

ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2018/150**z dnia 30 stycznia 2018 r.****zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) 2016/1240 w odniesieniu do metod analizy oraz oceny jakości mleka i przetworów mlecznych kwalifikujących się do interwencji publicznej i dopłat do prywatnego przechowywania**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1306/2013 z dnia 17 grudnia 2013 r. w sprawie finansowania wspólnej polityki rolnej, zarządzania nią i monitorowania jej oraz uchylające rozporządzenia Rady (EWG) nr 352/78, (WE) nr 165/94, (WE) nr 2799/98, (WE) nr 814/2000, (WE) nr 1290/2005 i (WE) nr 485/2008 ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 62 ust. 2 lit. i),

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu delegowanym Komisji (UE) 2016/1238 ⁽²⁾ i rozporządzeniu wykonawczym Komisji (UE) 2016/1240 ⁽³⁾ ustanowiono przepisy dotyczące interwencji publicznej i dopłat do prywatnego przechowywania. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 273/2008 ⁽⁴⁾ określa metody, które mają być stosowane przy ocenie, czy mleko i przetwory mleczne spełniają wymogi kwalifikowalności określone w tych rozporządzeniach w odniesieniu do interwencji publicznej i dopłat do prywatnego przechowywania.
- (2) W świetle postępu technicznego w metodach wykorzystywanych do analizy i oceny jakości mleka i przetworów mlecznych należy wprowadzić znaczne zmiany w celu uproszczenia i aktualizacji odniesień do norm ISO. W celu zapewnienia jasności i skuteczności oraz uwzględniając zakres oraz techniczny charakter zmian do przepisów rozporządzenia (WE) nr 273/2008, odpowiednie przepisy tego rozporządzenia należy włączyć do rozporządzenia wykonawczego (UE) 2016/1240.
- (3) W celu zapewnienia jednolitego stosowania nowych norm i metod we wszystkich państwach członkowskich laboratoria powinny mieć wystarczająco dużo czasu na dokonanie przeglądu procedur i stosowanie zaktualizowanych metod.
- (4) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie wykonawcze (UE) 2016/1240.
- (5) W celu zachowania pewności prawa należy uchylić rozporządzenie (WE) nr 273/2008.
- (6) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu ds. Wspólnej Organizacji Rynków Rolnych,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W rozporządzeniu wykonawczym (UE) 2016/1240 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) w art. 4 wprowadza się następujące zmiany:
 - a) w ust. 1 wprowadza się następujące zmiany:
 - (i) lit. d) otrzymuje brzmienie:
„d) w odniesieniu do masła: w częściach I i Ia załącznika IV do niniejszego rozporządzenia.”;
 - (ii) lit. e) otrzymuje brzmienie:
„e) w odniesieniu do odtuszczonego mleka w proszku: w częściach I i Ia załącznika V do niniejszego rozporządzenia.”;

⁽¹⁾ Dz.U. L 347 z 20.12.2013, s. 549.

⁽²⁾ Rozporządzenie delegowane Komisji (UE) 2016/1238 z dnia 18 maja 2016 r. uzupełniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1308/2013 w odniesieniu do interwencji publicznej i dopłat do prywatnego przechowywania (Dz.U. L 206 z 30.7.2016, s. 15).

⁽³⁾ Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2016/1240 z dnia 18 maja 2016 r. ustalające zasady stosowania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1308/2013 w odniesieniu do interwencji publicznej i dopłat do prywatnego przechowywania (Dz.U. L 206 z 30.7.2016, s. 71).

⁽⁴⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 273/2008 z dnia 5 marca 2008 r. ustanawiające szczegółowe zasady stosowania rozporządzenia Rady (WE) nr 1255/1999 w odniesieniu do metod analizy oraz oceny jakości mleka i przetworów mlecznych (Dz.U. L 88 z 29.3.2008, s. 1).

b) ust. 2 otrzymuje brzmienie:

„2. Metodami stosowanymi do określania jakości zbóż, masła i odtuszczonego mleka w proszku, które kwalifikują się do interwencji publicznej i o których mowa odpowiednio w załącznikach I, IV i V, są metody ustanowione w ramach najnowszych wersji odpowiednich norm europejskich lub międzynarodowych, stosownie do przypadku, które to normy obowiązują co najmniej 6 miesięcy przed pierwszym dniem okresu interwencji publicznej, jak określono w art. 12 rozporządzenia (UE) nr 1308/2013.”;

2) dodaje się art. 60a w brzmieniu:

„Artykuł 60a

Przepisy szczegółowe dotyczące kontroli w ramach interwencji publicznej oraz dopłat do prywatnego przechowywania w odniesieniu do mleka i przetworów mlecznych

1. Kwalifikowalność masła, odtuszczonego mleka w proszku i sera do otrzymania dopłat do prywatnego przechowywania ustala się zgodnie z metodami określonymi odpowiednio w załącznikach VI, VII i VIII.

Metody te ustanawia się poprzez odesłanie do najnowszych wersji odpowiednich norm europejskich lub międzynarodowych, stosownie do przypadku, które to normy obowiązują co najmniej 6 miesięcy przed pierwszym dniem okresu interwencji publicznej, jak określono w art. 12 rozporządzenia (UE) nr 1308/2013.

2. Wyniki kontroli przeprowadzonych z zastosowaniem metod określonych w niniejszym rozporządzeniu podlegają ocenie zgodnie z załącznikiem IX.”;

3) w załącznikach wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Rozporządzenie (WE) nr 273/2008 traci moc.

Artykuł 3

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie siódmego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 30 stycznia 2018 r.

W imieniu Komisji
Jean-Claude JUNCKER
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

W załącznikach do rozporządzenia wykonawczego (UE) 2016/1240 wprowadza się następujące zmiany:

1) w załączniku IV wprowadza się następujące zmiany:

a) w części I pkt 2 akapit drugi otrzymuje brzmienie:

„Każdą próbkę należy ocenić indywidualnie. Niedozwolone jest przeprowadzanie powtórnego pobierania próbek oraz powtórnej oceny.”;

b) dodaje się część Ia w brzmieniu:

„CZĘŚĆ IA

Metody analizy niesolonego masła do celów interwencji publicznej

Parametr	Metoda
Tłuszcz ⁽¹⁾	ISO 17189 lub ISO 3727 część 3
Woda	ISO 3727 część 1
Sucha masa beztłuszczowa	ISO 3727 część 2
Kwasowość tłuszczu	ISO 1740
Liczba nadtlenkowa	ISO 3976
Tłuszcz niemleczny	ISO 17678
Charakterystyka sensoryczna	ISO 22935 część 2 i 3 oraz punktacja jak w tabeli poniżej.

⁽¹⁾ Stosuje się metodę zatwierdzoną przez agencję płatniczą.

Tabela punktacji

Wygląd		Konsystencja		Zapach i smak	
Punkty	Uwagi	Punkty	Uwagi	Punkty	Uwagi
5	<i>Bardzo dobry</i> Idealny rodzaj Najwyższa jakość (równomiernie suche)	5	<i>Bardzo dobra</i> Idealny rodzaj Najwyższa jakość (możliwe równomierne rozsmarowanie)	5	<i>Bardzo dobry</i> Idealny rodzaj Najwyższa jakość (absolutnie czysty, naj- lepszy zapach)
4	<i>Dobry</i> (bez wyraźnych wad)	4	<i>Dobra</i> (bez wyraźnych wad)	4	<i>Dobry</i> (bez wyraźnych wad)
1, 2 lub 3	Jakiegolwiek wady	1, 2 lub 3	Jakiegolwiek wady	1, 2 lub 3	Jakiegolwiek wady”

2) w załączniku V dodaje się część Ia w brzmieniu:

„CZĘŚĆ IA

Metody analizy odtłuszczonego mleka w proszku do celów interwencji publicznej

Parametr	Metoda
Białko	ISO 8968 część 1
Tłuszcz	ISO 1736
Woda	ISO 5537
Kwasowość	ISO 6091
Mleczany	ISO 8069
Test na fosfatę	ISO 11816 część 1
Wskaźnik nierozpuszczalności	ISO 8156
Cząstki przypalone ⁽¹⁾	ADPI
Mikroorganizmy	ISO 4833 część 1
Maślanka	Dodatek I
Serwatka podpuszczkowa ⁽²⁾	Dodatki II i III
Serwatka kwasowa ⁽³⁾	ISO 8069 lub kontrole na miejscu
Kontrole sensoryczne ⁽⁴⁾	ISO 22935 część 2 i 3

⁽¹⁾ Analiza cząstek przypalonych może być przeprowadzana systematycznie. Analiza taka musi być jednak zawsze przeprowadzona w przypadku braku kontroli sensorycznej.

⁽²⁾ Stosuje się metodę zatwierdzoną przez agencję płatniczą (jedną lub więcej metod).

⁽³⁾ Stosuje się metodę zatwierdzoną przez agencję płatniczą.

⁽⁴⁾ Jeżeli okaże się to konieczne po przeprowadzeniu analizy ryzyka zatwierdzonej przez agencję płatniczą, przeprowadza się kontrole sensoryczne.

Dodatek I

ODTŁUSZCZONE MLEKO W PROSZKU: ILOŚCIOWE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI FOSFATYDYLOSERYNY I FOSFATYDYLOETANOLAMINY**Metoda: HPLC z odwróconymi fazami.**

1. ZAKRES I DZIEDZINA STOSOWANIA

Metoda opisuje procedurę ilościowego oznaczania fosfatydyloseryny (PS) oraz fosfatydyloetanolaminy (PE) w odtłuszczonym mleku w proszku (OMP) i jest odpowiednia do wykrywania suchej masy maślanki w odtłuszczonym mleku w proszku.

2. DEFINICJA

Zawartość PS + PE: ułamek masowy substancji oznaczony z wykorzystaniem procedury określonej w niniejszej metodzie. Wynik wyrażony jest w miligramach dipalmitoilofosfatydyloetanolaminy (PEDP) na 100 g proszku.

3. ZASADA METODY

Ekstrakcja aminofosfolipidów z odtworzonego mleka w proszku przy użyciu metanolu. Oznaczenie PS i PE jako pochodnych dialdehydu o-ftalowego (OPA) metodą HPLC z odwróconymi fazami i detekcją fluorescencyjną. Oznaczenie ilościowe zawartości PS i PE w badanej próbce przez odniesienie do próbki wzorcowej zawierającej znaną ilość PEDP.

4. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej. Stosuje się wodę destylowaną lub wodę o równoważnym stopniu czystości, jeżeli nie określono inaczej.

4.1. **Materiał wzorcowy: PEDP, czystość co najmniej 99 %**

Uwaga: Materiał wzorcowy musi być przechowywany w temperaturze – 18 °C.

4.2. **Odczynniki do przygotowania próbki wzorcowej i próbki badanej**

4.2.1. *Metanol o jakości wymaganej dla HPLC*

4.2.2. *Chloroform o jakości wymaganej dla HPLC*

4.2.3. *Monochlorowodorek tryptaminy*

4.3. **Odczynniki do derywatywacji dialdehydu o-ftalowego**

4.3.1. *Wodorotlenek sodu, roztwór wodny 12 M*

4.3.2. *Kwas borny, roztwór wodny 0,4 M, o pH doprowadzonym do 10,0 przy użyciu wodorotlenku sodu (ppkt 4.3.1)*

4.3.3. *2-merkaptoetanol*

4.3.4. *Dialdehyd o-ftalowy (OPA)*

4.4. **Rozpuszczalniki eluujące do HPLC**

4.4.1. *Rozpuszczalniki eluujące są przygotowywane przy użyciu odczynników o jakości wymaganej dla HPLC.*

4.4.2. *Woda o jakości wymaganej dla HPLC*

4.4.3. *Metanol o czystości zbadanej fluorometrycznie*

4.4.4. *Tetrahydrofuran*

4.4.5. *Diwodorofosforan sodu*

4.4.6. *Octan sodu*

4.4.7. *Kwas octowy*

5. APARATURA

5.1. **Waga analityczna, umożliwiająca ważenie z dokładnością do 1 mg, o dokładności odczytu 0,1 mg**

5.2. **Zlewki poj. 25 ml i 100 ml**

5.3. **Pipety umożliwiające dozowanie 1 ml i 10 ml**

5.4. **Mieszadło magnetyczne**

5.5. **Pipety miarowe umożliwiające dozowanie 0,2 ml, 0,5 ml i 5 ml**

5.6. **Kolby miarowe poj. 10 ml, 50 ml i 100 ml**

5.7. **Strzykawki poj. 20 μ l i 100 μ l**

5.8. **Łażnia ultradźwiękowa**

5.9. **Wirówka umożliwiająca osiągnięcie 27 000 \times g**

5.10. **Fiolki szklane poj. ok. 5 ml**

5.11. **Cylinder miarowy poj. 25 ml**

5.12. **Pehametr o dokładności pomiaru do 0,1 jednostki pH**

5.13. **Sprzęt do HPLC**

5.13.1. *Układ pompowy do elucji gradientowej umożliwiający pracę przy natężeniu 1,0 ml/min i ciśnieniu 200 barów*

5.13.2. *Automatyczny podajnik do próbek umożliwiający derywatazację*

5.13.3. *Ogrzewacz kolumnowy, umożliwiający utrzymanie kolumny w temp. 30 °C \pm 1 °C*

5.13.4. *Detektor fluorescencji, umożliwiający pracę przy długości fali wzbudzenia 330 nm i długości fali emisji 440 nm*

5.13.5. *Integrator lub oprogramowanie do przetwarzania danych umożliwiający pomiar powierzchni pików*

5.13.6. *LiChrospher® – kolumna 100 (250 \times 4,6 mm) lub równoważna kolumna wypełniona oktadecylosilanem (C 18) o uziarnieniu 5 μ m*

6. POBIERANIE PRÓBEK

Pobieranie próbek przeprowadza się zgodnie z normą ISO 707.

