CH 12.22.

Stanovenie cudzích tukov v mliečnom tuku

1. POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Tento predpis ustanovuje metódu na detekciu cudzích tukov, rastlinných tukov a živočíšnych tukov ako hovädzí loj a bravčová masť v mliečnom tuku mliečnych výrobkov s použitím plynovochromatografickej analýzy triglyceridov.
Cudzie tuky sú definované v tejto norme ako všetky rastlinné a živočíšne tuky okrem mliečneho tuku.

Popísaná metóda sa dá aplikovať na mlieko a je založená na reprezentatívnosti vzoriek mliečneho tuku. Aplikovaním rozpätí hodnôt S uvedených v tabuľke č. 3 sú vzorce v určitých podmienkach kŕmenia, napríklad pri nedostatočnom kŕmení alebo kŕmení kráv kŕmnymi kvasinkami alebo Ca-mydlami, vo všeobecnosti platné. Iba v prípadoch extrémneho kŕmenia (napr. vysoký príjem čistých kŕmnych olejov, vysoké dávky Ca-mydiel kombinovaných s kŕmnym tukom, atď.) uvedené vzorce čiastočne naznačujú prítomnosť modifikovaného mliečneho tuku.

2. PRINCÍP METÓDY

Po extrakcii mliečneho tuku sa pripraví zásobný roztok. Z tohto roztoku sú stanovené triglyceridy (celkové uhlíkové čísla) plynovou chromatografiou. Vložením hmotnosti molekúl tuku s rozdielnym uhlíkovým číslom (C24 - C54 - len párne čísla) do triglyceridového vzorca sa cudzie tuky buď kvalitatívne detekujú alebo kvantitatívne stanovia.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- plynový chromatograf vhodný na meranie pri vysokých teplotách okolo 400° C, vybavený FID detektorom a regulátorom konštantného prietoku nosného plynu, septami odolnými voči vysokým teplotám
- chromatografická kolóna: kapilárna kolóna J&W Scientific DB - 5 HT
- vodný kúpeľ
- sušiareň
- aparatúra na extrakciu tuku podľa Röse - Gottlieba

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- toluén pre chromatografiu
- petroléter na extrakciu Röse-Gottlieb
- síran sodný bezvodý
- štandardný referenčný materiál s certifikovanými hodnotami triglyceridov: bezvodý mliečny tuk, referenčný materiál CRM 519 (unhydrous butter fat), IRMM, Geel, Belgicko

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Nakoľko pri práci sa používajú horľaviny, je potrebné prísne dodržiavať Zásady pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORIEK

Izolácia mliečneho tuku z masla
5g až 10g masla sa rozpustí vo vodnom kúpeli pri 50°C. Medzitým sa v sušiarni pri 50°C predhreje Erlenmayerova banka s lievikom a vloženým skladaným filtrom. Do neho sa vloží 0,5g až 1,0g síranu sodného. Tuková vrstva rozpustenej vzorky masla sa cez túto predhriatu aparatúru prefiltruje. Takýto mliečny tuk je takmer bez fosfolipidov.

Extrakcia tukovej frakcie podľa Röse-Gottliebovej metódy

Extrakcia tuku zo sušeného mlieka, mliečnych výrobkov sa robí podľa pracovného postupu z normy STN ISO 1737.
Extrakcia mliečneho tuku z ochutených mliečnych výrobkov a mliečnych výrobkov s prísadami sa vykonáva podľa ISO 14156 / IDF172 (First Edition 2001-12-01).

Príprava roztoku vzorky
Pre plynovú chromatografiu sa pripraví 0,1%-ný (hmotn.%) roztok vzorky tuku v toluéne.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

Chromatografické stanovenie triglyceridov
Pri vysokých teplotách okolo 350°C na eluovanie triglyceridov sa ľahko vyskytne nárast základnej čiary, najmä ak kolóna na začiatku nebola adekvátne kondiciovaná. Tomuto nárastu základnej čiary pri vysokých teplotách sa dá úplne vyhnúť kombináciou 2 kolón alebo odčítaním základnej čiary.

