šķīvim atdzist eksikatorā līdz svaru telpas temperatūrai un sver ar precizitāti līdz 1 mg.
- 7.2.7. Atkārti žāvēšanas procesu uz papildu laika posmiem līdz vienai stundai, atdzesē un katreiz nosver, kā noteikts 7.2.6. iedaļā, kamēr iegūta konstanta masa (masas izmaiņas nepārsniedz 1 mg).

Ja masa palielinājusies, aprēķiniem izmanto mazāko reģistrēto masu.

8. Rezultātu izteikšana

8.1. Aprēķina metode un formula

Aprēķina ūdens saturu W kā masas procentus, izmantojot šādu formulu:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

kur

m_0 ir šķīvja ar pumeku masa gramos (7.2.3. iedaļa),

m_1 ir testa porcijas, šķīvja un pumeka masa gramos pirms žāvēšanas (7.2.4. iedaļa),

m_2 ir testa porcijas, šķīvja un pumeka masa gramos pēc žāvēšanas (7.2.7. iedaļa).

Rezultātu izsaka līdz pirmajai zīmei aiz komata.

8.2. Atkārtojamība

Absolūtā starpība starp rezultātiem, kas iegūti, vienam un tam pašam laborantam vienos un tajos pašos apstākļos veicot divas noteikšanas vienlaicīgi vai uzreiz vienu pēc otras identiskiem testa materiāliem ar to pašu aparāturu, nepārsniedz 0,2 %.

8.3. Sakritība

Absolūtā starpība starp diviem atsevišķiem un neatkarīgiem rezultātiem, ko ieguvuši divi laboranti, kuri strādā dažādās laboratorijās ar identisku testa materiālu, nepārsniedz 0,3 %.

9. Testa ziņojums

Testa ziņojumā norāda izmantotās metodes un iegūtos rezultātus. Tajā norāda arī visus datus par darbu, kas nav norādīti minētajā starptautiskajā standartā vai tiek uzskatīti par neobligātiem, kā arī datus par visiem starpgadījumiem, kas varētu būt ietekmējuši rezultātus. Testa ziņojumā ietver visu informāciju, kas vajadzīga parauga pilnīgai identificēšanai.

X PIELIKUMS

(8. pants)

SVIESTS: BEZTAUKU SAUSNAS SATURA NOTEIKŠANA

1. **Piemērošanas joma un nozare**

Šajā standartā noteikta metode beztauku sausnas satura noteikšanai sviestā.

2. **Atsauces**

IDF standarts 50 C: 1995 – Piens un piena produkti – Paraugu ņemšanas metodes.

3. **Definīcijas**

Beztauku sausnas saturs sviestā: vielu masas procenti, kā noteikts norādītajā procedūrā. To izsaka gramos uz 100 gramiem.

4. **Princips**

Ūdens iztvaicēšana no zināmas masas sviesta, tauku ekstrahēšana ar petrolēteri un atlikuma nosvēršana.

5. **Reaģents**

Petrolēteris ar vārīšanās intervālu starp 30 un 60 °C. Reaģents neatstāj vairāk kā 1 mg atlikuma pēc 100 ml iztvaicēšanas.

6. **Aparatūra un materiāli**

6.1. Analītiskie svāri ar jutību 1 mg.

6.2. Eksikators, kurā ir mitrumu efektīvi uzsūcoša viela (piemēram, svaigi žāvēts silikagels ar higroskopisku indikatoru).

6.3. Ventilējams, ar termostatu regulējams žāvēšanas skapis, kas darbojas 102 ± 2 °C temperatūrā visā kopējā darba telpā.

6.4. Stikla, porcelāna vai nerūsējoša metāla šķīvji, kuru teknes augstums ir apmēram 20 mm, diametrs 60 līdz 80 mm, ar stikla stienīti maisīšanai.

6.5. Keramiskā stikla filtrtūģelis, kā poras diametrs ir 16 līdz 40 μm, ar sūcējkolbu.

7. **Paraugu ņemšana**

Skat. IDF standartu 50 C: 1995.

8. **Procedūra**8.1. *Testa parauga sagatavošana*

Laboratorijas paraugu noslēgtā stikla vai piemērotā plastmasas traukā, kam vajadzētu būt līdz pusei vai divām trešdaļām pilnam, uzsilda līdz temperatūrai, kurā paraugs būs pietiekami miksts, lai atvieglotu tā pilnīgu sajaukšanu līdz viendabīgam stāvoklim (vai nu ar mehānisko kratītāju, vai ar roku). Maisīšanas temperatūrai parasti nevajadzētu pārsniegt 35 °C. Paraugu atdzesē līdz telpas temperatūrai. Tiklīdz iespējams, pēc atdzesēšanas atver parauga trauku un pirms svēršanas ātri samaisa (ne ilgāk kā 10 sekundes) ar piemērotu rīku, piemēram, karoti vai lāpstiņu.

8.2. *Noteikšana*

8.2.1. Šķīvi ar stienīti (6.4. iedaļa) un tūģeli (6.5. iedaļa) vienu stundu žāvē žāvēšanas skapī (6.3. iedaļa). Ļauj šiem priekšmetiem atdzist eksikatorā un kopā tos nosver (t.i., šķīvi, stienīti un tūģeli) ar precizitāti līdz 1 mg (m_0).

Piezīmes: — Parasti ir pietiekami, ja atdzesēšanas laiks ir 45 minūtes.

— Ir svarīgi, lai to pašu šķīvja, stienīša un tūģeļa komplektu izmantotu visām testa porcijām, ja no partijas analizē vairāk nekā vienu testa porciju.

8.2.2. Noņem tūģeli, pieraksta šķīvja un stienīša kopējo svaru ar precizitāti līdz 1 mg (m_1).

8.2.3. Ar precizitāti līdz 1 mg šķīvī iesver apmēram 5 g testa parauga (8.1. iedaļa) (m_2).

- 8.2.4. Ieliek šķīvi (kurā ir stienītis un sviests) žāvēšanas skapī 102 ± 2 °C temperatūrā un atstāj pa nakti.
- 8.2.5. Ļauj šķīvim (8.2.3. iedaļa) atdzist līdz istabas temperatūrai.
- 8.2.6. Šķīvi ielej 15 ml silta (apmēram 25° C) petrolētera un, cik iespējams, ar stikla stienīti atdala pie šķīvja pielipušās nogulsnes. Pārnes šķīdinātāju tīģeli un ļauj tam filtrēties sūcējkolbā.
- 8.2.7. Darbību, kas minēta 8.2.6. iedaļā veic vēl četras reizes. Ja uz šķīvja virsmas nav tauku pēdu, tad ceturtais mazgāšanas laikā pēc iespējas visas nogulsnes pārnes tīģelī. Citādi atkārto 8.2.6. iedaļā minēto darbību, līdz tauku pēdas ir pilnīgi likvidētas.
- 8.2.8. Nogulsnes tīģelī nomazgā ar 25 ml silta petrolētera.
- 8.2.9. Šķīvi, stikla stienīti un tīģeli 30 minūtes kopā žāvē žāvēšanas skapī 102 ± 2 °C temperatūrā.
- 8.2.10. Ļauj atdzist eksikatorā līdz istabas temperatūrai un nosver ar precizitāti līdz 1 mg.
- 8.2.11. Atkārto 8.2.9. un 8.2.10. iedaļā minētās darbības, līdz iegūst konstantu šķīvja, stienīša un tīģeļa kopējo masu (masas izmaiņas nepārsniedz 1 mg) (m_3).

9. Rezultātu izteikšana

9.1. Beztauku sausnas satūra aprēķināšana

Aprēķina beztauku sausnas saturu BS kā masas procentus, izmantojot šādu formulu:

$$\text{SNF} = \frac{m_3 - m_0}{m_2 - m_1} \times 100$$

kur

m_0 ir tukša šķīvja, stikla stienīša un tīģeļa (8.2.1. iedaļa) kopējā masa gramos,

m_1 ir tukša šķīvja un stikla stienīša kopējā masa gramos (8.2.2. iedaļa),

m_2 ir testa porcijas, šķīvja un stikla stienīša kopējā masa gramos (8.2.3. iedaļa),

m_3 ir šķīvja, stikla stienīša un tīģeļa ar nogulsnēm kopējā masa beigās gramos (8.2.11. iedaļa).

Rezultātu izsaka līdz pirmajai zīmei aiz komata.

9.2. Atkārtojamība

Absolūtā starpība starp rezultātiem, kas iegūti, vienam un tam pašam laborantam vienos un tajos pašos apstākļos veicot divas noteikšanas vienlaicīgi vai uzreiz vienu pēc otras identiskiem testa materiāliem ar to pašu aparāturu, nepārsniedz 0,1 %.

9.3. Sakritība

Absolūtā starpība starp diviem atsevišķiem un neatkarīgiem rezultātiem, ko ieguvuši divi laboranti, kuri strādā dažādās laboratorijās ar identisku testa materiālu, nepārsniedz 0,2 %.

10. Testa ziņojums

Testa ziņojumā norāda izmantotās metodes un iegūtos rezultātus. Tur norāda arī visus datus par darbu, kas nav norādīti šajā starptautiskajā standartā vai tiek uzskatīti par neobligātiem, kā arī datus par visiem starpgadījumiem, kas var būt ietekmējuši rezultātus. Testa ziņojumā ietver visu informāciju, kas vajadzīga parauga pilnīgai identificēšanai.

Piezīme:

Ja analīzes veic sālītam sviestam, pievienoto sāli nosaka kā beztauku sausnu. Lai noteiktu piena beztauku sausnas saturu, pievienotā sāls saturu atņem no beztauku sausnas satūra. Aprēķinātie precizitātes parametri piena beztauku sausnas satūra noteikšanai ir:

Atkārtojamība: $r = 0,104\%$

Sakritība: $R = 0,206\%$.

Var nolemt, ka precizitātes parametri, kas iegūti beztauku sausnas noteikšanai, ir derīgi, lai noteiktu piena beztauku sausnas saturu.

XI PIELIKUMS

(8. pants)

SVIESTA TAUKU SATURA NOTEIKŠANA

Tauku saturu iegūst netieši, nosakot ūdens saturu un beztauku sausnas saturu attiecīgi saskaņā ar IX pielikumu un X pielikumu. Tauku procents pēc masas ir vienāds ar

$$100 - (W + BS)$$

kur

W: ir ūdens procenti pēc masas,

BS: ir beztauku sausnas procenti pēc masas.

Aprēķinātie precizitātes parametri tauku satura noteikšanai ir

Atkārtojamība: $r = 0,22 \%$

Sakritība: $R = 0,36 \%$

XII PIELIKUMS

(9. pants)

VANILĪNA SATURA NOTEIKŠANA IEBIEZINĀTĀ SVIESTĀ, SVIESTĀ VAI KRĒJUMĀ AR AUGSTAS IZŠKIRTSPĒJAS ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJU

1. **Piemērošanas joma un nozare**

Ar šo metodi apraksta procedūru vanilīna daudzuma noteikšanai iebiezinātā sviestā, sviestā vai krējumā.

2. **Princips**

Zināma daudzuma parauga ekstrahēšana ar izopropanola/etanola/acetoni-trila maisījumu (1:1:2). Lielākās daļas tauku nogulsnešana ar atdzesēšanu starp - 15 °C un - 20 °C, pēc tam seko centrifugēšana.

Pēc atšķaidīšanas ar ūdeni veic vanilīna satura noteikšanu ar augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (HPLC).

3. **Aparatūra**

Parastā laboratorijas aparatūra, un jo īpaši šāda:

- 3.1. saldiejamaiss skapis, kas darbojas - 15°C līdz - 20°C temperatūras amplitūdā;
- 3.2. šļirces ar 2 ml ietilpību;
- 3.3. pret šķīdumu, kurš satur 5 % ekstrakcijas šķīduma (4.4. iedaļa) rezistenti membrānu mikrofiltri ar poras izmēru 0,45 µm;
- 3.4. šķidrums hromatogrāfijas sistēma, kas sastāv no sūkņa (plūsma 1,0 ml/min.), inžektora (ar automātisko vai manuālo iesmidzināšanu 20 µl), UV detektora (darbojas 306 nm, 0,01 AU pilna skala), pierakstošās iekārtas vai integratora un kolonnas termostata, kas darbojas 25°C temperatūrā;
- 3.5. analītiskā kolonna (250 mm x 4,6 mm ID) uzpildīta ar *LiChrospher RP 18* (Merck, 5 µm) vai līdzvērtīgu pildījumu;
- 3.6. priekškolonna (ca. 20 mm x 3 mm ID), kas sausi pildīta ar *Perisorb RP 18* (30 līdz 40 µm) vai līdzvērtīgu pildījumu.

4. **Reāģenti**

Visiem izmantotajiem reāģentiem jābūt ar atzītu analītisko kvalitāti.

- 4.1. Izopropanols.
- 4.2. Etanols, 96 % (V/V).
- 4.3. Acetonitrils.
- 4.4. Ekstrakcijas šķīdums.

Sajauc izopropanolu (4.1. iedaļa), etanolu (4.2. iedaļa) un acetoni-trilu (4.3. iedaļa) attiecībā 1:1:2 (V/V).

4.5. Vanilīns (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehīds).

4.5.1. Vanilīna izejas šķīdums (= 500 µg/ml).

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

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

Ar pipeti pārnes 5 ml vanilīna izejas šķīduma (4.5.1. iedaļa) mērkolbā ar 250 ml ietilpību un papildina ar ūdeni.

- 4.6. HPLC kvalitātes metanols.
- 4.7. Ledus etiķskābe.
- 4.8. HPLC kvalitātes ūdens.

4.9. HPLC kustīgā fāze.

Mērkolbā ar 1 000 ml ietilpību sajauc 300 ml metanola (4.6. iedaļa) ar apmēram 500 ml ūdens (4.8. iedaļa) un 20 ml etiķskābes (4.7. iedaļa) un papildina ar ūdeni (4.8. iedaļa). Filtrē ar 0,45 µm filtru (3.3. iedaļa).

5. Procedūra

5.1. Testa parauga sagatavošana

5.1.1. Sviests.

Karsē paraugu, līdz tas sāk kust. Izvairās no tā, ka paraugs vietām sakarstu virs 40°C. Kad paraugs kļuvis pietiekami plastisks, to homogenizē sakratot. Pirms parauga ņemšanas sviestu maisa 15 s. Mērkolbā ar 100 ml ietilpību ar precizitāti līdz 1 mg iesver apmēram 5 g (SM g) sviesta.

5.1.2. Iebiezināts sviests.

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

5.1.3. Krējums.

Karsē paraugu ūdens peldē vai inkubatorā 35 līdz 40 °C temperatūrā. Tākus vienmērīgi sadala skalinot vai vajadzības gadījumā samaisot. Paraugu ātri atdzesē līdz 20 ± 2 °C. Paraugam būtu jāizskatās viendabīgam, pretējā gadījumā procedūra būtu jāatkārto. Mērkolbā ar 100 ml ietilpību ar precizitāti līdz 1 mg iesver apmēram 10 g (SM g) krējuma.

5.2. Testa šķīduma sagatavošana

Testa porcijai (5.1.1., 5.1.2. vai 5.1.3. iedaļa) pievieno apmēram 75 ml ekstrakcijas šķīduma (4.4. iedaļa), maisa vai enerģiski krata apmēram 15 minūtes un papildina ar ekstrakcijas šķīdumu (4.4. iedaļa). Apmēram 10 ml šā ekstrakta pārnes testa mēģenē, kurai ir aizbāznis. Ieliek testa mēģeni saldējamā skapī (3.1. iedaļa) un atstāj tur apmēram 30 minūtes. Auksto ekstraktu centrifugē 5 minūtes ar apmēram 2 000 apgr./min. un tūlīt dekantē. Ļauj dekantētajam šķīdumam atdzist līdz istabas temperatūrai. Ar pipeti pārnes 5 ml dekantētā šķīduma mērkolbā ar 100 ml ietilpību un papildina ar ūdeni. Filtrē alikvotu ar membrānas mikrofiltru (3.3. iedaļa). Filtrāts ir gatavs noteikšanai ar HPLC.

5.3. Kalibrēšana

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

5.4. Noteikšana ar HPLC

Ļauj hromatogrāfijas sistēmai stabilizēties apmēram 30 minūtes. Iesmidzina standartšķīdumu (5.3. iedaļa). Atkārto, kamēr starpība starp maksimālajiem laukumiem vai maksimumu augstumiem starp divām secīgām iesmidzināšanām ir mazāks par 2%. Aprakstītajos apstākļos vanilīna aiztures laiks ir apmēram 9 minūtes. Analizē standartšķīdumu (5.3. iedaļa) divas reizes, iesmidzinot 20 µl. Iesmidzina 20 µl testa šķīdumu (5.2. iedaļa). Nosaka iegūto vanilīna maksimuma laukumu vai maksimālo augstumu. Atkārto divkārti standartšķīduma (5.3. iedaļa) iesmidzināšanu, 10 reizes iesmidzinot testa paraugus (5.2. iedaļa).

6. Rezultātu aprēķināšana

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

Aprēķina atbilstības koeficientu (R):

$$R = AC/CM,$$

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

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

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

kur

AS = ir testa parauga vanilīna maksimuma laukums,

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

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

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

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

Piezīme: Maksimuma laukuma vietā var izmantot maksimumu augstumus (skat. 8.3. iedaļu).

7. Metodes precizitāte

7.1. Atkārtojamība (r).

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

7.2. Sakritība (R).

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

8. Pielaižu robežas

8.1. Lai pārbaudītu viendabību, no iezīmētā produkta jāņem trīs paraugi.

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

8.2.1. Inkorporācijas līmenis 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehīdam ir 250 g uz tonnu iebiezināta sviesta vai sviesta. Ja krējums ir iezīmēts, tad inkorporācijas līmenis ir 250 g uz tonnu piena tauku.

8.2.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analīzēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95}):

— 221,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa),

— 159,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju starp 221,0 mg/kg un 159,0 mg/kg.

8.3. Marķieris, kas iegūts tikai no vaniļas pupām vai to apvienota ekstrakta.

8.3.1. Inkorporācijas līmenis 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehīdam ir 100 g uz tonnu iebiezināta sviesta vai sviesta. Ja krējums ir iezīmēts, tad inkorporācijas līmenis ir 100 g uz tonnu piena tauku.

8.3.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analīzēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95}):

— 79,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa),

— 54,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju starp 79,0 mg/kg un 54,0 mg/kg.

9. Piezīmes

9.1. Atkārtojamība r ir lielums, zem kura noteiktās iespējamības robežās var atrasties absolūtā starpība starp diviem atsevišķiem testa rezultātiem, kas iegūti no identiska testa materiāla ar to pašu metodi un tādus pašos apstākļos (tā pati aparatūra, tā pati laboratorija un īss starplaiks); ja nav citu norāžu, varbūtība ir 95 %.

- 9.2. Sakritība R ir lielums, zem kura noteiktās iespējamības robežās var atrasties absolūtā starpība starp diviem atsevišķiem testa rezultātiem, kas iegūti no identiska testa materiāla ar to pašu metodi dažādos apstākļos (dažādi laboranti, dažāda aparatūra, dažādas laboratorijas un/vai dažāds laiks); ja nav citu norāžu, varbūtība ir 95 %.
- 9.3. Pievienotā vanilīna reģenerācija 250 mg/kg sviesta eļļas līmenī mainās no 97,0 līdz 103,8. Vidējais konstatētais saturs bija 99,9 % ar 2,7 % standartnovirzi.
- 9.4. Standartšķīdums satur 5 % ekstrakcijas šķīduma, lai kompensētu maksimuma paplašināšanos, ko izraisa 5 % ekstrakcijas šķīduma testa paraugos. Tas nodrošina kvantifikāciju ar maksimuma augstumu.
- 9.5. Analīzes pamatā ir lineārās kalibrēšanas līnija bez pārrāvuma.

Izmantojot attiecīgus standartšķīduma (4.5.2. iedaļa) atšķaidījumus, linearitāte būtu jāpārbauda, kad analīzes veic pirmo reizi un tad ar regulāriem intervāliem un pēc HPLC aprīkojuma nomaiņas vai labošanas.

XIII PIELIKUMS

(9. pants)

BETA-APO-8' KAROTĒNSKĀBES ETILESTERA NOTEIKŠANA IEBIEZINĀTĀ SVIESTĀ UN SVIESTĀ AR SPEKTROMETRIJU**1. Piemērošanas joma un nozare**

Ar šo metodi apraksta procedūru beta-apo-8' karotēnskābes etilestera (apokarotēnesteris) daudzuma noteikšanai iebiezinātā sviestā un sviestā. Apokarotēnesteris ir visu to vielu summa paraugu ekstraktā, kuras iegūts apstākļos, kas aprakstīti metodē ar 440 nm gaismas absorbciju.

2. Princips

Sviesta taukus izšķīdina petrolēterī un mēra absorbciju pie 440 nm. Apokarotēnesteru saturu nosaka pret ārēju standartu.

3. Aparatūra

- 3.1. Mērpipetes ar 0,25, 0,50, 0,75 un 1,0 ml ietilpību.
- 3.2. Spektrofotometrs, kas piemērots izmantošanai pie 440 nm (un 447-449 nm) un aprīkots ar kivetēm, kuru optiskais mērceļš ir 1 cm.
- 3.3. Mērkolbas ar ietilpību 20 ml un 100 ml.
- 3.4. Analītiskie svāri ar jutīgumu 0,1 mg.

4. Reāģenti

Visiem reāģentiem jābūt ar atzītu analītisko kvalitāti.

4.1. Apokarotēnesteru suspensija (apmēram 20 %).

4.1.1. Suspensijas saturu nosaka šādi.

Mērkolbā (100 ml) iesver 400 mg, izšķīdina tajā 20 ml hloroforma (4.4. iedaļa) un uzpilda ar cikloheksānu (4.5. iedaļa). Atšķaida 5 ml šā šķīduma līdz 100 ml ar cikloheksānu (šķīdums A). Atšķaida 5 ml šķīduma A līdz 100 ml ar cikloheksānu. Absorbciju mēra pie 447-449 nm (mēra maksimumu pret cikloheksānu kā tukšo analīzi, izmantojot kivetes ar 1 cm garu optisko mērceļu).

$$\text{Apokarotēnesteru saturs(\%)} = \frac{A_{\text{maks}} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{maks} = mērīšanas šķīduma absorbcija maksimuma punktā,

A = parauga masa (g),

2 550 = A references (1 %, 1 cm) lielums.

Suspensijas tīrība ir P (%).

Piezīme: Apokarotēnesteru suspensija ir jutīga pret gaisu, karstumu un gaismu. Neatvērtā oriģināltraukā (noslēgts ar slāpekli) un vēsā vietā to var uzglabāt apmēram 12 mēnešus. Pēc atvēršanas saturs īsā laikā būtu jāizmanto.

4.1.2. Apokarotēnesteru standartšķīdums, apm. 0,2 mg/ml.

Ar precizitāti līdz 0,1 mg nosver apmēram 0,100 g apokarotēnesteru suspensijas (4.1.1. iedaļa) (Wg), izšķīdina petrolspirtā (4.2. iedaļa), pēc iespējas visu šķīdumu pārnes mērkolbā ar 100 ml ietilpību un līdz zīmei piepilda ar petrolspirtu.

Šis šķīdums satur (W.P)/10 mg/ml apokarotēnesteru.

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

4.2. Petrolspirts (40 - 60 °C).

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

4.4. Hloroforms.

4.5. Cikloheksāns.

5. Procedūra

5.1. Testa parauga sagatavošana

5.1.1. Iebiezināts sviests.

Paraugu kausē žāvēšanas skapī apmēram 45 °C temperatūrā.

5.1.2. Sviests.

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

5.2. Noteikšana

Ar precizitāti līdz 1 mg nosver apmēram 1 g iebiezināta sviesta (vai ekstrahētu sviesta tauku (5.1.2. iedaļa)), (Mg). Izmantojot petrolspirtu (4.2. iedaļa), pēc iespējas visu nosverto masu pārnes uz mērkolbu ar 20 ml ietilpību (Vml), uzpilda līdz zīmei un rūpīgi sajauc.

Pārnes alikvotu uz 1 cm kivetu un mēra absorbciju pie 440 nm pret petrolspirta tukšo analīzi. Pamatojoties uz kalibrēšanas grafiku (C?/ml), iegūst apokarotēnestera koncentrāciju šķīdumā.

5.3. Kalibrēšanas grafiks

Ar pipeti pārnes 0; 0,25; 0,5; 0,75 un 1,0 ml apokarotēnestera standartšķīduma (4.1.2. iedaļa) piecās mērkolbās ar 100 ml ietilpību. Atšķaida līdz attiecīgajam tilpumam ar petrolspirtu (4.2. iedaļa) un samaisa.

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

Atliek absorbcijas lielumus uz y ass pret apokarotēnestera koncentrāciju uz x ass.

6. Rezultātu aprēķināšana

6.1. Apokarotēnestera saturu, kas izteikts mg/kg produkta aprēķina šādi.

Iebiezināts sviests: (C.V)/M.

Sviests: 0,82 (C.V)M,

kur

C = apokarotēnestera saturs, µg/ml, nolasīts no kalibrēšanas grafika (5.3. iedaļa).

V = testa šķīduma (5.2. iedaļa) tilpums (ml).

M = testa porcijas (5.2. iedaļa) masa (g).

0,82 = korekcijas koeficients sviesta tauku saturam sviestā.

7. Metodes precizitāte

7.1. Atkārtojamība

7.1.1. Sviesta analīze.

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

7.1.2. Iebiezināta sviesta analīze.

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

7.2. Sakritība

7.2.1. Sviesta analīze.

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem ar dažādu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 4,7 mg/kg.

7.2.2. Iebiezināta sviesta analīze.

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās divreiz veicot noteikšanu identiski testa materiāliem ar dažādu aparāturu, nedrīkst pārsniegt 5,3 mg/kg.

7.3. Precizitātes datu avots

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

8. Pielaižu robežas

8.1. Lai pārbaudītu, vai produkts iezīmēts pareizi, no iezīmētā produkta jāņem trīs paraugi.

8.2. Sviests

8.2.1. Inkorporācijas līmenis sviestam, ņemot vērā fona absorbciju, ir 22 mg/kg.

8.2.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analīzēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95})):

- 18,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa),
- 13,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju starp 18,0 mg/kg un 13,0 mg/kg.

8.3. Iebiezināts sviests

8.3.1. Inkorporācijas līmenis iebiezinātam sviestam, ņemot vērā fona absorbciju, ir 24 mg/kg.

8.3.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analīzēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95})):

- 20,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa),
- 14,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju starp 20,0 mg/kg un 14,0 mg/kg.

XIV PIELIKUMS

(9. pants)

SITOSTERĪNA UN STIGMASTERĪNA NOTEIKŠANA SVIESTĀ UN IEBIEZINĀTĀ SVIESTĀ AR KAPILĀRO-KOLONNAS GĀZU HROMATOGRĀFIJU**1. PIEMĒROŠANAS JOMA UN NOZARE**

Ar šo metodi apraksta procedūru sitosterīna vai stigmasterīna daudzuma noteikšanai sviestā, sviestā un iebiezinātā sviestā. Sitosterīns jāaprēķina kā b-sitosterīna un 22 dihidro- β - sitosterīna summa, citus sitosterīnus uzskata par nenozīmīgiem.

2. PRINCIPS

Sviestu vai iebiezinātu sviestu pārziepjo ar kālija hidroksīdu etanola šķīdumā, un nepārziepjojamo vielu ekstrahē ar dietilēteri.

Sterīnus pārveido trimetilsililēteros un analizē ar kapilāro kolonnas gāzu hromatogrāfiju pret iekšējo standartu/betulīnu.