7. PROCEDURA

7.1. **Przygotowanie wewnętrznego roztworu wzorcowego**

7.1.1. *Odmierzyć wagowo 30,0 \pm 0,1 mg monochlorowodoru tryptaminy (ppkt 4.2.3) do kolby miarowej poj. 100 ml (ppkt 5.6) i uzupełnić do kreski metanolem (ppkt 4.2.1).*

7.1.2. *Odmierzyć pipetą 1 ml (ppkt 5.3) tego roztworu do kolby miarowej poj. 10 ml (ppkt 5.6) i uzupełnić do kreski metanolem (ppkt 4.2.1) w celu uzyskania stężenia 0,15 mM tryptaminy.*

7.2. **Przygotowanie roztworu próbki badanej**

7.2.1. *Odmierzyć wagowo 1,000 \pm 0,001 g próbki OMP do zlewki poj. 25 ml (ppkt 5.2). Odmierzyć pipetą (ppkt 5.3) 10 ml wody destylowanej o temp. 40 °C \pm 1 °C i mieszać mieszadłem magnetycznym (ppkt 5.4) przez 30 minut do całkowitego rozpuszczenia grudek.*

7.2.2. *Odmierzyć pipetą (ppkt 5.5) 0,2 ml odtworzonego mleka do kolby miarowej poj. 10 ml (ppkt 5.6), za pomocą strzykawki (ppkt 5.7) dodać 100 μ l roztworu 0,15 mM tryptaminy (ppkt 7.1) i uzupełnić do kreski metanolem (ppkt 4.2.1). Wymieszać dokładnie, odwracając kolbę i poddawać sonikacji (ppkt 5.8) przez 15 minut.*

7.2.3. *Wirować (ppkt 5.9) przy 27 000 \times g przez 10 minut i zebrać nadsącz do szklanej fiołki (ppkt 5.10).*

Uwaga: Do chwili przeprowadzenia analizy HPLC roztwór próbki badanej należy przechowywać w temp. 4 °C.

7.3. Przygotowanie zewnętrznego roztworu wzorcowego

- 7.3.1. Odmierzyć wagowo 55,4 mg PEDP (ppkt 4.1) do kolby miarowej poj. 50 ml (ppkt 5.6) i dodać ok. 25 ml chloroformu (ppkt 4.2.2), używając cylindra miarowego (ppkt 5.11). Podgrzać zakorkowaną kolbę do 50 °C ± 1 °C i wymieszać dokładnie aż do rozpuszczenia PEDP. Schłodzić kolbę do 20 °C, uzupełnić do kreski metanolem (ppkt 4.2.1) i wymieszać przez odwracanie.
- 7.3.2. Odmierzyć pipetą 1 ml (ppkt 5.3) tego roztworu do kolby miarowej poj. 100 ml (ppkt 5.6), uzupełnić do kreski metanolem (ppkt 4.2.1). Odmierzyć pipetą 1 ml (ppkt 5.3) tego roztworu do kolby miarowej poj. 10 ml (ppkt 5.6), dodać 100 µl (ppkt 5.7) roztworu 0,15 mM tryptaminy (ppkt 7.1) i uzupełnić do kreski metanolem (ppkt 4.2.1). Wymieszać przez odwracanie.

Uwaga: Do chwili przeprowadzania analizy HPLC roztwór próbki odniesienia należy przechowywać w temp. 4 °C.

7.4. Przygotowanie odczynnika do derywatyzacji

Odmierzyć wagowo 25,0 ± 0,1 mg OPA (ppkt 4.3.4) do kolby miarowej poj. 10 ml (ppkt 5.6), dodać 0,5 ml (ppkt 5.5) metanolu (ppkt 4.2.1) i wymieszać dokładnie w celu rozpuszczenia OPA. Uzupełnić do kreski roztworem kwasu borowego (ppkt 4.3.2) i dodać 20 µl 2-merkaptoetanolu (ppkt 4.3.3) za pomocą strzykawki (ppkt 5.7).

Uwaga: Odczynnik do derywatyzacji należy przechowywać w temp. 4 °C w fiolce z brązowego szkła; w takich warunkach zachowuje on stabilność przez okres jednego tygodnia.

7.5. Oznaczenie za pomocą HPLC

7.5.1. Rozpuszczalniki eluujące (ppkt 4.4)

Rozpuszczalnik A: roztwór 0,3 mM diwodorofosforanu sodu i roztwór 3 mM octanu sodu (dostosowane do pH 6,5 ± 0,1 za pomocą kwasu octowego): metanol: tetrahydrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Rozpuszczalnik B: metanol

7.5.2. Zalecany gradient elucji

Czas (minuty)	Rozpuszczalnik A (%)	Rozpuszczalnik B (%)	Natężenie przepływu (ml/min)
Początkowy	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

Uwaga: W celu uzyskania rozdzielczości przedstawionej na rys. 1 niezbędna może się okazać drobna modyfikacja gradientu elucji.

Temperatura kolumny: 30 °C.

7.5.3. Objętość wprowadzona: 50 µl odczynnika do derywatywacji i 50 µl roztworu próbki.

7.5.4. Równoważenie kolumny

Uruchamiając układ każdego dnia, należy przepłukiwać kolumny rozpuszczalnikiem B o stężeniu 100 % przez 15 minut, następnie ustalić rozpuszczalniki A i B w proporcji 40:60 i równoważyć przy 1 ml/min przez 15 minut. Przeprowadzić ślepią próbę poprzez wprowadzenie metanolu (ppkt 4.2.1).

Uwaga: Przed długotrwałym przechowywaniem płukać kolumnę roztworem metanolu i chloroformu w proporcji 80:20 (v/v) przez 30 minut.

7.5.5. Oznaczyć zawartość PS + PE w badanej próbce.

7.5.6. Przeprowadzić sekwencję analiz chromatograficznych, utrzymując niezmienny czas pomiędzy pojedynczymi analizami w celu uzyskania stałych czasów retencji. Wprowadzać zewnętrzny roztwór wzorcowy (ppkt 7.3) co 5–10 wprowadzeń roztworu badanej próbki w celu obliczenia współczynnika odpowiedzi.

Uwaga: Kolumna jest czyszczona przez przepłukiwanie 100 % rozpuszczalnikiem B (ppkt 7.5.1), przez co najmniej 30 minut, co 20–25 pojedynczych analiz.

7.6. Metoda całkowania

7.6.1. Pik PEDP

PEDP jest eluowana w postaci pojedynczego piku. Określić powierzchnię piku przez całkowanie wykresu między kolejnymi dolinami.

7.6.2. Pik tryptaminy

Tryptamina jest eluowana w postaci pojedynczego piku (rys. 1). Określić powierzchnię piku przez całkowanie wykresu między kolejnymi dolinami.

7.6.3. Grupy pików PS i PE

W opisanych warunkach (rys. 1) PS jest eluowana w postaci dwóch głównych, częściowo nierozdzielonych pików, poprzedzonych mniejszym pikiem. PE jest eluowana w postaci trzech głównych, częściowo nierozdzielonych pików. Określić całkowitą powierzchnię każdego skupiska pików przez ustawienie linii podstawowej zgodnie z rys. 1.

8. OBLICZANIE I PREZENTACJA WYNIKÓW

Zawartość PS i PE w próbce badanej oblicza się, jak następuje:

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

gdzie:

C = zawartość PS lub PE (mg/100 g proszku) w badanej próbce

A₁ = powierzchnia piku PEDP roztworu próbki wzorcowej (ppkt 7.3)

A₂ = powierzchnia piku PS lub PE roztworu próbki badanej (ppkt 7.2)

T₁ = powierzchnia piku tryptaminy w roztworze próbki wzorcowej (ppkt 7.3)

T₂ = powierzchnia piku tryptaminy w roztworze próbki badanej (ppkt 7.2)

9. DOKŁADNOŚĆ METODY

Uwaga: Wartości powtarzalności zostały obliczone zgodnie z międzynarodową normą IDF (*).

9.1. Powtarzalność

Względne odchylenie standardowe powtarzalności, wyrażające zmienność niezależnych wyników analitycznych otrzymanych przez ten sam podmiot, wykorzystujący tę samą aparaturę, w takich samych warunkach, na takiej samej próbce badanej oraz w krótkim odstępie czasu, nie powinno przekraczać 2 % wartości względnej. Jeżeli w tych warunkach otrzymane są dwa oznaczenia, względna różnica między dwoma wynikami nie powinna być większa niż 6 % średniej arytmetycznej wyników.

9.2. Odtwarzalność

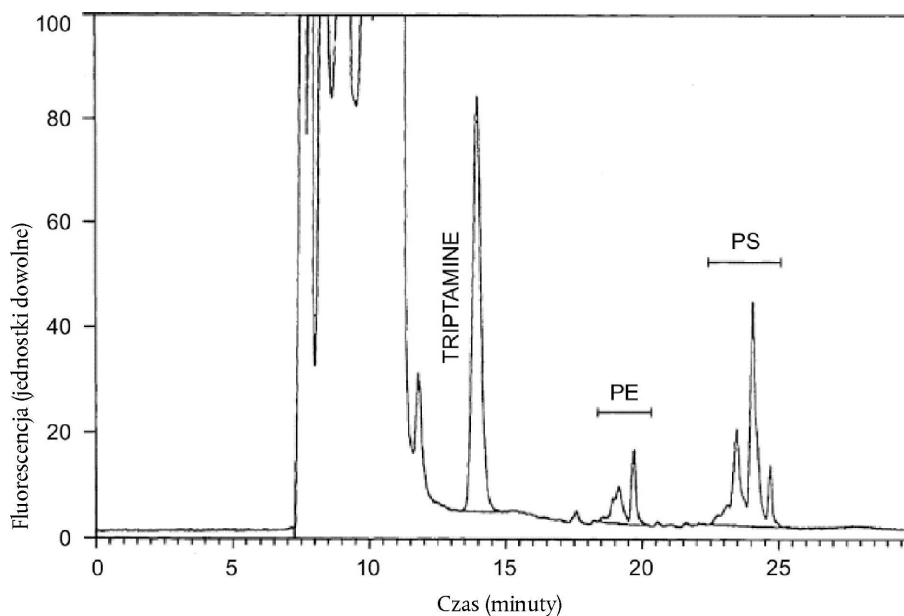
Jeżeli podczas analizy tej samej próbki badanej dwa oznaczenia są otrzymane przez podmioty w różnych laboratoriach, w różnych warunkach i przy wykorzystaniu różnej aparatury, względna różnica między dwoma wynikami nie powinna być większa niż 11 % średniej arytmetycznej wyników.

10. ODNIESIENIA

- 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).

Rys. 1

Uzyskany przy użyciu HPLC wzór pochodnych OPA fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloetanolaminy (PE) w wyciągu metanolowym odtworzonego odtuszczonego mleka w proszku. Podano tryb całkowania dla pików PS, PE i tryptaminy (wzorzec wewnętrzny).



Dodatek II

WYKRYWANIE OBECNOŚCI SERWATKI PODPUSZCZKOWEJ W ODTŁUSZCZONYM MLEKU W PROSZKU PRZEZNACZONYM DO PRZECHOWYWANIA PUBLICZNEGO ZA POMOCĄ OZNACZANIA MAKROPEPTYDÓW KAZEINOWYCH METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)

1. ZAKRES I DZIEDZINA STOSOWANIA

Omawiana metoda umożliwia wykrywanie obecności serwatki podpuszczkowej w odtłuszczonym mleku w proszku przeznaczonym do przechowywania publicznego za pomocą oznaczania makropeptydów kazeinowych.

2. ODNIESIENIE

Międzynarodowa norma ISO 707 – Mleko i przetwory mleczne – Wytyczne do pobierania próbek.

3. DEFINICJA

Zawartość suchej masy serwatki podpuszczkowej jest zdefiniowana jako procent masowy, określony w oparciu o zawartość makropeptydów kazeinowych w ramach opisanej procedury.

4. ZASADA

- Odtworzenie odtłuszczonego mleka w proszku, usunięcie tłuszczu i białka za pomocą kwasu trichlorooctowego, a następnie wirowanie lub sączenie,
- Oznaczenie ilości makropeptydów kazeinowych (CMP) w nadsączu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC),
- Ocena wyniku otrzymanego dla próbek poprzez odniesienie do próbek wzorcowych składających się z odtłuszczonego mleka w proszku z dodatkiem znanego udziału procentowego ilości serwatki w proszku lub bez takiego dodatku.

5. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej. Stosuje się wodę destylowaną lub wodę o równoważnym stopniu czystości.