Korekcia základnej čiary - kondiciovaním
Vhodným počiatočným kondiciovaním novej kolóny a minimálne 20 nástrekmi roztokov mliečneho tuku je nárast základnej čiary často tak nízky, že korekcia základnej čiary nie je potrebná.

Kalibrácia
Pri kalibrácii je potrebné stanoviť responzné faktory príslušných triglyceridov ako aj cholesterolu v mliečnom tuku použitím štandardizovaných triglyceridov (aspoň C24, C30, C36, C42, C48, C50, C52, a C54 ako aj cholesterolu). Stredné responzné faktory sa môžu nájsť matematickou interpoláciou. Softvér plynového chromatografu ich vypočíta automaticky.
Pri každom meraní sa robia 2 až 3 kalibrácie. Stanoví sa responzný faktor každej zložky použitím štandardizovaného tuku s certifikovaným zložením triglyceridov, ako CRM 519 (bezvodý mliečny tuk) z Inštitútu pre referenčné materiály a merania, Geel, Belgicko.

Podmienky analýzy pre plynovú chromatografiu

Kolóna:	kapilárna, DB - 5HT
Nosný plyn:	vodík, prietok 55cm/sec pri 250°C
Teplotný program:	(35 - 250)°C pri 70°C/min
	(250 - 400)°C pri 5°C/min
	400°C 2 min

Injektor: Cool On- column
Nástrek: 1 µl 0,1% (m/m) roztoku tuku v toluéne
Detektor: FID, 400°C
Make up: Dusík 30 ml/min

5.3. MERANIE

Po kalibrácii s CRM 519 sa zaradí analýza štandardu – mliečneho tuku bez cudzích tukov a skontroluje sa, či vyhovuje všetkým rozsahom S. Ak áno, pokračuje sa meraním vzoriek. Každá vzorka sa analyzuje duplicitne (t.j. 2 paralelné stanovenia od prípravy až po chromatografické meranie). Po každej štvrtej analýze sa zaradí kontrolný štandard a skontroluje sa, či vyhovuje všetkým rozsahom S.
Ak štandard nevyhovuje čo len v jednom rozsahu S, musí sa vykonať buď nová kalibrácia, alebo skontrolovať príprava štandardu, reagencie, zopakovať prípravu a analýzu vzorky...atď.

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Integrujú sa plochy triglyceridov s párnym číslom (2n). Menej reprodukovateľné nízke obsahy C56 sa nezohľadňujú. Zvyšné triglyceridy (plocha píku) v chromatograme, vrátane cholesterolu (vrchol blízko C24) sa násobia príslušnými reakčnými faktormi štandardného tuku (z poslednej kalibrácie) a spolu sa normalizujú na 100. Okrem voľného cholesterolu sa tak hodnotia triglyceridy C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 a C54. Výsledky sú udané v hmotnostných % (g/100g).
Na kontrolu podmienok merania sa pre rôzne triglyceridy použijú relatívne štandardné odchýlky (RSD: variačný koeficient x 100) uvedené v tab.č.1. Ak sú RSD omnoho vyššie ako hodnoty uvedené v tabuľke 1, podmienky chromatografie nie sú vhodné a je potrebné overiť septá , skontrolovať prietok nosného plynu, ostatné chromatografické podmienky...

Tab.č.1: Relatívne štandardné odchýlky (RSD) obsahov triglyceridov (n = 6)

Triglycerid	C26	C28	C30	C32	C34	C36	C38	C40	C42	C44	C46	C48	C50	C52	C54
RSD (%)	1,95	1,46	1,08	0,39	0,43	0,13	0,13	0,20	0,16	0,36	0,39	0,39	0,24	0,34	0,24

6.1. SPRACOVANIE NAMERANÝCH HODNÔT

Na zistenie prítomnosti cudzích tukov boli vytvorené triglyceridové vzorce (tab.č.2) s limitmi S (tab.č.3), v ktorých sa hodnoty S čistých mliečnych tukov môžu pohybovať. Ak sa tieto limity prekročia, dá sa predpokladať prítomnosť cudzieho tuku.