3. APARATŪRA

- 3.1. Pārziepjošanas kolba, kā ietilpība ir 150 ml, ar pieslīpētu savienojumu un atceses dzesinātāju.
- 3.2. Šķirpiltuves ar 500 ml ietilpību.
- 3.3. Kolbas ar 250 ml ietilpību.
- 3.4. Spiedienu izlīdzinošās piltuves ar 250 ml vai līdzīgu ietilpību dietilētera palieku savākšanai.
- 3.5. Stikla kolonna, 350 mm x 20 mm, ar keramiskā stikla aizbāzni.
- 3.6. Ūdens vanna vai sildapvalks.
- 3.7. Reakcijas kolbas ar 2 ml ietilpību.
- 3.8. Gāzu hromatogrāfs, kas piemērots izmantošanai ar kapilāro kolonnu un kas aprīkots ar sadales sistēmu, un kā sastāvdaļas ir šādas:
 - 3.8.1. kamera ar regulējamu temperatūru vēlamās temperatūras uzturēšanai kolonnās ar precizitāti līdz ± 1 °C;
 - 3.8.2. smidzinātājs ar pielāgojamu temperatūru;
 - 3.8.3. liesmas jonizācijas detektors un pārveidotājs/pastiprinātājs;
 - 3.8.4. reģistrējošā iekārta/integrators, kas piemērots darbam ar pārveidotāju/pastiprinātāju (3.8.3. iedaļa).
- 3.9. Kvarca kapilārā kolonna viscaur vienmērīgā 0,25 μ m biezumā pārklāta ar BP1 vai līdzvērtīgu pārklājumu; kolonnai jāspēj izšķirt lanosterīna un sitosterīna trimetilsilila atvasinājumus. Piemērots ir BP1 ar garumu 12 m un iekšējo diametru 0,2 mm.
- 3.10. Gāzu hromatogrāfijas 1 μ l mikrošļirce ar rūdītu adatu.

4. REAĢENTI

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

- 4.1. Etanols ar vismaz 95 % tīrību.
- 4.2. Kālija hidroksīda 60 % šķīdums, izšķīdina 600 g kālija hidroksīda (minimums 85 %) ūdenī un papildina ar ūdeni līdz vienam litram.
- 4.3. Betulīns ar vismaz 99 % tīrību.
 - 4.3.1. Betulīna šķīdumi dietilēterī (4.4. iedaļa).
 - 4.3.1.1. Sitosterīna noteikšanai izmantotā betulīna šķīduma koncentrācijai jābūt 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. Stigmasterīna noteikšanai izmantotā betulīna šķīduma koncentrācijai jābūt 0,4 mg/ml.

- 4.4. Analītiski tīrs dietilēteris (bez peroksīdiem vai nogulsnēm).
- 4.5. Bezūdens granulēts nātrija sulfāts, kas iepriekš divas stundas žāvēts 102 °C temperatūrā.
- 4.6. Sililējošs reagens, piemēram TRI-SIL (pieejams no *Pierce Chemical Co*, kat. Nr. 49001) vai līdzvērtīgs. (Svarīgi: TRI-SIL ir viegli uzliesmojoša, toksiska, kodīga un, iespējams, kancerogēna viela. Laboratorijas personālam jāzina drošības informācija par TRI-SIL un jāveic attiecīgi piesardzības pasākumi.)
- 4.7. Lanosterīns.
- 4.8. Sitosterīns ar zināmu tīrību, kas nav mazāka par 90 % (P).
 1. *piezīme:* Kalibrēšanai izmantoto standartmateriālu tīrība jānosaka ar normalizācijas metodi. Pieņem, ka visi paraugā esošie sterīni ir atspoguļoti hromatogrammā, ka kopējais maksimumu laukums atspoguļo 100 % sterīna sastāvdaļu un ka ar detektoru noteiktie dati par sterīniem ir tādi paši. Sistēmas linearitāte jāapstiprina visos attiecīgajos koncentrācijas diapazonos.
- 4.8.1. Sitosterīna standartšķīdums – ar precizitāti līdz 0,001 mg/ml sagatavo šķīdumu, kas satur apmēram 0,5 mg/ml (W_1) sitosterīna (4.8. iedaļa) dietilēterī (4.4. iedaļa).
- 4.9. Stigmasterīns ar zināmu tīrību, kas nav mazāka par 90 % (P).
- 4.9.1. Stigmasterīna standartšķīdums – ar precizitāti līdz 0,001 mg/ml sagatavo šķīdumu, kas satur apmēram 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterīna (4.9. iedaļa) dietilēterī (4.4. iedaļa).
- 4.10. Izšķirtspējas testa maisījums. Sagatavo šķīdumu, kas satur 0,05 mg/ml lanosterīna (4.7. iedaļa) un 0,5 mg/ml sitosterīna (4.8. iedaļa) dietilēterī (4.4. iedaļa).

5. METODE

- 5.1. Hromatogrāfijas standartšķīdumu sagatavošana. Vienlaicīgi ar pievienošanu pārziepjojamajam paraugam (skat. 5.2.2. iedaļu) iekšējais standartšķīdums (4.3.1. iedaļa) jāpievieno attiecīgajam sterīna standartšķīdumam.
 - 5.1.1. Sitosterīna standarta hromatogrāfijas šķīdums: pārnes 1 ml sitosterīna standartšķīduma (4.8.1. iedaļa) abās divās reakcijas kolbās (3.7. iedaļa) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri. Pievieno 1 ml iekšējā šķīduma (4.3.1.1. iedaļa) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri.
 - 5.1.2. Stigmasterīna standarta hromatogrāfijas šķīdums: pārnes 1 ml stigmasterīna standartšķīduma (4.9.1. iedaļa) abās divās reakcijas kolbās (3.7. iedaļa) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri. Pievieno 1 ml iekšējā šķīduma (4.3.1.2. iedaļa) un ar slāpekļa plūsmu aizvada dietilēteri.
- 5.2. *Nepārziepjojamās vielas pagatavošana*
 - 5.2.1. Kausē sviesta paraugu temperatūrā, kas nepārsniedz 35 °C, maisot pamatīgi sajauc paraugu.

Ar precizitāti līdz 1 mg kolbā ar ietilpību 150 ml (3.1. iedaļa) iesver apmēram 1 g sviesta (W_2) vai iebiezināta sviesta (W_2). Pievieno 50 ml etanola (4.1. iedaļa) un 10 ml kālija hidroksīda šķīduma (4.2. iedaļa). Pieliek atces dzesinātāju un 30 minūtes karsē apmēram 75 °C temperatūrā. Atvieno kondensatoru un atdzesē kolbu apmēram līdz telpas temperatūrai.
 - 5.2.2. Ja jānosaka sitosterīns, kolbā ielej 1,0 ml iekšējā standartšķīduma (4.3.1.1. iedaļa) vai, ja jānosaka stigmasterīns - 4.3.1.2. iedaļā paredzētā šķīduma. Rūpīgi sajauc. Pēc iespējas visu kolbas saturu pārnes šķirpiltuvē ar 500 ml ietilpību (3.2. iedaļa), grotot mazgājot kolbu ar 50 ml ūdens un 250 ml dietilētera (4.4. iedaļa). Divas minūtes šķirpiltuvi enerģiski krata, un ļauj atdalīties fāzēm. Notecina apakšējo ūdens slāni un ar četriem secīgiem 100 ml ūdens alikvotiem kratot nomazgā ētera slāni.
 2. *piezīme* Lai neveidotos emulsija, kolba pirmās divas reizes ar ūdeni jāmazgā viegli (10 apgriezieni). Kolbu mazgājot trešo reizi, to var darīt enerģiski, kratot 30 sekundes. Ja izveidojusies emulsija, to var likvidēt, pievienojot 5–10 ml etanola. Ja pievienots etanols, kolba nākamās divas reizes ar ūdeni jāmazgā enerģiski.
 - 5.2.3. Tiro, no ziepēm brīvo ētera slāni laiž caur stikla kolonnu (3.5. iedaļa), kas satur 30 g bezūdens nātrija sulfāta (4.5. iedaļa). Ēteri savāc kolbā ar 250 ml ietilpību (3.3. iedaļa). Pievieno vienu viršanas ķermeņiņu granulu un tvaicē gandrīz sausu ūdens peldē vai sildapvalkā, raugoties, lai tiktu savākts šķīdinātāja pārpalikums.
 3. *piezīme:* Ja parauga ekstrakti ir ņemti pilnīgā sausumā pārāk augstā temperatūrā, ir iespējami sterīna zudumi.

5.3. Trimetilsililēteru sagatavošana

- 5.3.1. Kolbā palikušo ētera šķīdumu ar 2 ml ētera pārnes uz reakcijas kolbu ar ietilpību 2 ml (3.7. iedaļa), un ar slāpekļa plūsmu aizvada ēteri. Kolbu mazgā ar divām secīgām 2 ml dietilētera alikvotiem, katreiz pārnesot uz reakcijas kolbu un aizvadot ēteri ar slāpekli.
- 5.3.2. Sililē paraugu, pievienojot 1 ml TRI-SIL (4.6. iedaļa). Noslēdz reakcijas kolbu un enerģiski krata, lai izšķīdinātu paraugu. Ja paraugs pilnīgi neizšķīst, to silda līdz 65-70 °C. Pirms iesmidzināšanas gāzu hromatogrāfā ļauj nostāvēties vismaz piecas minūtes. Tāpat kā paraugus sililē standartus. Izšķirtspējas testa maisījumu (4.10. iedaļa) sililē tāpat kā paraugus.

4. *piezīme:* Sililēšana jāveic no ūdens brīvā vidē. Uz nepilnīgu betulīna sililēšanu norāda betulīna maksimumam tuvu esošs otrs maksimums.

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

5.4. Gāzu hromatogrāfijas analīze

5.4.1. Darba apstākļu izvēle.

Saskaņā ar ražotāja instrukcijām uzstāda gāzu hromatogrāfu.

Norādījumi par darba apstākļiem ir šādi:

- kolonnas temperatūra: 265 °C;
- inžektora temperatūra: 265 °C;
- detektora temperatūra: 300 °C;
- nesējgāzes plūsmas ātrums: 0,6 ml/min;
- ūdeņraža spiediens: 84 kPa;
- gaisa spiediens: 155 kPa;
- parauga dalījums: 10:1 līdz 50:1; dalījuma attiecība ir optimizējama saskaņā ar ražotāja instrukcijām un detektora atbildes reakcijas linearitāti, tad apstiprināma visos interesējošos koncentrācijas diapazonos.

5. *piezīme:* Īpaši svarīgi ir, lai smidzināšanas cauruli regulāri tīrītu.

- iesmidzinātās vielas daudzums: 1 µl TMSE šķīduma.

Ļauj sistēmai stabilizēties, un pirms jebkuru analīžu sākšanas iegūst pietiekami stabili atbildes reakciju.

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

- sitosterīna maksimumam jābūt atbilstīgi atdalītam no lanosterīna. Pirmajā attēlā parādīta tipiska hromatogramma, kas būtu jāiegūst no sililēta izšķirtspējas testa maisījuma (4.10. iedaļa),
- šādu sterīnu relatīvajam aiztures laikam vajadzētu būt apmēram šādam:
 - holesterīns: 1,0;
 - stigmasterīns: 1,3;
 - sitosterīns: 1,5;
 - betulīns: 2,5;
- betulīna aiztures laikam vajadzētu būt apmēram 24 minūtes.

5.4.2. Analīzes procedūra.

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

Iemidzina nākamo 1 µl sililēta standartšķīduma, lai noteiktu atbilstības koeficientus pret betulīnu.

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

Orientējoši katrā kārtā būtu sešreiz jāiesmidzina paraugs.

6. *piezīme:* Stigmasterīna maksimuma integrācijai būtu jāietver visi straujie kritumi kā 2.b attēlā punktos 1, 2 un 3.

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

6. REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

- 6.1. Nosaka sterīna maksimumu un betulīna maksimumu laukumu abos standartos, kas nodala partiju, un aprēķina R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{sterīna maksimuma vidējais laukums standartam;}}{\text{betulīna maksimuma vidējais laukums standartam.}}$$

Nosaka maksimuma laukumu sterīnam (stigmasterīns un sitosterīns) un betulīna maksimumu paraugam un aprēķina R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{sterīna maksimuma vidējais laukums paraugam;}}{\text{betulīna maksimuma vidējais laukums paraugam.}}$$

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

W_2 = parauga masa (g) (5.2.1. iedaļa).

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

$$\text{Sterīna saturs paraugā (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

7. METODES PRECIZITĀTE

7.1 Sviests

7.1.1. Atkārtojamība.

7.1.1.1. Stigmasterīns.

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

7.1.1.2. Sitosterīns.

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

7.1.2. Sakritība.

7.1.2.1. Stigmasterīns.

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

7.1.2.2. Sitosterīns.

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

7.1.3. Precizitātes datu avots.

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

7.2. *Iebiezināts sviests*

7.2.1. *Atkārtojamība.*

7.2.1.1. Stigmaterīns.

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās noteikšanās, ko iespējami īsā laikā veicis viens laborants ar identisku testa materiālu, izmantojot to pašu aparāturu, nedrīkst pārsniegt 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterīns.

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

7.2.2. *Sakritība.*

7.2.2.1. Stigmaterīns.

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem ar dažādu aparāturu, nedrīkst pārsniegt 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterīns.

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

7.2.3. Precizitātes datu avots.

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

8. **PIELAIDES ROBEŽAS**

8.1. Lai pārbaudītu, vai produkts iezīmēts pareizi, no iezīmētā produkta jāņem trīs paraugi.

8.2. *Sviests*

8.2.1. Stigmaterīns.

8.2.1.1. Stigmaterīna inkorporācijas līmenis ir 150 g stigmaterīna ar vismaz 95 % tīrību uz tonnu sviesta, t.i., 142,5 mg/kg vai 170 g stigmaterīna ar vismaz 85 % tīrību uz tonnu sviesta, t.i., 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analīzēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95})):

- 116,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmaterīnam ar 95 % tīrību),
- 118,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmaterīnam ar 85 % tīrību),
- 81,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmaterīnam ar 95 % tīrību),
- 82,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmaterīnam ar 85 % tīrību).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju attiecīgi starp 116,0 mg/kg un 81,0 mg/kg vai 118,0 mg/kg un 82,0 mg/kg.

8.2.2. Sitosterīns.

8.2.2.1. Sitosterīna inkorporācijas līmenis ir 600 g ar vismaz 90 % tīrību uz tonnu sviesta, t.i., 540 mg/kg.

8.2.2.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analizēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95}):

- 486,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa sitosterīnam ar 90 % tīrību),
- 358,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa sitosterīnam ar 90 % tīrību),

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju starp 486,0 mg/kg un 358,0 mg/kg.

8.3. *Iebiezināts sviests*

8.3.1. Stigmasterīns.

8.3.1.1. Stigmasterīna inkorporācijas līmenis ir 150 g stigmasterīna ar vismaz 95 % tīrību uz tonnu sviesta, t.i., 142,5 mg/kg; vai 170 g stigmasterīna ar vismaz 85 % tīrību uz tonnu iebiezināta sviesta, t.i., 144,5 mg/kg.

8.3.1.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analizēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95}):

- 120,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmasterīnam ar 95 % tīrību),
- 122,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmasterīnam ar 85 % tīrību),
- 84,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmasterīnam ar 95 % tīrību),
- 86,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa stigmasterīnam ar 85 % tīrību).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju attiecīgi starp 120,0 mg/kg un 84,0 mg/kg vai 122,0 mg/kg un 86,0 mg/kg.

8.3.2. Sitosterīns.

8.3.2.1. Sitosterīna inkorporācijas līmenis ir 600 g sitosterīna ar vismaz 90 % tīrību uz tonnu iebiezināta sviesta, t.i., 540 mg/kg.

8.3.2.2. Lai pārbaudītu marķiera inkorporācijas līmeni un viendabīgumu, izmanto produkta analizēs iegūtos triju paraugu rezultātus, un mazāko rezultātu salīdzina ar šādām robežām (ņemta vērā kritiskā starpība 95 % varbūtības līmenim (DCr_{95}):

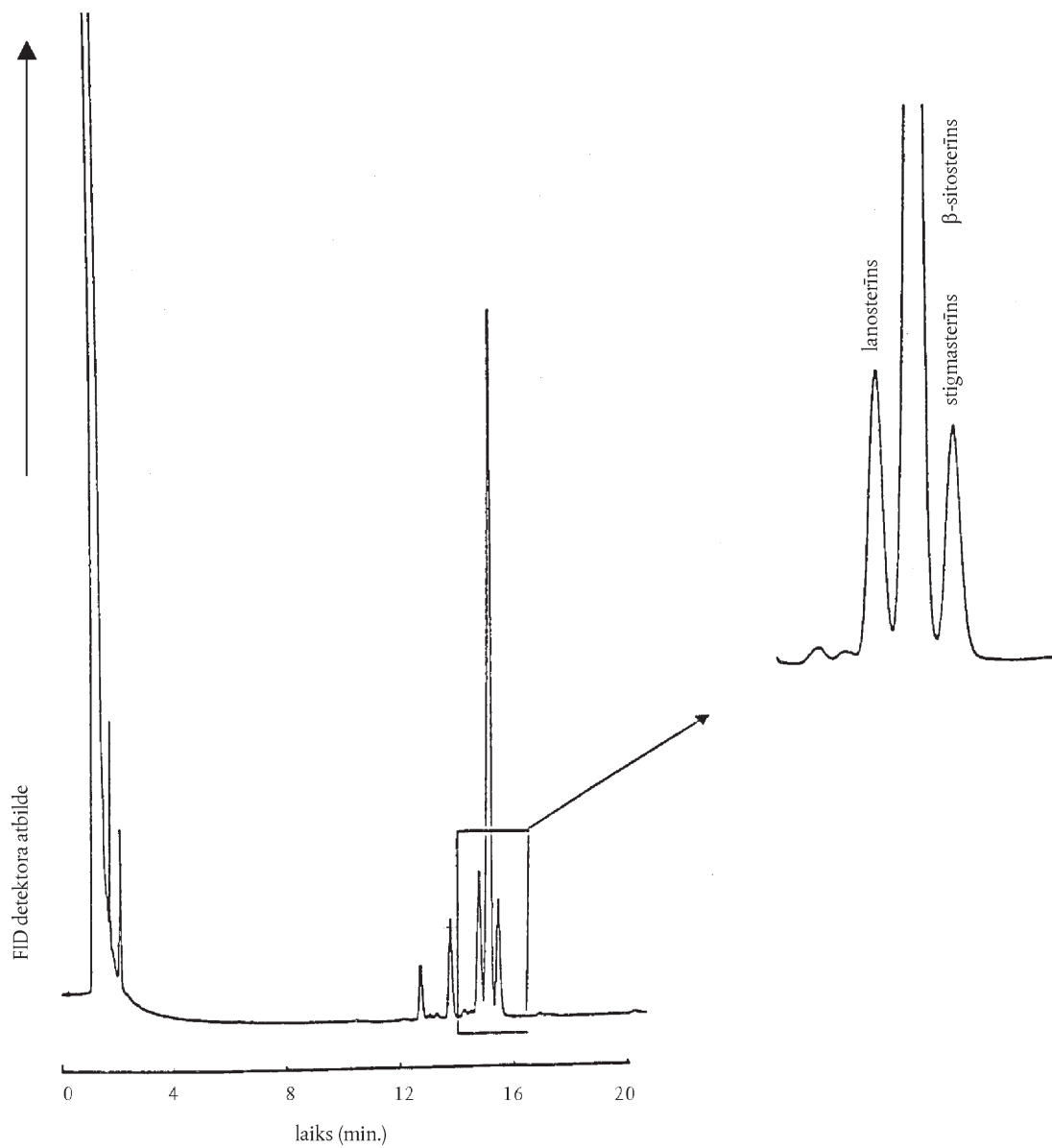
- 486,0 mg/kg (95 % no minimālā inkorporācijas līmeņa sitosterīnam ar 90 % tīrību),
- 358,0 mg/kg (70 % no minimālā inkorporācijas līmeņa sitosterīnam ar 90 % tīrību).

Marķiera koncentrāciju paraugā, no kā iegūts vismazākais rezultāts, izmanto saistībā ar interpolāciju starp 486,0 mg/kg un 358,0 mg/kg.

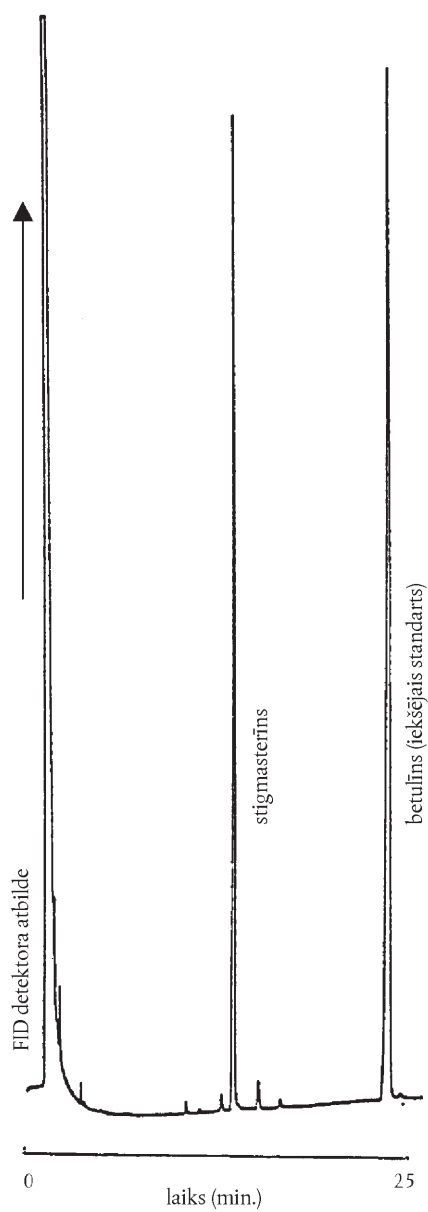
1. attēls

Izšķirtspējas testa maisījuma hromatogramma

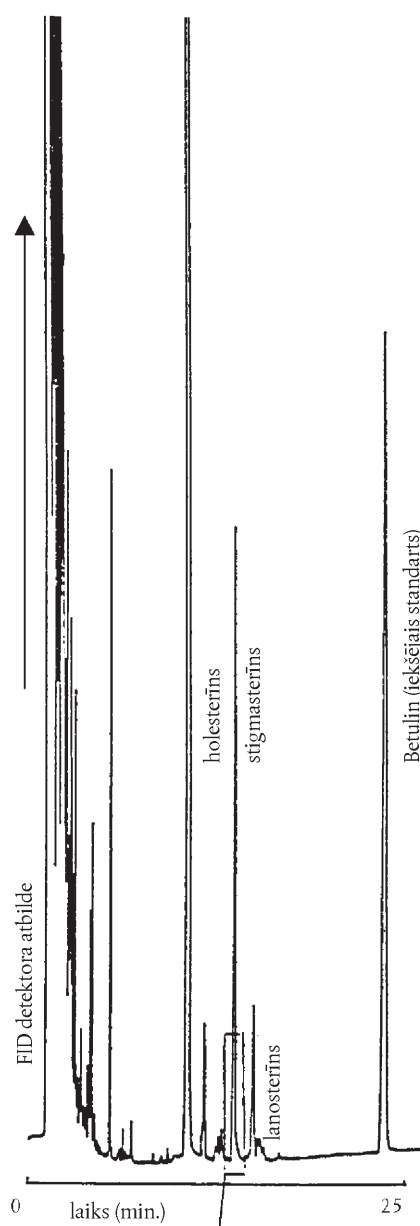
Vēlama pilnīga izšķirtspēja, t.i., lanosterīna maksimuma līknei būtu jāatgriežas pie bāzes līnijas, pirms tā aiziet no sitosterīna maksimuma, lai gan pieļaujama arī daļēja izšķirtspēja.



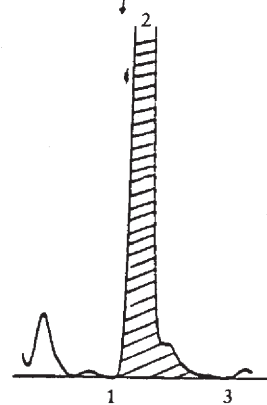
2.a attēls
Stigmasterīna standarts



2.b attēls
Ar stigmasterīnu denaturēts sviesta paraugs

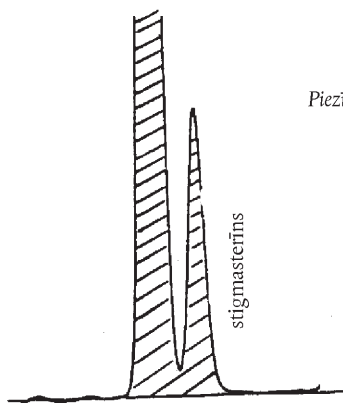
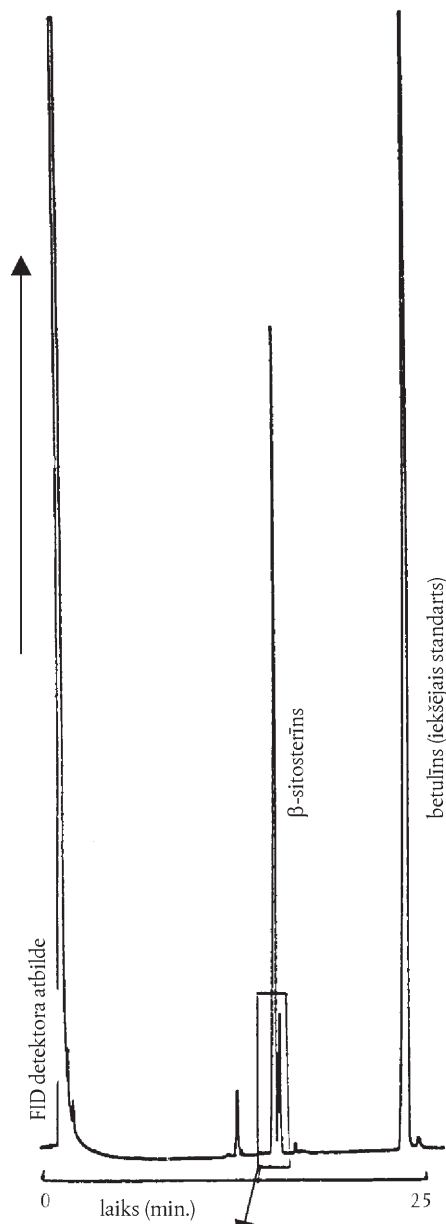


Piezīme. Stigmasterīna maksimuma integrācijai jāietver visi straujie kritumi kā punktos 1, 2 un 3.



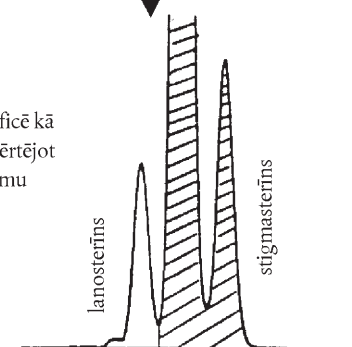
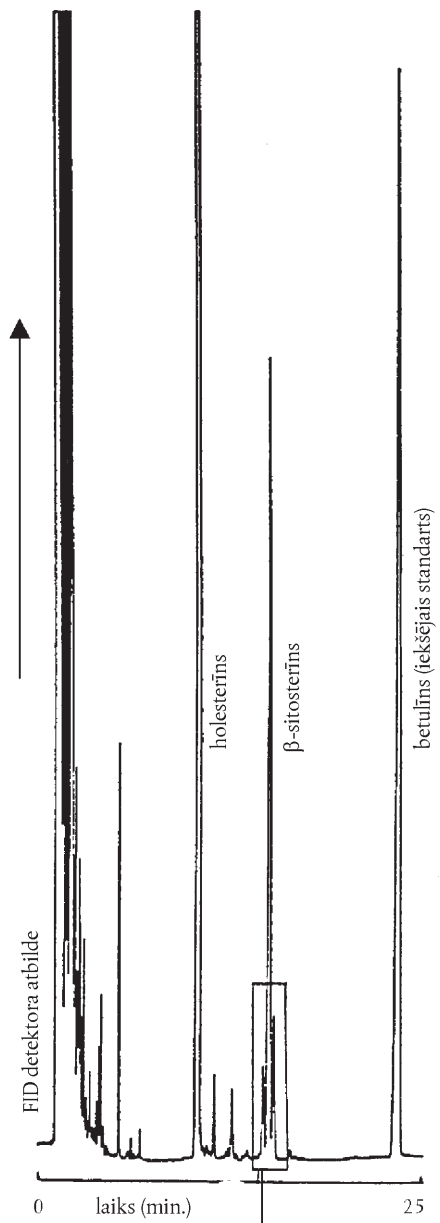
3.a attēls

Sitosterīna standarts



3.b attēls

Ar β-sitosterīnu denaturēta sviesta paraugs



Piezīme: β-sitosterīns bieži satur piemaisījumus (ko identificē kā stigmastanolu), kas eluē tūlīt pēc β-sitosterīna. Vērtējot kopējo β-sitosterīna klātbūtni, šo divu maksimumu laukumi būtu jāsummē.