5.1. **Roztwór kwasu trichlorooctowego**

Rozpuścić 240 g kwasu trichlorooctowego (CCl_3COOH) w wodzie i uzupełnić do 1 000 ml. Roztwór powinien być klarowny i bezbarwny.

5.2. **Roztwór eluentu, pH 6,0**

Rozpuścić 1,74 g ortofosforanu dipotasu (K_2HPO_4), 12,37 g ortofosforanu potasu (KH_2PO_4) oraz 21,41 g siarczanu sodu (Na_2SO_4) w ok. 700 ml wody. W razie potrzeby doprowadzić pH do wartości 6,0, używając roztworu kwasu ortofosforowego lub wodorotlenku potasu.

Uzupełnić wodą do 1 000 ml i homogenizować.

Uwaga: Skład eluentu można aktualizować w celu zachowania zgodności z certyfikatem norm lub zaleceniami producenta materiału wypełniającego kolumnę.

Przed zastosowaniem przesączyć roztwór eluentu przez sączek membranowy o średnicy porów 0,45 μm .

5.3. **Rozpuszczalnik przepłukujący**

Zmieszać jedną objętość acetonitrylu (CH_3CN) z dziewięcioma objętościami wody. Przed użyciem przesączyć mieszaninę przez sączek membranowy o średnicy porów 0,45 μm .

Uwaga: Można zastosować każdy inny rozpuszczalnik przepłukujący o działaniu bakteriobójczym, który nie wpływa niekorzystnie na zdolność rozdzielczą kolumn.

5.4. **Próbki wzorcowe**5.4.1. *Odłuszczone mleko w proszku spełniające wymogi niniejszego rozporządzenia (tzn. [0])*5.4.2. *To samo odłuszczone mleko w proszku zafalszowane 5 % (m/m) serwatką typu podpuszczkowego w proszku o składzie standardowym (tzn. [5]).*

6. APARATURA
- 6.1. **Waga analityczna**
- 6.2. **Opcjonalnie wirówka umożliwiająca osiągnięcie siły odśrodkowej 2 200 g, wyposażona w próbówki wirówkowe z korkiem lub zatyczką, poj. ok. 50 ml**
- 6.3. **Wstrząsarka mechaniczna**
- 6.4. **Mieszadło magnetyczne**
- 6.5. **Lejki szklane o średnicy ok. 7 cm**
- 6.6. **Sączi papierowe, średnia prędkość sączenia, o średnicy ok. 12,5 cm**
- 6.7. **Szklany zestaw do sączenia z sączkiem membranowym o średnicy porów 0,45 μ m**
- 6.8. **Pipety miarowe pozwalające na dozowanie 10 ml (ISO 648, klasa A lub ISO/R 835) lub system dozujący umożliwiający dostarczenie 10,0 ml w ciągu dwóch minut**
- 6.9. **System dozujący umożliwiający dostarczenie 20 ml wody w temp. ok. 50 °C**
- 6.10. **Łaźnia wodna kontrolowana termostatycznie, ustawiona na 25 °C \pm 0,5 °C.**
- 6.11. **Zestaw do HPLC, w skład którego wchodzi:**
 - 6.11.1. *Pompa*
 - 6.11.2. *Dozownik, ręczny lub automatyczny, poj. 15–30 μ l*
 - 6.11.3. *Dwie kolumny TSK 2 000-SW połączone szeregowo (długość 30 cm, średnica wewnętrzna 0,75 cm) lub kolumny równoważne (np. jedna kolumna TSK 2 000-SWxl, jedna kolumna Agilent Technologies Zorbax GF 250), oraz przedkolumna (3 cm \times 0,3 cm) wypełnione I 125 lub materiałem o równoważnej efektywności*
 - 6.11.4. *Piec do kolumn kontrolowany termostatycznie, ustawiony na temp. 35 °C \pm 1 °C*
 - 6.11.5. *Detektor UV o zmiennej długości fali, umożliwiający pomiary przy 205 nm, o czułości 0,008 Å*
 - 6.11.6. *Integrator umożliwiający całkowanie wykresu między kolejnymi dolinami*

Uwaga: Praca z kolumnami utrzymywanymi w temperaturze pokojowej jest możliwa, ale ich zdolność rozdzielcza jest wtedy nieco niższa. W takim wypadku temperatura nie powinna podlegać wahaniom większym niż \pm 5 °C w ramach żadnej z analiz.

7. POBIERANIE PRÓBEK
 - 7.1. *Próbki pobiera się zgodnie z procedurą określoną w międzynarodowej normie ISO 707. Państwa członkowskie mogą jednak stosować inną metodę pobierania próbek pod warunkiem, że jest ona zgodna z zasadami powyższej normy.*
 - 7.2. *Próbkę przechowywać w warunkach wykluczających spadek jakości lub zmianę składu.*
8. PROCEDURA
 - 8.1. **Przygotowanie próbki do badań**

Przenieść mleko w proszku do pojemnika o pojemności w przybliżeniu dwukrotnie większej niż objętość proszku, wyposażonego w hermetyczną pokrywę. Natychmiast zamknąć pojemnik. Wymieszać dobrze mleko w proszku poprzez wielokrotne odwracanie pojemnika do góry dnem.
 - 8.2. **Porcja badana**

Odmierzyć wagowo 2,000 \pm 0,001 g badanej próbki i umieścić w próbówce wirówkowej (ppkt 6.2) bądź w odpowiedniej kolbie z zatyczką (50 ml).
 - 8.3. **Usuwanie tłuszczu i białek**
 - 8.3.1. *Do porcji badanej dodać 20,0 ml ciepłej wody (50 °C). Rozpuścić proszek, wstrząsając przez 5 minut przy pomocy wstrząsarki mechanicznej (ppkt 6.3). Umieścić próbówkę w łaźni wodnej (ppkt 6.10) i pozostawić do wyrównania się temperatury do 25 °C.*

8.3.2. Dodawać stopniowo w ciągu dwóch minut 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (ppkt 5.1) o temp. ok. 25 °C, mieszając jednocześnie energicznie mieszadłem magnetycznym (ppkt 6.4). Umieścić probówkę w łaźni wodnej (ppkt 6.10) i pozostawić na 60 minut.

8.3.3. Wirować (ppkt 6.2) przez 10 minut przy 2 200 g lub przesączyć przez sączonek papierowy (ppkt 6.6), odrzucając pierwsze 5 ml przesączonek.

8.4. Oznaczenie chromatograficzne

8.4.1. Wprowadzić 15–30 µl dokładnie odmierzzonego nadsączonek lub przesączonek (ppkt 8.3.3) do aparatury HPLC (ppkt 6.11), pracując przy natężeniu przepływu wynoszącym 1,0 ml roztworu eluentu (ppkt 5.2) na minutę.

Uwaga 1. Można zastosować inne natężenie przepływu w zależności od średnicy wewnętrznej wykorzystywanej kolumny lub instrukcji producenta kolumny.

Uwaga 2. Podczas każdej przerwy przepłukiwać kolumny wodą. Nie należy nigdy pozostawiać roztworu eluentu (ppkt 5.2) w kolumnach.

Przed każdą przerwą dłuższą niż 24 godziny przepłukać kolumny wodą, a następnie przemywać je roztworem (ppkt 5.3) przez co najmniej trzy godziny przy natężeniu przepływu równym 0,2 ml/min.

8.4.2. Wyniki chromatograficznej analizy badanej próbki [E] otrzymuje się w postaci chromatogramu, na którym poszczególne piki określa się za pomocą ich czasu retencji RT w następujący sposób:

Pik II:	Drugi pik chromatogramu z RT wynoszącym ok. 12,5 minuty.
Pik III:	Trzeci pik chromatogramu, odpowiadający CMP, z RT wynoszącym 15,5 minuty.

Dobór kolumny lub kolumn może mieć znaczący wpływ na czasy retencji poszczególnych pików.

Integrator (ppkt 6.11.6) automatycznie oblicza powierzchnię A każdego piku.

A _{II} :	powierzchnia piku II
A _{III} :	powierzchnia piku III

Konieczne jest zbadanie wyglądu każdego chromatogramu przed dokonaniem interpretacji ilościowej w celu wykrycia ewentualnych nieprawidłowości, będących skutkiem wadliwego działania aparatury lub kolumn albo też pochodzenia i rodzaju analizowanej próbki.

W razie wątpliwości analizę należy powtórzyć.

8.5. Kalibracja

8.5.1. Do próbek wzorcowych (ppkt 5.4) zastosować dokładnie procedurę opisaną w ppkt 8.2–8.4.2.

Używać świeżo przygotowanych roztworów, ponieważ w środowisku 8 % kwasu trichlorooctowego następuje rozpad CMP. Straty szacuje się na 0,2 % na godzinę w temp. 30 °C.

8.5.2. Przed oznaczeniem chromatograficznym próbek należy przygotować kolumny, wprowadzając wielokrotnie próbkę wzorcową (ppkt 5.4.2) w roztworze (ppkt 8.5.1) do momentu, gdy powierzchnia i czas retencji piku odpowiadającego CMP są stałe.

8.5.3. Oznaczyć współczynniki odpowiedzi R poprzez wprowadzenie takiej samej objętości przesączonek (ppkt 8.5.1), jak objętość wykorzystana do próbek.

9. PREZENTACJA WYNIKÓW

9.1. Metoda obliczania i wzory

9.1.1. Obliczanie współczynników odpowiedzi R:

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

gdzie:

R_{II} = współczynniki odpowiedzi pików II,

A_{II} [0] = powierzchnie pików II próbki wzorcowej [0] otrzymane w ppkt 8.5.3.

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

gdzie:

- R_{III} = współczynniki odpowiedzi pików III,
 $A_{III}[0]$ i $A_{III}[5]$ = powierzchnie pików III w próbkach wzorcowych, odpowiednio [0] i [5], otrzymane w ppkt 8.5.3.
 W = ilość serwatki w próbce wzorcowej [5], tzn. 5.

9.1.2. Obliczanie względnej powierzchni pików w próbce [E]

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

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

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

gdzie:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = względne powierzchnie pików, odpowiednio, II, III i IV, w próbce [E],
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = powierzchnie pików, odpowiednio, II i III w próbce [E], otrzymane w ppkt 8.4.2,
 R_{II} , R_{III} = współczynniki odpowiedzi obliczone w ppkt 9.1.1.

9.1.3. Obliczanie względnego czasu retencji pików III w próbce [E]:

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

gdzie:

- $RRT_{III}[E]$ = względny czas retencji pików III w próbce [E],
 $RT_{III}[E]$ = względny czas retencji pików III w próbce [E] otrzymany w ppkt 8.4.2,
 $RT_{III}[5]$ = czas retencji pików III w próbce kontrolnej [5] otrzymany w ppkt 8.5.3.

9.1.4. Doświadczenia wykazały, że istnieje liniowa zależność między względnym czasem retencji pików III, tzn. $RRT_{III}[E]$ i zawartością procentową serwatki w proszku w zakresie do 10 %.

- $RRT_{III}[E]$ jest < 1,000, gdy zawartość serwatki wynosi > 5 %,
- $RRT_{III}[E]$ jest \geq 1,000 gdy zawartość serwatki wynosi \leq 5 %.

Dopuszczalna niepewność w odniesieniu do wartości RRT_{III} wynosi $\pm 0,002$.

Zazwyczaj wartość $RRT_{III}[0]$ odbiega nieco od 1,034. W zależności od stanu kolumn wartość ta może zbliżać się do 1,000, ale zawsze musi ją przewyższać.

9.2. Obliczanie zawartości procentowej serwatki podpuszczkowej w proszku w próbce:

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

gdzie:

- W = zawartość procentowa m/m serwatki podpuszczkowej w próbce [E];
 $S_{III}[E]$ = względna powierzchnia pików III próbki badanej [E] otrzymana w ppkt 9.1.2;
1,3 = stanowi średnią powierzchnię względną pików III wyrażoną w gramach serwatki podpuszczkowej na 100 g, oznaczoną w niezafałszowanym odtłuszczonym mleku w proszku różnego pochodzenia. Wielkość tę uzyskano doświadczalnie;
 $S_{III}[0]$ = stanowi względną powierzchnię pików III, która jest równa $R_{III} \times A_{III}[0]$. Wartości te uzyskano odpowiednio w ppkt 9.1.1 i pkt. 8.5.3;
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ = stanowi poprawkę, jaką należy wprowadzić w odniesieniu do średniej powierzchni względnej 1,3, gdy $S_{III}[0]$ nie jest równe 0,9. Doświadczalnie określono, że średnia powierzchnia pików III próbki kontrolnej [0] wynosi 0,9.

9.3. Dokładność procedury

9.3.1. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równocześnie lub w bezpośrednim następstwie przez tego samego analityka przy użyciu tej samej aparatury na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 0,2 % m/m.

9.3.2. Odtwarzalność

Różnica między dwoma pojedynczymi i niezależnymi wynikami, otrzymanymi w dwóch różnych laboratoriach na identycznym materiale badanym, nie może przekraczać 0,4 % m/m.