Tabuľka 2 znázorňuje rôzne triglyceridové vzorce pre zistenie obsahu rôznych cudzích tukov. Na zistenie obsahu cudzích tukov sójového oleja, slnečnicového oleja, olivového oleja, repkového oleja, ľanového oleja, oleja z pšeničných a kukuričných klíčkov, bavlníkového oleja, hydrogenovaného rybieho oleja, rastlinných tukov z kokosovej a z palmovej dužiny ako aj palmového oleja a hovädzieho loja sa dá použiť jednotný vzorec.
Keďže triglyceridové zloženie cudzích tukov sa tiež mení, použili sa štyri rôzne experimentálne zmerané údaje pre triglyceridy cudzích tukov rovnakého typu.

Tzv. sumárnym vzorcom je možné pre všetky cudzie tuky dosiahnuť podobne dobré výsledky.

$$-2{,}7575 \cdot C26 + 6{,}4077 \cdot C28 + 5{,}5437 \cdot C30 - 15{,}3247 \cdot C32 + 6{,}2600 \cdot C34 + 8{,}0108 \cdot C40 - 5{,}0336 \cdot C42 + 0{,}6356 \cdot C44 + 6{,}0171 \cdot C46 = S$$

Tab č.2: Triglyceridové vzorce na zisťovanie prítomnosti rôznych cudzích tukov v mliečnom tuku so štandardnými odchýlkami SD pre S

Vzorec pre sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej z pšeničných klíčkov, olej z kukuričných klíčkov, bavlníkový a rybí olej
2,0983.C30 + 0,7288.C34 + 0,6927.C36 + 0,6353.C38 + 3,7452.C40 - 1,2929.C42 + 1,3544.C44 + 1,7013.C46 + 2,5283.C50 = S; SD = 0,38157
Vzorec pre kokosový olej a olej z palmovej dužiny
3,7453.C32 + 1,1134.C36 + 1,3648.C38 + 2,1544.C42 + 0,4273.C44 + 0,5809.C46 + 1,2926.C48 + 1,0306.C50 + 0,9953.C52 + 1,2396.C54 = S; SD = 0,11323
Vzorec pre palmový olej a hovädzí loj
3,6644.C28 + 5,2297.C30 – 12,5073.C32 + 4,4285.C34 – 0,2010.C36 + 1,2791.C38 + 6,7433.C40 – 4,2714.C42 + 6,3739.C46 = S; SD = 0,81094
Vzorec pre bravčovú masť
6,5125.C26 + 1,2052.C32 + 1,7336.C34 + 1,7557.C36 + 2,2325.C42 + 2,8006.C46 + 2,5432.C52 + 0,9892.C54 = S; SD = 0,39897

Tab č.3: Limity S pre mliečne tuky

Cudzí tuk	Rozsah S
sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej z pšeničných klíčkov, olej z kukuričných klíčkov, bavlníkový a rybí olej	98,05 – 101,95
kokosový olej a olej z palmovej dužiny	99,42 – 100,58
palmový olej a hovädzí loj	95,90 – 104,10
bravčová masť	97,96 – 102,04
sumárny vzorec	95,68 – 104,32