XV PIELIKUMS

(10. pants)

REFERENCES METODE GOVS PIENA UN KAZEINĀTA KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANAI SIEROS, KAS GATAVOTI NO AITAS PIENA, KAZAS PIENA VAI BIFEĻMĀTES PIENA, VAI AITAS, KAZAS UN BIFEĻMĀTES PIENA MAISIĀJUMIEM**1. Joma**

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

2. Piemērošanas nozare

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

3. Metodes būtība

- 3.1. Kazeīnu izolēšana no siera un references standartiem.
- 3.2. Izolēto kazeīnu šķīdināšana un šķelšana ar plazmīniem (EK.3.4.21.7.).
- 3.3. Ar plazmīnu apstrādāto kazeīnu izoelektriskā fokusēšana urīnvielas klātbūtnē un olbaltumvielu iekrāsošana.
- 3.4. Iekrāsoto γ_3 un γ_2 -kazeīnu joslu vērtēšana (pierādījums par govus piena klātbūtni), salīdzinot no parauga iegūtās joslas ar joslām, kas iegūtas tajā pašā gelā no references standartiem, kas satur 0 % un 1 % govus piena.

4. Reaģenti

Ja vien nav norādīts citādi, jāizmanto analītiskas kvalitātes ķīmikālijas. Ūdenim jābūt divreiz destilētam vai ar līdzvērtīgu tīrību.

Piezīme: Uz laboratorijā sagatavotu urīnvielu saturošu poliakrilamīda gelu ar izmēriem 265 x 125 x 0,25 mm attiecas turpmāk izklāstītās prasības. Ja izmanto cita izmēra un cita veida gelu, atdalīšanas nosacījumus var pielāgot.

Izoelektriskā fokusēšana.

4.1. Reaģenti urīnvielu saturošu poliakrilamīda gelu iegūšanai**4.1.1. Gela izejas šķīdums.**

Šķīdina ūdenī:

4,85 g akrilamīda,

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

48,05 g urīnvielas,

15,00 g glicerīna (87 masas %),

uzpilda līdz 100 ml, glabā ledusskapī brūna stikla pudelē.

Piezīme: Labāk izmantot tirdzniecībā pieejamo iepriekš sajaukto akrilamīda/BIS šķīdumu, nevis noteiktu fiksētu svaru neirotoksiskā akrilamīda. Ja šāds šķīdums satur 30 % m/V akrilamīda un 0,8 % m/V BIS, tad pie šādas koncentrācijas izteiksmes jāizmanto 16,2 ml tilpums. Izejas šķīduma glabāšanas laiks lielākais ir 10 dienas; ja tā vadītspēja ir lielāka par 5 μ S, to dejonizē, 30 minūtes maisot ar 2 g MB-3 amberlīta, tad filtrē ar 0,45 μ m membrānas filtru.

- 4.1.2. Gela šķīdums.
Sagatavo gela šķīdumu, sajaucot piedevas un amfolitus ar gela izejas šķīdumu (skat. 4.1.1. iedaļu):
9,0 ml izejas šķīduma,
24 mg β -alanina,
500 μ l amfolita pH 3,5 - 9,5 ⁽¹⁾,
250 μ l amfolita pH 5-7 ⁽¹⁾,
250 μ l amfolita pH 6-8 ⁽¹⁾.
Gela šķīdumu sajauc un atgāzo divas līdz trīs minūtes ultraskaņas vannā vai vakuumā.
Piezīme: Sagatavo gela šķīdumu tieši pirms tā saliešanas (skat. 6.2. iedaļu).
- 4.1.3. Katalizatora šķīdumi.
- 4.1.3.1. N, N, N' N' – tetrametiletilenediamīns (*Temed*).
- 4.1.3.2. 40 % m/V amonija persulfāts (PER).
Ūdenī izšķīdina 800 mg PER un papildina līdz 2 ml.
Piezīme: Vienmēr izmanto svaigi pagatavotu PER šķīdumu.
- 4.2. *Kontakšķīdums*
Petroleja vai šķidrās parafīns.
- 4.3. *Anoda šķīdums*
Ūdenī izšķīdina 5,77 g fosforskābes (85 masas %) un atšķaida līdz 100 ml.
- 4.4. *Katoda šķīdums*
Ūdenī izšķīdina 2,00 g nātrija hidroksīda un atšķaida ar ūdeni līdz 100 ml.

Parauga sagatavošana.
- 4.5. *Reaģenti olbaltumvielu izolēšanai*
- 4.5.1. Atšķaida etiķskābi (25,0 ml ledus etiķskābes papildina ar ūdeni līdz 100 ml).
- 4.5.2. Dihlormetāns.
- 4.5.3. Acetons
- 4.6. *Olbaltumvielas šķīdināošs bufersšķīdums.*
Šķīdina
5,75 g glicerīna (87 masas %),
24,03 g urīnvielas,
250 mg ditiotreitolāūdeni un papildina līdz 50 ml.
Piezīme: Uzglabā ledusskapī, maksimālais glabāšanas laiks ir viena nedēļa.
- 4.7. *Reaģenti kazeīnu šķelšanai ar plazmīniem*
- 4.7.1. Amonija karbonāta bufersšķīdums.
Titrē 0,2 mol/l amonija hidroģēnkarbonāta šķīdumu (1,58 g/100 ml ūdens), kas satur 0,05 mol/l etilēndiamīntetraetiķskābi (EDTA, 1,46 g/100 ml) ar 0,2 mol/l amonija karbonāta šķīdumu (1,92 g/100 ml ūdens), kas satur 0,05 mol/l EDTA līdz pH 8.
- 4.7.2. Liellopu plazmīns (EK. 3.4.21.7) ar vismaz 5 vien./ml aktivitāti.
- 4.7.3. ϵ -aminokapronskābes šķīdums fermentu kavēšanai.
Šķīdina 2,624 g ϵ -aminokapronskābes (6 amino-n-heksānskābe) 100 ml 40 % (V/V) etanola.

⁽¹⁾ Produkti - *Ampholine*® pH 3,5-9,5 (*Pharmacia*) un *Resolyte*® pH 5-7, un pH 6-8 (*BDH, Merck*) - ir apstiprināti kā īpaši piemēroti, lai iegūtu vajadzīgo λ -kazeīnu separāciju.

- 4.8. *Standarts*
- 4.8.1. Sertificētu ar siera fermentu sajaukta aitas un kazas vājpiena references standartu, kas satur 0 % un 1 % govju piena, var iegādāties no *Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440 Geel, Belgium*.
- 4.8.2. Laboratorijas pagaidu standartu sagatavošana no bifeljmātes piena, kas sajaukts ar siera fermentu un kas satur 0 % un 1 % govju piena.

Vājpienu sagatavo, 20 minūtes centrifugējot 2 500 g neapstrādāta bifeljmātes vai govju piena 37 °C temperatūrā. Pēc tam ātri atdzesē mēģeni un tās saturu līdz 6-8 °C temperatūrai, tad virsējo tauku slāni pilnībā noņem. Lai sagatavotu 1 % standartu 1 l vārglāzē 495 ml bifeljmātes vājpiena pievieno 5,00 ml govju vājpiena, noregulē pH uz 6,4, pievienojot atšķaidītu pienskābi (10 % m/V). Noregulē temperatūru uz 35 °C un pievieno 100 µl teļa siera fermenta (fermenta aktivitāte 1: 10 000, c. 3 000 vien./ml), maisa 1 minūti un vārglāzi, kas pārklāta ar alumīnija foliju, vienu stundu atstāj 35 °C temperatūrā, ļaujot veidoties rūgušpiena biežmasai. Pēc tam, kad izveidojusies rūgušpiena biežmasa, visu ar siera fermentu sajaukto pienu žāvē ar saldēšanas metodi bez iepriekšējas homogenizācijas vai sūkļu novadīšanas. Pēc žāvēšanas ar saldēšanas metodi tas ir smalkgraudains materiāls viendabīga pulvera iegūšanai. Lai sagatavotu 0 % standartu, veic to pašu procedūru, izmantojot tīru bifeljmātes vājpienu. Standarti jāuzglabā 20 °C temperatūrā.

Piezīme: Pirms standartu sagatavošanas ir ieteicams pārbaudīt bifeljmātes piena tīrību, veicot izoelektrisko fokusēšanu ar plazmīnu apstrādātiem kazeīniem.

Reaģenti olbaltumvielu iekrāsošanai.

- 4.9. *Fiksators*
- Ūdeni izšķīdina 150 g trihloretikskābes un papildina līdz 1 000 ml.
- 4.10. *Atkrāsojošais šķīdums*
- Ar destilēto ūdeni atšķaida 500 ml metanola un 200 ml ledus etiķskābes līdz 2 000 ml.
- Piezīme:* Katru dienu gatavo svaigu atkrāsojošo šķīdumu; to var sagatavot, sajaucot vienādus 50 % (V/V) metanola un 20 % (V/V) ledus etiķskābes izejas šķīdumu tilpumus.
- 4.11. *Iekrāsojošie šķīdumi*
- 4.11.1. Krāsojošais šķīdums (1. izejas šķīdums).
- Izmantojot magnētisko maisītāju (apmēram 45 minūtes), šķīdina 3,0 g *Coomassie* briljanzilā G-250 (C.I. 42655) 1 000 ml 90 % (V/V) metanola, filtrē ar diviem vidēji ātras filtrācijas kroku filtriem.
- 4.11.2. Krāsojošais šķīdums (2. izejas šķīdums).
- Šķīdina 5,0 g vara sulfāta pentahidrāta 1 000 ml 20 % (V/V) etiķskābes.
- 4.11.3. Krāsojošais šķīdums (darba šķīdums).
- Tieši pirms iekrāsošanas sajauc kopā pa 125 ml no katra izejas šķīduma (4.11.1. un 4.11.2. iedaļa).
- Piezīme:* Krāsojošais šķīdums jāgatavo tā izmantošanas dienā.

5. **Aprīkojums**

- 5.1. Stikla plates (265 x 125 x 4 mm); gumijas veltnis (platums 15 cm); līmeņots galds.
- 5.2. Gela nesējloksne (265 x 125 mm).
- 5.3. Segloksne (280 x 125 mm). Katrai garajai malai (skat. 1. attēlu) pielīmē strēmeli līmlentes (280 x 6 x 0,25 mm).
- 5.4. Elektrofokusēšanas kamera ar dzesēšanas plāksni (piem., 265 x 125 mm) un piemērota strāvas padeve ($\geq 2,5$ kV) vai automātiskā elektroforēzes ierīce.
- 5.5. Cirkulācijas kriostats ar termostatu, kas noregulēts uz $12 \pm 0,5$ °C.
- 5.6. Centrifūga, kas noregulējama uz 3 000 g.
- 5.7. Elektrodu plāksnes (≥ 265 mm garas).

- 5.8. Plastmasas pilināmās pudeles anoda un katoda šķīdumiem.
- 5.9. Parauga aplikators (10 x 5 mm, viskoze vai filtrpapīrs ar zemu olbaltumvielu adsorbētspēju).
- 5.10. Nerūsējošā tērauda grieznes, skalpeļi un pincetes.
- 5.11. Nerūsējošā tērauda vai stikla iekrāsošanas un atkrāsošanas šķīvi (piem., 280 x 150 mm instrumentu paplātes).
- 5.12. Homogenizētājs ar regulējamu stieni (roktura diametrs 10 mm), 8 000 līdz 20 000 apgriezīnu minūtē.
- 5.13. Magnētiskais maisītājs.
- 5.14. Ultraskaņas vanna.
- 5.15. Iekārta folijas sašūšanai.
- 5.16. 25 µl mikropipetes.
- 5.17. Vakuumcentrifūga vai liofilizators.
- 5.18. Ar termostatu regulējama ūdens vanna, kas noregulējama uz 35 un 40 ± 1 °C, ar kratītāju.
- 5.19. Densitroms, kā rādītāji nolasāmi, ja $\lambda = 634$ nm.

6. Procedūra

6.1. Parauga sagatavošana

6.1.1. Kazeīnu izolēšana.

Centrifūgas mēģenē iesver apjomu, kas vienāds ar 5 g siera sausās masas vai 100 ml standartvielas, pievieno 60 g destilētā ūdens un homogenizē ar stieņa homogenizētāju (8 000 līdz 10 000 apgriezīnu minūtē). Ar atšķaidītu etiķskābi noregulē pH 4,6 (4.5.1. iedaļa) un centrifugē (5 minūtes, 3 000 g). Dekantē taukus un sūkalas, homogenizē atlikumu ar 20 000 apgr./min. 40 ml destilēta ūdens, kurā ar atšķaidītu etiķskābi (4.5.1. iedaļa) pH noregulē uz 4,5, pievieno 20 ml dihlormetāna (4.5.2. iedaļa), atkal homogenizē un centrifugē (5 min., 3 000 g). Ar lāpstiņu noņem kazeīna slāni, kas atrodas starp ūdens un organisko fāzi (skat. 2. attēlu), un dekantē abas fāzes. Rehomogenizē kazeīnu 40 ml destilēta ūdens (skat. iepriekš) un 20 ml dihlormetāna (4.5.2. iedaļa) un centrifugē. Atkārtoti šo procedūru, līdz abas ekstrakcijas fāzes ir bezkrāsainas (divas vai trīs reizes). Homogenizē olbaltumvielu atlikumu ar 50 ml acetona (4.5.3. iedaļa) un filtrē ar vidēji ātras filtrācijas kroku filtrpapīru. Katru reizi mazgā atlikumu uz filtra ar divām atsevišķām 25 ml acetona porcijām un atļauj nožūt gaisā vai žāvē ar slāpekļa plūsmu, tad miezeri saberž smalkā pulverī.

Piezīme: Sausie kazeīna izolāti būtu jāglabā - 20 °C temperatūrā.

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

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

Piezīme: Lai iegūtu lielāku simetriju fokusētajās kazeīna joslās, pēc ε-aminokapronskābes pievienošanas ieteicams šķīdumu žāvēt ar saldēšanas metodi un tad izšķīdināt atlikumu 0,5 ml olbaltuma šķīdināšanas buferšķīduma (4.6. iedaļa).

6.2. Poliakrilamīda gelus saturošās urīnvielas sagatavošana

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

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

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

6.3. Izoelektriskā fokusēšana

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

Izoelektriskās fokusēšanas nosacījumi.

6.3.1. Gela izmērs 265 x 125 x 0,25 mm.

posms	Laiks (min.)	spriegums (V)	strāvas stiprums (mA)	jauda (W)	voltstundas (V·h)
1. Pirmsfokusēšana	30	maks. 2 500	maks. 15	const 4	c. 300
2. Parauga fokusēšana (1)	60	maks. 2 500	maks. 15	const 4	c. 1 000
3. Galīgā fokusēšana	60	maks. 2 500	maks. 5	maks. 20	c. 3 000
	40	maks. 2 500	maks. 6	maks. 20	c. 3 000
	30	maks. 2 500	maks. 7	maks. 25	c. 3 000

(1) Parauga aplikācija: Pēc pirmsfokusēšanas (1. posms) ar pipeti pārnes 18 µl parauga un standartšķīdumu uz parauga aplikatoriem (10 x 15 mm), liek tos uz gela ar 1 mm intervālu un 5 mm attālumā no anoda, viegli piespiež. Iepriekšminētajos apstākļos veic fokusēšanu, uzmanīgi noņem parauga aplikatorus pēc 60 minūtes ilgas parauga fokusēšanas.

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

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

posms	spriegums	strāvas stiprums	jauda	t°	voltstundas
1. Pirmsfokusēšana	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 V·h
2. Parauga fokusēšana	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 V·h
3. Fokusēšana	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 V·h
4. Fokusēšana	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 V·h

Parauga aplikatoru 2. posmā novieto pie 0 V·h.

Parauga aplikatoru 2. posmā noņem pie 30 V·h.

6.4. Olbaltumvielu iekrāsošana

6.4.1. Olbaltumvielu fiksēšana.

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

6.4.2. Gela plates mazgāšana un iekrāsošana.

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

6.4.3. Gela plates atkrāsošana.

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

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

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

7. **Vērtēšana**

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

7.1. *Vizuālā vērtēšana*

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

7.2. *Densimetriskā novērtēšana*

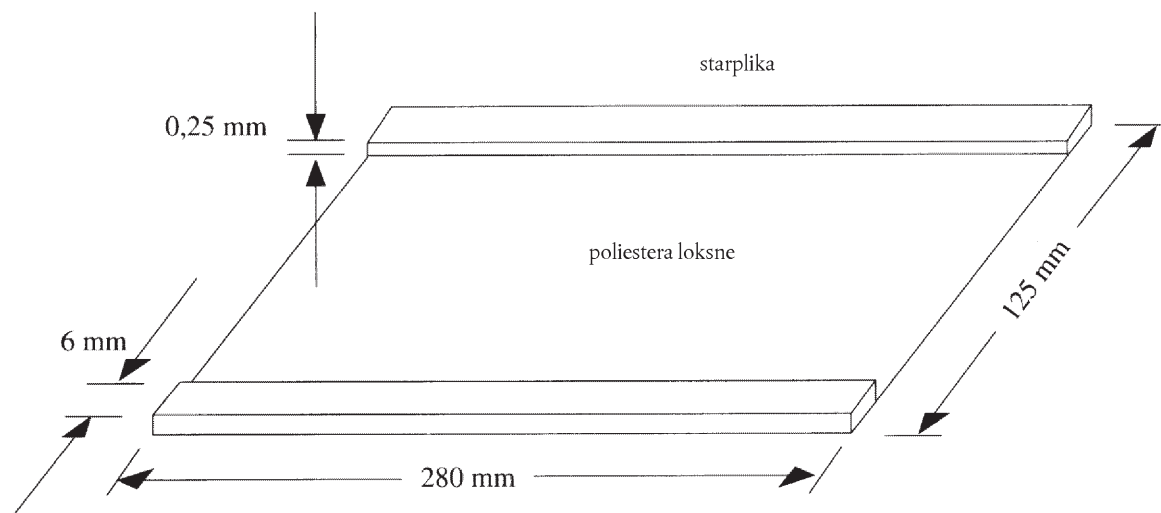
Lai noteiktu liellopu γ_2 - un γ_3 -kazeīnu maksimumu laukumu attiecību pret aitas, kazas un/vai bifeļmātes piena γ_2 - un γ_3 -kazeīnu maksimumu laukumiem (skat. 5. attēlu), ja iespējams, veic densimetriju (5.19. iedaļa). Salīdzina šo lielumu ar 1 % tā references standarta (aitas, kazas piens) vai tā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

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

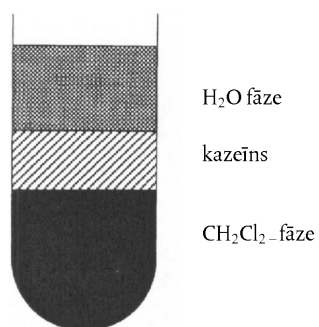
Paraugu novērtē kā pozitīvu, ja abu liellopu γ_2 - un γ_3 -kazeīnu vai atbilstīgo maksimumu laukumu attiecības ir 1 % vai lielākas par 1 % no daudzuma references standartā.

8. **Atsauces:**

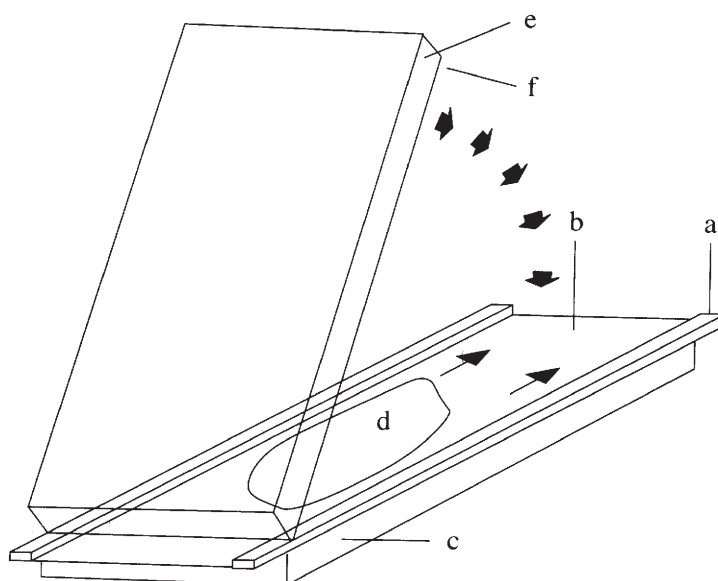
1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte - and carrier ampholyte/immobilized pH gradient - isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf und Ziegenmilch bzw.-käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. 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. attēls. Shematisks segloksnes zīmējums.

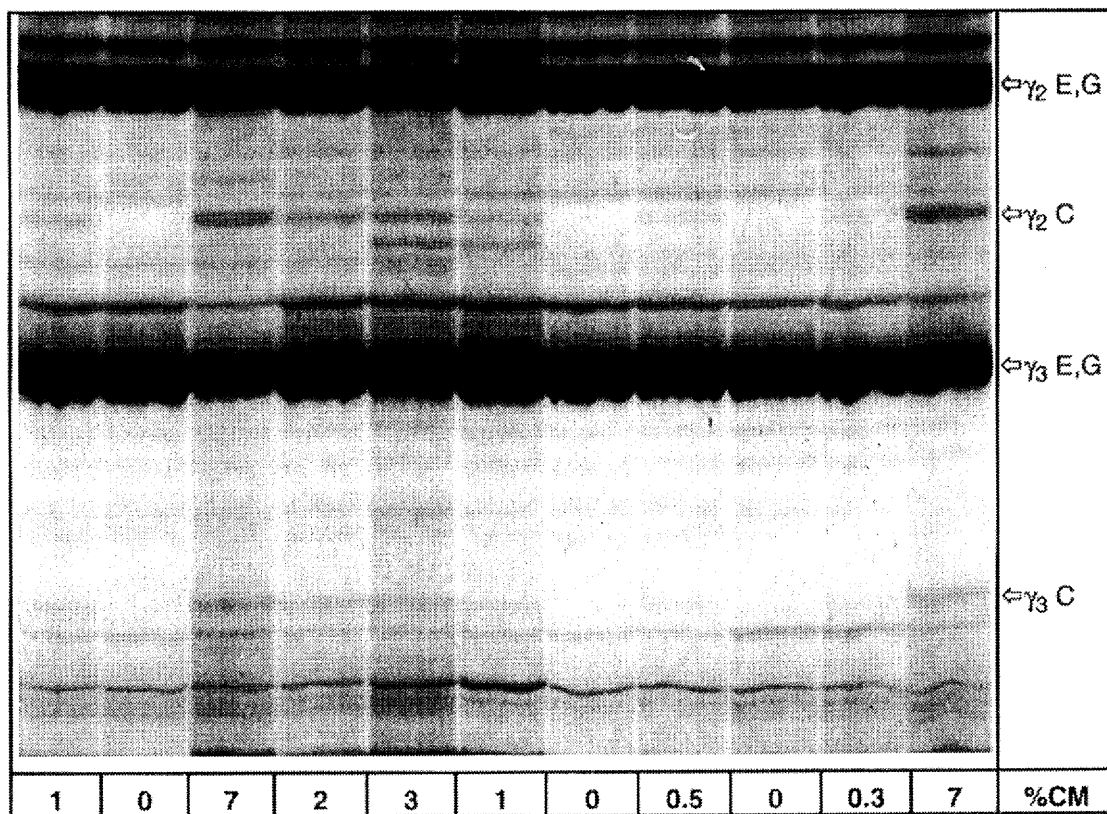


2. attēls. Kazeīna slānis, kas pēc centrifugēšanas atrodas starp ūdens fāzi un organisko fāzi.



3. attēls. Noliešanas paņēmieni ultraplāno poliakrilamīda gelu noliekšanai.

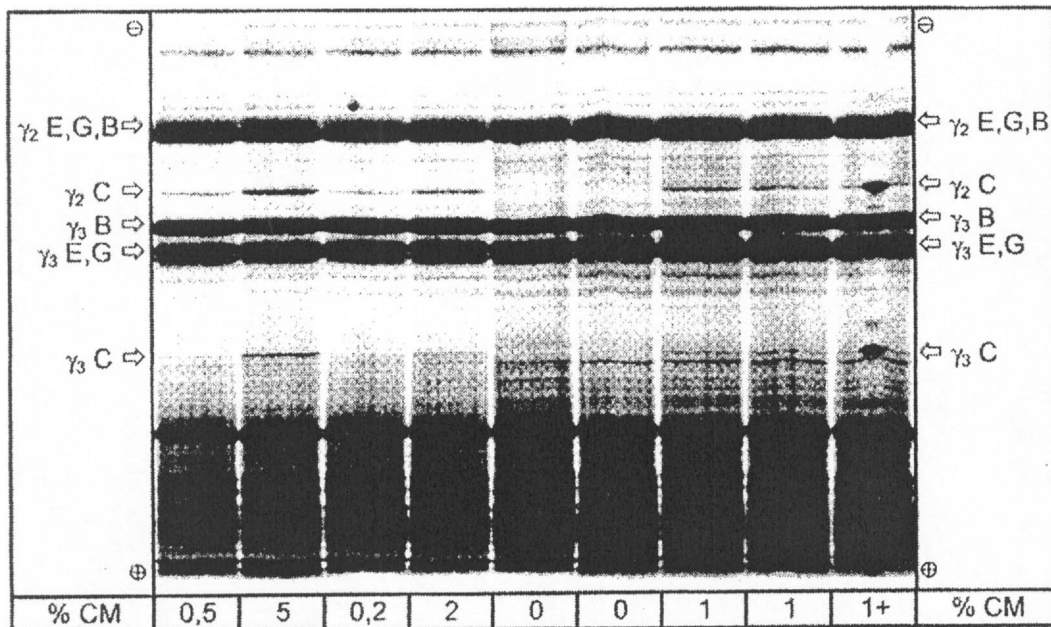
a = starpļika (0,25 mm); b = segloksne (5.3. iedaļa); c, e = stikla plates (5.1. iedaļa); d = gela šķīdums (4.1.2. iedaļa); f = gela nesējglazne (5.2. iedaļa)



4.a attēls. Izoelektriskā fokusēšana ar plazmīnu apstrādātiem kazeīniem no aitas un kazas piena sieriem, kuri satur dažādus govju piena daudzumus.