9.4. Interpretacja

9.4.1. Należy przyjąć, że serwatka jest nieobecna, jeżeli względna powierzchnia pików III, $S_{III} [E]$, wyrażona w gramach serwatki podpuszczkowej na 100 g produktu, wynosi $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$,

gdzie:

2,0	to maksymalna wartość dopuszczalna dla względnej powierzchni pików III przy uwzględnieniu względnej średniej powierzchni pików III, tzn. 1,3; niepewność wyniku ze zmian składu odłuszczonego mleka w proszku oraz odtwarzalności metody (ppkt 9.3.2),
$(S_{III} [0] - 0,9)$	to poprawka, jaką należy wprowadzić, jeżeli powierzchnia $S_{III} [0]$ jest różna od 0,9 (zob. ppkt 9.2)

9.4.2. Jeżeli względna powierzchnia pików III, $S_{III} [E]$, jest $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$, a względna powierzchnia pików II, $S_{II} [E] \leq 160$, należy oznaczyć zawartość serwatki podpuszczkowej w sposób wskazany w ppkt 9.2.

9.4.3. Jeżeli względna powierzchnia pików III, $S_{III} [E]$, jest $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$, a względna powierzchnia pików II, $S_{II} [E] \leq 160$, należy oznaczyć zawartość białka (P %); następnie zbadać wykresy 1 i 2.

9.4.3.1. Dane otrzymane po analizie próbek niezafałszowanego odłuszczonego mleka w proszku o wysokiej całkowitej zawartości białka zostały zgromadzone na wykresach 1 i 2.

Linia ciągła ilustruje regresję liniową, której współczynniki obliczane są metodą najmniejszych kwadratów.

Linia prosta przerywana wyznacza górną granicę względnej powierzchni pików III z prawdopodobieństwem nieprzekroczenia jej w 90 % przypadków.

Równania w odniesieniu do prostych linii przerywanych na wykresach 1 i 2 są następujące:

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

gdzie, odpowiednio:

S_{III} to względna powierzchnia pików III wyliczona albo według całkowitej zawartości białka, albo według względnej powierzchni pików II, $S_{II} [E]$,

P % to całkowita zawartość białka wyrażona jako zawartość procentowa, masowo,

$S_{II} [E]$ to względna powierzchnia pików próbki obliczona w ppkt 9.1.2.

Równania te odpowiadają liczbom 1,3 wymienionym w ppkt 9.2.

Rozbieżność (T_1 i T_2) między stwierdzoną względną powierzchnią $S_{III} [E]$ a względną powierzchnią S_{III} jest podawana w sposób następujący: $T_1 = S_{III} [E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III} [0] - 0,9)]$; $T_2 = S_{III} [E] - [0,0123 S_{II} [E] + 0,93] + (S_{III} [0] - 0,9)$

9.4.3.2. Jeżeli T_1 lub T_2 są równe lub mniejsze od zera, nie można ustalić obecności serwatki podpuszczkowej.

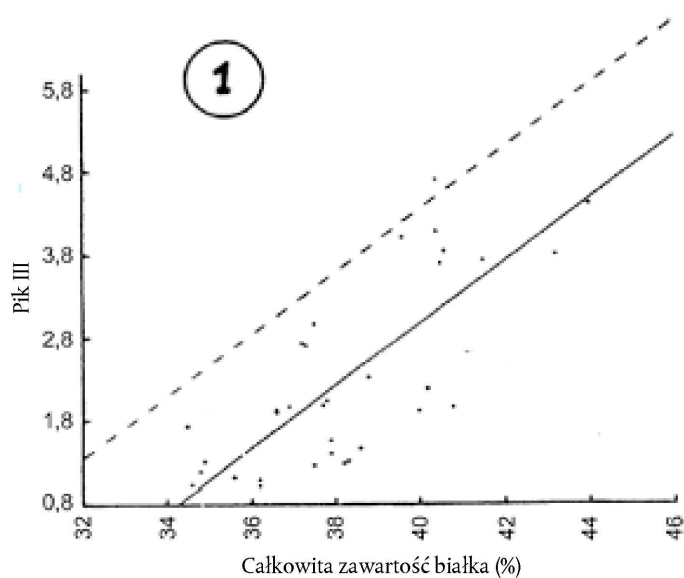
Jeżeli T_1 lub T_2 są większe od zera, serwatka podpuszczkowa jest obecna.

Zawartość serwatki podpuszczkowej jest obliczana zgodnie ze wzorem: $W = T_2 + 0,91$,

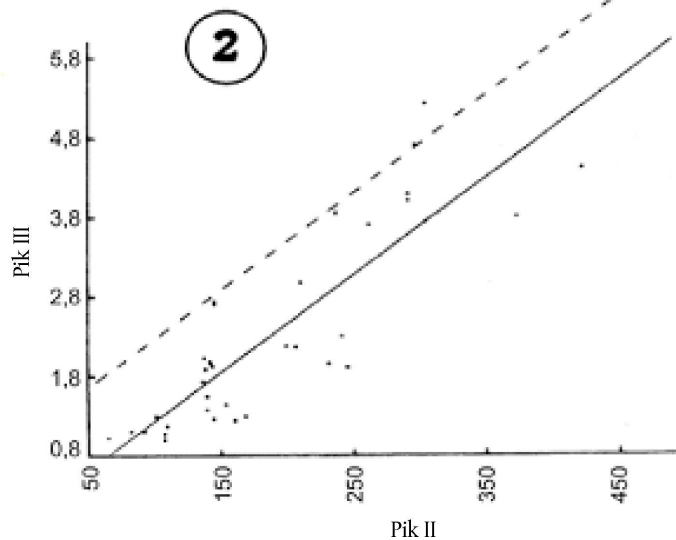
gdzie:

0,91 stanowi odległość na osi pionowej pomiędzy ciągłymi i przerywanymi liniami prostymi.

Odtłuszczone mleko w proszku



Odtłuszczone mleko w proszku



Dodatek III

OZNACZANIE SUCHEJ MASY SERWATKI PODPUSZCZKOWEJ W ODTŁUSZCZONYM MLEKU W PROSZKU

1. CEL: WYKRYCIE DODATKU SUCHEJ MASY SERWATKI PODPUSZCZKOWEJ DO ODTŁUSZCZONEGO MLEKA W PROSZKU
2. ODNIESIENIA: MIĘDZYNARODOWA NORMA ISO 707
3. DEFINICJA
Zawartość suchej masy serwatki podpuszczkowej zdefiniowana jest jako procent masowy, określony na podstawie zawartości makropeptydów kazeinowych za pomocą opisanej procedury.
4. ZASADA
Próbki poddaje się badaniu na makropeptyd kazeinowy A za pomocą procedury wysokosprawnej chromatografii cieczowej (procedura HPLC) z odwróconymi fazami. Ocena wyników otrzymywana jest poprzez odniesienie do próbek wzorcowych składających się z odtłuszczonego mleka w proszku zawierającego znany udział procentowy serwatki w proszku i odtłuszczonego mleka w proszku niezawierającego tego udziału. Wyniki wyższe niż 1 % (m/m) wskazują na obecność suchej masy serwatki podpuszczkowej.
5. ODCZYNNIKI
Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej klasie analitycznej. Stosuje się wodę destylowaną lub wodę o równoważnym stopniu czystości. Acetonitryl powinien mieć jakość spektroskopową lub jakość wymaganą dla HPLC.
- 5.1. **Roztwór kwasu trichlorooctowego**
Rozpuścić 240 g kwasu trichlorooctowego (CCl_3COOH) w wodzie i uzupełnić do 1 000 ml. Roztwór powinien być klarowny i bezbarwny.
- 5.2. **Eluenty A i B**
Eluent A: Eluent A: 150 ml acetonitrylu (CH_3CN), 20 ml izopropanolu ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) oraz 1,00 ml kwasu trifluorooctowego (TFA, CF_3COOH) umieszcza się w kolbie miarowej o poj. 1 000 ml. Uzupełnić wodą do 1 000 ml.
Eluent B: 550 ml acetonitrylu, 20 ml izopropanolu oraz 1,00 ml TFA umieszcza się w kolbie miarowej o poj. 1 000 ml. Uzupełnić wodą do 1 000 ml. Przed zastosowaniem przesączyć roztwór eluentu przez sączek membranowy o średnicy porów 0,45 μm .
- 5.3. **Konserwacja kolumny**
Po przeprowadzeniu analiz kolumna przepłukiwana jest eluentem B (metodą gradientową), a następnie przepłukiwana acetonitrylem (metodą gradientową przez 30 minut). Kolumna przechowywana jest w acetonitrylu.
- 5.4. **Próbki wzorcowe**
 - 5.4.1. *Odtłuszczone mleko w proszku spełniające wymogi przechowywania publicznego (tzn. [0]).*
 - 5.4.2. *To samo odtłuszczone mleko w proszku zafalszowane 5 % (m/m) serwatką typu podpuszczkowego w proszku o składzie standardowym (tzn. [5]).*
 - 5.4.3. *To samo odtłuszczone mleko w proszku zafalszowane 50 % (m/m) serwatką typu podpuszczkowego w proszku o składzie standardowym (tzn. [50]).*
6. APARATURA
 - 6.1. **Waga analityczna**
 - 6.2. **Opcjonalnie wirówka umożliwiająca osiągnięcie siły odśrodkowej 2 200 g, wyposażona w próbki wirówkowe z korkiem lub zatyczką, poj. ok. 50 ml**
 - 6.3. **Wstrząsarka mechaniczna**
 - 6.4. **Mieszadło magnetyczne**
 - 6.5. **Lejki szklane o średnicy ok. 7 cm**

- 6.6. **Sączki papierowe, średnia prędkość sączenia, o średnicy ok. 12,5 cm**
- 6.7. **Szklany zestaw do sączenia z sączkiem membranowym o średnicy porów 0,45 µm**
- 6.8. **Pipety miarowe pozwalające na dozowanie 10 ml (ISO 648, klasa A lub ISO/R 835) albo system dozujący umożliwiający dostarczenie 10,0 ml w ciągu dwóch minut.**
- 6.9. **System dozujący umożliwiający dostarczenie 20,0 ml wody w temp. ok. 50 °C**
- 6.10. **Łaźnia wodna kontrolowana termostatycznie, ustawiona na 25 °C ± 0,5 °C.**
- 6.11. **Zestaw do HPLC, w skład którego wchodzi:**
 - 6.11.1. Układ pompowy do dwuskładnikowej elucji gradientowej
 - 6.11.2. Dozownik, ręczny lub automatyczny, poj. 100 µl
 - 6.11.3. Kolumna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (długość 25 cm, średnica wewnętrzna 0,46 cm) bądź równoważna kolumna do chromatografii z odwróconymi fazami z wypełnieniem na bazie krzemionki o szerokich porach.
 - 6.11.4. Piec do kolumn kontrolowany termostatycznie, ustawiony na temp. 35 °C ± 1 °C
 - 6.11.5. Detektor UV o zmiennej długości fali, umożliwiający pomiary przy 210 nm (w razie konieczności można stosować długość fal do 220 nm), o czułości 0,02 Å
 - 6.11.6. Integrator umożliwiający całkowanie względem wspólnej linii podstawowej lub wykresu między kolejnymi dolinami

Uwaga: Działanie kolumny w temperaturze pokojowej jest możliwe pod warunkiem, że temperatura pokojowa nie podlega wahaniom większym niż 1 °C, w przeciwnym razie ma miejsce zbyt duże wahanie w czasie retencji CMP_A .

7. POBIERANIE PRÓBEK

- 7.1. **Próbki pobiera się zgodnie z procedurą określoną w międzynarodowej normie ISO 707. Państwa członkowskie mogą jednak stosować inną metodę pobierania próbek pod warunkiem, że jest ona zgodna z zasadami powyższej normy.**
- 7.2. **Próbkę przechowywać w warunkach wykluczających spadek jakości lub zmianę składu.**

8. PROCEDURA

8.1. Przygotowanie próbki do badań

Przenieść mleko w proszku do pojemnika o pojemności w przybliżeniu dwukrotnie większej niż objętość proszku, wyposażonego w hermetyczną pokrywę. Natychmiast zamknąć pojemnik. Wymieszać dobrze mleko w proszku poprzez wielokrotne odwracanie pojemnika do góry dnem.

8.2. Porcja badana

Odmierzyć wagowo 2,00 ± 0,001 g badanej próbki i umieścić w probówce wirówkowej (ppkt 6.2) bądź w odpowiedniej kolbie z korkiem (50 ml).

Uwaga: W przypadku mieszanek odmierzyć wagowo taką ilość badanej próbki, aby odtłuszczona porcja próbki odpowiadała 2,00 g.

8.3. Usuwanie tłuszczu i białek

- 8.3.1. Do porcji badanej dodać 20,0 ml ciepłej wody (50 °C). Rozpuścić proszek, wstrząsając przez 5 minut przy pomocy wstrząsarki mechanicznej (ppkt 6.3). Umieścić probówkę w łaźni wodnej (ppkt 6.10) i pozostawić do wyrównania się temperatury do 25 °C.
- 8.3.2. Dodawać stopniowo przez dwie minuty 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (ppkt 5.1) o temp. ok. 25 °C, mieszając jednocześnie energicznie mieszadłem magnetycznym (ppkt 6.4). Umieścić probówkę w łaźni wodnej (ppkt 6.10) i pozostawić na 60 minut.
- 8.3.3. Wirować (ppkt 6.2) przez 10 minut przy 2 200 g lub przesączyć przez sączek papierowy (ppkt 6.6), odrzucając pierwsze 5 ml przesączu.