Ak je vzorka pravdepodobne zmesou mliečneho tuku a jedného zo 14 rôznych cudzích tukov alebo kombinácie týchto cudzích tukov, tak na kontrolu neznámej vzorky tuku sa musia použiť všetky vzorce uvedené v tab.č.2 ako aj celkový vzorec. Ak sa dosadením triglyceridov vzorky tuku získa hodnota S, ktorá spadá mimo rozpätia čo len jedného z piatich vzorcov uvedených v tab. č.3, vzorka je pravdepodobne modifikovaným mliečnym tukom.
Pomocou všetkých vzorcov je možné detekovať aj kombinácie rôznych cudzích tukov. Rozsahy kolísania triglyceridov v rôznych cudzích tukoch jedného druhu nemajú významný vplyv na medzné hodnoty detekcie.
Z opakovateľnosti r a reprodukovateľnosti R možno vypočítať rozšírenú neistotu S-hodnoty. Zahrnutie rozšírenej neistoty (na základe opakovaných analýz) do S limitov tabuľky 2 má za následok rozšírené S-limity, ktoré uvádza tabuľka 4. Podľa týchto rozšírených intervalov sa vyhodnocujú vzorky.

Tab.č.4: Rozšírené S-limity čistých mliečnych tukov vrátane rozšírenej neistoty

Cudzí tuk	Rozsah S
sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej z pšeničných klíčkov, olej z kukuričných klíčkov, bavlníkový a rybí olej	97,36 – 102,64
kokosový olej a olej z palmovej dužiny	99,14 – 100,86
palmový olej a hovädzí loj	94,77 – 105,23
bravčová masť	97,65 – 102,35
sumárny vzorec	94,42 – 105,58

Kvantitatívne stanovenie cudzieho tuku

Na získanie kvantitatívnych informácií o koncentrácii cudzieho tuku vo vzorke mliečneho tuku sa používa nasledovný vzorec:

$$X (\%) = 100 . \{(100-S)/ (100 - S_F)\}$$

Pričom X znamená množstvo neznámeho cudzieho tuku alebo zmesi cudzieho tuku v neznámom mliečnom tuku. S dostaneme z prídavku neznámeho cudzieho tuku tak, že dosadíme hodnoty triglyceridov zo zmesi neznámy tuk/mliečny tuk do uvedeného celkového vzorca pre triglyceridy. Ak sa do mliečneho tuku pridá neznámy cudzí tuk, stredná S - hodnota rôznych cudzích tukov pre sumárny vzorec sa zvolí S_F ; táto stredná S-hodnota sa získa vložením údajov o triglyceridoch z čistých cudzích tukov do tohto vzorca a vypočítaním strednej hodnoty (S_F = 7,46). Dobré kvantitatívne výsledky týkajúce sa prídavkov akéhokoľvek cudzieho tuku získame aj použitím vzorca pre palmový olej/ hovädzí loj (tab.č.2) a s použitím strednej S_F hodnoty 10,57.
V prípade známych druhov cudzieho tuku sa musia vložiť do uvedeného vzorca nasledovné S_F hodnoty a treba si zvoliť príslušný vzorec pre cudzí tuk z tab. č.2.

7. LITERATÚRA

7.1. Nariadenie komisie (ES) č. 273/2008, Príloha XX, (Článok 16), Referenčná metóda stanovenia čistoty mliečneho tuku plynovou chromatografickou analýzou triglyceridov – revízia 2

7.2. Aplikácia výrobcu plynového chromatografu: „ The essential Chromatography Catalog from Agilent, 2005-2006, str.401

7.3. STN ISO 1737

7.4. Manuál k plynovému chromatografu: „Understanding Your ChemStation“, Agilent Technologies, Deutschland GmbH2003

7.5. ISO 14156 / IDF172 (First Edition 2001-12-01).

CH 12.22.
Stanovenie triglyceridov metódou GC/FID (prítomnosť cudzieho tuku)