% CM = govju piena procentuālais daudzums, C = govju, E = aita, G = kaza

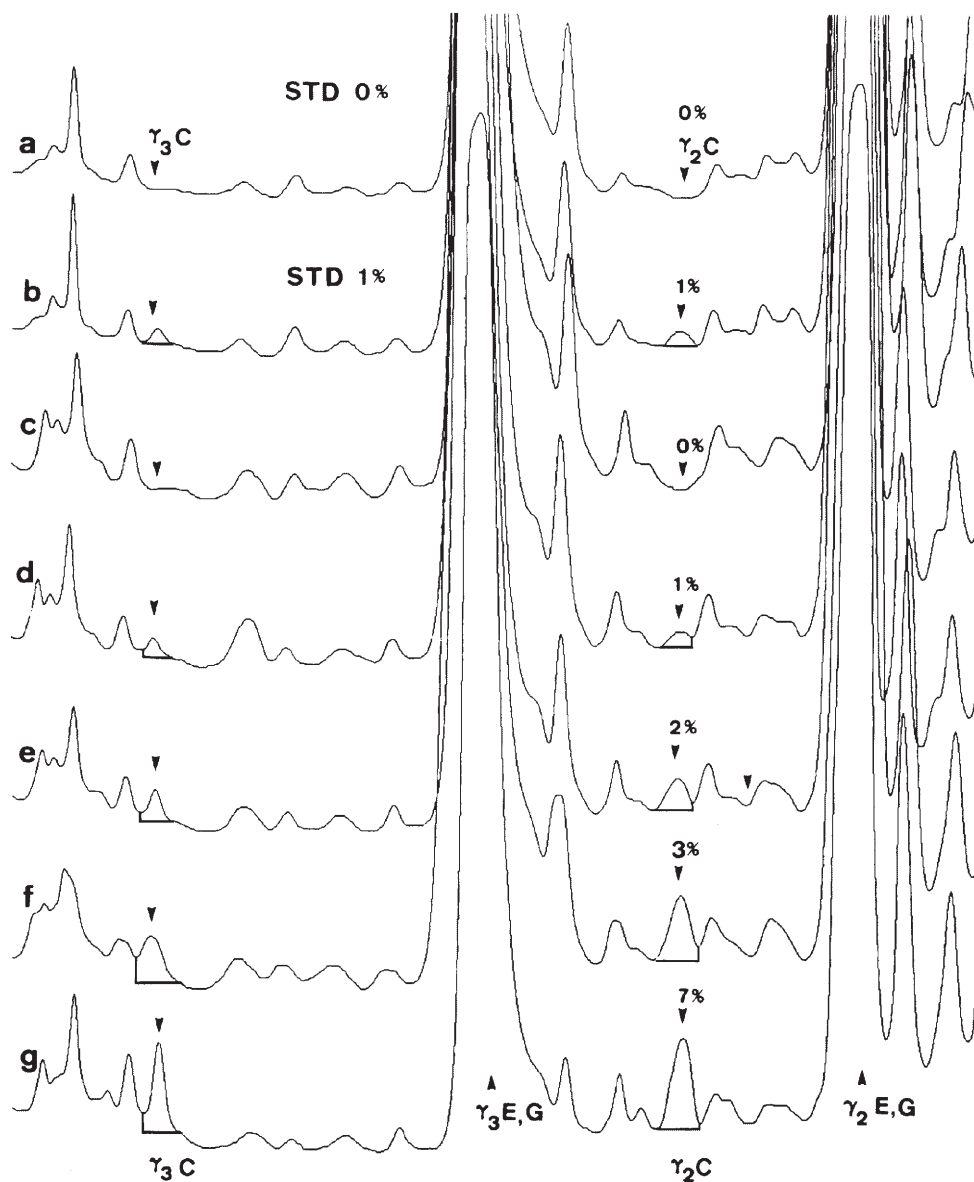
Parādīta IEF gela apakšējā daļa.



4.b attēls. Izoelektriskā fokusēšana ar plazmīnu apstrādātiem kazeīniem no sieriem, kas gatavoti no aitas, kazas un bifeļmātes piena, kurš satur dažādus govju piena daudzumus.

% CM = govju piena procentuālais daudzums; 1 + = paraugs, kas satur 1 % govju piena un tīru liellopu kazeīnu, kas parādās joslas vidū. C = govju, E = aita, G = kaza, B = bifeļmāte.

Parādīts IEF gela kopējais separācijas attālumus.



5. attēls. Standartu un siera paraugu, kas iegūti no aitas un kazas piena maisījumiem, densitogrammu (STD) superpozīcija pēc izoelektriskās fokusešanas.

a,b = standarti, kas satur 0 un 1 % govs piena; c-g = siera paraugi, kas satur 0, 1, 2, 3 un 7 % govs piena. C = govs, E = aita, G = kaza.

IEF gela apakšējā daļa skanēta pie $\lambda = 634$ nm.

XVI PIELIKUMS

(11. pants)

REFERENCES METODE KOLIBAKTĒRIJU KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANAI SVIESTĀ, SAUSAJĀ VĀJPIENĀ, KAZEĪNĀ UN KAZEINĀTOS

Pārbaudot kolibaktēriju klātbūtni sviestā, barotnē uzsēj paraugus, kas atbilst 1 g sviesta.

Ja kolibaktēriju klātbūtni pārbauda sausajam vājpienam vai kazeīnam/kazeinātiem, barotnē uzsēj 0,1 g paraugus.

Piemēro *IDF* Standartu 73A: 1985, B metodi ar šādām modifikācijām:

- 1) Paraugu sagatavo saskaņā ar *IDF* Standartu 122B:1992. Skābajam kazeīnam kā alternatīvu var izmantot parauga sagatavošanas procedūru, kas aprakstīta *IDF* Standartā 73A:1985.
- 2) Inkubē un vērtē tikai tās mēģenes, kurās uzsets attiecīgi 1 g paraugu (sviests) vai 0,1 g paraugu (sausais vājpiens, kazeīns/kazeināti). Neveic decimālatšķaidījumus.

Rezultātu vērtēšana

trīs negatīvi rezultāti: prasības izpildītas

divi vai trīs pozitīvi rezultāti: prasības nav izpildītas

divi negatīvi rezultāti: jāanalizē vēl divi paraugi, iesverot 1 g (sviesta) un 0,1 g (sausā vājpiena, kazeīna/kazeinātu)
ja pēdējie divi rezultāti ir negatīvi, prasības ir izpildītas; pretējā gadījumā prasības nav izpildītas

Piezīme

Kolibaktēriju saturs: vidēji 1/10 g sviestam; 1/g sausajam vājpienam, kazeīnam/kazeinātiem.

Rezultātus, kas norāda, ka prasības ir izpildītas, iegūst ar 93 % varbūtību.

Kolibaktēriju saturs: vidēji 1/g sviestam; 1/0,1 g sausajam vājpienam, kazeīnam/kazeinātiem.

Rezultātus, kas norāda, ka prasības nav izpildītas, iegūst ar 91 % varbūtību.

Pieņēmums: Puasona [*Poisson*] distribūcija)

XVII PIELIKUMS

(12. pants)

METODE LAKTOZES SATURA NOTEIKŠANAI PRODUKTOS AR KN KODU 2309 ⁽¹⁾

I DAĻA

1. Piemērošanas joma

Metode būtu jāpiemēro gadījumos, kad laktozes saturs pārsniedz 0,5 %.

2. Princips

Cukurus izšķīdina ūdenī. Ļauj darboties raugam (*Saccharomyces cerevisiae*); tas neskars laktozi. Pēc dzidrināšanas un filtrēšanas ar Lufa-Šorla [*Luff-Schoorl*] metodi nosaka laktozes saturu minētajā šķīdumā.

3. Reāģenti

Nātrija tiosulfāts 0,1 n.

Indikators: cietes šķīdums. Pievieno 5 g šķīstošās cietes (kā konservantu var pievienot 10 mg dzīvsudraba jodīda) un 30 ml ūdens maisījumu 1 l vāroša ūdens; maisījumu vāra trīs minūtes; ļauj atdzist.

Kālija jodīda šķīdums AR pie 30 % (m/V).

Sērskābes šķīdums 6 n.

Lufa-Šorla reāģents:

- izšķīdina 25 g no dzelzs attīrīta vara (II) sulfāta pentahidrāta ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 100 ml ūdens;
- izšķīdina 50 g citronskābes monohidrāta ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 50 ml ūdens;
- izšķīdina 143,8 g bezūdens nātrija karbonāta (Na_2CO_3) apmēram 300 ml karsta ūdens un ļauj atdzist.

Iepriekšējā b) iedaļā minēto šķīdumu pievieno pie c) iedaļā minētā šķīduma, viegli sakrata, tad pievieno a) iedaļā minēto šķīdumu. Papildina līdz 1l, pa nakti ļauj nostāvēties un tad filtrē. Pārbauda tādā veidā iegūtā reāģenta normalitāti (Cu 0,1 n; Na_2CO_3 2 n). pH jābūt apmēram 9,4.

Karesa [*Carrez*] I šķīdums: šķīdina 23,8 g Zn ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂·2H₂O un 3 g ledus etiķskābes ūdenī un papildina līdz 100 ml.

Karesa [*Carrez*] II šķīdums: šķīdina 10,6 g $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ūdenī un papildina līdz 100 ml.

Pumeka gabaliņus, kas vārot apstrādāti ar sāļsskābi, nomazgā ar ūdeni un žāvē. *Saccharomyces cerevisiae* suspensija: 25 g svaīga rauga 100 ml ūdens (ledusskapī neglabā ilgāk par vienu nedēļu).

4. Procedūra

Ar precizitāti līdz 1 mg analīzei nosver 1 g parauga; ievieto to 100 ml mērkolbā. Pievieno 25 līdz 30 ml ūdens. Kolbu uz trīsdesmit minūtēm ieliek verdošā ūdens vannā, pēc tam atdzesē līdz apmēram 35 °C temperatūrai.

Pievieno 5 ml rauga suspensijas ⁽²⁾ un krata. Atstāj mērkolbu un tās saturu ūdens peldē 38 līdz 40 °C temperatūrā uz divām stundām.

Pēc fermentēšanās atdzesē līdz apmēram 20 °C temperatūrai. Pievieno 2,5 ml Karesa [*Carrez*] I šķīduma un krata trīsdesmit sekundes; tad pievieno 2,5 ml Karesa [*Carrez*] II šķīduma un atkal krata trīsdesmit sekundes. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml, sajauc un filtrē. Ņem pipetē filtrāta daudzumu, kas nav lielāks par 25 ml un kas, ieteicams, satur 40 līdz 80 mg laktozes; vajadzības gadījumā tilpumu papildina ar ūdeni līdz 25 ml un nosaka bezūdens laktozes saturu ar Lufa-Šorla metodi.

Veic pilnu tukšo analīzi tikai ar raugu.

⁽¹⁾ Regula (EEK) Nr. 222/88

⁽²⁾ Produktiem, kas satur vairāk nekā 40 % fermentējama cukura, palielina suspensijas daudzumu

II DAĻA

1. Laktozes satura noteikšana ar Lufa-Šorla metodi.

Ar pipeti ņem 25 ml Lufa-Šorla reaģenta un liek to 300 ml Erlenmeijera [Erlenmeyer] kolbā; pievieno precīzi nomērītus 25 ml dzidrinātā šķīduma.

Pēc tam, kad pievienoti divi pumeka gabaliņi, karsē, kratot ar roku, uz vidēji lielas atklātas liesmas, šķīdumu apmēram divās minūtēs uzkaršējot līdz vārīšanās temperatūrai. Tūlīt liek Erlenmeijera kolbu uz metāla sieta ar azbesta ekrānu, zem kura iepriekš aizdegta liesma. To noregulē tā, lai Erlenmeijera kolbu sildītu tikai no apakšas; tad pievieno atteces dzesinātāju. No šā brīža vāra precīzi 10 minūtes. Tūlīt atdzesē aukstā ūdenī un pēc apmēram piecām minūtēm pārbauda šādi:

Šķīdumam pievieno 10 ml kālija jodīda un tūlīt pēc tam uzmanīgi (jo var notikt ievērojama uzputošanās) – 25 ml sērskābes 6 n.

Analīzi veic ar nātrija tiosulfātu, līdz kļūst redzams dzeltens iekrāsojums, un beigās pievieno cietes indikatoru.

To pašu analīzi veic maisījumam no precīzi 25 ml Lufa-Šorla reaģenta un 25 ml ūdens pēc 10 ml kālija jodīda un 6 n sērskābes pievienošanas, šoreiz nekarsē, līdz tas sāk vārīties.

Izmantojot turpmāk doto tabulu, nosaka laktozes daudzumu mg, kas atbilst divu testu rezultātu starpībai (izsaka 0,1 n nātrija tiosulfāta mililitros).

TABULA

Tabula 25 ml Lufa-Šorla reaģentam

(skat. nosacījumus tekstā)

1. Nātrija tiosulfāts 0,1 n.

2. Laktoze C₁₂H₂₂O₁₁.

1	2		1	2	
ml	mg	starpība	ml	mg	starpība
1	3,6	3,7	12	44,6	3,8
2	7,3	3,7	13	48,4	3,8
3	11,0	3,7	14	52,2	3,8
4	14,7	3,7	15	56,0	3,9
5	18,4	3,7	16	59,9	3,9
6	22,1	3,7	17	63,8	3,9
7	25,8	3,7	18	67,7	4,0
8	29,5	3,7	19	71,7	4,0
9	33,2	3,8	20	75,7	4,1
10	37,0	3,8	21	79,8	4,1
11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
		3,8	23	88,0	4,1

XVIII PIELIKUMS

(13. pants)

SIERA SŪKALU KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANA INTERVENCES KRĀJUMIEM PAREDZĒTAJĀ SAUSAJĀ VĀJPIENĀ AR GLIKOMAKROPEPTĪDU NOTEIKŠANU AUGSTSPIEDIENA ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJĀ (HPLC)**1. Piemērošanas joma un nozare**

Ar šo metodi var noteikt siera sūkulu klātbūtni sausajā vājpienā, kas paredzēts intervences krājumiem, nosakot glikomakropeptīdus.

2. Atsauce

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

3. Definīcija

Glikomakropeptīdu saturs sausajā vājpienā: masas procentos izteikts to vielu saturs, kuras noteiktas ar turpmāk izklāstīto metodi.

4. Princips:

- sausā vājpiena atjaunošana, tauku un olbaltumvielu atdalīšana ar trihloretiķskābi, pēc tam centrifugēšana,
- glikomakropeptīdu (GMP) daudzuma noteikšana centrifugātā ar augstspiediena šķidrums hromatogrāfiju (HPLC),
- tā rezultāta novērtēšana, kurš iegūts, paraugus salīdzinot ar standartparaugiem, kas sastāv no sausā vājpiena, kam ir vai nav pievienota zināma daļa sauso sūkulu.

5. Reaģenti

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

5.1. Trihloretiķskābes šķīdums

Izšķīdina ūdenī 240 g trihloretiķskābes (Cl_3CCOOH) un papildina līdz 1000 ml.

5.2. Eluenta šķīdums, pH 6,0

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

Papildina ar ūdeni līdz 1 000 ml un homogenizē.

Eluenta šķīdumu pirms izmantošanas filtrē ar membrānas filtru, kā poru diametrs ir 0,45 μm .

5.3. Skalošanas šķīdinātājs

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

Piezīme: Var izmantot jebkuru citu baktericīdas iedarbības skalošanas šķīdinātāju, kas nepasliktina kolonnas izšķirtspējas efektivitāti.

5.4. Standartparaugi

5.4.1. Sausais vājpiens, kas atbilst prasībām par minēto izšķirtspēju (t.i., [0]).

5.4.2. Tas pats sausais vājpiens, kam piejaukti 5 % (m/m) tādu sauso sūkulu ar siera fermentu, kurām ir standarta sastāvs (t.i., [5]).

6. Aparatūra

- 6.1. Analītiskie sviri.
- 6.2. Centrifūga, kas spēj sasniegt centrālās spēku 2 200 g un kas aprīkota ar aizbāžamām centrifūgas mēģenēm, kuru ietilpība ir aptuveni 25 ml.
- 6.3. Mehāniskais kratītājs.
- 6.4. Magnētiskais maisītājs.
- 6.5. Stikla piltuves ar aptuveni 7 cm diametru.
- 6.6. Filtrpapīrs ar aptuveni 12,5 cm diametru vidēji ātrai filtrēšanai.
- 6.7. Stikla filtrēšanas ierīce ar membrānas filtru, kura poru diametrs ir 0,45 μm.
- 6.8. Mērpipetes, ar kurām var iepildīt 10 ml (ISO 648, A klase vai ISO/R 835).
- 6.9. Ūdens vanna ar regulējamu temperatūru, kas noregulēta uz $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. HPLC iekārta, kuru veido šādas ierīces:
 - 6.10.1. Sūkņi.
 - 6.10.2. Rokas vai automātiskais inžektors ar 15 līdz 30 μl ietilpību.
 - 6.10.3. Divu TSK 2 000-SW kolonnu sistēma (garums 30 cm, iekšējais diametrs 0,75 cm) vai ekvivalentas kolonnas un priekškolonna (3 cm x 0,3 cm), kas piepildīta ar I 125 vai līdzvērtīgas iedarbības materiālu.
 - 6.10.4. Termiski regulējama kolonnas krāsns, kas noregulēta uz 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5. Maināma viļņu garuma UV detektors, kas ļauj veikt mērījumus 205 nm diapazonā ar jutību 0,008 A.
 - 6.10.6. Integrators, ar ko var veikt nepilnīgi sadalītu maksimumu [valley-to-valley] integrāciju.

Piezīme: Darbs ar kolonnām, ko uzglabā istabas temperatūrā ir iespējams, bet to izšķirtspēja ir mazliet mazāka. Šādā gadījumā temperatūra varētu atšķirties par mazāk nekā ± 5 °C katrā atsevišķā analīzu kārtā.

7. Paraugu ņemšana

- 7.1. Starptautiskais standarts ISO 707 – “Piens un piena produkti – Paraugu ņemšanas metodes”, atbilstīgi I pielikuma 2. punkta c) apakšpunkta pēdējās daļas norādījumiem.
- 7.2. Paraugu glabā apstākļos, kas aizkavē jebkādu produkta bojāšanos vai izmaiņas sastāvā.

8. Procedūra

- 8.1. *Testa parauga sagatavošana*

Sauso pienu ieber traukā, kura ietilpība ir apmēram divreiz lielāka par pulvera tilpumu un kuram ir hermētisks vāks. Trauku tūlīt aiztaisa. Sauso pienu labi sajauc, vairākkārt apvēršot trauku.
- 8.2. *Testa porcija*

Iesver $2,000 \pm 0,001$ g testa parauga centrifūgas mēģenē (6.2. iedaļa).
- 8.3. *Tauku un olbaltumvielu ņemšana*
 - 8.3.1. Testa porcijai pievieno 20 g silta ūdens (50 °C). Pulveri izšķīdina, piecas minūtes kratot ar mehānisko kratītāju (6.3. iedaļa). Atdzesē mēģeni līdz 25 °C.
 - 8.3.2. Divās minūtēs pievieno 10,0 ml trihloretiķskābes šķīduma (5.1. iedaļa), tikmēr maisot ar magnētisko maisītāju (6.4. iedaļa). Ieliek mēģeni ūdens vannā (6.9. iedaļa) un atstāj uz 60 minūtēm.
 - 8.3.3. Centrifugē (6.2. iedaļa) 10 minūtes pie 2 200 g vai filtrē ar filtrpapīru (6.6. iedaļa), izmetot pirmos 5 ml filtrāta.

8.4. *Hromatogrāfiskā noteikšana*

- 8.4.1. Iesmidzina 15 līdz 30 µl precīzi nomērīta centrifugāta vai filtrāta (8.3.3. iedaļa) HPLC aparatūrā (6.10. iedaļa), darbojoties ar plūsmas ātrumu – 1,0 ml eluenta šķīduma (5.2. iedaļa) minūtē.

Piezīmes:

1. Glabā eluenta šķīdumu (5.2. iedaļa) 85 °C temperatūrā visu hromatogrāfiskās analīzes laiku, lai saglabātu eluentu atgāzotu un aizkavētu baktēriju vairošanos. Var veikt visus piesardzības pasākumus ar līdzīgu ietekmi.
2. Katrā pārtraukumā izskalo kolonnas ar ūdeni. Nekad tajās neatstāj eluenta šķīdumu (5.2. iedaļa).

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

- 8.4.2. Testa parauga [E] hromatogrāfiskās analīzes rezultātā iegūst hromatogrammu, kurā katru maksimumu pēc tā aiztures laika (RT) identificē šādi:

- | | |
|---------------|---|
| II maksimums | otrais maksimums hromatogrammā, tā RT ir apmēram 12,5 minūtes |
| III maksimums | trešais maksimums hromatogrammā atbilstīgi GMP, tā RT ir 15,5 ± 1,0 minūtes |
| IV maksimums | ceturtais maksimums hromatogrammā, tā RT ir apmēram 17,5 minūtes |

Kolonnas kvalitāte var ietekmēt atsevišķo maksimumu aiztures laikus.

Integrētājs (6.10.6. iedaļa) automātiski aprēķina katra maksimuma laukumu A

- | | |
|------------------|-----------------------|
| A _{II} | II maksimuma laukums |
| A _{III} | III maksimuma laukums |
| A _{IV} | IV maksimuma laukums |

Pirms kvantitatīvas interpretācijas ir svarīgi novērtēt katras hromatogrammas izskatu, lai atklātu jebkuras novirzes sakarā ar iekārtas vai kolonnas nepareizu darbību vai analizējamā parauga izcelsmi vai īpašībām.

Ja ir šaubas, analīzes atkārtoti.

8.5. *Kalibrēšana*

- 8.5.1. Standartparaugiem (5.4. iedaļa) precīzi piemēro procedūru, kas aprakstīta no 8.2. iedaļas līdz 8.4.2. iedaļai.

Izmanto svaigi sagatavotus šķīdumus, jo GMP degradējas 8 % trihloretikskābes vidē. Zudumus novērtē kā 0,2 % stundā, ja temperatūra ir 30 °C.

- 8.5.2. Pirms paraugu hromatogrāfiskās noteikšanas, kolonnas kondicionē, atkārtoti iesmidzinot standarta paraugu (5.4.2. iedaļa) šķīdumā (8.5.1. iedaļa), kamēr GMP atbilstīgā maksimuma laukums un aiztures laiks kļūst konstants.

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

9. **Rezultātu izteikšana**

- 9.1.
- Aprēķina metode un formulas*

- 9.1.1. Atbilstības koeficientu R aprēķināšana:

$$\text{II maksimums:} \quad R_{\text{II}} = \frac{100}{A_{\text{II}}[0]}$$

$$\text{IV maksimums:} \quad R_{\text{IV}} = \frac{100}{A_{\text{IV}}[0]}$$

kur

R_{II} un R_{IV} = attiecīgi II un IV maksimuma atbilstības koeficienti,

A_{II} [0] un A_{IV} [0] = attiecīgi standartparauga [0], kas iegūts, kā noteikts 8.5.3. iedaļā, II un IV maksimuma laukumi.

$$\text{III maksimums:} \quad R_{\text{III}} = \frac{W}{A_{\text{III}}[5] - A_{\text{III}}[0]}$$

kur

R_{III} = III maksimuma atbilstības koeficients,

A_{III} [0] un A_{III} [5] = attiecīgi standartparaugu [0] un [5], kas iegūti, kā noteikts 8.5.3. iedaļā, III maksimuma laukumi,

W = sūkļu daudzums standartparaugā [5], t.i., 5.

9.1.2. Relatīvo maksimumu laukumu aprēķināšana paraugā [E]:

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

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

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

kur

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

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = attiecīgi parauga [E], kas iegūts, kā noteikts 8.4.2., II, III un IV maksimuma relatīvais laukums,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = atbilstības koeficienti, kas aprēķināti, kā noteikts 9.1.1. iedaļā.

9.1.3. Parauga [E] III maksimuma relatīvā aiztures laika aprēķins:

$$RRT_{III} [E] = \frac{RT_{III} [E]}{RT_{III} [5]}$$

kur

$RRT_{III} [E]$ = parauga [E] III maksimuma relatīvais aiztures laiks,

$RT_{III} [E]$ = parauga [E], kas iegūts, kā noteikts 8.4.2. iedaļā, III maksimuma relatīvais aiztures laiks,

$RT_{III} [5]$ = kontrolparauga [5], kas iegūts, kā noteikts 8.5.3. iedaļā, III maksimuma aiztures laiks.

9.1.4. Eksperimentos ir pierādīts, ka pastāv lineāra sakarība starp relatīvo III maksimuma aiztures laiku, t.i., $RRT_{III} [E]$ un pievienotajām sausajām sūkalām, ja to daudzums ir līdz 10 %.

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

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

Pieļaujamās RRT_{III} lielumu svārstības ir $\pm 0,002$.

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

9.2. Sauso siera sūkalu procenta aprēķins paraugā:

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

kur

W = siera sūkalu masas procents paraugā [E];

$S_{III} [E]$ = analīžu parauga [E], kas iegūts kā norādīts 9.1.2. iedaļā, III maksimuma relatīvais laukums;

1,3 = nozīmē III maksimuma vidējo relatīvo laukumu, kas izteikts gramos siera sūkalu uz 100 g produkta un kas noteikts dažādas izcelsmes sausajā vājpienā bez piejaukumiem. Šis skaitlis ir iegūts eksperimentāli;

$S_{III} [0]$ = apzīmē III maksimuma vidējo relatīvo laukumu, kas ir vienāds ar $R_{III} \times A_{III} [0]$. Šos lielumus iegūst, kā noteikts attiecīgi 9.1.1. un 8.5.3. iedaļā;

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = nozīmē korekciju, kas jāveic attiecībā uz vidējo relatīvo laukumu 1,3, ja $S_{III} [0]$ nav vienāds ar 0,9. Eksperimentāli vidējais III maksimuma kontrolparauga [0] relatīvais laukums ir 0,9.

9.3. Procedūras precizitāte

9.3.1. Atkārtojamība.

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

9.3.2. Sakritība.

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

9.4. Interpretācija

- 9.4.1. Pieņem, ka paraugā nav sūkalu, ja relatīvais III maksimuma laukums $S_{III} [E]$, kas izteikts gramos siera sūkalu uz 100 g produkta, ir $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$

kur

2,0 = ir maksimālais lielums, kas pieļaujams III maksimuma relatīvajam laukumam, ņemot vērā III maksimuma relatīvā laukuma, t.i., 1,3, mainīgumu saistībā ar sausā vājpiena sastāva izmaiņām un metodes sakritību (9.3.2. iedaļa).

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = ir korekcija, kas jāizdara, ja laukums $S_{III} [0]$ atšķiras no 0,9 (sk. 9.2. punktu).

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

- 9.4.3. Ja III maksimuma relatīvais laukums $S_{III} [E]$ ir $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ un II maksimuma relatīvais laukums $S_{II} [E] \leq 160$, tad nosaka kopējo olbaltumvielu saturu (P %); tad novērtē pēc 1. un 2. grafika.

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

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

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

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

$$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7 \quad (1. \text{ grafiks}),$$

$$S_{III} = 0,0123 S_{II}[E] + 0,93 \quad (2. \text{ grafiks}),$$

kur attiecīgi

S_{III} ir III maksimuma relatīvais laukums, kas aprēķināts vai nu pēc kopējā olbaltumvielu satura, vai pēc $S_{II} [E]$ maksimuma relatīvā laukuma,

P% ir kopējais olbaltumvielu saturs, kas izteikts svara procentos,

$S_{II} [E]$ ir parauga relatīvais laukums, kas aprēķināts, kā noteikts 9.1.2. iedaļā.

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

Neatbilstību (T_1 un T_2) starp noteikto relatīvo laukumu $S_{III} [E]$ un relatīvo laukumu S_{III} izsaka šādi:

$$T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

$$T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

- 9.4.3.2. Ja T_1 un/vai T_2 ir nulle vai mazāk, sūkalu klātbūtni nevar noteikt.