8.4. Oznaczenie chromatograficzne

8.4.1. Analiza HPLC z odwróconymi fazami wyklucza możliwość otrzymania wyników fałszywie dodatnich ze względu na obecność maślanki kwasowej w proszku.

8.4.2. Przed przeprowadzeniem analizy HPLC z odwróconymi fazami należy zoptymalizować warunki gradientu. Czas retencji wynoszący 26 ± 2 minuty dla CMP_A jest czasem optymalnym w systemach gradientowych z martwą objętością wynoszącą ok. 6 ml (objętość od punktu, w którym łączą się rozpuszczalniki, do pętli dozownika włącznie). W przypadku systemów gradientowych z niższą martwą objętością (np. 2 ml) należy stosować optymalny czas retencji wynoszący 22 minuty.

Pobrać roztwory próbek wzorcowych (ppkt 5.4) z dodatkiem 50 % serwatki podpuszczkowej oraz bez takiego dodatku.

Wprowadzić 100 μ l nadsącza lub przesącza (ppkt 8.3.3) do aparatury HPCL działającej w warunkach gradientu rozpoznawczego podanych w tabeli 1.

Tabela 1

Warunki gradientu rozpoznawczego dla optymalizacji chromatografii

Czas (minuty)	Przepływ (ml/min)	% A	% B	Krzywa
Początkowy	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	liniowa
32	1,0	10	90	liniowa
37	1,0	10	90	liniowa
42	1,0	90	10	liniowa

Porównanie dwóch chromatogramów powinno ujawnić położenie piku CMP_A .

Wykorzystując podany niżej wzór, można obliczyć początkowy skład rozpuszczalnika, który ma zostać użyty do gradientu normalnego (zob. ppkt 8.4.3) $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 1,11$

gdzie:

RT_{cmpA} : czas retencji CMP_A w gradiencie rozpoznawczym

10: początkowy % B gradientu rozpoznawczego

2,5: % B w punkcie środkowym minus % B w początku gradientu normalnego

13,5: czas w punkcie środkowym gradientu rozpoznawczego

26: wymagany czas retencji CMP_A

6: stosunek nachylenia gradientu rozpoznawczego i normalnego

30: % B na początku minus % B w 27 minucie gradientu rozpoznawczego

27: czas przebiegu gradientu rozpoznawczego

8.4.3. Pobranie roztworów badanych próbek:

Wprowadzić 100 μ l dokładnie odmierzonego nadsącza lub przesącza (ppkt 8.3.3) do aparatury HPCL, pracując przy natężeniu przepływu roztworu eluentu (ppkt 5.2) wynoszącej 1,0 ml na minutę.

Skład eluentu w chwili rozpoczęcia analizy otrzymuje się z ppkt 8.4.2. Zazwyczaj jest on zbliżony do A: B = 76:24 (ppkt 5.2). Natychmiast po wprowadzeniu uruchamia się gradient liniowy, który daje zwiększenie wartości procentowej B o 5 % po 27 minutach. Następnie uruchamia się gradient liniowy, który pozwala na uzyskanie składu eluentu w wysokości 90 % B w ciągu pięciu minut. Skład ten utrzymywany jest przez pięć minut, po czym zostaje zmieniony poprzez gradient liniowy w ciągu pięciu minut do składu początkowego. W zależności od wewnętrznej pojemności układu pompującego następnie wprowadzenie można wykonać 15 minut po uzyskaniu warunków początkowych.

Uwaga 1. Czas retencji CMP_A powinien wynosić 26 ± 2 minuty. Można to osiągnąć poprzez zmianę początkowych i końcowych warunków pierwszego gradientu. Jednakże różnica w % B dla początkowych i końcowych warunków pierwszego gradientu pozostaje na poziomie 5 % B.

Uwaga 2. Eluenty powinny być odgazowane w sposób wystarczający i pozostawać w takim stanie. Jest to istotne dla właściwego funkcjonowania gradientowego układu pompowego. Odchylenie standardowe dla czasu retencji pików CMP_A powinno być mniejsze niż 0,1 minuty ($n = 10$).

Uwaga 3. Po wprowadzeniu każdej serii pięciu próbek należy wprowadzić próbkę odniesienia [5] i wykorzystać ją do obliczenia nowego współczynnika odpowiedzi R. (ppkt 9.1.1).

- 8.4.4. Wyniki analizy chromatograficznej badanej próbki (E) otrzymuje się w postaci chromatogramu, na którym pik CMP_A określa się na podstawie jego czasu retencji wynoszącego ok. 26 minut.

Integrator (ppkt 6.11.6) automatycznie oblicza wysokość H pików CMP_A . W każdym chromatogramie należy sprawdzić położenie linii podstawowej. W przypadku nieprawidłowego położenia linii podstawowej analizę lub całkowanie należy powtórzyć.

Uwaga: Jeżeli pik CMP_A jest wystarczająco oddzielony od innych pików, należy zastosować wyznaczenie linii podstawowej na podstawie położenia dolin między pikami, w przeciwnym razie zastosować spuszczenie prostokątnych na wspólną linię podstawową, której punkt wyjścia powinien być położony w pobliżu pików CMP_A (co wyklucza $t = 0$ min!). W odniesieniu do wzorca i do próbek należy zastosować tę samą metodę całkowania, jak również sprawdzić, w przypadku wspólnej linii podstawowej, jej spójność w odniesieniu do próbek i do wzorca.

Przed dokonaniem interpretacji ilościowej niezbędne jest zbadanie wyglądu każdego chromatogramu w celu wykrycia ewentualnych nieprawidłowości, będących skutkiem wadliwego działania aparatury lub kolumny albo też pochodzenia i rodzaju analizowanej próbki. W razie wątpliwości analizę należy powtórzyć.

8.5. Kalibracja

- 8.5.1. Do próbek wzorcowych (ppkt 5.4.1–5.4.2) zastosować dokładnie procedurę opisaną od ppkt 8.2 do ppkt 8.4.4. Używać świeżo przygotowanych roztworów, ponieważ w środowisku 8 % kwasu trichlorooctowego w temperaturze pokojowej następuje rozkład CMP. W temp. 4 °C roztwór pozostaje stabilny przez 24 godziny. W przypadku długich serii analiz wskazane jest zastosowanie schłodzonego zasobnika na próbki w dozowniku automatycznym.

Uwaga: Podpunkt 8.4.2. można opuścić w przypadku, gdy % B w warunkach początkowych jest znany z poprzednich analiz.

Chromatogram próbki odniesienia [5] powinien być analogiczny do pokazanego na rys. 1. Na tym rysunku pik CMP_A poprzedzony jest przez dwa niewielkie piki. Istotne jest, aby uzyskać podobny rozdział.

- 8.5.2. Przed oznaczeniem chromatograficznym próbek wprowadzić 100 µl próbki wzorcowej bez serwatki podpuszczkowej [0] (ppkt 5.4.1).

Chromatogram nie powinien wykazywać pików w czasie retencji pików CMP_A .

- 8.5.3. Określić współczynniki odpowiedzi R poprzez wprowadzenie takiej samej objętości przesączu (ppkt 8.5.1), jak objętość wykorzystana do próbek.

9. PREZENTACJA WYNIKÓW

9.1. Metoda obliczania i wzory

- 9.1.1. Obliczanie współczynnika odpowiedzi R:

$$\text{Pik } CMP_A: R = W/H,$$

gdzie:

R = współczynnik odpowiedzi pików CMP_A

H = wysokość pików CMP_A

W = ilość serwatki w próbce wzorcowej [5].

9.2. Obliczanie zawartości procentowej serwatki podpuszczkowej w proszku w próbce

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

gdzie:

W(E) = zawartość procentowa (m/m) serwatki podpuszczkowej w próbce (E)

R = współczynnik odpowiedzi pików CMP_A (ppkt 9.1.1)

H(E) = wysokość pików CMP_A próbki (E)

W przypadku gdy wartość W(E) jest większa niż 1 %, a różnica między czasem retencji próbki badanej a czasem retencji próbki wzorcowej [5] jest mniejsza niż 0,2 minuty, wówczas stwierdzona jest obecność suchej masy serwatki podpuszczkowej.

9.3. Dokładność procedury

9.3.1. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równocześnie lub w bezpośrednim następstwie przez tego samego analityka przy użyciu tej samej aparatury na identycznym materiale badanym nie może przekraczać 0,2 % m/m.

9.3.2. Odtwarzalność

Nieustalona.

9.3.3. Liniowość

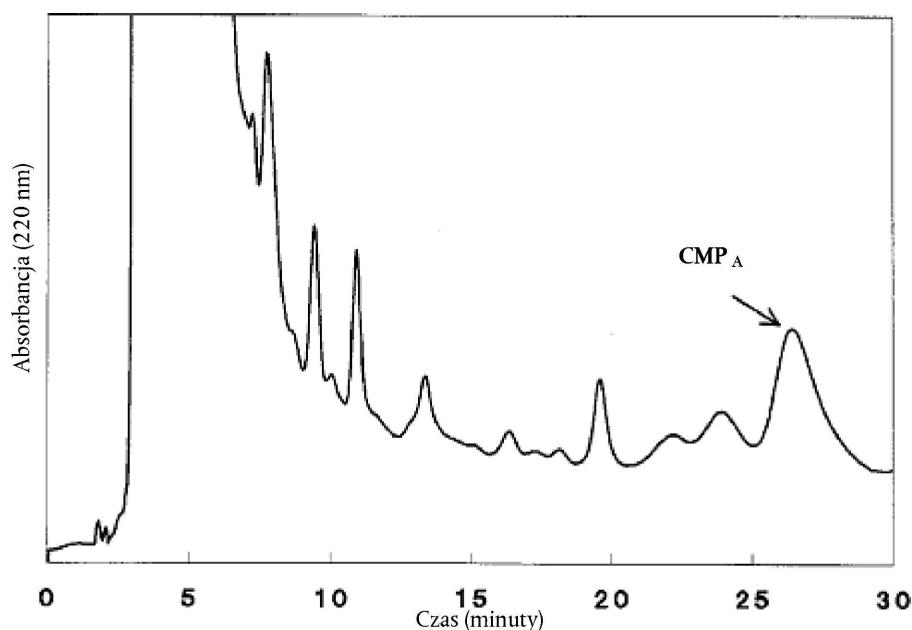
W zakresie 0–16 % serwatki podpuszczkowej należy otrzymać zależność liniową przy współczynniku korelacji > 0,99.

9.4. Interpretacja

Wartość graniczna wynosząca 1 % uwzględnia niepewność związaną z odtwarzalnością.

Rys. 1

Ni – wzorzec 4.6



(*) Norma międzynarodowa 135B/1991. Mleko i przetwory mleczne. Charakterystyka precyzji metod analitycznych. Zarys procedury współpracy badawczej.”;

3) dodaje się załączniki w brzmieniu:

„ZAŁĄCZNIK VI

Metody analizy masła do celów prywatnego przechowywania

Parametr	Metoda
Tłuszcz ⁽¹⁾	ISO 17189 lub ISO 3727 część 3
Woda	ISO 3727 część 1
Sucha masa beztłuszczowa (z wyjątkiem soli)	ISO 3727 część 2
Sól	ISO 15648

⁽¹⁾ Stosuje się metodę zatwierdzoną przez agencję płatniczą.

ZAŁĄCZNIK VII

Metody analizy odtłuszczonego mleka w proszku do celów prywatnego przechowywania

Parametr	Metoda
Tłuszcz	ISO 1736
Białko	ISO 8968 część 1
Woda	ISO 5537

ZAŁĄCZNIK VIII

Metody analizy sera do celów prywatnego przechowywania

1. Metoda analizy opisana w dodatku jest stosowana w celu zapewnienia, by ser wyprodukowany wyłącznie z mleka owczego, mleka koziego lub mleka bawolego, lub z mieszanin mleka owczego, koziego i bawolego, nie zawierał kazeiny mleka krowiego.

Uznaje się, że kazeina mleka krowiego jest obecna w produkcie, jeżeli jej zawartość w analizowanej próbce jest równa zawartości w próbce odniesienia zawierającej 1 % mleka krowiego lub od niej większa, jak określono w dodatku.

2. Metody wykrywania kazeiny mleka krowiego w serach, określone w ust. 1, mogą być stosowane, pod warunkiem że:
 - a) granica wykrywalności wynosi nie więcej niż 0,5 %; oraz
 - b) nie występują fałszywie pozytywne wyniki; oraz
 - c) kazeina mleka krowiego jest wykrywalna, z wymaganą czułością, również po upływie długich okresów dojrzewania, które mogą wystąpić w zwykłych warunkach handlowych.

Jeżeli którekolwiek ze wspomnianych powyżej wymagań nie jest spełnione, stosuje się metodę opisaną w dodatku.