1 PRINCÍP METÓDY

Po extrakcii mliečneho tuku sa pripraví zásobný roztok, z ktorého sa zistí prítomnosť triglyceridov. Porovnaním chromatografického záznamu referenčného tuku BCR 519-bezvodý maslový tuk a neznámej vzorky sa zistí prítomnosť cudzieho tuku (bez ohľadu na podmienky kŕmenia alebo pridájania) – porušenie triglyceridového reťazca C50 – C52. Po extrakcii tuku zo vzorky čokolády sa pripraví zásobný roztok s prídavkom vnútorného štandardu a porovnaním chromatografického záznamu s referenčným materiálom IRMM-801 (kakaové maslo) sa zistí prítomnosť cudzieho tuku.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na zistenie prítomnosti cudzích tukov, rastlinných aj živočíšnych (ako napríklad hovädzí loj alebo bravčová masť), v mliečnom tuku mliečnych výrobkov a v tuku čokolád a tiež zistenie obsahu mliečneho tuku v mliečnych a bielych čokoládach plynovou chromatografiou triglyceridov.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 redestilovaná voda
3.1.2 dietyléter p.a
3.1.3 petroléter
3.1.4 n- heptán, p.a.
3.1.5 n-hexán
3.1.6 izooktán
3.1.7 CRM IRMM - 801 – čisté kakaové maslo
3.1.8 CRM BCR - 519 – bezvodý mliečny tuk
3.1.9 1-palmitoyl-2-stearoyl-3-butyroyl-glycerol (PSB)
3.1.10 α-cholestan

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 Kyselina chlorovodíková, c=4mol/l

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok α-cholestanu, c=1,00mg/ml
Do 10ml odmernej banky navážiť 10 mg α-cholestanu a doplniť po značku heptánom (3.1.4). Roztok uchovávať v mrazničke.

3.3.2 Pracovný roztok α-cholestanu, c=0,004mg/ml
Napipetovať 0,1ml roztoku α-cholestanu (3.3.1) do 25ml odmernej banky a doplniť po značku heptánom (3.1.4). Roztok uchovávať v mrazničke.

3.3.3 Zásobný roztok PSB, c=1,0mg/ml
Do 10 ml odmernej banky navážiť 10 mg PSB (3.1.9) a doplniť po značku heptánom (3.1.4). Roztok uchovávať v mrazničke.

3.3.4 Pracovné roztoky PSB s kakaovým maslom
Zo zásobného roztoku roztoku PSB (3.3.3) pripraviť 5 základných kalibračných roztokov v kakaovom masle podľa tabuľky 1. Roztoky uchovávať v mrazničke.

TABUĽKA 1 – príprava základných kalibračných roztokov

Pracovný roztok	IRMM 801 (3.1.7) navážka v 10ml odmernej banke v mg	Objem zásobného roztoku PSB (3.3.3) pridaný do 10ml odm. banky v ml	C_{PSB} v základnom pracovnom roztoku v mg/ml	$C_{IRMM-801}$ v mg/ml
1	100	1,0	0,1	10
2	100	0,8	0,08	10
3	100	0,6	0,06	10
4	100	0,4	0,04	10
5	100	0,2	0,02	10

Pripravené roztoky nariediť 10x (1ml pracovných roztokov podľa tabuľky 1 do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku heptánom).

3.3.5 Kalibračné roztoky
Kalibračné roztoky pripraviť zmiešaním 1ml pracovných roztokov PSB (3.3.4) a 1ml α-cholestanu (3.3.2). Výsledné koncentrácie jednotlivých kalibračných roztokov sú uvedené v tabuľke 2. Roztoky uchovávať v mrazničke.

TABUĽKA 2 - koncentrácie kalibračných roztokov

Kalibračný roztok	C_{PSB} v kalibračnom roztoku v mg/ml	$C_{a\text{-}cholestan}$ v kalibračnom roztoku v mg/ml	$C_{IRMM-801}$ v mg/ml
1	0,005	0,002	0,5
2	0,004	0,002	0,5
3	0,003	0,002	0,5
4	0,002	0,002	0,5
5	0,001	0,002	0,5

3.4 Porovnávacie roztoky CRM

3.4.1 Porovnávací roztok CRM BCR-519 (bezvodý mliečny tuk) - 0,05% v heptáne
CRM BCR-519 (3.1.8) rozpustiť pri 75˚C, opatrne premiešať a navážiť 100mg do 10ml odmernej banky. Doplniť po značku heptánom (3.1.4). Roztok zriediť 20x. Roztok uchovávať v mrazničke.