Ja T_1 un T_2 ir virs nulles, tad sūkalu klātbūtne ir noteikta

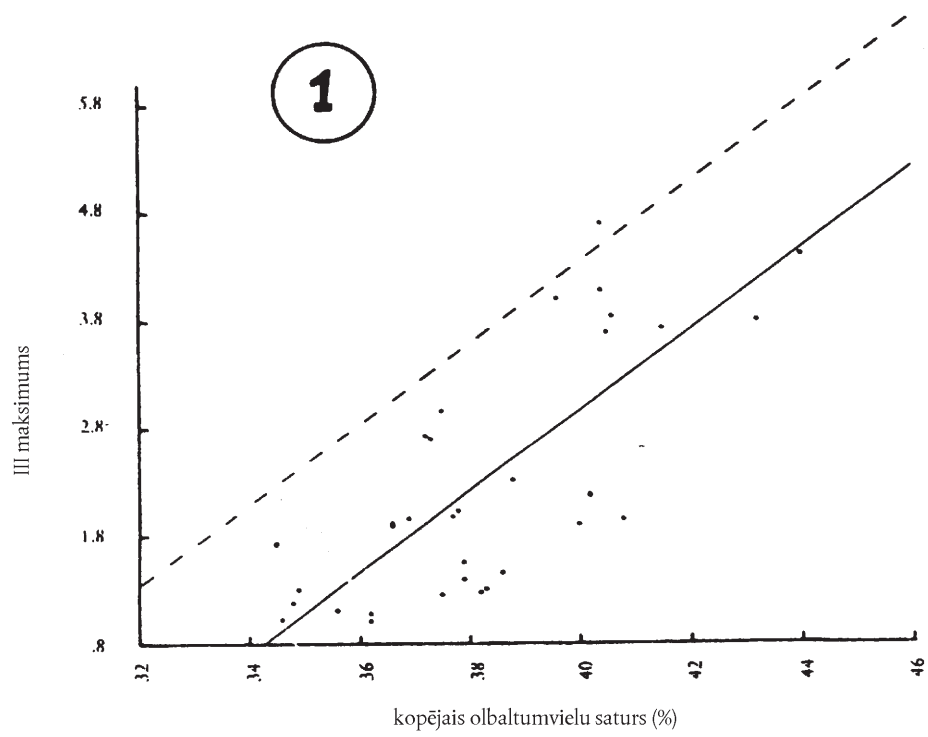
Siera sūkalu daudzumu aprēķina saskaņā ar šādu formulu:

$$W = T_2 + 0,91$$

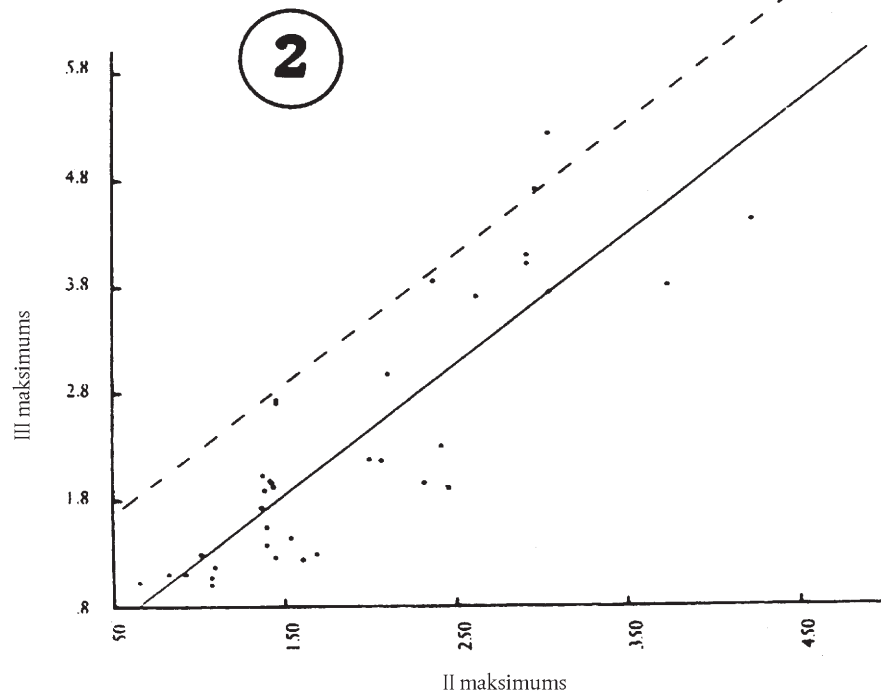
kur

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

SAUSAIS VĀJPIENS



SAUSAIS VĀJPIENS



XIX PIELIKUMS

(13. pants)

SIERA SŪKALU SAUSNAS NOTEIKŠANA SAUSAJĀ VĀJPIENĀ UN MAISĪJUMOS, KAS MINĒTI REGULĀ
(EK) Nr. 2799/19991. **Mērķis: Siera sūkaku klātbūtnes noteikšana:**

- a) sausajā vājpienā, kas definēts Regulas (EK) Nr. 2799/1999 2. pantā, un
- b) maisījumos, kas definēti Regulas (EK) Nr. 2799/1999 4. pantā.

2. **Atsauces: Starptautiskais standarts ISO 707**3. **Definīcija**

Siera sūkaku sausnas saturu definē kā masas procentus, ko nosaka, kā paredzēts aprakstītajā procedūrā.

4. **Princips**

A glikomakropeptīdu saturu nosaka saskaņā ar XVIII pielikumu. Paraugiem, kam iegūti pozitīvi rezultāti, ar apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfijas procedūru (HPLC procedūra) nosaka A glikomakropeptīdus. Rezultātu novērtē pret standartparaugiem, kas sastāv no sausā vājpiena ar zināmu procentuālo daļu sauso sūkaku vai bez tām. Rezultāti, kas pārsniedz 1 % (m/m), norāda uz siera sūkaku sausnas klātbūtni.

5. **Reāģenti**

Visiem reāģentiem jābūt ar atzītu analītisko kvalitāti. Jāizmanto destilēts ūdens vai ūdens ar vismaz līdzvērtīgu tīrību. Acetonitrilam jābūt ar spektroskopisku vai HPLC kvalitāti.

Procedūrai vajadzīgie reāģenti ir aprakstīti šīs regulas XVIII pielikumā.

Reāģenti HPLC apgrieztajai fāzei.

5.1. *Trihloretiķskābes šķīdums*

Izšķīdina ūdenī 240 g trihloretiķskābes (CCl₃CCOOH) un papildina līdz 1 000 ml.

5.2. *Eluenti A un B*

Eluents A: mērkolbā, kā ietilpība ir 1 000 ml, ielej 150 ml acetnitrila (CH₃CN), 20 ml izopropanola (CH₃CHOHCH₃) un 1,00 ml trifluoretiķskābes (TFA, CF₃COOH). Papildina ar ūdeni līdz 1 000 ml. Eluents B: mērkolbā, kā ietilpība ir 1 000 ml, ielej 550 ml acetnitrila, 20 ml izopropanola un 1,00 ml TFA. Papildina ar ūdeni līdz 1 000 ml. Eluenta šķīdumu pirms izmantošanas filtrē ar membrānas filtru, kā poru diametrs ir 0,45 μm.

5.3. *Kolonnas saglabāšana*

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

5.4. *Standartparaugi*

- 5.4.1. Sausais vājpiens, kas atbilst prasībām attiecībā uz intervences krājumiem (t.i., [0]).
- 5.4.2. Tas pats sausais vājpiens, kuram piemaisīti 5 % (m/m) tādu sauso sūkaku ar siera fermentu, kurām ir standarta sastāvs (t.i., [5]).
- 5.4.3. Tas pats sausais vājpiens, kuram piemaisīti 50 % (m/m) tādu sauso sūkaku ar siera fermentu, kurām ir standarta sastāvs (t.i., [50])⁽¹⁾.

6. **Aparatūra**

Procedūrai vajadzīgā aparatūra ir aprakstīta šīs regulas XVIII pielikumā.

- 6.1. 6.1.1. Analītiskie svāri.
- 6.2. Centrifūga, kas spēj sasniegt centrālās spēku 2 200 g un kas aprīkota ar aizbāžamām centrifūgas mēģenēm, kuru ietilpība ir aptuveni 50 ml.

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

- 6.3. Mehāniskais kratītājs, ar ko var veikt kratīšanu 50 °C temperatūrā.
- 6.4. Magnētiskais maisītājs.
- 6.5. Stikla piltuves, diametrs aptuveni 7 cm.
- 6.6. Filtrpapīrs ar aptuveni 12,5 cm diametru vidēji ātrai filtrēšanai.
- 6.7. Stikla filtrēšanas ierīce ar membrānas filtru, kura poru diametrs ir 0,45 µm.
- 6.8. Mērpipetes, ar kurām var iepildīt 10 ml (ISO 648, A klase vai ISO/R 835), vai sistēma, ar ko divās minūtēs var pārnest 10,0 ml.
- 6.9. Ūdens vanna ar regulējamu temperatūru, kas noregulēta uz 25 ± 0,5 °C.
- 6.10. HPLC iekārta, kā sastāvdaļas ir šādas:
 - 6.10.1. Bināra gradientu sūknēšanas sistēma.
 - 6.10.2. Rokas vai automātiskais inžektors ar 100 līdz 30 µl ietilpību.
 - 6.10.3. Dupont Protein Plus kolonna (garums 25 cm, iekšējais diametrs 0,46 cm) vai līdzvērtīga lielporu silīcija apgrieztās fāzes kolonna.
 - 6.10.4. Kolonnu žāvēšanas skapis ar termostatu, kas noregulēts uz 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5. Mainīga viļņu garuma UV detektors, kas ļauj veikt mērījumus pie 210 nm (vajadzības gadījumā var izmantot lielāku viļņu garumu līdz 220 nm) ar 0,02 Å jutību.
 - 6.10.6. Integrators, ar ko var veikt nepilnīgi sadalītu maksimumu [valley-to-valley] integrāciju.

Piezīme

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

7. Paraugu ņemšana

- 7.1. Paraugi jāpaņem saskaņā ar Starptautiskajā standartā ISO 707 noteikto procedūru. Tomēr dalībvalstis var izmantot citu paraugu ņemšanas metodi ar noteikumi, ka šī metode atbilst principiem, kas izklāstīti iepriekšminētajā standartā.
- 7.2. Paraugu glabā apstākļos, kas nepieļauj nekādu produkta bojāšanos vai sastāva izmaiņas.

8. Procedūra

- 8.1. *Testa parauga sagatavošana*

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

Centrifūgas mēģenē (6.2. iedaļa) vai piemērotā noslēdzamā mēģenē (50 ml) iever 2,00 ± 0,001 g testa parauga.
- 8.3. *Tauku un olbaltumvielu atdalīšana*
 - 8.3.1. Testa porcijai pievieno 20,0 g silta ūdens (50 °C). Izmantojot mehānisko kratītāju (6.3. iedaļa), izšķīdina pulveri, kratot piecas minūtes vai - skābkrējuma paniņu gadījumā - 30 minūtes. Mēģeni liek ūdens vannā (6.9. iedaļa) un ļauj temperatūrai stabilizēties līdz 25 °C.
 - 8.3.2. Pastāvīgi divu minūšu laikā 25 °C temperatūrā pievieno 10,0 ml trihloretikskābes šķīduma (5.1. iedaļa), tikmēr enerģiski maisot ar magnētisko maisītāju (6.4. iedaļa). Ieliek mēģeni ūdens vannā (6.9. iedaļa) un atstāj uz 60 minūtēm.
 - 8.3.3. Centrifugē (6.2. iedaļa) 10 minūtes 2 200 g vai filtrē ar filtrpapīru (6.6. iedaļa), izmetot pirmos 5 ml filtrāta.
- 8.4. *Hromatogrāfiskā noteikšana*
 - 8.4.1. Veic HPLC analīzi, kā aprakstīts XVIII pielikumā. Ja iegūst negatīvu rezultātu, analizētais paraugs nosakāmajos daudzumos nesatur siera sūkalu sausnu. Ja rezultāts ir pozitīvs, jāpiemēro turpmāk aprakstītā apgrieztās fāzes HPLC procedūra. Skābkrējuma sauso paniņu klātbūtne var dot kļūdaini pozitīvus rezultātus. Apgrieztās fāzes HPLC metode izslēdz šādu iespēju.

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

Ņem standarta paraugu šķīdumus (5.4. iedaļa), kuros ir vai nav 50 % siera sūkalu.

Iesmidzina 100 µl centrifugāta vai filtrāta (8.3.3. iedaļa) HPLC aparatūrā, kas darbojas saskaņā ar 1. tabulā paredzētajiem testa gradienta nosacījumiem.

1. tabula

Testa gradienta nosacījumi hromatogrāfijas optimizēšanai

laiks (minūtes)	plūsma (ml/minūtes)	% A	% B	līkne
Sākums	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

Divu hromatogrammu salīdzinājumam jāatklāj (GMP_A maksimuma) atrašanās.

Ar turpmāk doto formulu var aprēķināt šķīdinātāju sākotnējo sastāvu, kas izmantojams parastam gradientam (skat. 8.4.3. iedaļu).

$$\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{GMPA} - 26/6)) * 30/27$$

$$\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{GMPA} - 26/6)) * 1,11,$$

kur

- RT_{GMPA}: GMP_A aiztures laiks testa gradientā,
 10: testa gradienta sākotnējais % B,
 2,5: % B viduspunktā mīnus % B sākumā parastajā gradientā,
 13,5: testa gradienta viduspunkta laiks,
 26: prasītais GMP_A aiztures laiks,
 6: testa un parastā gradienta kāpumu skaits,
 30: % B sākumā mīnus % B testa gradienta 27 minūtēs,
 27: testa gradienta ilgums,

- 8.4.3. Ņem testa paraugu šķīdumus.

Iesmidzina 100 µl precīzi nomērīta centrifugāta vai filtrāta (8.3.3. iedaļa) HPLC aparatūrā, kas darbojas ar plūsmas ātrumu 1,0 ml eluenta šķīduma (5.2. iedaļa) minūtē.

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

Piezīmes

- Glikomakropeptīda aiztures laikam vajadzētu būt 26 ± 2 minūtēm. To var panākt, mainot pirmā gradienta sākotnējos un beigu apstākļus. Tomēr % B starpībai pirmā gradienta sākuma un beigu apstākļos jāpaliek 5 % B.
- Eluentiem vajadzētu būt pietiekami degazētiem un tiem arī būtu jāpaliek degazētiem. Tas ir būtisks nosacījums pareizai gradientu sūkņēšanas sistēmas darbībai. GMP maksimuma aiztures laika standartnovirzei vajadzētu būt mazākai par 0,1 minūti (n = 10).
- Pēc katriem pieciem paraugiem (5. iedaļa) būtu jāiesmidzina references paraugs un jāizmanto, lai aprēķinātu jauno atbilstības koeficientu R (9.1.1. iedaļa)

- 8.4.4. Testa parauga [E] hromatogrāfiskās analīzes rezultātus iegūst kā hromatogrammu, kurā GMP maksimumu nosaka pēc tā aiztures laika, kas ir apmēram 26 minūtes.

Integrators (6.10.6. iedaļa) automātiski aprēķina GMP maksimuma augstumu H. Katrā hromatogrammā jāpārbauda bāzes līnijas atrašanās. Ja bāzes līnija atrodas nepareizā vietā, tad analīze vai integrācija būtu jāatkārto.

Pirms kvantitatīvas interpretācijas, ir svarīgi novērtēt katras hromatogrammas izskatu, lai atklātu jebkuras novirzes sakarā ar iekārtas vai kolonnu nepareizu darbību vai analizētā parauga izcelsmi vai pamatīpašībām. Ja rodas šaubas, analīzi atkārto.

8.5. Kalibrēšana

- 8.5.1. Standartparaugiem (5.4.1. līdz 5.4.2. iedaļa) precīzi piemēro procedūru, kas aprakstīta 8.2. līdz 8.4.4. iedaļā Izmanto svaigi sagatavotus šķīdumus, jo GMP degradējas 8 % trihloretihskābes vidē istabas temperatūrā. Šķīdums saglabā stabilitāti 24 stundas 4 °C temperatūrā. Ja tiek veiktas garas analīžu virknes, automātiskajā inžektorā vēlams izmantot atdzesētu paraugu paplāti.

Piezīme

8.4.2. Var izlaist, ja % B sākotnējos apstākļos ir zināmi no iepriekšējām analīzēm.

References parauga (5. iedaļa) hromatogrammai vajadzētu būt analogai 1. attēlā parādītajai. Minētajā attēlā pirms GMP_A maksimuma ir divi mazi maksimumi. Ir būtiski iegūt līdzīgu atdalīšanos.

- 8.5.2. Pirms paraugu hromatogrāfiskās noteikšanas iesmidzina 100 μ l standartparauga bez siera sūkalām [0] (5.4.1. iedaļa).

GMP_A maksimuma aiztures laikā hromatogrammā nevajadzētu parādīties maksimumam.

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

9. Rezultātu izteikšana

9.1. Aprēķina metode un formulas

- 9.1.1. Atbilstības koeficienta R aprēķināšana:

GMP maksimums: $R = W/H$,

kur

R= GMP maksimuma atbilstības koeficients,

H= GMP maksimuma augstums,

W= sūkalu daudzums standartparaugā (5. iedaļa).

- 9.2. Sauso siera sūkalu procentuālās daļas aprēķināšana paraugā

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

kur

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

R= GMP maksimuma atbilstības koeficients (9.1.1. iedaļa),

H(E)= parauga (E) GMP maksimuma augstums.

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

9.3. Procedūras precizitāte

- 9.3.1. Atkārtojamība.

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, vienam un tam pašam analītiķim veicot divas noteikšanās vienlaicīgi vai uzreiz vienu pēc otras identiskiem testa materiāliem ar to pašu aparāturu, nepārsniedz 0,2 % m/m.

9.3.2. Sakritība.

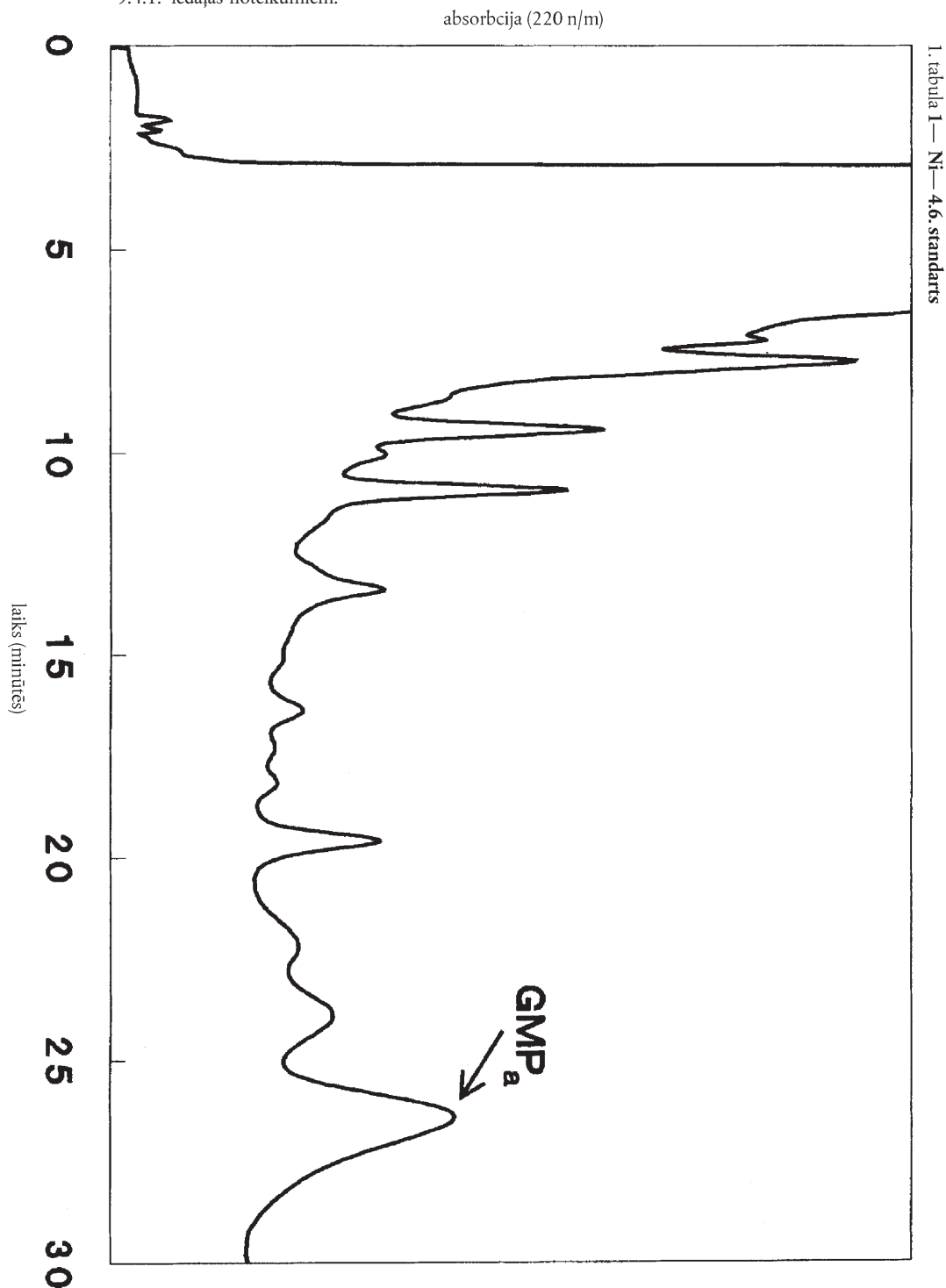
Vēl nav noteikta.

9.3.3. Linearitāte.

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

9.4. Interpretācija

9.4.1. Uzskata, ka sūkalas ir klāt, ja 9.2. punktā iegūtie rezultāti ir lielāki par 1 % m/m un GMP maksimuma aiztures laiks atšķiras mazāk nekā par 0,2 minūtēm no standartparauga (5. iedaļa) GMP maksimuma aiztures laika. Robeža 1 % ir noteikta saskaņā ar Regulas (EEK) Nr. 625/78 V pielikuma 9.2. un 9.4.1. iedaļas noteikumiem.



XX PIELIKUMS

(14. pants)

SAUSAIS VĀJPIENS: FOSFATIDILSERĪNA UN FOSFATIDILETANOLAMĪNA DAUDZUMA NOTEIKŠANA

Metode: HPLC apgrieztā fāze

1. Mērķis un piemērošanas joma

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

2. Definīcija

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

3. Princips

Aminofosfolipīdu ekstrakcija ar metanolu no atjaunota sausā piena. PS un PE kā o-ftaldialdehīda (OPA) atvasinājumu noteikšana ar HPLC apgriezto fāzi (RP) un fluorescences atklāšana. PS un PE satura kvantifikācija testa paraugā pret standartparaugu, kas satur zināmu daudzumu PEDP.

4. Reāģenti

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

4.1. Standartmateriāls: PEDP ar vismaz 99 % tīrību

Piezīme: Standartmateriāls jāuzglabā -18 °C temperatūrā.

4.2. Reāģenti standartparaugu un testa paraugu sagatavošanai

4.2.1. Metanols ar HPLC tīrības pakāpi.

4.2.2. Hloroforms ar HPLC tīrības pakāpi.

4.2.3. Triptamīna monohidrohlorīds.

4.3. Reāģenti o-ftaldialdehīda atvasināšanai

4.3.1. Nātrija hidroksīda 12 M šķīdums ūdenī

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

4.3.3. 2-merkaptoetanolis.

4.3.4. o-ftaldialdehīds (OPA).

4.4. HPLC eluēšanas šķīdinātāji

Eluēšanas šķīdinātāji jāgatavo, izmantojot reāģentus ar HPLC tīrības pakāpi.

4.4.1. Ūdens ar HPLC tīrības pakāpi.

4.4.2. Metanols ar fluorimetriski testētu tīrību.

4.4.3. Tetrahidrofurāns.

4.4.4. Nātrija dihidrogēnfosfāts.

4.4.5. Nātrija acetāts.

4.4.6. Etiķskābe.

5. Aparatūra

5.1. Analītiskie svāri.

5.2. Mērglāzes ar 25 un 100 ml ietilpību.

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

5.4. Magnētiskais maisītājs.

- 5.5. Mērpipetes, ar kurām var iepildīt 0,2, 0,5 un 5 ml.
- 5.6. Mērkolbas ar 10, 50 un 100 ml ietilpību.
- 5.7. Šļircis ar 20 un 100 µl ietilpību.
- 5.8. Ultraskaņas vanna.
- 5.9. Centrifūga, kas darbojas ar 27 000 x g
- 5.10. Stikla pudelītes ar aptuveni 5 ml ietilpību.
- 5.11. Mērcilindrs ar 25 ml ietilpību.
- 5.12. pH mērītājs.
- 5.13. HPLC iekārta.
 - 5.13.1. Gradiēta sūkņēšanas sistēma, kas spēj darboties ar 1,0 ml/min 200 bāru spiedienā.
 - 5.13.2. Automātisks paraugu noņēmējs ar atvasināšanas spēju.
 - 5.13.3. Kolonnas sildītājs, kas noregulēts uz 30 °C.
 - 5.13.4. Fluorescences detektors, kas noregulēts uz 330 nm indukcijas viļņu garumu un uz 440 nm emisijas viļņu garumu.
 - 5.13.5. Integrators vai datu apstrādes programmatūra, kas spēj izmērīt maksimumu laukumu.
 - 5.13.6. Lihrosfēra - 100 kolonnas (250 x 4,6 mm) vai līdzvērtīgas kolonnas, kas pildītas ar oktadecilsilānu (C 18), kura daļiņu izmērs ir 5 µm.

6. Paraugu ņemšana

Paraugu ņemšana jāveic saskaņā ar IDF Standartu 50B:1985.

7. Procedūra

7.1. Iekšējā standartšķīduma sagatavošana

Mērkolbā ar 100 ml ietilpību (5.6. iedaļa) iesver $30,0 \pm 0,1$ mg triptamīna monohidrohlorīda (4.2.3. iedaļa) un papildina līdz zīmei ar metanolu (4.2.1. iedaļa). Ar pipeti (5.3. iedaļa) iepilina 1 ml šā šķīduma mērkolbā ar 10 ml ietilpību (5.6. iedaļa) un papildina līdz zīmei ar metanolu (4.2.1. iedaļa), lai iegūtu 0,15 mM triptamīna koncentrāciju.

7.2. Testa parauga šķīduma sagatavošana

Vārglāzē ar 25 ml ietilpību (5.2. iedaļa) iesver $1,000 \pm 0,001$ g SV parauga. Ar pipeti (5.3. iedaļa) pievieno 10 ml destilēta ūdens, kā temperatūra ir 40 °C, un maisa ar magnētisko maisītāju (5.4. iedaļa) 30 minūtes, lai izšķīdinātu visus kunkuļus. Mērkolbā ar 10 ml ietilpību (5.6. iedaļa) ar pipeti iepilina 0,2 ml (5.5. iedaļa) atjaunota piena, pievieno 100 µl 0,15 mM triptamīna šķīduma (7.1. iedaļa), izmantojot šļirci (5.7. iedaļa), un papildina tilpumu ar metanolu (4.2.1. iedaļa). Apgriežot otrādi ultraskaņas vannā, 15 minūtes uzmanīgi maisa (5.8. iedaļa). Centrifugē (5.9. iedaļa) 10 minūtes pie 27 000 x g un savāc centrifugātu stikla pudelītē (5.10. iedaļa).

Piezīme: Līdz HPLC analīzu veikšanai, testa parauga šķīdums jāglabā 4 °C temperatūrā.

7.3. Ārējā standartšķīduma sagatavošana

Mērkolbā ar 50 ml ietilpību (5.6. iedaļa) iesver 55,4 mg PEDP (4.1. iedaļa) un, izmantojot mērcilindru (5.11. iedaļa), pievieno apmēram 25 ml hloroforma (4.2.2. iedaļa). Karsē aizkorķēto kolbu līdz 50 °C un rūpīgi sajauc, līdz PEDP izšķīst. Atdzesē kolbu līdz 20 °C, tilpumu papildina ar metanolu (4.2.1. iedaļa) un maisa, apgāžot otrādi. Mērkolbā ar 100 ml ietilpību (5.6. iedaļa) ar pipeti iepilina 1 ml (5.3. iedaļa) šā šķīduma un papildina tilpumu ar metanolu (4.2.1. iedaļa). Mērkolbā ar 10 ml ietilpību (5.6. iedaļa) ar pipeti iepilina 1 ml (5.3. iedaļa) šā šķīduma, pievieno 100 µl (5.7. iedaļa) 0,15 mM triptamīna šķīduma (7.1. iedaļa) un papildina tilpumu ar metanolu (4.2.1. iedaļa). Sajauc, apgriežot otrādi.

Piezīme: Līdz HPLC analīzu veikšanai, references parauga šķīdums būtu jāglabā 4 °C temperatūrā.

7.4. Atvasināšanas reaģenta sagatavošana

Mērkolbā ar 10 ml ietilpību (5.6. iedaļa) iesver $25,0 \pm 0,1$ mg OPA (4.3.4. iedaļa), pievieno 0,5 ml (5.5. iedaļa) metanola (4.2.1. iedaļa) un rūpīgi sajauc, lai izšķīdinātu OPA. Papildina līdz zīmei ar borskābes šķīdumu (4.3.2. iedaļa) un ar šļirci (5.7. iedaļa) pievieno 20 µl 2-merkaptotanolu (4.3.3. iedaļa).

Piezīme: Atvasināšanas reaģents būtu jāglabā 4 °C temperatūrā tumšā pudelē, un tas ir stabils vienu nedēļu.

7.5. Noteikšana ar HPLC

7.5.1. Eluēšanas šķīdinātāji (4.4. iedaļa).

Šķīdinātājs A:

0,3 mM nātrija dihidrogēnfosfāta un 3 mM nātrija acetāta šķīduma (kuram ar etiķskābi noregulēts pH 6,5): metanols: tetrahidrofurāns = 558:440:2 (V/V/V)

Šķīdinātājs B:

metanols.

7.5.2. Ieteicamais eluēšanas gradients:

laiks (min.)	šķīdinātājs A (%)	šķīdinātājs B (%)	plūsmas ātrums (ml/min.)
Sākums	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

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

Kolonnas temperatūra: 30 °C.