—

Dodatek

METODA WYKRYWANIA OBECNOŚCI MLEKA KROWIEGO I KAZEINIANÓW W SERACH Z MLEKA OWCEGO, MLEKA KOZIEGO, MLEKA BAWOLEGO LUB MIESZANEK MLEKA OWCEGO, KOZIEGO I BAWOLEGO

1. ZAKRES

Wykrywanie obecności mleka krowiego i kazeinianów w serach wyprodukowanych z mleka owczego, mleka koziego, mleka bawolego lub mieszanek mleka owczego, koziego i bawolego przez wyznaczenie punktu izoelektrycznego gamma-kazeiny po plazminolizie.

2. DZIEDZINA STOSOWANIA

Metoda jest odpowiednia dla czułego i specyficznego wykrywania naturalnego oraz poddanego obróbce cieplnej mleka krowiego i kazeinianów w świeżych i dojrzałych serach wyprodukowanych z mleka owczego, mleka koziego, mleka bawolego lub mieszanin mleka owczego, koziego i bawolego. Metoda nie jest odpowiednia do wykrywania przypadków fałszowania mleka i sera przy użyciu poddanych obróbce cieplnej koncentratów białkowych serwatki pochodzącej od krów.

3. ZASADA METODY

3.1. Oddzielenie kazeiny z sera i wzorców odniesienia

3.2. Rozpuszczenie oddzielonej kazeiny i poddanie jej rozszczepieniu za pomocą plazminy (EC.3.4.21.7)

3.3. Wyznaczenie punktu izoelektrycznego kazeiny poddanej działaniu plazminy w obecności mocznika oraz barwienie białka

3.4. Ocena zabarwionych wzorów gamma3-kazeiny i gamma2-kazeiny (dowód na występowanie mleka krowiego) poprzez porównanie wzoru otrzymanego z próbki z wzorami otrzymanymi w tym samym żelu ze wzorców odniesienia zawierających 0 % i 1 % mleka krowiego

4. ODCZYNNIKI

Jeżeli nie wskazano inaczej, stosuje się chemikalia klasy analitycznej. Stosuje się wodę redestylowaną lub wodę o równoważnym stopniu czystości.

Uwaga: Poniższe dane szczegółowe odnoszą się do przygotowanych w laboratorium żeli poliakryloamidowych zawierających mocznik, o wymiarach 265 × 125 × 0,25 mm. W przypadku gdy stosuje się inne rozmiary i rodzaje żelu, niezbędne może się okazać odpowiednie dostosowanie warunków rozdzielania.

Wyznaczenie punktu izoelektrycznego

4.1. Odczynniki do produkcji żeli poliakryloamidowych zawierających mocznik.

4.1.1. Roztwór podstawowy żelu

Rozpuścić:

4,85 g akryloamidu

0,15 g N, N'-metyleno-bis-akryloamidu (BIS)

48,05 g mocznika

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

w wodzie, uzupełnić do 100 ml i przechowywać w butelce z brązowego szkła w chłodziarce.

Uwaga: Można stosować dostępny w handlu wstępnie zestawiony roztwór akryloamid/BIS zamiast podanych mas neurotoksycznych akryloamidów. W przypadku gdy taki roztwór zawiera 30 % w/v akryloamidu i 0,8 % w/v BIS, należy użyć do preparatu objętości 16,2 ml zamiast podanych mas. Okres przechowywania roztworu podstawowego wynosi maksymalnie 10 dni; jeżeli przewodnictwo roztworu jest wyższe niż 5 µS, dejonizować poprzez mieszanie z 2 g Amberlitu MB-3 przez 30 minut, a następnie przesączyć przez sączonek membranowy o średnicy porów 0,45 µm.

4.1.2. Roztwór żelu

Przygotować roztwór żelu przez wymieszanie dodatków i amfolitów (*) z podstawowym roztworem żelu (zob. ppkt 4.1.1).

9,0 ml roztworu podstawowego

24 mg beta-alaniny

500 µl amfolitu o pH 3,5–9,5

250 µl amfolitu o pH 5–7

250 µl amfolitu o pH 6–8

Wymieszać roztwór żelu i odgazowywać przez dwie do trzech minut w łaźni ultradźwiękowej lub w próżni.

Uwaga: Przygotować roztwór żelu bezpośrednio przed wlaniem (zob. ppkt 6.2).

4.1.3. Roztwory katalityczne

4.1.3.1. N, N, N' N' – tetrametyloetylenodiamina (Temed)

4.1.3.2. nadsiarczan amonu (PER) 40 % w/v:

rozpuścić 800 mg PER w wodzie i uzupełnić do 2 ml.

Uwaga: Zawsze stosować świeżo przygotowany roztwór PER.

4.2. Płyn kontaktowy

Nafta lub parafina ciekła.

4.3. Roztwór anodowy

Rozpuścić 5,77 g kwasu ortofosforowego (85 % w/w) w wodzie i uzupełnić do 100 ml.

4.4. Roztwór katodowy

Rozpuścić 2,00 g wodorotlenku sodu w wodzie i uzupełnić wodą do 100 ml.

Przygotowanie próbki

4.5. Odczynniki do oddzielenia białka

4.5.1. Rozcieńczyć kwas octowy (objętość 25,0 ml kwasu octowego lodowatego uzupełniona wodą do objętości 100 ml)

4.5.2. Dichlorometan

4.5.3. Aceton

4.6. Bufor do rozpuszczania białka

Rozpuścić:

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

24,03 g mocznika

250 mg ditiotreitolu

w wodzie i uzupełnić do 50 ml.

Uwaga: Przechowywać w chłodziarce; maksymalny okres przechowywania wynosi jeden tydzień.

4.7. **Odczynniki do rozszczepienia kazeiny za pomocą plazminy**

4.7.1. *Bufor z węglanem amonu*

Miareczkować roztwór wodorowęglanu amonu o stężeniu 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml wody) zawierający 0,05 mol/l kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA, 1,46 g/100 ml) roztworem węglanu amonu o stężeniu 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml wody) zawierającym 0,05 mol/l EDTA do osiągnięcia pH 8.

4.7.2. *Plazmina bydlęca (EC. 3.4.21.7), o aktywności co najmniej 5 U/ml*

4.7.3. *Roztwór kwasu ε-aminokapronowego do inhibicji enzymów*

Rozpuścić 2,624 g kwasu ε-aminokapronowego (kwas 6-aminoheksanowy) w 100 ml etanolu o stężeniu 40 % (v/v).

4.8. **Wzorce**

4.8.1. *Certyfikowane wzorce odniesienia mieszanki odtłuszczonego mleka owczego i koziego z dodatkiem podpuszczki, zawierające 0 % i 1 % mleka krowiego, dostępne są w Instytucie Materiałów Referencyjnych i Pomiarów przy Komisji, B-2440 Geel, Belgia*

4.8.2. *Przygotowanie laboratoryjnych wzorców pośrednich mleka bawolego z dodatkiem podpuszczki, zawierających 0 % i 1 % mleka krowiego*

Mleko odtłuszczone przygotowuje się przez odwirowanie surowego mleka bawolego lub krowiego w temp. 37 °C przy 2 500 g przez 20 minut. Po szybkim schłodzeniu próbówki wraz z jej zawartością do 6–8 °C, górna warstwa tłuszczu usuwana jest w całości. Aby przygotować wzorzec 1 % należy dodać 5,00 ml odtłuszczonego mleka krowiego do 495 ml odtłuszczonego mleka bawolego w jednolitrowej zlewce, doprowadzić pH do wartości 6,4 przez dodanie rozcieńczonego kwasu mlekowego (10 % w/v). Doprowadzić temperaturę do 35 °C i dodać 100 µl podpuszczki cielęcej (aktywność podpuszczki 1:10 000, ok. 3 000 U/ml), mieszać przez 1 minutę, po czym odstawić zlewkę przykrytą folią aluminiową na jedną godzinę w temp. 35 °C, aby uformował się twaróg. Po uformowaniu twarogu całe mleko z podpuszczką jest suszone sublimacyjnie bez uprzedniej homogenizacji lub odsączenia serwatki. Po wysuszeniu sublimacyjnym mleko jest dokładnie rozdrabniane do uzyskania jednorodnego proszku. Aby przygotować wzorzec 0 % należy przeprowadzić taką samą procedurę przy użyciu prawdziwego odtłuszczonego mleka bawolego. Wzorce przechowuje się w temp. – 20 °C.

Uwaga: Przed przygotowaniem wzorców zaleca się zbadanie mleka bawolego pod względem jego czystości poprzez wyznaczenie punktu izoelektrycznego kazeiny poddanej działaniu plazminy.

Odczynniki do barwienia białka

4.9. **Utrwalacz**

Rozpuścić 150 g kwasu trichlorooctowego w wodzie i uzupełnić do 1 000 ml.

4.10. **Roztwór odbarwiający**

Uzupełnić 500 ml metanolu i 200 ml kwasu octowego lodowatego wodą destylowaną do objętości 2 000 ml.

Uwaga: Należy przygotowywać świeży roztwór odbarwiający każdego dnia; można go przygotować poprzez zmieszanie jednakowych objętości roztworów podstawowych 50 % (v/v) metanolu i 20 % (v/v) kwasu octowego lodowatego.

4.11. **Roztwory barwiące**

4.11.1. *Roztwór barwiący (roztwór podstawowy 1)*

Rozpuścić 3,0 g barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) w 1 000 ml metanolu o stężeniu 90 % (v/v) za pomocą mieszadła magnetycznego (ok. 45 minut), przesączyć przez dwa złożone sączki o średniej prędkości sączenia.

4.11.2. *Roztwór barwiący (roztwór podstawowy 2)*

Rozpuścić 5,0 g siarczynu miedzi pięciowodnego w 1 000 ml kwasu octowego o stężeniu 20 % (v/v).

4.11.3. *Roztwór barwiący (roztwór roboczy)*

Zmieszać razem 125 ml każdego z roztworów podstawowych (ppkt 4.11.1, 4.11.2) bezpośrednio przed barwieniem.

Uwaga: Roztwór barwiący powinien być przygotowany w dniu, w którym ma zostać użyty.

5. WYPOSAŻENIE
 - 5.1. Szklane płytki (265 × 125 × 4 mm); wałek gumowy (szerokość 15 cm); stół poziomujący
 - 5.2. Arkusz nośny żelū (265 × 125 mm)
 - 5.3. Arkusz przykrywający (280 × 125 mm). Przykleić pasek taśmy klejącej (280 × 6 × 0,25 mm) wzdłuż obu dłuższych krawędzi (zob. rys. 1)
 - 5.4. Komora elektroogniskowania z płytą chłodzącą (na przykład 265 × 125 mm) oraz odpowiednim układem zasilania (≥ 2,5 kV) lub automatyczny system elektroforezy
 - 5.5. Kriostat cyrkulacyjny, regulowany termostatem w temp. 12 ± 0,5 °C
 - 5.6. Wirówka z regulacją do 3 000 g
 - 5.7. Elektrody paskowe (o długości ≥ 265 mm)
 - 5.8. Plastikowe butelki z wkraplaczem do roztworu anodowego i katodowego
 - 5.9. Aplikatory próbek (10 × 5 mm, wiskoza lub sączek papierowy o niskim współczynniku adsorpcji białka)
 - 5.10. Naczynia do barwienia i odbarwiania ze stali nierdzewnej lub ze szkła (na przykład tace na narzędzia o wymiarach 280 × 150 mm)
 - 5.12. Nastawny homogenizator obrotowy (średnica wału 10 mm), liczba obr./min od 8 000 do 20 000
 - 5.13. Mieszadło magnetyczne
 - 5.14. Łaźnia ultradźwiękowa
 - 5.15. Zgrzewarka do folii
 - 5.16. Mikropipety poj. 25 µl
 - 5.17. Koncentrator próżniowy lub suszarka sublimacyjna
 - 5.18. Łaźnia wodna kontrolowana termostycznie, nastawna do 35 °C i 40 ± 1 °C, z wytrząsarką
 - 5.19. Aparatura densytometryczna umożliwiająca odczyt przy λ = 634 nm
6. PROCEDURA
 - 6.1. Przygotowanie próbki
 - 6.1.1. Oddzielenie kazeiny

Odmierzyć wagowo równowartość 5 g suchej masy sera lub wzorców odniesienia do próbki wirówkowej poj. 100 ml, dodać 60 ml destylowanej wody i homogenizować za pomocą homogenizatora obrotowego (8 000–10 000 obr./min). Doprowadzić pH do wartości 4,6 za pomocą rozcieńczonego kwasu octowego (ppkt 4.5.1) i odwirować (5 minut, 3 000 g). Zdekantować tłuszcz i serwatkę, homogenizować pozostałość przy prędkości 20 000 obr./min w 40 ml destylowanej wody o pH dostosowanym do wartości 4,5 za pomocą rozcieńczonego kwasu octowego (ppkt 4.5.1), dodać 20 ml dichlorometanu (ppkt 4.5.2), ponownie homogenizować i odwirować (5 minut, 3 000 g). Usunąć warstwę kazeiny znajdującą się pomiędzy fazą wodną i organiczną (zob. rys. 2) za pomocą szpatułki i zdekantować obydwie fazy. Ponownie homogenizować kazeinę w 40 ml destylowanej wody (zob. wyżej) oraz 20 ml dichlorometanu (ppkt 4.5.2) i odwirować. Powtarzać tę procedurę do czasu, gdy obie fazy ekstrakcyjne staną się bezbarwne (dwa–trzy razy). Homogenizować pozostałości białka wraz z 50 ml acetonu (ppkt 4.5.3) i przesączyć przez złożony sączek papierowy o średniej prędkości sączenia. Przemyć pozostałości znajdujące się na sączku, każdorazowo za pomocą dwóch oddzielnych 25 ml porcji acetonu, i pozostawić do wysuszenia na powietrzu lub suszyć w strumieniu azotu, na koniec dokładnie sproszkować w moździerzu.