3.4.2 Porovnávací roztok CRM IRMM-801 (čisté kakaové maslo) - 0,05% v heptáne
CRM IRMM-801 (3.1.7) rozpustiť pri teplote 75˚C, opatrne premiešať a navážiť 100mg do 10ml odmernej banky. Doplniť po značku heptánom (3.1.4). Roztok zriediť 20x. Roztok uchovávať v mrazničke.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 analytické váhy
4.2 rotačná vákuová odparka (RVO)
4.3 plynovýchromatograf s FID detektorom Agilent 7890A
4.4 kapilárna kolóna WCOT-fused silica - 25m x 0,25mm ID, DF=0,1 coating tap for triglycerides
4.5 vodík 5.0
4.6 syntetický vzduch WM frei
4.7 sušiareň
4.8 Soxhletov extraktor s príslušenstvom
4.9 exikátor
4.10 filtračný papier Watmann
4.11 laboratórne sklo

5 PRACOVNÝ POSTUP

Mliečne výrobky okrem mliečnej čokolády

5.1 Izolácia mliečneho tuku z masla

10g s presnosťou 0,1g masla roztopiť v kadičke vo vodnom kúpeli pri teplote 75°C. 50ml Erlenmeyerovu banku a lievik s filtračným papierom Watmann predsušiť na teplotu 50°C. Vrstvu tuku zo vzorky masla prefiltrovať.

5.2 Extrakcia tukovej frakcie podľa Röse – Gottliebovej metódy

1. Vzorku ohriať vo vodnom kúpeli na teplotu 35 až 40°C, premiešať a ochladiť na teplotu 20°C.
2. Do extrakčnej banky navážiť 10g s presnosťou 0,1g vzorky, pridať 2ml 25% roztoku amoniaku a premiešať.
3. Pridať 10ml etanolu a opatrne premiešať kývavým pohybom. K lepšiemu rozpoznaniu vrstiev je možné pridať 2 kvapky kongo-červene.
4. Pridať 25ml dietyléteru a opatrne premiešať kývavým pohybom po dobu 1 minúty. (Silné pretrepávanie môže spôsobiť vznik emulzie, v prípade zahriatia roztok v extraktore ochladiť pod tečúcou vodou).
5. Pridať 25ml petroléteru, banku uzavrieť a opatrne miešať kývavým pohybom po dobu 30s.
6. 30 min nechať postáť, vrstvy sa oddelia.
7. Opatrne vybrať zátku a opláchnuť hrdlo dietyléterom. Extrahovaný tuk previesť do vysušenej banky. Previesť druhú extrakciu avšak použiť iba 15ml dietyléteru a 15ml petroléteru (u masla postačuje jedna extrakcia).
8. Odpariť na RVO a dofúkať N_2 do sucha.

Čokolády

5.3 Predpríprava vzorky

Asi 200g čokolády nastrúhať alebo pomlieť, preniesť do uzatvárateľnej nádoby a uložiť na chladnom mieste.

5.4 **Rýchla extrakcia**

Z nastrúhanej čokolády navážiť 5g a v oddeľovacom lieviku extrahovať trikrát po 10 ml n-hexánu. Odstrediť, vrstvy spojiť a na RVO odpariť rozpúšťadlo, dosušiť pod prúdom dusíka.

5.5 **Stanovenie celkového obsahu tuku**

4-5g čokolády navážiť do 300ml odmernej banky, pomaly pridať za pomalého miešania 45 ml vriacej vody tak, aby sa vytvorila homogénna suspenzia. Pridať 55ml 4mol/l HCl (3.2.1), varné guličky, prikryť hodinovým sklíčkom a priviesť do varu. Jemne variť 15 minút. Potom sklíčko opláchnuť 100 ml vody, prefiltrovať cez filtračný papier (4.12), opláchnuť kadičku 3x vodou. Filter so vzorkou uložiť do 100 ml kadičky a sušiť pri 100˚C 2 hodiny. Potom vložiť filter do patróny, navrch dať sklenú vatu, kadičku opláchnuť 50 ml petroléteru (3.1.3). Extrahovať 4 hodiny pri 100˚C. Petroléter odpariť a sušiť pri 102˚C 1,5 hodiny. Po vychladnutí v exikátore odvážiť, sušiť 1 hodinu pri 102˚C, odvážiť a pokračovať až do konštantnej hmotnosti.