7.5.3. Iesmidzināmais tilpums: 50 µl atvasināšanas reaģenta un 50 µl parauga šķīduma.

7.5.4. Kolonnas līdzsvarošana.

Sistēmu iedarbina katru dienu, kolonnu 15 minūtes skalo ar 100 % šķīdinātāju B, tad iepilda A: B = 40:60 un 15 minūtes līdzsvaro pie 1 ml/min. Darbina tukšgaitā, iesmidzinot metanolu (4.2.1. iedaļa).

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

7.5.5. PS + PE satura noteikšana testa paraugā.

7.5.6. Veic hromatogrāfiskās analīzes darbības, saglabājot nemainīgu laiku starp analīžu sērijām, lai iegūtu konstantus aiztures laikus. Uz katriem 5-10 testa paraugiem iesmidzina ārējo standartšķīdumu (7.3. iedaļa), lai novērtētu atbilstības koeficientu.

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

7.6. Integrēšanas režīms

7.6.1. PEDP maksimums.

PEDR eluē kā atsevišķs maksimums. Nosaka maksimuma laukumu ar nepilnīgi sadalītu maksimumu [valley-to-valley]integrāciju.

7.6.2. Triptamīna maksimums.

Triptamīns eluē kā atsevišķs maksimums (1. attēls). Nosaka maksimuma laukumu ar nepilnīgi sadalītu maksimumu [valley-to-valley]integrāciju.

7.6.3. PS un PE maksimumu grupas.

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

8. Rezultātu aprēķināšana un izteikšana

PS un PE saturu testa paraugā aprēķina šādi:

$$C = 55,36 \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{T_1}{T_2}$$

kur

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

A₁ = standartparauga šķīduma (7.3. iedaļa) PEDP maksimuma laukums,

A₂ = testa parauga šķīduma (7.2. iedaļa) PS vai PE maksimuma laukums,

T₁ = standartparauga šķīduma triptamīna maksimuma laukums (7.3. iedaļa),

T₂ = testa parauga šķīduma triptamīna maksimuma laukums (7.2. iedaļa).

9. Precizitāte

Piezīme: Atkārtamības lielumi aprēķināti saskaņā ar IDF Starptautisko standartu ⁽¹⁾. Provizorisks sakritības robežas aprēķinātas saskaņā ar procedūru, kas noteikta šīs regulas III pielikuma b) iedaļā.

9.1. Atkārtamība

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

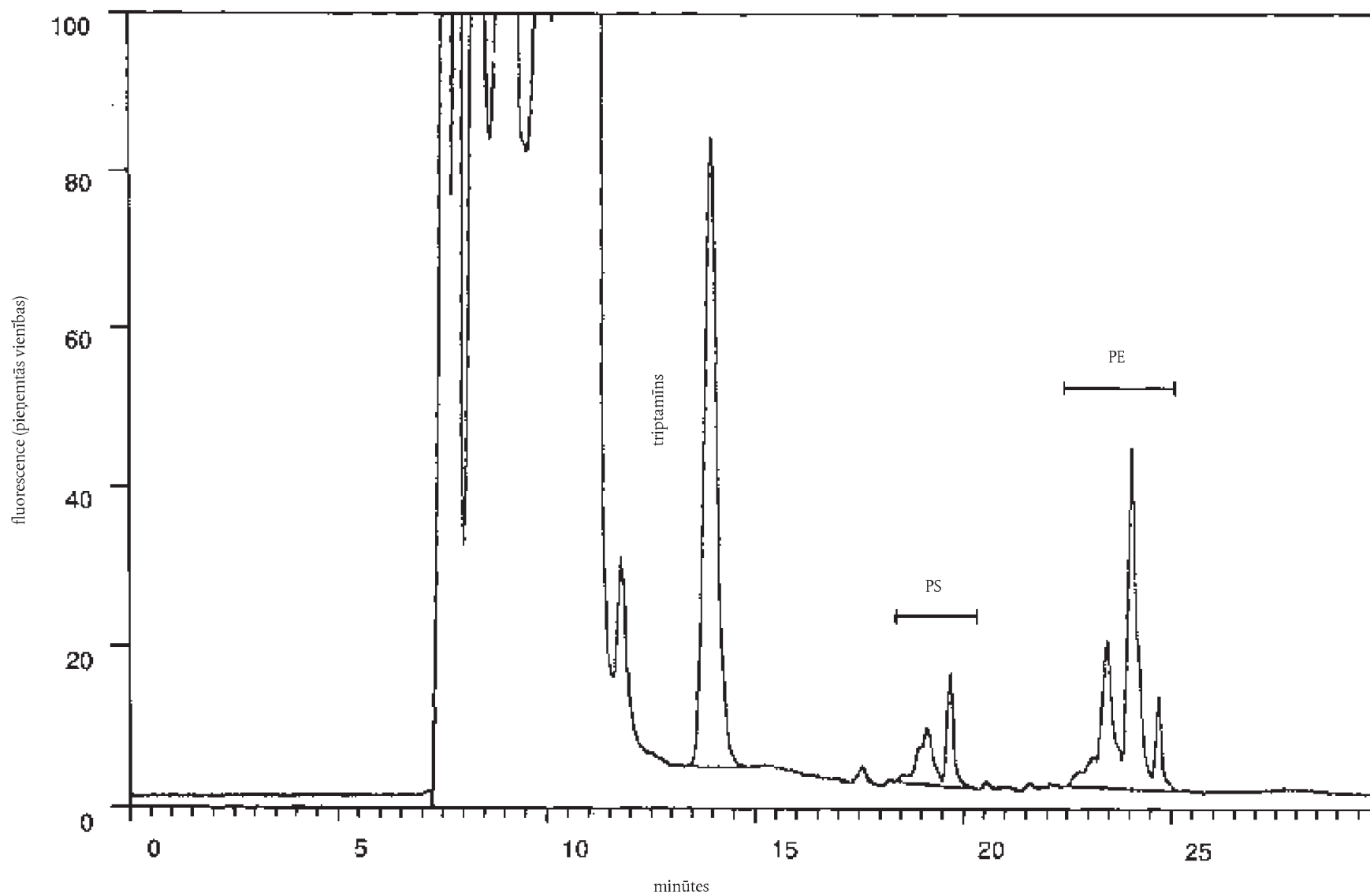
9.2. Sakritība.

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

10. Atsauces

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

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



1. attēls.: HPLC paraugs atjaunotā sausā vājpiena fosfatidilserīna (PS) un fosfatidiletanolamīna (PE) OPA-atvasinājumiem metanola ekstraktā. Parādīts PS, PE un triptamīna (iekšējais standarts) maksimumu integrēšanas veids.

XXI PIELIKUMS

(15. pants)

ANTIBIOTIKU UN SULFONAMĪDA/DAPSONA ATLIEKU KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANA SAUSAJĀ VĀJPIENĀ

Izmanto inhibitoru skrīninga testu ar *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 kā testa mikroorganismu un ar pietiekamu jutīgumu, lai pienā noteiktu 4 µg benzilpenicilīna un 100 µg sulfadimīna klātbūtni. Pieejami rūpnieciski testu komplekti, un tos var izmantot, ja tiem piemīt benzilpenicilīna un sulfadimīna noteikšanai vajadzīgais jutīgums (¹).

Testam izmanto atjaunotu sauso vājpienu (1 g pulvera + 9 ml destilēta ūdens). Testu veic, kā aprakstīts IDF Biļetenā Nr. 258/1991 1. iedaļas 2. nodaļā vai saskaņā ar testa komplekta ražotāja norādījumiem.

Pozitīvus rezultātus interpretē šādi:

1. Atkārtu testu, testu sistēmai pievienojot penicilināzi.
Pozitīvs rezultāts: Ar šo procedūru nevar identificēt inhibitorvielu.
Negatīvs rezultāts: Inhibitorviela ir β-laktama antibiotika.
2. Atkārtu testu, testu sistēmai pievienojot p-aminobenzoskābi.
Pozitīvs rezultāts: Ar šo procedūru nevar identificēt inhibitorvielu.
Negatīvs rezultāts: Inhibitorviela ir sulfonamīds/dapsons.
3. Atkārtu testu, testu sistēmai pievienojot penicilināzi + p-aminobenzoskābi.
Pozitīvs rezultāts: Ar šo procedūru nevar identificēt inhibitorvielu.
Negatīvs rezultāts: Inhibitorvielas ir β-laktama antibiotika un sulfonamīds/dapsons.

⁽¹⁾ *Svarīga piezīme:* Analizējot sauso vājpienu, var iegūt kļūdaini pozitīvus rezultātus. Tas ir svarīgi tādēļ, lai pārbaudītu, ka izmantotā testa sistēma nedod kļūdaini pozitīvus rezultātus.

XXII PIELIKUMS

(16. pants)

SAUSĀ VĀJPIENA KVANTITATĪVA NOTEIKŠANA AR PARAKAZEĪNA FERMENTU KOAGULĀCIJU KOMBINĒTAJĀ LOPBARĪBĀ**1. Mērķis**

Sausā vājpiena kvantitatīva noteikšana ar parakazeīna fermentu koagulāciju kombinētajā lopbarībā.

2. Piemērošanas joma

Šo metodi piemēro kombinētajai lopbarībai, kas satur vismaz 10 % sausā vājpiena; lielos daudzumos paniņas un/ vai dažas olbaltumvielas, kas nav piena olbaltumvielas, var radīt traucējumus.

3. Metodes princips

- 3.1. Tāda kazeīna šķīdināšana ar nātrija citrāta šķīduma ekstrakciju, kuru satur kombinētā lopbarība.
- 3.2. Kalcija jona koncentrācijas koriģēšana līdz prasītajam līmenim, lai izgulsnētu parakazeīnu; pievienojot siera fermenta parakazeīnu, kas iegūts no kazeīna.
- 3.3. Slāpekļa saturu parakazeīna nogulsnēs nosaka ar Kjeldāla [Kjeldahl] metodi, kā aprakstīts IDF standartā 20A 1986; sausā vājpiena daudzumu aprēķina, pamatojoties uz 27,5 % minimālo kazeīna saturu (skat. 9.1. iedaļa).

4. Reaģenti

Izmantotajiem reaģentiem jābūt ar analītisku kvalitāti. Jāizmanto destilētais ūdens vai ūdens ar vismaz līdzvērtīgu tīrību. Visiem reaģentiem un šķīdumiem, izņemot siera fermentu (4.5. iedaļa), jābūt bez slāpekli saturošām vielām.

- 4.1. Trinātrija citrāta dihidrāts (1 % m/V šķīdums).
- 4.2. Kalcija hlorīds (šķīdums 2M). Atbilstīga izmēra porcelāna traukā (150 līdz 200 ml) vai vārglāzē iesver 20,018 g CaCO₃ (ar analītisku kvalitāti). Pārlej ar destilēto ūdeni un liek virs vāroša ūdens vannas. Lēnām pievieno 50 līdz 60 ml HCl šķīduma (konc. HCl: ūdens = 1: 1), lai pilnībā izšķīdinātu karbonātu. Tur virs vārošā ūdens vannas, kamēr izžāvē CaCl₂, lai izdalītu HCl, kas nav reaģējusi. Ar destilēto ūdeni pārnes uz 100 ml mērkolbu un atšķaida līdz zīmei. Mēra pH lielumu, kas nedrīkst būt mazāks par 4,0. Šķīdumu glabā ledusskapī.
- 4.3. 0,1 n nātrija hidrāts.
- 4.4. 0,1 n sālsskābe.
- 4.5. Šķidrns teļa siera ferments (standarta stiprums 1: 10 000). Glabā ledusskapī 4 līdz 6 °C temperatūrā.
- 4.6. Reaģenti slāpekļa kvantitatīvai noteikšanai saskaņā ar Kjeldāla metodi, kā aprakstīts IDF standartā 20A 1986.

5. Aparatūra

Parasta laboratorijas aparatūra, tostarp:

- 5.1. miezeris vai homogenizētājs,
- 5.2. analītiskie svāri,
- 5.3. galda centrifūga (2 000 līdz 3 000 apgr./min.) ar 50 ml mēģenēm,
- 5.4. magnētiskais maisītājs (10 līdz 15 mm) ar magnētiskajiem stienīšiem,
- 5.5. 150 līdz 200 ml vārglāzes,
- 5.6. 250 un 500 ml kolbas,
- 5.7. stikla piltuves ar 60 līdz 80 mm diametru,
- 5.8. ātras filtrācijas bezpelnu filtri ar 150 mm diametru (S.S. 589, S.S. 595 1/2),
- 5.9. pipetes ar dažādiem nominālajiem tilpumiem,

- 5.10. ar termostatu regulējama ūdens vanna, 37 °C,
- 5.11. pH mērītājs,
- 5.12. Kjeldāla šķelšanas un destilācijas aparāts ar piederumiem,
- 5.13. birete ar 25 ml ietilpību un iedaļām,
- 5.14. plastmasas skalotne destilētajam ūdenim,
- 5.15. nerūsējošā tērauda lāpstiņas,
- 5.16. termometri,
- 5.17. žāvēšanas krāsns ar regulējamu temperatūru.

6. Procedūra

6.1. Paraugu sagatavošana.

Lai iegūtu viendabīgu maisījumu, 10 līdz 20 g parauga samaļ miezerī vai homogenizē dzirnaviņās.

6.2. Sausā piena šķīdināšana un nešķīstošā atlikuma atdalīšana.

- 6.2.1. Tieši 50 ml centrifūgas mēģenē iesver $1,000 \pm 0,002$ g labi sasmalcinātas kombinētās lopbarības (6.1. iedaļa). Pievieno 30 ml trinātrija citrāta šķīduma (4.1. iedaļa), kas iepriekš uzsildīts līdz 45 °C. Šim nolūkam maisa ar magnētisko maisītāju vismaz piecas minūtes.
- 6.2.2. Centrifugē 10 minūtes pie 500 g (2 000 līdz 3 000 apgr./min.) un dekantē tīro ūdens centrifugātu 150 līdz 200 ml vārglāzē, raugoties, lai neielītu nekādas nogulsnes no dibena.
- 6.2.3. Saskaņā ar to pašu procedūru, atlikumam veic vēl divas ekstrakcijas, pievienojot iegūtos ekstraktus pirmajam.
- 6.2.4. Ja virskārtā veidojas eļļas slānis, atdzesē ledusskapī, līdz tauki sacietē un ar lāpstiņu noņem cieto slāni.

6.3. Kazeīna koagulēšana ar kādu no siera fermentiem.

- 6.3.1. Nepārtraukti maisot, kopējam ūdens ekstraktam (apmēram 100 ml) pa pilienam pievieno 3,4 ml piesātināta kalcija hlorīda šķīduma (4.2. iedaļa). Ar NaOH (4.3. iedaļa) vai HCl (4.4. iedaļa) noregulē pH līdz 6,4 – 6,5. Liek ar termostatu regulējamā ūdens vannā 37 °C temperatūrā uz 15 līdz 20 minūtēm, lai iegūtu sāļu līdzsvaru. Tas kļūst uzskatāmāks, veidojoties vieglam duļķojumam.
- 6.3.2. Pārnes šķidrums vienā (vai divās) centrifūgas mēģenēs un centrifugē pie 2 000 g 10 minūtes, lai atdalītu izgulsnējušos vielu. Nesaskalojot nogulsnes, pārnes centrifugātu vienā (vai divās) centrifūgas mēģenēs.
- 6.3.3. Atdzesē centrifugātu līdz 37 °C temperatūrai. Maisot ekstraktu, pa pilienam pievieno 0,5 ml šķidrā siera fermenta (4.5. iedaļa). Koagulācija notiek vienā vai divās minūtēs.
- 6.3.4. Atkal ieliek paraugu ūdens vannā un uz 15 minūtēm atstāj 37 °C temperatūrā. Izņem paraugu no vannas un maisot sajauc koagulātu. Centrifugē pie 2 000 g 10 minūtes. Filtrē centrifugātu caur piemērotu filtrpapīru (!) (*Whatman* Nr. 541 vai līdzvērtīgs) un filtrpapīru saglabā. Mazgā nogulsnes centrifūgas mēģenē ar 50 ml ūdens apmēram 35 °C, samaisot nogulsnes.

Atkal centrifugē pie 2 000 g 10 minūtes. Centrifugātu filtrē ar iepriekš saglabāto filtrpapīru.

6.4. Kazeīna slāpekļa noteikšana.

- 6.4.1. Pēc mazgāšanas, izmantojot destilēto ūdeni, kvantitatīvi pārnes nogulsnes uz filtrpapīru, kas saglabāts no 6.3.4. iedaļā minētās darbības. Liek filtrpapīru Kjeldāla mēģenē. Nosaka slāpekli ar Kjeldāla metodi, kā aprakstīts *IDF* standartā 20A 1986.

7. Tukšā parauga analīze

- 7.1. Tukšā parauga analīzi veic regulāri, izmantojot bezpelnu filtrpapīru (5.8. iedaļa), kas samitrināts ar 90 ml (4.1. iedaļa) nātrija citrāta šķīduma, 1 ml piesātināta kalcija hlorīda šķīduma (4.2. iedaļa), 0,5 ml šķidrā siera fermenta (4.5. iedaļa), un pirms mineralizācijas ar Kjeldāla metodi, kā aprakstīts *IDF* standartā 20A 1986, trīsreiz to mazgā ar 15 ml destilēta ūdens.
- 7.2. Skābes tilpums, kas izmantots tukšā parauga analīzē, jāatņem no skābes tilpuma (4.4. iedaļa), kas izmantots parauga titrēšanai.

(!) Būtu jāizmanto ātras filtrācijas bezpelnu papīrs.

8. Kontroltests

- 8.1. Lai pārbaudītu iepriekšminēto procedūru un reagentus, noteikšanu veic ar standarta kombinēto lopbarību ar zināmu sausā vājpiena sastāvu, kā noteikts kopējos pētījumos. Atkārtotu noteikšanu vidējam rezultātam nevajadzētu atšķirties vairāk kā par 1 % no kopējos pētījumos noteiktā rezultāta.

9. Rezultātu izteikšana

- 9.1. Sausā vājpiena procentuālo saturu kombinētajā lopbarībā aprēķina pēc šādas formulas:

$$\% \text{ MMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) - 2,81}{0,908}$$

kur N ir parakazeīna slāpekļa procentuālais saturs; 27,5 ir koeficients noteiktā kazeīna pārvēršanai sausā vājpiena procentos. 2,81 un 0,908 ir korekcijas koeficienti, kas iegūti regresijas analīzēs.

10. Metodes precizitāte

10.1. Atkārtojamība

Vismaz 95 % izpētīto gadījumu, tā paša parauga atkārtotās analīzēs, ko veic tas pats laborants tajā pašā laboratorijā, iegūto rezultātu atšķirībām jābūt ne lielākām kā 2,3 g sausā vājpiena 100 g kombinētās lopbarības.

10.2. Sakritība

Vismaz 95 % izpētīto gadījumu, tā paša parauga analīzēs, ko veic divās laboratorijās, iegūto rezultātu atšķirībām jābūt ne lielākām par 6,5 g sausā vājpiena 100 g kombinētās lopbarības.

11. Pielaides robežas

CrD₉₅ lielumu (kritiskā starpība; 95 % ticamības robeža) aprēķina, izmantojot formulu (ISO 5725):

$$\text{CrD}_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

(R: sakritība; r: atkārtojamība).

Divkārsa noteikšana: CrD₉₅ = 4,5 g.

Ja ķīmisko analīžu rezultāti atšķiras no sausā vājpiena deklarētā satura par ne vairāk kā 4,5 g (divkārsa noteikšana), kombinētās lopbarības sūtījumu uzskata par atbilstīgu šim regulas noteikumam.

12. Piezīmes

- 12.1. Ja pievienots liels procentuālais daudzums dažu olbaltumvielu, kas nav piena olbaltumvielas, un jo īpaši sojas olbaltumvielas, karsējot kopā ar sauso vājpienu, var iegūt pārāk augstus rezultātus saistībā ar piena parakazeīnu nogulsnešanos.
- 12.2. Ja pievieno paniņas, var iegūt mazliet pazeminātus skaitļus saistībā ar faktu, ka noteikšanu veic tikai beztauku porcijai. Ja pievienots zināms daudzums skābkrējuma paniņu, var iegūt ievērojami samazinātus skaitļus saistībā ar nepilnīgu izšķīšanu citrāta šķīdumā.
- 12.3. Arī 0,5 % vai lielākas lecitīna piedevas dēļ var iegūt pazeminātus rezultātus.
- 12.4. Augstā temperatūrā karsēta sausā vājpiena inkorporācijas dēļ var iegūt pārāk lielus skaitļus saistībā ar noteiktu sūkalu olbaltumvielu izgulsnēšanos līdz ar piena parakazeīnu.

XXIII PIELIKUMS

(17. pants)

CIETES KVALITATĪVA NOTEIKŠANA SAUSAJĀ VĀJPIENĀ, DENATURĒTĀ SAUSAJĀ PIENĀ UN KOMBINĒTAJĀ LOPBARĪBĀ**1. Piemērošanas joma**

Šī metode paredzēta tam, lai noteiktu tādas cietes klātbūtni, kura denaturētā sausajā pienā pievienota kā marķieris. Klātbūtnes noteikšanas robeža metodē ir aptuveni 0,05 g cietes uz 100 g parauga.

2. Princips

Reakcija balstās uz jodometrijā izmantoto reakciju:

- brīvā joda fiksēšana ar koloīdiem ūdens šķīdumā,
- absorbcija ar cietes *micelles* un ar krāsas veidošanos.

3. Reāģenti

3.1. Joda šķīdums:

- jods: 1 g,
- kālija jodīds: 2 g,
- destilēts ūdens: 100 ml.

4. Aparatūra

- 4.1. Analītiskie svāri.
- 4.2. Ūdens vanna.
- 4.3. Testa mēģenes, 25 mm x 200 mm.

5. Procedūra

Nosver 1 g parauga un pārnes to testa mēģenē (4.3. iedaļa).

Pievieno 20 ml destilēta ūdens un krata, lai disperģētu paraugu.

Liek vāroša ūdens vannā (4.2. iedaļa) un atstāj uz piecām minūtēm.

Izņem no vannas un atdzesē līdz istabas temperatūrai.

Pievieno 0,5 ml joda šķīduma (3.1. iedaļa), sakrata un novēro izveidojušos krāsu.

6. Rezultātu izteikšana

Zils krāsojums norāda uz dabīgās cietes klātbūtni paraugā.

Ja paraugs satur pārveidotu cieti, krāsa var nebūt zila.

7. Piezīmes

Krāsa, krāsas intensitāte un cietes izskats mikroskopā var mainīties atkarībā no dabīgās cietes izcelsmes (piemēram, kukurūzas vai kartupeļu) un pārveidotās cietes, kas ir paraugā.

Pārveidotās cietes klātbūtnē iegūtā krāsa kļūst violeta, sarkana vai brūna atkarībā no dabīgās cietes kristāliskās struktūras pārveidojuma pakāpes.

XXIV PIELIKUMS

(18. pants)

MITRUMA NOTEIKŠANA SKĀBKREĶJUMA SAUSAJĀS PANIŅĀS

1. Joma

Noteikt mitruma saturu skābkrējuma sausajās paniņās, kas paredzēts dzīvnieku barībai.

2. Princips

Paraugu žāvē vakuumā. Masas zudumus nosaka sverot.

3. Aparatūra

- 3.1. Analītiskie sviri.
- 3.2. Sausi trauki no nerūsējoša metāla vai stikla ar vākiem, kas nodrošina hermētisku noslēgšanu; darba virsma, kas ļauj izklāt testa paraugu aptuveni 0,3 g/cm² slānī.
- 3.3. Regulējams elektriskais vakuuma žāvēšanas skapis ar eļļas sūkni un vai nu ar mehānismu karsta sausa gaisa ievadīšanai, vai ar vielu, kas uzsūc mitrumu (piemēram, kalcija oksīdu).
- 3.4. Eksikators ar efektīvu žāvēšanas aģentu.
- 3.5. Ar termostatu regulējams ventilējams žāvēšanas skapis, kas noregulēts uz 102 ± 2 °C.

4. Procedūra

Karsē trauku (3.2. iedaļa) ar vāku žāvēšanas skapī (3.5. iedaļa) vismaz vienu stundu. Traukam uzliek vāku, un tūlīt ieliek to eksikatorā (3.4. iedaļa), atļaujot atdzist līdz istabas temperatūrai un nosverot ar precizitāti līdz 0,5 mg.

Nosver trauku (3.2. iedaļa) ar vāku ar precizitāti līdz 0,5 mg. Nosvērtajā traukā ar precizitāti līdz 1 mg iesver aptuveni 5 g parauga un izlīdzina. Trauku bez vāka ieliek vakuuma žāvēšanas skapī, kas iepriekš sakarsēta līdz 83 °C. Lai novērstu krāsns temperatūras pārmērīgu samazināšanos, trauku ievieto pēc iespējas ātri.

Palielina spiedienu līdz 100 tor (13,3 kPa) un šādā spiedienā žāvē četras stundas – vai nu karsta sausa gaisa plūsmā, vai ar vielu, kas uzsūc mitrumu (aptuveni 300 g uz 20 paraugiem). Pēdējā gadījumā pēc paredzētā spiediena sasniegšanas vakuumsūkni atvieno. Žāvēšanas laiku skaita no brīža, kad temperatūra žāvēšanas skapī atkal sasniedz 83 °C. Žāvēšanas skapī uzmanīgi atjauno atmosfēras spiedienu. Žāvēšanas skapī atver, traukam tūlīt uzliek vāku, izņem trauku no žāvēšanas skapja, 30 līdz 45 minūtes atdzesē eksikatorā (3.4. iedaļa) un nosver ar precizitāti līdz 1 mg. Vēl 30 minūtes žāvē vakuuma žāvēšanas skapī (3.3. iedaļa) 83 °C temperatūrā un vēlreiz nosver. Abu svēršanas rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt 0,1 % mitruma.

5. Aprēķināšana

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

kur

E = testa parauga sākotnējā masa gramos,

m = izžāvētā testa parauga masa gramos.

6. Precizitāte

6.1. Atkārtojamības robeža

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, pēc iespējas īsā laikā vienam un tam pašam laborantam divreiz veicot noteikšanu identiskiem testa materiāliem ar to pašu aparatūru, nedrīkst pārsniegt 0,4 g ūdens uz 100 g skābkrējuma sauso paniņu.

6.2. *Sakritības robeža*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti, laborantiem dažādās laboratorijās veicot divas noteikšanās identiskiem testa materiāliem ar dažādu aparāturu, nepārsniedz 0,6 g ūdens uz 100 g skābkrējuma sauso paniņu.

6.3. *Precizitātes datu avots*

Precizitātes datus noteica eksperimentā, ko veica 1995. gadā, aptverot astoņas laboratorijas un 12 paraugus (sešas aklās dubultanalīzes).

XXV PIELIKUMS

(19. pants)

REFERENCES METODE SVEŠAS IZCELSMES TAUKU KLĀTBŪTNES NOTEIKŠANAI PIENA TAUKOS AR TRIGLICERĪDU GĀZU HROMATOGRĀFIJAS ANALĪZI – 1. LABOJUMS

1. Piemērošanas joma un nozare

Ar šo standartu nosaka metodi svešas izcelsmes tauku, gan augu, gan dzīvnieku, piemēram, kausētu liellopu un aitauku un kausētu cūku tauku klātbūtnes noteikšanai piena produktu piena taukos, izmantojot triglicerīdu gāzu hromatogrāfijas analīzi.

Izmantojot noteiktu triglicerīdu formulu, tīros piena taukos kvalitatīvi un kvantitatīvi nosaka augu un dzīvnieku taukus neatkarīgi no barošanas vai slaukšanas apstākļiem.

- 1. piezīme:* Kaut gan sviestskābe (C4), kas sastopama tikai piena taukos, dod iespēju kvantitatīvi novērtēt nelielus vai vidējus piena tauku daudzumus augu taukos, kvalitatīvu un kvantitatīvu informāciju par svešas izcelsmes tauku pievienošu tīriem piena taukiem vismaz līdz 20 % (masas %) sniegt ir grūti sakarā ar lielu C4 atšķirību robežās no aptuveni 3,5 līdz 4,5 % (masas %).
- 2. piezīme:* Kvantitatīvos rezultātus var praktiski iegūt tikai ar triglicerīdu analīzēm, jo augu tauku sterīnu saturs atšķiras atkarībā no ražošanas un apstrādes apstākļiem.