Uwaga: Oddzieloną suchą kazeinę należy przechowywać w temp. – 20 °C.

- 6.1.2. *Hydrolizowanie beta-kazeiny za pomocą plazminy w celu zwiększenia intensywności uwidocznienia gamma-kazeiny*

Zdyspergować 25 mg oddzielonej kazeiny (ppkt 6.1.1) w 0,5 ml buforu z węglanem amonu (ppkt 4.7.1) i homogenizować przez 20 minut, stosując, na przykład, obróbkę ultradźwiękową. Podgrzać do 40 °C i dodać 10 µl plazminy (ppkt 4.7.2), wymieszać i inkubować przez jedną godzinę w temp. 40 °C, nieprzerwanie wstrząsając. Aby doprowadzić do inhibicji enzymu, dodać 20 µl roztworu kwasu ε-aminokapronowego (ppkt 4.7.3), następnie dodać 200 mg mocznika w postaci stałej i 2 mg ditiotreitolu.

Uwaga: Aby otrzymać lepszą symetrię w skupionych pasmach kazeiny, zaleca się suszenie sublimacyjne roztworu po dodaniu kwasu ε-aminokapronowego, a następnie rozpuszczenie pozostałości w 0,5 ml buforu do rozpuszczania białka (ppkt 4.6).

6.2. Przygotowanie żeli poliakryloamidowych zawierających mocznik

Dodając kilka kropli wody, rozwałkować arkusz nośny żelu (ppkt 5.2) na szklanej płytce (ppkt 5.1), usuwając resztki wody ręcznikiem papierowym lub bibułą. W ten sam sposób rozwałkować arkusz przykrywający (ppkt 5.3) z przekładkami (0,25 mm) na drugiej płytce szklanej. Położyć płytkę poziomo na stole poziomującym.

Dodać 10 µl Temedu (ppkt 4.1.3.1) do przygotowanego i odpowietrzonego roztworu żelu (ppkt 4.1.2), wymieszać i dodać 10 µl roztworu PER (ppkt 4.1.3.2), starannie wymieszać i natychmiast wylać równomiernie na środek arkusza przykrywającego. Umieścić jedną krawędź płytki pokrytej arkuszem nośnym żelu (stroną pokrytą do dołu) na arkuszu przykrywającym i opuszczać ją powoli, tak aby między arkuszami uformowała się cienka powłoka żelu, rozproszona równomiernie i pozbawiona pęcherzyków (rys. 3). Ostrożnie opuścić płytkę pokrytą arkuszem nośnym żelu, pomagając sobie cienką szpatułką, tak by przylegała do arkusza przykrywającego, i umieścić na wierzchu trzy dodatkowe płytki szklane w charakterze obciążników. Po zakończeniu polimeryzacji (ok. 60 minut) zdjąć spolimeryzowany żel na płytkę pokrytą arkuszem nośnym żelu razem z arkuszem przykrywającym, obstukując lekko płytki szklane. Ostrożnie wyczyścić drugą stronę płytki celem usunięcia pozostałości żelu oraz mocznika. Zgrzać „kanapkę” żelu w tubie foliowej i przechowywać w chłodziarce (maksymalnie przez sześć tygodni).

Uwaga: Arkusz przykrywający z przekładkami może być użyty ponownie. Żel poliakryloamidowy może być pocięty na mniejsze fragmenty, co jest zalecane w przypadku, kiedy jest kilka próbek, lub kiedy używa się automatycznego systemu elektroforezy (dwa żele, rozmiar 4,5 × 5 cm).

6.3. Wyznaczenie punktu izoelektrycznego

Nastawić termostat chłodzący na 12 °C. Przetrzeć drugą stronę arkusza nośnego żelu naftą, po czym nanieść kilka kropel nafty (ppkt 4.2) na środkową część bloku chłodzącego. Następnie rozwałkować na nim „kanapkę” żelu, stroną pokrytą arkuszem nośnym do dołu, nie dopuszczając do powstawania pęcherzyków. Wyrzeć nadmiar nafty i usunąć arkusz przykrywający. Nasączyć elektrody paskowe roztworami elektrodowymi (ppkt 4.3, 4.4), przyciąć do długości żelu i umieścić w określonym położeniu (odległość między elektrodami 9,5 cm).

Warunki wyznaczenia punktu izoelektrycznego:

6.3.1. Rozmiar żelu 265 × 125 × 0,25 mm

Etap	Czas (minuty)	Napięcie elektryczne (V)	Natężenie elektryczne (mA)	Moc (W)	Woltogodziny (Vh)
1. Ogniskowanie wstępne	30	maksymalnie 2 500	maksymalnie 15	stała 4	ok. 300
2. Ogniskowanie próbki ⁽¹⁾	60	maksymalnie 2 500	maksymalnie 15	stała 4	ok. 1 000
3. Ogniskowanie końcowe	60	maksymalnie 2 500	maksymalnie 5	maksymalnie 20	ok. 3 000
	40	maksymalnie 2 500	maksymalnie 6	maksymalnie 20	ok. 3 000
	30	maksymalnie 2 500	maksymalnie 7	maksymalnie 25	ok. 3 000

⁽¹⁾ Zastosowanie próbki: Po ogniskowaniu wstępnym (etap 1) odmierzyć przy użyciu pipety 18 µl próbki i roztworów wzorcowych na aplikatory próbek (10 × 5 mm), rozmieścić je w odległości 1 mm od siebie na żelu i w odległości 5 mm w pozycji poziomej względem anody, po czym lekko docisnąć. Kontynuować ogniskowanie w przedstawionych powyżej warunkach, ostrożnie usuwając aplikatory próbek po 60 minutach ogniskowania próbki.

Uwaga: Jeżeli grubość lub szerokość żeli zostały zmienione, wartości natężenia elektrycznego i mocy należy odpowiednio dostosować (np. w przypadku stosowania żelu o rozmiarach 265 × 125 × 0,5 mm należy podwoić wartości natężenia elektrycznego i mocy).

- 6.3.2. Przykładowe programowanie napięcia elektrycznego dla urządzenia do automatycznej elektroforezy (dwa żele $5,0 \times 4,5$ cm), elektrody bez pasków przyłożone bezpośrednio do żelu.

Etap	Napięcie elektryczne	Natężenie elektryczne	Moc	Temperatura	Woltogodziny
1. Ogniskowanie wstępne	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Ogniskowanie próbki	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Ogniskowanie	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Ogniskowanie	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Umieścić aplikator próbki w etapie 2 przy 0 Vh.

Usunąć aplikator próbki w etapie 2 przy 30 Vh.

6.4. Barwienie białka

6.4.1. Utrwalanie białka

Usunąć paski elektrody niezwłocznie po wyłączeniu mocy i włożyć żel bezpośrednio do naczynia do barwienia/odbarwiania, wypełnionego 200 ml utrwalacza (ppkt 4.9.); pozostawić na 15 minut, stale wstrząsając.

6.4.2. Przemycanie i barwienie płytki żelu

Starannie osączyć utrwalacz i dwukrotnie przemycać płytkę żelu przez 30 sekund w 100 ml roztworu odbarwiającego (ppkt 4.10). Wylać roztwór odbarwiający i napełnić naczynie 250 ml roztworu barwiącego (ppkt 4.11.3); pozostawić do zabarwienia na 45 minut, lekko wstrząsając.

6.4.3. Odbarwianie płytki żelu

Wylać roztwór barwiący, przemycić dwukrotnie płytkę żelu, używając za każdym razem 100 ml roztworu odbarwiającego (ppkt 4.10), następnie wstrząsać z 200 ml roztworu odbarwiającego przez 15 minut i powtórzyć etap odbarwiania co najmniej dwa lub trzy razy do czasu uzyskania przezroczystego i bezbarwnego tła. Następnie płukać płytkę żelu wodą destylowaną (2 × 2 minuty) i suszyć na powietrzu (2–3 godziny) lub za pomocą suszarki do włosów (10–15 minut).

Uwaga 1: Czynności utrwalania, przemycania, barwienia i odbarwiania wykonywać w temp. 20 °C. Unikać podwyższonych temperatur.

Uwaga 2: Jeżeli preferowane jest bardziej czułe barwienie srebrem (na przykład zestaw do barwienia srebrem Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, kod nr 17-1150-01), próbki kazeiny poddanej działaniu plazminy należy rozcieńczyć do uzyskania stężenia 5 mg/ml.

7. OCENA

Ocena dokonywana jest poprzez porównanie wzorów białek nieznannej próbki z wzorcami odniesienia na tym samym żelu. Wykrywanie mleka krowiego w serach wyprodukowanych z mleka owczego, mleka koziego, mleka bawolego lub mieszanek mleka owczego, koziego i bawolego dokonywane jest za pośrednictwem gamma2-kazeiny i gamma3-kazeiny, których punkty izoelektryczne mieszczą się w zakresie od pH 6,5 do pH 7,5 (rys. 4 a, b, rys. 5). Granica wykrywalności jest niższa niż 0,5 %.

7.1. Ocena wizualna

W odniesieniu do oceny wizualnej ilości mleka krowiego zaleca się dostosowanie stężeń próbek i wzorców celem uzyskania tego samego poziomu intensywności uwidocznienia owczej, koziej lub bawolej gamma2-kazeiny i gamma3-kazeiny (zob. „ γ_2 E, G, B” i „ γ_3 E, G, B” na rys. 4 a, b i na rys. 5). Po takim dostosowaniu ilość mleka krowiego (mniejsza, równa lub większa od 1 %) w nieznannej próbce może być oceniona bezpośrednio poprzez porównanie intensywności uwidocznienia gamma2-kazeiny i gamma3-kazeiny krowiej (zob. „ γ_3 C” i „ γ_2 C” na rys. 4 a, b i na rys. 5) z intensywnością uwidocznienia gamma2-kazeiny i gamma3-kazeiny wzorców odniesienia 0 % i 1 % (owczej, koziej) lub laboratoryjnych wzorców pośrednich (bawolej).

7.2. Ocena densytometryczna

Jeżeli istnieje taka możliwość, zastosować densytometrię (ppkt 5.19) celem określenia stosunku powierzchni pików gamma2-kazeiny i gamma3-kazeiny krowiej do gamma2-kazeiny i gamma3-kazeiny owczej, koziej lub bawolej (zob. rys. 5). Porównać tę wartość do stosunku powierzchni pików gamma2-kazeiny i gamma3-kazeiny 1 % wzorca odniesienia (owczej, koziej) lub laboratoryjnego wzorca pośredniego (bawolej), poddanych analizie na tym samym żelu.

Uwaga: Metoda sprawdza się należycie w przypadkach, gdy występuje wyraźny dodatni sygnał zarówno w odniesieniu do krowiej gamma2-kazeiny, jak i krowiej gamma3-kazeiny w 1 % wzorca odniesienia, ale nie w 0 % wzorca odniesienia. Jeżeli sygnał nie występuje, należy optymalizować procedurę przestrzegając dokładnie szczegółów metody.

Próbka jest oceniana jako pozytywna, jeżeli krowia gamma2-kazeina oraz krowia gamma3-kazeina, lub stosunek powierzchni odpowiednich pików, są równe lub wyższe od poziomu 1 % wzorca odniesienia.