Percentuálny obsah tuku v čokoláde sa vypočíta nasledovne:

$$M_{fat,choc} = \frac{w_{fat} \times 100}{w}$$

kde w je hmotnosť čokolády použitej na analýzu v g
w_{fat} je hmotnosť celkového tuku získaného Soxhletovou extrakciou v g
$M_{fat,choc}$ je celkový tuk v čokoláde v %

5.6 **Príprava vzorky k analýze**

Pre stanovenie prítomnosti cudzieho tuku v mliečnom tuku pripraviť 0,05% roztok tuku v n-heptáne. Použiť tuk získaný podľa bodu 5.1 alebo 5.2
Pre stanovenie mliečneho tuku a CBE pripraviť 1% roztok tuku v heptáne získaný podľa bodu 5.4 alebo 5.5. Následne pripraviť 0,1% roztok a potom pracovný roztok zmiešaním 1ml 0,1% roztoku tuku a 1ml roztoku vnútorného štandardu α-cholestanu (3.3.2).

5.7 **Chromatografická analýza**

5.7.1 GC-podmienky – Agilent 7890A s kapilárnou kolónou
plynový chromatograf s FID detektorom s nastavením podmienok podľa návodu

- ✓ Teplota injektora: 360˚C
- ✓ Teplota detektora: 360˚C
- ✓ H_2 flow – 30ml/min
- ✓ Air flow – 300ml/min
- ✓ Makeup flow – 20ml/min

- ✓ Teplotný program: 1 min. pri 100°C, potom 30 ^{o}C/min do 270 ^{o}C, potom 5 ^{o}C/min do 350 ^{o}C a držať 5 min.
- ✓ Nástrek: 0,5 μl

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

6.1 Kvalitatívne zistenie prítomnosti cudzích tukov (mlieko a mliečne výrobky okrem čokolády)

Porovnaním chromatografického záznamu referenčného tuku BCR 519 - bezvodý maslový tuk a neznámej vzorky sa zistí prítomnosť cudzieho tuku – porušenie triglyceridového reťazca C50 – C52.

6.2 Kvantitatívne zistenie prítomnosti cudzích tukov a množstva mliečneho tuku

tmavé čokolády

Vyhodnotenie sa vykonáva pomocou sheetu CoCal1.

mliečne čokolády

Vyhodnotenie sa vykonáva pomocou sheetu CoCal2.

7 ZOZNAM SKRATIEK

GC – plynová chromatografia
FID – plameňovoionizačný detektor
RVO – vákuová rotačná odparka
R – nastavenie rozsahu lineárneho rozšírenia
CBE – cocoa butter equivalents (obsah cudzieho tuku)
MF – mliečny tuk
IRMM - Institute for Reference Materials and Measurements

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

8.1 Reference method for the detection of foreign fats in milk fat by gas chromatographic analysis of triglycerides – revision 1

8.2 Nariadenie Komisie (ES) č.213/2001 z 9. januára 2001, ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá pre aplikáciu nariadenia Rady (ES) č.1255/1999 týkajúce sa metód analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov a ktorým sa menia a dopĺňajú nariadenia (ES) č.2771/1999 a (ES) č. 2799/1999 – Príloha XXV – Referenčná metóda zisťovania prítomnosti cudzích tukov v mliečnom tuku plynovou chromatografiou triglyceridov – oprava

8.3 Detection and quantification of cocoa butter equivalents in milk chocolate, validated method, European Commision, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium, 2007