2. Definīcija

Svešas izcelsmes tauki piena taukos: svešas izcelsmes tauki, kā noteikts šajā standartā, ir visi augu un dzīvnieku tauki, izņemot piena taukus.

3. Metodes princips

Pēc piena tauku ekstrakcijas sagatavo izejas šķīdumu. No šā šķīduma ar gāzu hromatogrāfiju nosaka triglicerīdus (oglekļa atomu kopskaitu) pildītajās kolonnās. Ievietojot triglicerīdu formulā dažādu izmēru (C24 - C54 - tikai pāra skaitļu) tauku molekulmasas %, vai nu kvalitatīvi vai kvantitatīvi nosaka svešas izcelsmes taukus.

Piezīme: Veicot šeit aprakstīto vērtēšanu, var izmantot kapilāro gāzu hromatogrāfiju, ja garantē, ka tiks iegūti salīdzināmi rezultāti ⁽¹⁾.

4. Reāģenti

Jāizmanto analītiskas kvalitātes ķīmikālijas.

- 4.1. Nesējgāzes: slāpekļis ar tīrības pakāpi $\geq 99,996\%$.
- 4.2. Piesātināti standarta triglicerīdi ⁽²⁾ tāpat kā holesterīns standarta tauku standartizēšanai saskaņā ar 6.5.4. iedaļu.
- 4.3. Bezūdens metanols.
- 4.4. n-heksāns.
- 4.5. n-heptāns.
- 4.6. Toluols.
- 4.7. Dimetilhlorsilāna šķīdums: 50 ml dimetilhlorsilāna izšķīdina 283 ml toluola.
- 4.8. Deggāze: ūdeņradis un mākslīgais gaiss.
- 4.9. Stacionārā fāze, 3- % OV-1 uz 125/150 μm (100/120 sieta acs) *Gas ChromQ* ⁽³⁾.
- 4.10. 10 % kakao sviesta šķīdums.

5. Instrumenti

Parastas laboratorijas iekārtas, un jo īpaši šādas.

- 5.1. Augstas temperatūras gāzu hromatogrāfs, kas piemērots vismaz 400 – 450 °C temperatūrām, kas apgādāts ar liesmas jonizācijas detektoru (LJD) un nesējgāzes konstantas masas plūsmas kontrolleri. Deggāze: 30 ml/min. H₂, 270 ml/min. mākslīgais gaiss.

⁽¹⁾ Piemērotas metodes jau ir aprakstītas, skat. D. Precht and J. Molkentin: *Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns*, *Chrom-pack News* 4, 16-17 (1993).

⁽²⁾ Piemēroti produkti ir nopērkami.

⁽³⁾ Produkti ar tādām preču zīmēm kā, piemēram, *Extrelut*, *Gas ChromQ*., *Chrompack* ir piemērotu produktu paraugi, kas pieejami specializētajā tirdzniecībā. Šī informācija kalpo tam, lai lietotājiem būtu vieglāk rīkoties ar standartiem, un tā nepārstāv produkta pieprasījumu. Norāde uz graudiem pārvērsta ŠI sistēmas vienībās (μm) saskaņā ar BS 410:1988 "British Standard Specification for test sieves".

Ņemot vērā augsto nesējgāzes plūsmu, liesmas sprauslai jābūt īpaši lielai.

Piezīme: Tā kā, veicot triglicerīdu analīzes, ir augstas temperatūras, tad stikla detaļas, kas ievietotas LJD vai inžektora sistēmā, bieži jātīra.

Gāzu hromatogrāfam jābūt aprīkotam ar membrānu, kas iztur augstas temperatūras, ko var bieži izmantot un kurai parasti ir ļoti zema noplūdes pakāpe.

Piezīme: Piemērotas ir *Chromblue* (tm) membrānas (*Chrompack*).

Membrāna regulāri jāmaina, t.i., aptuveni pēc 100 iesmidzināšanām vai tiklīdz pasliktinās izšķirtspēja (skat. 4. attēlu).

5.2. Hromatogrāfijas kolonna

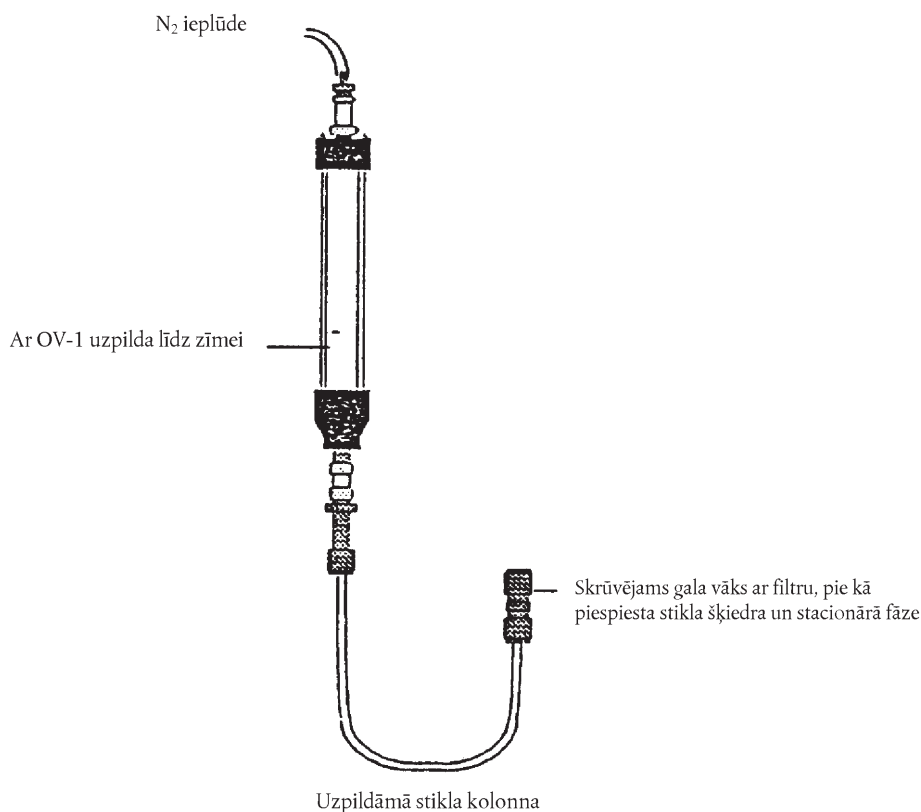
U veida stikla kolonna (iekšējais diametrs 2 mm, garums 500 mm), kura ir vispirms saskaņā ar 6.1. iedaļu silanizēta ar dimetilhorosilānu, lai dezaktivētu stikla virsmu.

Piezīme: Piemērotas ir arī mazliet garākas (80 – 200 mm garas) pildītās kolonnas. Ar tām var sasniegt mazliet labākus sakrītības rezultātus. No otras puses, stacionārā fāze pēc darbības laiku pa laikam uzrāda plaisas, kas, savukārt, var novest pie sliktākiem kvantitatīvajiem rezultātiem. Turklāt LJD liesmu var viegli nodzēst ar ļoti lielu nesējgāzes plūsmu - 75 līdz 85 ml/min.

5.3. Kolonnas pildīšana (skat. 1. attēlu).

1. attēls

Kolonnas pildīšana



- 5.3.1. Plastmasas kolonna ar uzskrūvētiem gala vākiem ar zīmi, līdz kurai var pildīt vajadzīgo stacionārās fāzes daudzumu.
- 5.3.2. Smalks siets (acu izmērs apmēram 100 μm) ar skrūvējamu vāku, kas piemērots stikla kolonnas noslēgšanai saskaņā ar 1. attēlu.
- 5.3.3. Dezaktivēta silanizēta stikla vate.
- 5.3.4. Vibrators vienmērīgai stacionārās fāzes sadalīšanai pildīšanas laikā.
- 5.4. 1 līdz 3 ml ekstrēlūtkolonna⁽¹⁾ ar silikagelu. Šo kolonnu var alternatīvi izmantot ekstrakcijai, lai iegūtu piena taukus.

(1) Skat. 3. zemsvītras piezīmi 86. lpp.

- 5.5. Grafīta aizslēgs 6,4 mm (1/4) ar 6 mm urbumu.
- 5.6. Ierīces kolonnas stikla virsmu silanizēšanai saskaņā ar 6.1. iedaļu.
- 5.6.1. Vulfa [Woulff] kolba.
- 5.6.2. Ūdens sūcējsūknis.
- 5.7. Ūdens vanna, noregulējama uz 50 ± 2 °C.
- 5.8. Žāvēšanas skapis, noregulējams uz 50 ± 2 °C un 100 ± 2 °C.
- 5.9. Mikropipete.
- 5.10. Mērpipete ar 5 ml ietilpību 1,5 ml metanola nomērīšanai.
- 5.11. Apaļkolba ar 50 ml ietilpību.
- 5.12. Erlenmeijera kolba ar nominālo tilpumu 50 ml.
- 5.13. Piltuve.
- 5.14. Sīkporains filtrs.
- 5.15. Rotācijas ietvaicētājs.
- 5.16. Ar alumīnija vāciņu noslēdzamas ampulas, kā nominālais tilpums ir 1 ml, ar membrānu iekšpusē.
- 5.17. Injekciju šļirce, izmantotās šļirces virzulis nedrīkst sasniegt adatas galu.

Piezīme: Šādas šļirces ļauj iegūt labāku rezultātu sakritību.

Lai izvairītos no membrānas nolietojšanās, adatas gals ik pēc noteikta laika posma jāpārbauda (piemēram, ar stereomikroskopu).

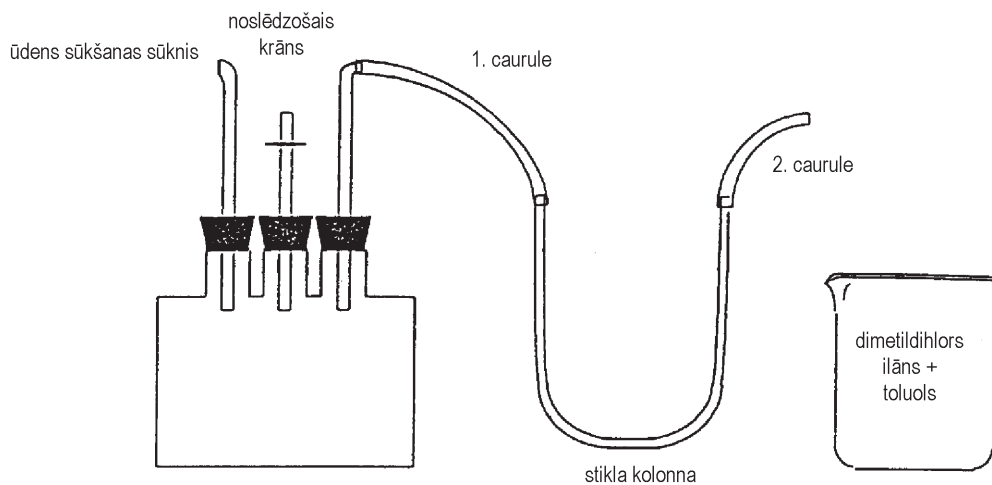
6. Procedūra

6.1. Kolonnas sagatavošana (silanizēšana)

Pēc Vulfa kolbas pievienošanas, kā parādīts 2. attēlā, ūdens sūkņa 2. cauruli iemērc šķīdumā saskaņā ar 4.7. iedaļu. Aizverot noslēdzošo krānu, kolonna piepildās; pēc tam noņem abas caurules.

2. attēls

Silanizēšana



Kolonnai nostiprina statīvā un ar pipeti piepilda pilnu ar dimetildihlorosilāna šķīdumu

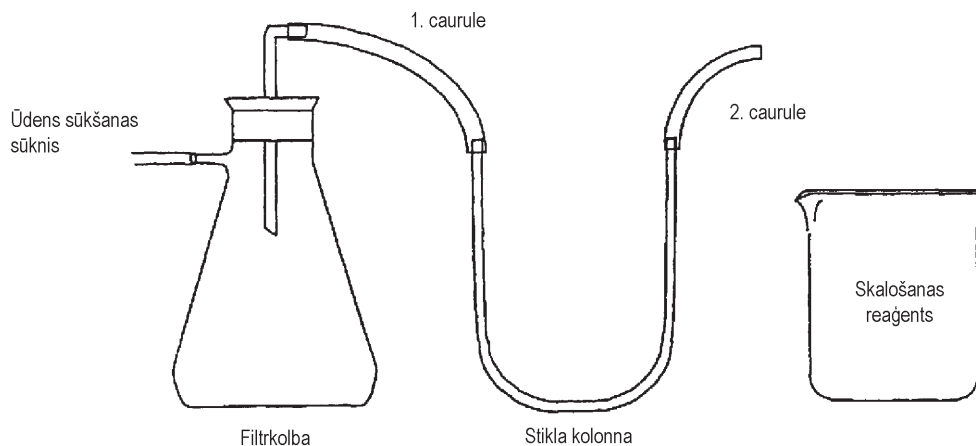
Pēc 20 – 30 minūtēm Vulfa kolbu aizstāj ar filtrkolbu un kolonnai iztukšo, pievienojot tai ūdens sūcējsūkni (skat. 3. attēlu).

6.2. Kolonnas pildīšana

Pēc tam secīgi veic skalošanu, izmantojot 75 ml toluola un 50 ml metanola; tad iztukšoto kolonnu žāvē žāvēšanas skapī 100 °C temperatūrā aptuveni 30 minūtes.

3. attēls

Skalošana



Kolonnas pildīšanai sagatavojas, kā parādīts 1. attēlā. Stacionāro fāzi saskaņā ar 4.9. iedaļu iepilda plastmasas kolonnā līdz zīmei. Pildāmās kolonnas zemākais gals ir noslēgts ar aptuveni 1 cm garu stikla vates aizbāzni, kurš iepriekš silanizēts un kurš iespiests, izmantojot tērauda stieni. Tad kolonnas galu noslēdz ar sietu saskaņā ar 5.3.2. iedaļu.

Kolonnu pilda ar stacionāro fāzi zem spiediena (3 bāri, ar N₂). Lai iegūtu viendabīgu, nepārtrauktu un ciešu pildījumu, gar stikla kolonnu pildīšanas laikā augšup un lejup pārvieto vibratoru.

Pēc pildīšanas otru pildītās kolonnas galu noslēdz ar silanizētas stikla vates aizbāzni, ārpusē palikušos galus nogriež, un aizbāzni par dažiem milimetriem iebīda kolonnā ar lāpstiņu.

6.3. Paraugu sagatavošana

Paraugu sagatavošanai izmanto vienu no trim šādām metodēm.

6.3.1. Piena tauku izolēšana no sviesta.

Saskaņā ar 5.7. iedaļu 5 līdz 10 g sviesta izkausē piemērotā traukā ūdens vannā 50 °C temperatūrā.

Erlenmeijera kolbu ar 50 ml ietilpību un piltuvi ar tajā ievietotu filtru saskaņā ar 5.14. iedaļu karsē žāvēšanas skapī līdz 50 °C. Izkausētā sviesta paraugu tauku kārtu filtrē, izmantojot iepriekš sakarsēto ierīci.

Šādi piena tauki ir gandrīz bez fosfolipīdiem.

6.3.2. Tauku frakcijas ekstrakcija saskaņā ar Rozes-Gotlība [Röse-Gottlieb] metodi

Ekstrakciju veic vai nu saskaņā ar IDF standartu 1C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987, vai 22B: 1987.

Ar šādiem piena tauku fosfolipīdiem var iegūt holesterīna maksimumu, kas palielināts par aptuveni 0,1 %.

Triglicerīdu spektru, kas standartizēts līdz 100 ar holesterīnu, tādējādi ietekmē tikai ļoti mazā mērā.

6.3.3. Ekstrahēšana no piena ar silikagela kolonnām.

0,7 ml piena parauga, kas turēts vienmērīgā 20 °C temperatūrā, saskaņā ar 5.4. iedaļu ar mikropipeti ievada ekstrelūtkolonnā ar 1 līdz 3 ml ietilpību un apmēram piecas minūtes ļauj vienmērīgi sadalīties uz silikagela.

Lai denaturētu olbaltumvielu un lipīdu kompleksus ar pipeti pievieno 1,5 ml metanola. Pēc tam paraugu ekstrahē ar 20 ml n-heksāna. Tad nelielos daudzumos lēni pievieno n-heksānu un notecējušo šķīdinātāju savāc 50 ml apaļkolbā, kura izžāvēta līdz konstantai zināmai masai.

Pēc ekstrakcijas kolonnu iztecina, līdz tā ir tukša.

Šķīdinātājus atdala no eluāta rotējošajā iztvaikotājā, ja vannā ūdens temperatūra ir 40 līdz 50 °C.

Kolbu žāvē un nosverot nosaka taukus.

Piezīme: Tauku ekstrakcija saskaņā ar Gerbera [*Gerber*], Veibula-Berntropa [*Weibull-Berntrop*], Šmīda-Bondzinska-Raclafa [*Schmid-Bondzynski-Ratzlaff*] vai piena tauku izolēšanas metodi, izmantojot detergentus (BDI metode) nav piemērotas triglicerīdu analīzei, tādēļ ka šajās metodēs lielāks vai mazāks daudzums daļēju glicerīdu vai fosfolipīdu var nonākt tauku fāzē.

6.4. Parauga šķīduma sagatavošana

Gāzu hromatogrāfijai iegūst 5 % tauku šķīdumu n-heptānā saskaņā ar 6.3. iedaļu. Lai sagatavotu šo parauga šķīdumu, atbilstīgus iegūtā parauga materiāla daudzumus saskaņā ar 6.3.1. un 6.3.2. iedaļu nosver un izšķīdina atbilstīgā n-heptāna daudzumā.

Parauga sagatavošanai saskaņā ar 6.3.3. iedaļu parauga materiālam kolbā pievienojamā n-heptāna daudzumu aprēķina, pamatojoties uz parauga materiāla svaru un tajā izšķīdināto pārpalikumu.

Aptuveni 1 ml parauga šķīduma iepilda ampulā saskaņā ar 5.16. iedaļu.

6.5. Hromatogrāfiskā triglicerīdu noteikšana

Augstās izskalošanas temperatūrās līdz 350 °C garo ķēžu triglicerīdos C52-C56 viegli notiek bāzes līnijas kāpums, jo īpaši tad, ja kolonnas sākumā nav pietiekami kondicionētas. Šo bāzes līnijas kāpuma var pilnīgi novērst, vai nu kombinējot divas kolonnas, vai veicot bāzes līnijas substrakciju.

Izmantojot kompensēšanas paņēmieni vai darbojoties ar vienu kolonnu, kā arī inžektorā un detektorā ievietotajām stikla detaļām jāizmanto grafitā aizslēgs saskaņā ar 5.5. iedaļu.

6.5.1. Bāzes līnijas korekcija.

Lai novērstu bāzes līnijas kāpumu, izmanto vienu no šādām četrām metodēm.

6.5.1.1. Kolonnu kombinēšana.

Divas pildītās kolonnas izmanto ar kompensēšanas paņēmieni.

6.5.1.2. Bāzes līnijas korekcija ar gāzu hromatogrāfu.

Bāzes līnijas kāpumu var novērst, darbinot gāzu hromatogrāfu bez tauku šķīduma injekcijas un pēc tam veicot palikušās bāzes līnijas substrakciju.

6.5.1.3. Bāzes līnijas korekcija ar programmatūras integrēšanu.

Bāzes līnijas kāpumu var novērst, darbinot integrēto sistēmu bez tauku šķīduma injekcijas un pēc tam veicot palikušās bāzes līnijas substrakciju.

6.5.1.4. Bāzes līnijas korekcija ar atbilstīgu kondicionēšanu.

Ar atbilstīgu sākotnējo kolonnas kondicionēšanu un aptuveni 20 reizes veicot piena tauku šķīdumu iesmidzināšanu, bāzes līnijas kāpums augstās temperatūrās parasti ir tik neliels, ka bāzes līnijas korekcijas nav vajadzīgas.

6.5.2. Injekcijas paņēmieni.

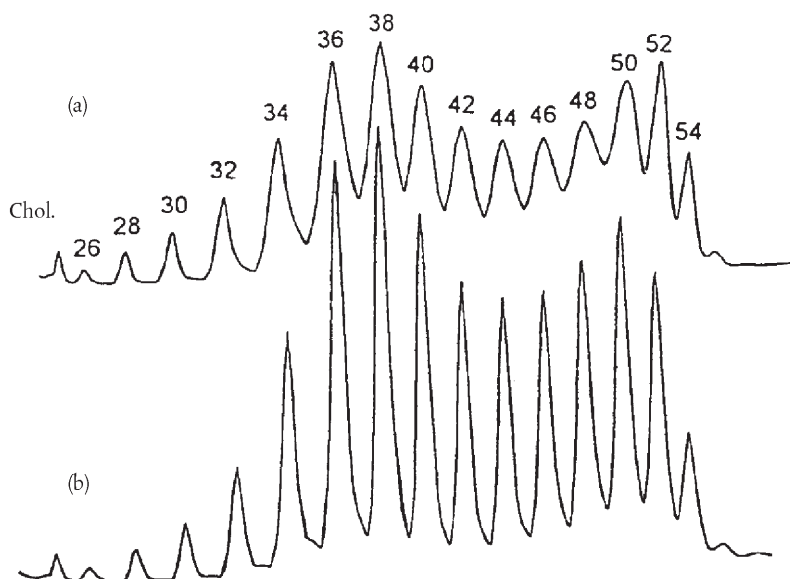
Lai novērstu atšķirīgus rezultātus, izmanto "karstās injekcijas" paņēmieni, sasniedzot labākus kvantitatīvos rezultātus triglicerīdu sastāvdaļām, kam ir augsta viršanas temperatūra. Atbilstīgi tam tauku šķīdumu ievieļ šīrcē, un auksto šīrces adatu pirms injekcijas apmēram trīs sekundes silda inžektora galvā. Tad šīrces saturu strauji izsmidzina.

Piezīme: Izmantojot šādu injekcijas paņēmieni, samazinās dalīšanās vai injekcijas bloķēšanas iespējamība. Tiešo injekciju "virs kolonnas" augšējā pagarinātajā kolonnas daļā neizmanto, jo membrānas fragmentu, kas šeit sakrājas, kā arī sārņu sakrāšanos var viegli novērst ar izmantoto paņēmieni, regulāri mainot inžektora ievietojumu bez kolonnas noņemšanas.

Lai nesabojātu membrānu, adatas gals nemaz nedrīkst būt saliekts (pat ja to ir grūti saskatīt), pieskaroties parauga mērglāzes dibenam.

4. attēls

Piena tauku parauga triglicerīdu hromatogramma



(a) Slikta izšķirtspēja bojātas membrānas rezultātā

(b) Laba izšķirtspēja

6.5.3. Pildītās kolonnas kondicionēšana.

Lai izvairītos no piesārņošanas, veicot a) līdz c) iedaļā minētās darbības, kolonnas galu nepievieno detektoram.

Kolonnas, kas piepildītas saskaņā ar 6.2. iedaļu, kondicionē šādi:

- N_2 plūsma 15 min 40 ml/min 50 °C temperatūrā;
- karsēšana 1 K/min. līdz 355 °C ar 10 ml N_2 /min.;
- 12 līdz 15 h izturēšana 355 °C temperatūrā;
- divas 1 μ l kakao sviesta šķīduma injekcijas saskaņā ar 4.10. sadaļu un attiecīgu temperatūras režīmu;
- divdesmit 0,5 μ m piena tauku šķīduma injekcijas divās vai trīs dienās saskaņā ar 6.4. sadaļu.

Piezīme: Kakao sviests sastāv gandrīz vienīgi no C50 līdz C56 triglicerīdiem ar augstu viršanas temperatūru. Iesmidzinot kakao sviestu, īpaši noder kondicionēšanai garas ķēdes savienojumu intervālā. Atbilstības koeficients triglicerīdiem C50 līdz C54 ar augstu viršanas temperatūru var būt līdz apmēram 1,20. Parasti, veicot atkārtotu piena tauku šķīduma injekciju, var sagaidīt C50 līdz C54 sākotnēji augsto atbilstības koeficientu samazināšanos. Triglicerīdiem ar zemu acil-c skaitu, atbilstības koeficients tuvinās skaitlim 1. Saskaņā ar 6.2. iedaļu attiecīgi sagatavo trīs pārus pildītu kolonnu. Kondicionētos pārus attiecīgi pārbauda ar piena tauku rutīnas analīzi.

Turpmāk izmanto to kolonnu pāri, kurš dod labākos kvantitatīvos rezultātus (atbilstības koeficients gandrīz 1). Kolonnas, kuru atbilstības koeficients ir > 1,20, neizmanto.

6.5.4. Kalibrēšana.

Lai varētu veikt kalibrēšanu, būtu jānosaka attiecīgo triglicerīdu, kā arī piena tauku holesterīna (standartizēti tauki) atbilstības koeficienti, izmantojot standartizētus triglicerīdus (vismaz piesātinātus triglicerīdus C24, C30, C36, C42, C48 un C54, kā arī holesterīnu; vēl labāk papildus C50 un C52). Starposma atbilstības koeficientus var noteikt ar matemātisko interpolāciju.

Izmantojot standartizētus taukus, katru dienu jāveic divas vai trīs kalibrēšanas. Ja iegūst gandrīz identiskus rezultātus, paraugu triglicerīdu analīzēs sasniedz rezultātus ar labu sakrītības līmeni.

Standartizētos piena taukus var uzglabāt vairākus mēnešus uzglabāšanas temperatūrās, kas nav augstākas par - 18 °C, un tādējādi tos var izmantot kā standartu.

Piezīme: Var noteikt atbilstības koeficientus arī katrai sastāvdaļai, izmantojot standartizētus taukus ar apstiprinātu triglicerīdu sastāvu, tādus kā CRM 519 (bezūdens piena tauki), ko var iegādāties no *Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium*.

6.5.5. Temperatūru režīms, nesējgāze un citi triglicerīdu analīžu nosacījumi.

Temperatūru režīms: sākotnējā kolonnas temperatūrā 210 °C iztur vienu minūti, tad programmē 6 °C/min., līdz sasniedz 350 °C un beigu temperatūrā iztur piecas minūtes.

Detektora un inžektora temperatūra: attiecīgi 370 °C.

Piezīme: Detektora, inžektora un žāvēšanas skapja temperatūra (sākotnējā temperatūra) būtu jāsauglabā konstanta (arī naktī, nedēļas nogalēs un brīvdienās).

Nesējgāzes: slāpekļis, plūsmas ātrums 40 ml/min.

Piezīme: Ja izmanto 80 cm kolonnas, tad plūsmai jābūt vismaz 75 ml/min. N₂. Nesējgāzes plūsma jāuztur konstanta (arī naktī, kā arī nedēļas nogalēs un brīvdienās). Precīza nesējgāzes plūsma jāpielāgo tā, ka 341 °C temperatūrā neatkarīgi no kolonnas garuma tiek eluēti C54.

Analīzes ilgums: 29,3 minūtes.

Injekcijas tilpums: 0,5 µl.

Piezīme: Šļirce pēc katras injekcijas vairākas reizes jāskalo ar tīru heptānu.

LJD nosacījumi: saskaņā ar 5.1. iedaļu.

Piezīme: Liesmas jonizācijas detektoru aizdedzina attiecīgi katras darba dienas sākumā.