8. ODNIESIENIA

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

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

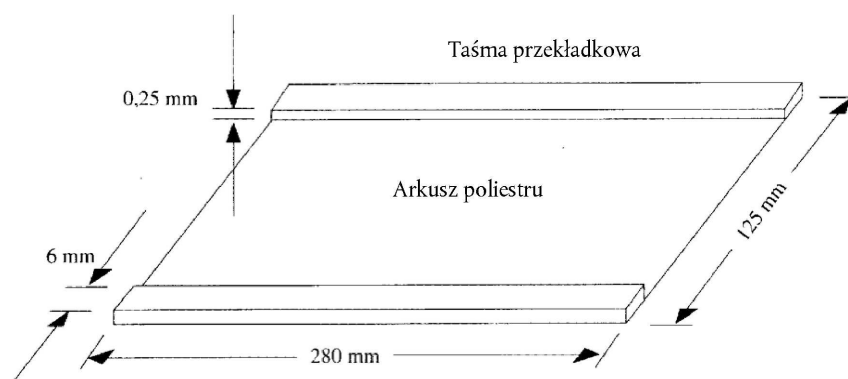
Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum* 89 (B.J. Radola, ed.) s. 389–393,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

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

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

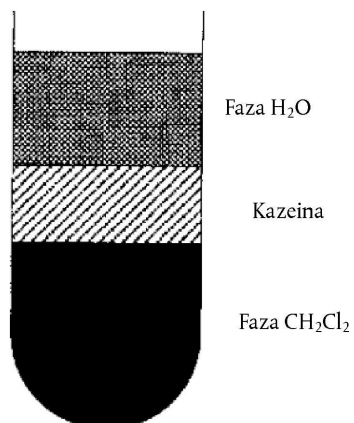
Rys. 1

Schematyczny rysunek arkusza przykrywającego



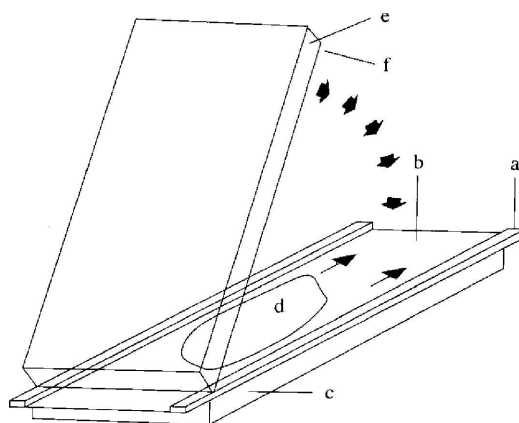
Rys. 2

Warstwa kazeiny utrzymująca się między fazą wodną i fazą organiczną po odwirowaniu



Rys. 3

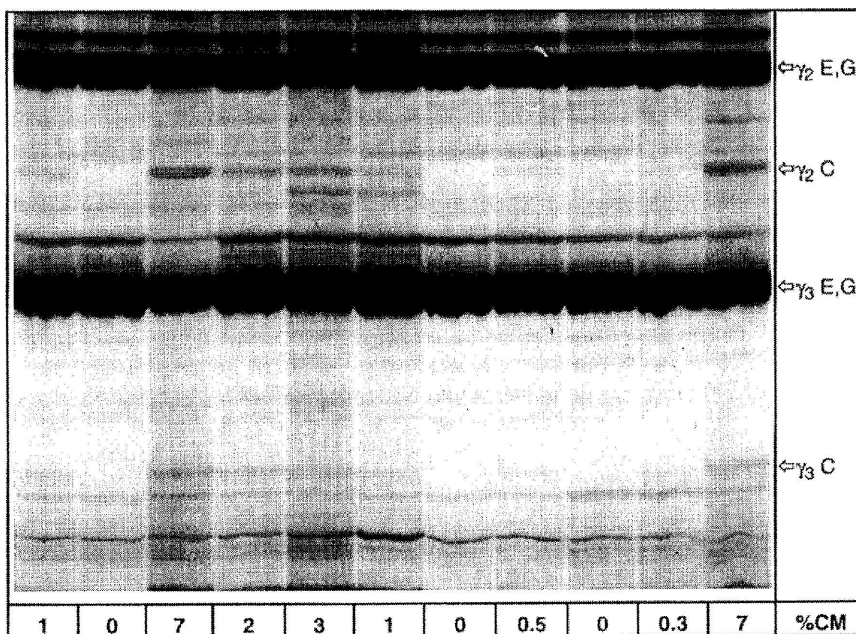
Technika „przykrywania klapą“, której celem jest otrzymanie ultracienkich żeli poliakryloamidowych



a = taśma przekładkowa (0,25 mm); b = arkusz pokrywający (ppkt 5.3.); c, e = płytki szklane (ppkt 5.1.); d = roztwór żelu (ppkt 4.1.2.); f = pojemnik transportowy arkusza żelu (ppkt 5.2.)

Rys. 4a

Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny poddanej działaniu plazminy z sera z mleka owczego i koziego, zawierającego różne ilości mleka krowiego

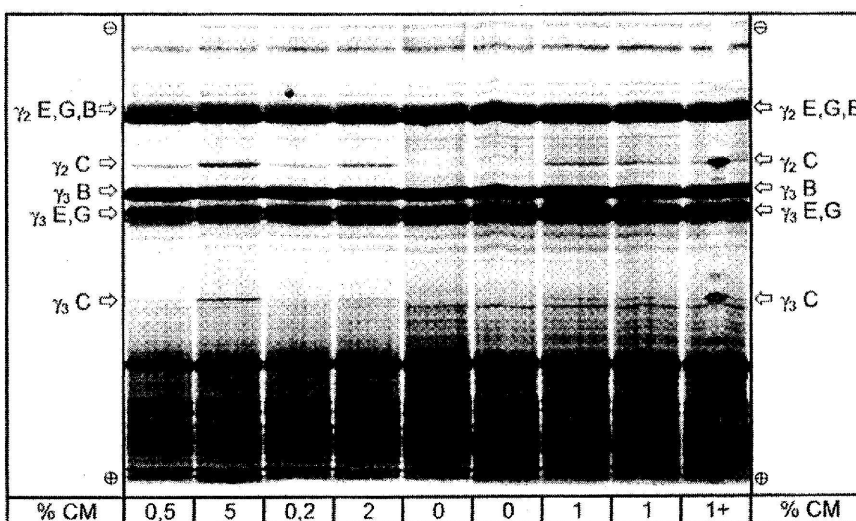


% CM = udział procentowy mleka krowiego, C = krowie, E = owcze, G = kozie

Przedstawiona jest górna połowa żelu IEF.

Rys. 4b

Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny poddanej działaniu plazminy z sera wyprodukowanego z mieszanek mleka owczego, koziego i bawolego, zawierających różne ilości mleka krowiego

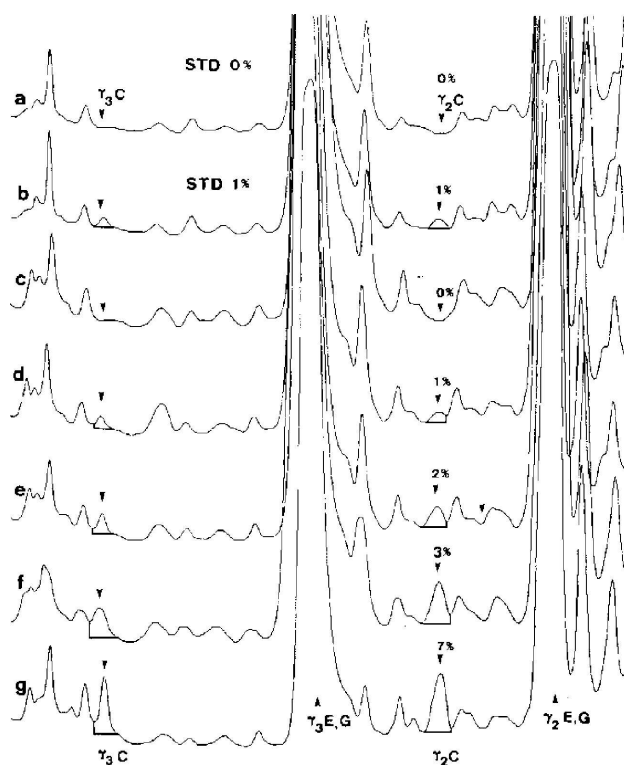


% CM = udział procentowy mleka krowiego; 1 + = próbka zawierająca 1 % mleka krowiego z dodatkiem czystej kazeiny krowiej w środku ścieżki. C = krowie, E = owcze, G = kozie, B = bawole.

Przedstawiona jest całkowita odległość rozdziału w żelu IEF.

Rys. 5

Zestawienie nałożonych densytogramów wzorców (STD) oraz próbek sera wyprodukowanego z mieszanki mleka owczego i koziego po wyznaczeniu punktu izoelektrycznego



a, b = wzorce zawierające 0 i 1 % mleka krowiego; c-g = próbki sera zawierające 0, 1, 2, 3 i 7 % mleka krowiego. C = krowie, E = owcze, G = kozie.

Górna połowa żelu IEF została zeskanowana przy $\lambda = 634$ nm.

ZAŁĄCZNIK IX

Ocena analiz**1. Zapewnianie jakości**

Analizy są przeprowadzane przez laboratoria wyznaczone zgodnie z art. 12 rozporządzenia (WE) nr 882/2004 (**) lub wyznaczone przez właściwe organy państwa członkowskiego.

2. Pobieranie próbek oraz spory dotyczące wyników analiz

1. Pobieranie próbek przeprowadzane jest zgodnie z odpowiednimi przepisami dotyczącym rozpatrywanego produktu. Jeżeli wyraźnie nie przewidziano żadnych przepisów w odniesieniu do pobierania próbek, stosuje się przepisy normy ISO 707, Mleko i przetwory mleczne – Wytyczne do pobierania próbek.
2. Laboratoryjne sprawozdania na temat wyników analiz zawierają informacje wystarczające dla oceny wyników przeprowadzanej zgodnie z dodatkiem.
3. W celu wykonania analiz wymaganych zgodnie z przepisami unijnymi pobiera się dwie próbki.
4. W przypadku pojawienia się sporu w odniesieniu do wyników agencja płatnicza zleca ponowne przeprowadzenie niezbędnej analizy danego produktu, a koszty pokrywa strona przegrywająca.

Wyżej wspomniana analiza jest przeprowadzana, pod warunkiem że zapieczętowane duplikaty próbek produktu są dostępne i były odpowiednio przechowywane przez właściwe organy. Producent przesyła do agencji płatniczej wniosek o przeprowadzenie analizy w ciągu 7 dni roboczych od ogłoszenia wyników pierwszej analizy. Agencja płatnicza wykonuje analizę w ciągu 21 dni roboczych od otrzymania wniosku.

5. Wynik uzyskany w procedurze odwoławczej jest ostatecznym wynikiem.
6. Jeżeli w ciągu pięciu dni roboczych od momentu pobrania próbek producent może udowodnić, że procedura pobierania próbek nie została przeprowadzona prawidłowo, pobranie próbek należy w miarę możliwości powtórzyć. Jeżeli pobranie próbek nie może być powtórzone, partia towaru zostaje dopuszczona.

Dodatek

Ocena zgodności partii towaru z prawnie obowiązującą wartością graniczną**1. Zasada**

W przypadku gdy w odniesieniu do interwencji publicznej i prywatnego przechowywania prawodawstwo przewiduje szczegółowe procedury pobierania próbek, procedur tych należy przestrzegać. We wszystkich pozostałych przypadkach wykorzystuje się próbkę spośród co najmniej 3 próbek pobranych wrywkowo z partii towaru przedłożonej do kontroli. Dopuszcza się przygotowanie próbki złożonej. Otrzymany wynik jest porównywany z prawnie obowiązującymi wartościami granicznymi poprzez obliczenie przedziału ufności wynoszącego 95 % jako podwójnego odchylenia standardowego, przy czym odnośne odchylenie standardowe zależy od tego, czy 1) metoda jest zwalidowana w drodze współpracy międzynarodowej z uwzględnieniem wartości σ_r i σ_R , lub 2) w przypadku walidacji wewnętrznej, czy obliczono odtwarzalność wewnętrzną. Wspomniany przedział ufności będzie wówczas równy niepewności pomiaru danego wyniku.

2. Metoda jest zwalidowana w drodze współpracy międzynarodowej

W tym przypadku odchylenie standardowe powtarzalności σ_r oraz odchylenie standardowe odtwarzalności σ_R zostały określone, a laboratorium jest w stanie wykazać zgodność z cechami wydajności zwalidowanej metody.

Należy obliczyć średnią arytmetyczną \bar{x} liczby n powtórzonych pomiarów.

Należy obliczyć niepewność rozszerzoną ($k = 2$) dla \bar{x} ze wzoru

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

Jeżeli wynik końcowy x pomiaru jest obliczany przy użyciu wzoru w postaci $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ lub $x = y_1/y_2$ w takich przypadkach należy przestrzegać normalnych procedur łączenia odchyleń standardowych.

Partia towaru jest uznana za niezgodną z górną prawnie obowiązującą wartością graniczną UL, jeżeli

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

w przeciwnym razie jest ona uznana za zgodną z UL.

Partia towaru jest uznana za niezgodną z dolną prawnie obowiązującą wartością graniczną LL, jeżeli

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

w przeciwnym razie jest ona uznana za zgodną z LL.

3. Walidacja wewnętrzna uwzględniająca obliczenie wewnętrznego odchylenia standardowego odtwarzalności

W przypadkach gdy stosowane są metody nieokreślone w niniejszym rozporządzeniu, a miary precyzji nie zostały ustanowione, przeprowadza się walidację wewnętrzną. We wzorach na obliczenie niepewności rozszerzonej U niezbędne jest zastosowanie wewnętrznego odchylenia standardowego powtarzalności s_r oraz wewnętrznego odchylenia standardowego odtwarzalności s_R zamiast, odpowiednio, σ_r i σ_R .

Zasady, których należy przestrzegać w celu ustalenia zgodności z prawnie obowiązującą wartością graniczną, są określone w pkt 1. Jeżeli jednak partia towaru zostanie uznana za niezgodną z prawnie obowiązującą wartością graniczną, pomiary powtarza się przy użyciu metody określonej w niniejszym rozporządzeniu oraz wyniki ocenione zgodnie z pkt 1.

(*) Produkty Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) i Resolyte® pH 5–7 oraz pH 6–8 (BDH, Merck) okazały się szczególnie odpowiednie do uzyskania wymaganego rozdzielenia gamma-kazein.

(**) Rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt, Dz.U. L 165 z 30.4.2004, s. 1.”