7. Mērīšanas apstākļu integrēšana, novērtēšana un kontrole

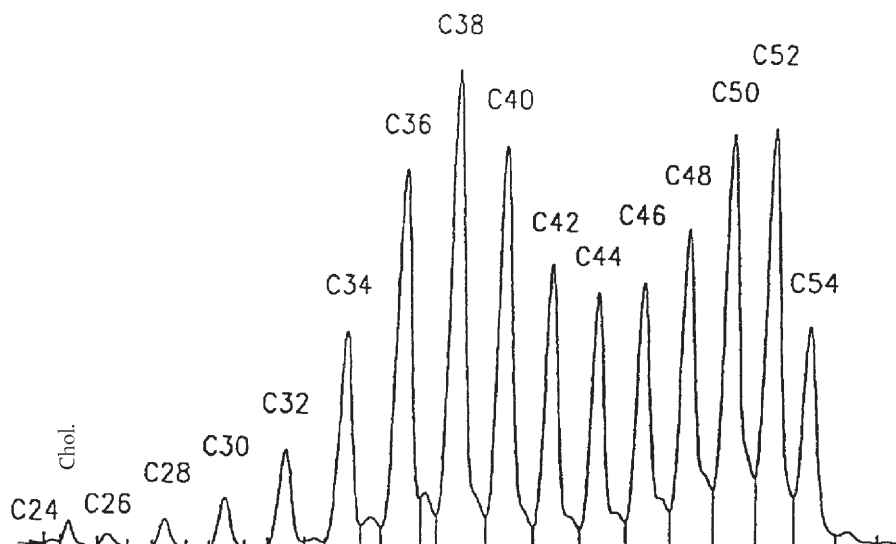
Triglicerīdus ar nepāra acil-c skaitu (2n+1) kombinē ar iepriekšējo pāra skaitļa triglicerīdu (2n). Mazāk reproducējamo zemo C56 saturu neņem vērā. Atlikušo triglicerīdu (maksimuma laukumā) hromatogrammā, ieskaitot holesterīnu (maksimums tuvu C24) reizina ar attiecīgajiem standarta tauku (pēdējās kalibrēšanas) atbilstības koeficientiem un kopumā normalizē līdz 100. Bez brīvā holesterīna tādējādi novērtē triglicerīdus C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 un C54. Rezultātus izsaka masas % (g/100 g).

Hromatogrammu maksimumu novērtēšana būtu jāveic ar integratoru, ar ko var zīmēt bāzes līniju. Būtu vajadzīga iespēja integrēt atkārtoti ar optimizētiem integrēšanas parametriem.

5. un 6. attēlā parādīti divi triglicerīdu hromatogrammu piemēri. 5. attēlā parādīta hromatogramma, ko var labi novērtēt, savukārt 6. attēlā parādīta sporādisku kļūdu C50 līdz C54 intervālā; salīdzinot ar 5. attēlu, bāzes līnija virzās nepareizi. No šādām tipiskām kļūdām var izvairīties, tikai izmantojot integratoru, ar kuru zīmē bāzes līniju.

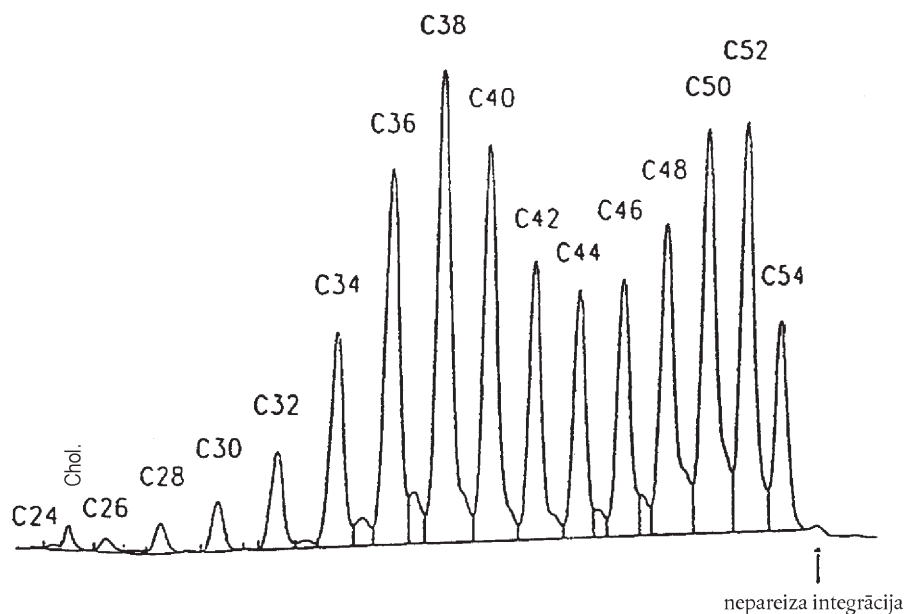
5. attēls

Viegli novērtējama piena tauku triglicerīdu hromatogramma ar iezīmētu bāzes līniju



6. attēls

Nepareizi integrēta piena tauku hromatogramma



Lai pārbaudītu mērīšanas nosacījumus, var izmantot relatīvās standartnovirzes (RSN: variāciju koeficienti x 100), kas dažādiem triglicerīdiem norādīti 1. tabulā. Tie tika aprēķināti 19 secīgās tādu pašu piena tauku analizēs.

1. tabula

Triglicerīdu satura (n=19) relatīvās standartnovirzes (RSN)

triglicerīds	RSN (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Ja RSN ievērojami pārsniedz 1. tabulā norādītos lielumus, hromatogrāfiskie nosacījumi nav pieņemami un jāpārbauda membrāna vai nesējgāzes plūsma. Turklāt sīkas membrānas daļiņas var veidot nogulsnes uz stikla vates kolonnas ieejā vai kolonna kļūst nepiemērota izmantošanai novecošanas, temperatūras u.c. koeficientu ietekmē (skat. 3. attēlu).

Piezīme: 1. tabulā norādītie lielumi nav obligāti, bet orientējoši kvalitātes kontroles nolūkiem. Tomēr, ja pieņem augstākus RSN lielumus, atbilstībai jābūt ar atkārtamības un sakritības robežām, kas norādītas 11. punktā.

8. Kvalitatīva svešas izcelsmes tauku klātbūtnes noteikšana

Lai noteiktu svešas izcelsmes tauku klātbūtni, ir izstrādāta triglicerīdu formula (2. tabula) ar robežām S (3. tabula), kurā tīru piena tauku S vērtības var svārstīties. Ja šīs robežas tiek pārsniegtas, var pieņemt, ka paraugā ir klāt svešas izcelsmes tauki.

Visprecīzākā formula kausētu cūku tauku piemaisījuma noteikšanai ir

$$6,5125 \cdot C_{26} + 1,2052 \cdot C_{32} + 1,7336 \cdot C_{34} + 1,7557 \cdot C_{36} + 2,2325 \cdot C_{42} + 2,8006 \cdot C_{46} + 2,5432 \cdot C_{52} + 0,9892 \cdot C_{54} = S$$

Piezīme: Izmantojot 755 dažādus piena tauku paraugus, noteikta 99 % ticamības robeža $S = 97,96 - 102,04$ tīra piena tauku paraugiem ar standartnovirzi visiem S lielumiem $SN = 0,39897$.

Sākot ar nezināmu tauku parauga triglicerīdu sastāvu, neizmantojot datoru, ar šādu formulu var vienkārši pārbaudīt, vai šeit noteiktā triglicerīdu satura summas ar attiecīgiem reizinātājiem ir ārpus $97,96 - 102,04$ robežām un, visticamāk, paraugā ir klāt svešas izcelsmes tauku piemaisījumi.

Lai noteiktu svešas izcelsmes tauku klātbūtni, 2. tabulā norādītas dažādas triglicerīdu formulas. Lai noteiktu svešas izcelsmes tauku klātbūtni, var izmantot vispārīgo formulu un attiecīgās formulas sojas eļļai, saulespuķu eļļai, olīveļļai, rapšu sēkļu eļļai, linsēkļu eļļai, kviešu dīgļu eļļai, kukurūzas dīgļu eļļai, kokvilnas eļļai un hidroge-nizētai zivju eļļai, augu tauku kokosēļai un palmu kodolu eļļai, kā arī palmu eļļai un kausētiem liellopu un aitu taukiem.

Tā kā svešas izcelsmes tauku triglicerīdu sastāvs arī ir mainīgs, pat līdz četriem dažādiem svešas izcelsmes taukiem, tika izmantoti eksperimentāli izmērīti svešas izcelsmes tauku triglicerīdu viena un tā paša veida dati. (Attiecībā uz vienu un tā paša veida svešas izcelsmes taukiem ņemtas vērā attiecīgi vismazāk labvēlīgās robežas (skat. 4. tabulu).

Ar šādu "kopējo formulu" var iegūt vienlīdz labus rezultātus attiecībā uz visiem svešas izcelsmes taukiem:

$$- 2,7575 \cdot C_{26} + 6,4077 \cdot C_{28} + 5,5437 \cdot C_{30} - 15,3247 \cdot C_{32} + 6,2600 \cdot C_{34} + 8,0108 \cdot C_{40} - 5,0336 \cdot C_{42} + 0,6356 \cdot C_{44} + 6,0171 \cdot C_{46} = S.$$

Jebkuri aprēķini svešas izcelsmes tauku kombināciju klātbūtnes noteikšanai piena taukos parādījuši, ka, piemēram, lai gan, izmantojot 2. tabulā kausētiem cūku taukiem norādīto formulu, šo svešas izcelsmes tauku piemaisījumu robeža ir zema, proti 2,7 %, svešas izcelsmes tauku, piemēram, kokosēļas, palmu eļļas vai palmu kodolu eļļas ar atklāšanas robežām attiecīgi 26,8, 12,5 un 19,3 %, ar šo formulu var noteikt tikai tad, ja tie piena taukiem pievienoti ļoti lielos daudzumos. Tas attiecas arī uz citām 2. tabulā ietvertajām formulām.

2. tabula

Triglicerīdu formulas svešas izcelsmes tauku noteikšanai piena taukos, norādot S standartnovirzi SN

Formula sojas, saulespuķu, rapšu sēkļu, linsēkļu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas un zivju eļļas noteikšanai

$$2,0983 \cdot C_{30} + 0,7288 \cdot C_{34} + 0,6927 \cdot C_{36} + 0,6353 \cdot C_{38} + 3,7452 \cdot C_{40} - 1,2929 \cdot C_{42} + 1,3544 \cdot C_{44} + 1,7013 \cdot C_{46} + 2,5283 \cdot C_{50} = S; SN = 0,38157$$

Formula kokosriekstu un palmu kodolu eļļas noteikšanai

$$3,7453 \cdot C_{32} + 1,1134 \cdot C_{36} + 1,3648 \cdot C_{38} + 2,1544 \cdot C_{42} + 0,4273 \cdot C_{44} + 0,5809 \cdot C_{46} + 1,1226 \cdot C_{48} + 1,0306 \cdot C_{50} + 0,9953 \cdot C_{52} + 1,2396 \cdot C_{54} = S; SN = 0,11323$$

Formula palmu eļļas un kausētu liellopu un aitu tauku noteikšanai

$$3,6644 \cdot C_{28} + 5,2297 \cdot C_{30} - 12,5073 \cdot C_{32} + 4,4285 \cdot C_{34} - 0,2010 \cdot C_{36} + 1,2791 \cdot C_{38} + 6,7433 \cdot C_{40} - 4,2714 \cdot C_{42} + 6,3739 \cdot C_{46} = S; SN = 0,81094$$

Formula kausētu cūku tauku noteikšanai

$$6,5125 \cdot C_{26} + 1,2052 \cdot C_{32} + 1,7336 \cdot C_{34} + 1,7557 \cdot C_{36} + 2,2325 \cdot C_{42} + 2,8006 \cdot C_{46} + 2,5432 \cdot C_{52} + 0,9892 \cdot C_{54} = S; SN = 0,39897$$

Lai pārbaudītu nezināmu tauku paraugu, jāizmanto visas 2. tabulā norādītās formulas un kopējā formula (2), ja šķiet, ka tas varētu būt piena tauku maisījums ar vienu no 14 dažādiem svešas izcelsmes taukiem vai šo svešas izcelsmes tauku kombināciju. Ja, ievietojot formulā analizējamo tauku paraugu triglicerīdus, iegūst S lielumu, kas neatbilst kaut vienam no 3. tabulā norādīto formulu diapazoniem, tad, visticamāk, paraugā ir pārveidoti piena tauki. Svešas izcelsmes tauku klātbūtnes noteikšana piena taukos pēc vienas no četrām 2. tabulā norādītajām formulām nedod iespēju secināt, kāda veida svešas izcelsmes tauki ir piejaukti.

3. tabula

S robežas piena taukiem

formulas svešas izcelsmes tauku klātbūtnes noteikšanai	S diapazons
sojas, saulespuķu, olīvu, rapšu sēkļu, linsēkļu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas un zivju eļļa	98,05 – 101,95
kokosriekstu un palmu kodolu eļļa	99,42 – 100,58
palmu eļļu un liellopu tauki	95,90 – 104,10
kausēti cūku tauki	97,96 – 102,04
kopējā formula	95,68 – 104,32

4. tabulā norādītas klātbūtnes noteikšanas robežas dažādiem svešas izcelsmes tauku piemaisījumiem ar 99 % ticamību. Pirmajā slejā norādīta minimālā klātbūtnes noteikšanas robeža labākajām 2. tabulas piena tauku formulām. Otrajā ailē dotas klātbūtnes noteikšanas robežas, ja izmanto kopējo formulu. Lai gan robežas ir mazliet augstākas, lai noteiktu mazliet lielākus svešas izcelsmes tauku daudzumus, vajadzīga tikai šī formula. Dažādas svešas izcelsmes tauku kombinācijas var noteikt arī, izmantojot visas formulas. Viena tipa dažādu svešas izcelsmes tauku piemaisījumu triglicerīdu variāciju diapazonam nav būtiskas ietekmes uz klātbūtnes noteikšanas robežām.

4. tabula

Procentos izteiktas 99% klātbūtnes noteikšanas robežas, pievienojot svešas izcelsmes taukus piena taukiem

	atsevišķā formula	kopējā formula
sojas eļļa	2,1	4,4
saulespuķu eļļa	2,3	4,8
olīveļļa	2,4	4,7
kokoseļļa	3,5	4,3
palmu eļļa	4,4	4,7
palmu kodolu eļļa	4,6	5,9
rapšu sēkļu eļļa	2,0	4,4
linsēkļu eļļa	2,0	4,0
kviešu dīgstu eļļa	2,7	6,4
kukurūzas dīgstu eļļa	2,2	4,5
kokvilnas eļļa	3,3	4,4
kausēti cūku tauki	2,7	4,7
liellopu tauki	5,2	5,4
hidrogenizēta zivju eļļa	5,4	6,1

Piezīme: S diapazonus aprēķina, tikai pieņemot, ka paraugā ir klāt svešas izcelsmes tauki, ja pēc atsevišķām formulām robežas ir pārsniegtas (skat. 4. tabulu).

9. Svešas izcelsmes tauku daudzuma noteikšana

Lai iegūtu informāciju par svešas izcelsmes tauku koncentrāciju piena tauku paraugā, izmanto šādu formulu:

$$X(\%) = 100|(100 - S)/(100 - S_F)|,$$

kur X ir nezināmu svešas izcelsmes tauku vai svešas izcelsmes tauku kombinācijas daudzums nezināmos piena taukos. S iegūst saskaitot nezināmos svešas izcelsmes taukus, ievietojot šo tauku un piena tauku maisījuma triglicerīdus iepriekš minētajā kopējā triglicerīdu formulā. Ja piena taukiem ir pievienoti nezināmi svešas izcelsmes tauki, kopējai formulai kā atšķirīgo svešas izcelsmes tauku vidējo S lielumu izvēlas S_F ; šo vidējo S lielumu iegūst, ievietojot tīro svešas izcelsmes tauku triglicerīdu datus šajā formulā un aprēķinot vidējo lielumu ($S_F = 7,46$). Labus rezultātus attiecībā uz jebkuru svešas izcelsmes tauku piemaisījumu daudzumu, iegūst arī izmantojot palmu eļļas/kausētu liellopu un aitu tauku formulu (2. tabula) un vidējo S_F lielumu 10,57.

Ja piejaukto tauku veids ir zināms, ievieto šādas S_F vērtības iepriekš minētajā formulā un izvēlas atbilstīgu piejaukto tauku formulu no 2. tabulas:

5. tabula

Dažādu svešas izcelsmes tauku S_F lielumi

svešas izcelsmes tauki	S_F
sojas eļļa	8,18
saulespuķu eļļa	9,43
olīveļļa	12,75
kokoseļļa	118,13
palmu eļļa	7,55
palmu kodolu eļļa	112,32
rapšu sēkļu eļļa	3,30
linsēkļu eļļa	4,44
kviešu dīgstu eļļa	27,45
kukurūzas dīgstu eļļa	9,29
kokvilnas eļļa	41,18
kausēti cūku tauki	177,55
kausēti liellopu tauki	17,56
zivju eļļa	64,12

10. Klātbūtnes noteikšanas metodes piemērošanas diapazons

Aprakstīto metodi piemēro neiekasētiem piena produktiem, un šī metode balstās uz to, ka piena tauku paraugi ir reprezentatīvi.

Ļoti specifiska klātbūtnes noteikšana būtu iespējama, ja reprezentatīvam piena tauku daudzumam iepriekš aprakstītās formulas tiktu izstrādātas dažādām valstīm.

Varētu būt īpaši piemērotas klātbūtnes noteikšanas iespējas, ja dažādās valstīs reprezentatīvam piena tauku daudzumam tiktu izstrādātas formulas, kā aprakstīts šeit. Tādā gadījumā nav jāizmanto kompleksas datorprogrammas, ja piemēro 2. tabulā izmantotās triglicerīdu kombinācijas un reizinātāji ir noteikti atkārtoti, izmantojot mazāko kvadrātu metodi.

Piemērojot S diapazonus, kā parādīts 3. tabulā, formulas ir parasti izmantojamas īpašos barošanas apstākļos, piemēram, nepietiekama barošana vai govju barošana ar lopbarības raugu vai Ca ziepēm. Tikai ārkārtējos barošanas apstākļos (piem., lielas tīras lopbarības eļļas devas, augsta Ca ziepju piedeva, kombinējot ar lopbarības taukiem u.tml.) formula daļēji uzrāda pārveidotus piena taukus.

Piezīme: Frakcionētus piena taukus parasti atzīst par pārveidotiem piena taukiem, ja pārveidi pieņem tikai tad, kad ir pārsniegtas robežas. Tikai tad, ja frakcionētos piena taukus ar piena taukiem neraksturīgu sastāvu, kā tas ir, piemēram, attiecībā uz cieto frakciju, ko iegūst, frakcionējot ar fizikālām metodēm augstās temperatūrās ap 30 °C ar nelielu dažu procentu iznākumu vai frakcionējot ar CO₂ virs kritiskās normas, formula norāda uz modifikāciju.

Piena tauku frakcionēšanu tomēr var noteikt, izmantojot citas procedūras, piemēram, diferenciālskenēšanas kalorimetriju.

11. Metodes precizitāte

Nosaka pēc piena taukiem, pamatojoties uz 2. tabulā norādītajām formulām un 3. tabulā norādīto S diapazonu.

11.1. Atkārtojamība

Starpība starp lielumiem S, kas iegūti, vienam laborantam ar, cik iespējams, īsu starplaiku divreiz veicot noteikšanu ar vienu un to pašu procedūru un identiskiem paraugu materiāliem tajos pašos apstākļos (tā pati persona, tie paši instrumenti/tās pašas ierīces, tā pati laboratorija):

6. tabula

Atkārtojamības robežas (r) dažādām formulām

formula, lai noteiktu šādu svešu tauku klātbūtni	r
sojas, saulespuķu, olīvu, rapšu sēkļu, linsēkļu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas un zivju eļļu	0,67
kokosriekstu un palmu kodolu eļļu	0,12
palmu eļļu un kausētus liellopu un aitu taukus	1,20
kausētus cūku taukus	0,58
kopējā formula	1,49

11.2. *Sakritība*

Starpība starp lielumiem S, kas iegūti divās noteikšanās, ko veikuši laboranti dažādās laboratorijās ar to pašu procedūru un identiskiem parauga materiāliem dažādos apstākļos (dažādas personas, dažādi instrumenti) un dažādos laikos.

7. tabula

Dažādu formulu sakritības robežas (R)

formula, lai noteiktu šādu svešu tauku klātbūtni	R
sojas, saulespuķu, olīvu, rapšu sēkļu, linsēkļu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas un zivju eļļu	1,08
kokosriekstu un palmu kodolu eļļu	0,40
palmu eļļu un kausētus liellopu un aitu taukus	1,81
kausētus cūku taukus	0,60
kopējā formula	2,07

11.3. *Kritiskā starpība*

Kritiskās starpības visiem 3. tabulas S diapazoniem var aprēķināt, izmantojot atkārtojamības robežu (r) un sakritības robežu (R). Attiecīgie lielumi norādīti 8. tabulā.

8. tabula

Triglicerīdu formulu kritiskās starpības

formula, lai noteiktu šādu svešu tauku klātbūtni	diapazons
Sojas, saulespuķu, olīvu, rapšu sēkļu, linsēkļu, kviešu dīgstu, kukurūzas dīgstu, kokvilnas un zivju eļļu	97,43 – 102,57
kokosriekstu un palmu kodolu eļļu	99,14 – 100,86
palmu eļļu un kausētus liellopu un aitu taukus	94,91 – 105,09
kausētus cūku taukus	97,65 – 102,35
kopējā formula	94,58 – 105,42

11.4. Rezultātu pieņemamība

Visi kalibrētie, līdz divām decimālzīmēm noapaļotie C24, C26, C28 līdz C54 triglicerīdu daudzumi, kā arī holesterīns, jānormalizē precīzi līdz 100.

Atkārtotu analīžu rezultātus izmanto, lai pārbaudītu atkārtojamību. Ja absolūtā starpība starp diviem S rezultātiem visām piecām triglicerīdu formulām nepārsniedz 6. tabulā norādītās atkārtojamības robežas r, tad atkārtojamības prasība ir izpildīta.

Lai pārbaudītu, vai hromatogrāfijas nosacījumi ir optimāli, un jo īpaši kolonnas kvalitāti, būtu jāgarantē, ka 10 atkārtojumu sērijās maksimālo un minimālo S lielumu starpība visām piecām triglicerīdu formulām nepārsniedz diapazonu $x \cdot r$, ja $x = 1,58$ (10 sērijām, skat. 16. atsauci literatūras sarakstā) un atkārtojamības robežas r dažādām formulām 6. tabulā.

12. Citētie standarti

DIN 10 336: 1994	Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchliefen anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse
IDF Standard 1 C: 1987	Piens. Tauku satura noteikšana – Rozes-Gotlība gravimetriskā metode (Milk. Determination of Fat Content – Röse Gottlieb Gravimetric Method)
IDF Standard 16C: 1987	Krējums. Tauku satura noteikšana – Rozes-Gotlība gravimetriskā metode (Cream. Determination of Fat Content – Röse Gottlieb Gravimetric Method)
IDF Standard 116A: 1987	Piena saldējums un saldējuma maisījumi. Tauku satura noteikšana – Rozes-Gotlība gravimetriskā metode (Milk-Based Edible Ices and Ice Mixes. Determination of Fat Content – Röse Gottlieb Gravimetric Method)
IDF Standard 22B: 1987	Vājpiens, paniņas un sūkalas. Tauku satura noteikšana – Rozes-Gotlība gravimetriskā metode (Skimmed Milk, Whey & Buttermilk. Determination of Fat Content – Röse Gottlieb Gravimetric Method)

13. Atsauces

1. Commission of the European Communities: Detection of foreign fats in milk fat by means of gas chromatographic triglyceride analysis, Doc. No VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Commission of the European Communities: Control of butter fat purity of 100 different samples of different feeding periods from 11 EEC countries; Doc. No VI/4577/93.
3. Commission of the European Communities: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. Dairy Research 47 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: Nachweis von modifiziertem Milchliefen mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchliefen mit Hilfe von Triglyceridkombinationen, 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: Zum Nachweis von Fremdfett in Milchliefen über die Triglyceridanalyse. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 29-35 (1987).
7. Precht, D.: Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchliefen. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143-157 (1989).
8. Precht, D.: Schnelle Extraktion von Milchliefen, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchliefen. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992).
13. Precht, D.: Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns in CRC Handbook of Chromatography: Analysis of lipids, p. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkentin, J.: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molkentin, J., Precht, D.: Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme, Springer-Verlag, Berlin, P. 378 (1970).

XXVI PIELIKUMS

PIRMAJĀ APSVĒRUMĀ MINĒTO REGULU SARAKSTS

- Komisijas 1968. gada 9. augusta Regula (EEK) Nr. 1216/68, ar ko nosaka metodi laktozes satura noteikšanai kombinētajā lopbarībā, kuru importē no trešām valstīm ⁽¹⁾, kas grozīta ar Komisijas 1987. gada 22. decembra Regulu (EEK) Nr. 222/88, kas pēc kombinētās nomenklatūras ieviešanas groza atsevišķus pasākumus tirgus kopējās organizācijas īstenošanai piena un piena produktu nozarē ⁽²⁾;
- Komisijas 1992. gada 22. decembra Regula (EEK) Nr. 3942/92, ar ko ievieš referenes metodi sitosterīna un stigmasterīna noteikšanai sviesta eļļā ⁽³⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas Regulu (EK) Nr. 175/1999, ar ko groza Regulas (EEK) Nr. 3942/92, (EK) Nr. 86/94, (EK) Nr. 1082/96 un (EK) Nr. 1459/98, ar kurām ievieš referenes metodes konkrētu marķieru noteikšanai sviestā, piena bezūdens taukos un krējumā ⁽⁴⁾;
- Komisijas 1994. gada 19. janvāra Regula (EK) Nr. 86/94, ar ko ievieš referenes metodi sitosterīna un stigmasterīna noteikšanai sviestā ⁽⁵⁾, kas grozīta ar Regulu (EK) Nr. 175/1999;
- Komisijas 1995. gada 24. novembra Regula (EK) Nr. 2721/95, ar ko ievieš noteikumus referenes metožu un rutīnas metožu piemērošanai piena un piena produktu analīzēm un kvalitatīvai novērtēšanai saistībā ar tirgus kopīgo organizāciju ⁽⁶⁾;
- Komisijas 1996. gada 14. jūnija Regula (EK) Nr. 1080/96, ar ko ievieš referenes metodi kolibaktēriju klātbūtnes noteikšanai sviestā, sausajā vājpienā un kazeinā/kazeinātos ⁽⁷⁾;
- Komisijas 1996. gada 14. jūnija Regula (EK) Nr. 1081/96, ar ko ievieš referenes metodi govs piena un kazeinātu klātbūtnes noteikšanai sieros, kas gatavoti no aitas piena, kazas piena vai bifelīmātes piena vai aitas, kazas un bifelīmātes piena maisījumiem, un ar ko atceļ Regulu (EEK) Nr. 690/92 ⁽⁸⁾;
- Komisijas 1996. gada 14. jūnija Regula (EK) Nr. 1082/96, ar ko ievieš referenes metodi beta-apo-8' karotēnskābes etilesteru noteikšanai iebiezinātā sviestā un sviestā ⁽⁹⁾, kas grozīta ar Regulu (EK) Nr. 175/1999;
- Komisijas 1996. gada 26. septembra Regula (EK) Nr. 1854/96, ar ko ievieš to referenes metožu sarakstu, kuras piemērojamas piena un piena produktu analīzēm un kvalitātes vērtējumam saskaņā ar tirgus kopīgo organizāciju ⁽¹⁰⁾, kas grozīta ar Regulu (EK) Nr. 881/1999 ⁽¹¹⁾;
- Komisijas 1998. gada 24. aprīļa Regula (EK) Nr. 880/98, ar ko ievieš referenes metodes ūdens, beztauku saunas un tauku satura noteikšanai sviestā ⁽¹²⁾;
- Komisijas 1998. gada 8. jūlija Regula (EEK) Nr. 1459/98, ar ko ievieš referenes metodi vaniļīna noteikšanai iebiezinātā sviestā, sviestā vai krējumā ⁽¹³⁾, kas grozīta ar Regulu (EK) Nr. 175/1999.

⁽¹⁾ OV L 198, 10.8.1968., 13 lpp.

⁽²⁾ OV L 28, 1.2.1988., 1 lpp.

⁽³⁾ OV L 399, 31.12.1992., 29 lpp.

⁽⁴⁾ OV L 20, 27.1.1999., 22 lpp.

⁽⁵⁾ OV L 17, 20.1.1994., 7 lpp.

⁽⁶⁾ OV L 283, 25.11.1995., 7 lpp.

⁽⁷⁾ OV L 142, 15.6.1996., 13 lpp.

⁽⁸⁾ OV L 142, 15.6.1996., 15 lpp.

⁽⁹⁾ OV L 142, 15.6.1996., 26 lpp.

⁽¹⁰⁾ OV L 246, 27.9.1996., 5 lpp.

⁽¹¹⁾ OV L 111, 29.4.1999., 24 lpp.

⁽¹²⁾ OV L 124, 25.4.1998., 16 lpp.

⁽¹³⁾ OV L 193, 9.7.1998., 16 lpp.