

(Právne akty, ktorých publikovanie je povinné)

**NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 213/2001
z 9. januára 2001,**

ktorým sa stanovujú podrobné pravidlá pre uplatňovanie 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

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na nariadenie Rady (ES) č. 1255/1999 zo 17. mája 1999 o spoločnej organizácii trhu s mliekom a mliečnymi výrobkami¹ a najmä na jeho články 10, 15, 26(3), 29(1) a 31(14),

keďže:

(1) Nariadenia Komisie (EHS) č. 1216/68, (EHS) č. 3942/92, (ES) č. 86/94, (ES) č. 2721/95, (ES) č. 1080/96, (ES) č. 1081/96, (ES) č. 1082/96, (ES) č. 1854/96, (ES) č. 880/98, (ES) č. 1459/98, ktorých úplné citácie sú uvedené v prílohe XXVI tohto nariadenia, ustanovujú referenčné a rutinné metódy analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov a stanovujú rozsah a pravidlá uplatňovania týchto metód. V záujme jasnosti a na poskytnutie jednotného súboru metód a pravidiel na ich uplatňovanie prevádzkovateľom v sektore je potrebné horeuvedené nariadenia prepracovať a zhrnúť do jedného textu. Z rovnakého dôvodu je potrebné zmeniť a doplniť nariadenie Komisie (ES) č. 2771/1999 zo 16. decembra 1999 stanovujúce podrobné pravidlá uplatňovania nariadenia Rady (ES) č. 1255/1999 týkajúce sa intervencií na trhu s maslom a smotanou² a nariadenie Komisie (ES) č. 2799/1999 zo 17. decembra 1999 stanovujúce podrobné pravidlá uplatňovania nariadenia (ES) č. 1255/1999 týkajúce sa poskytovania pomoci pre odstredenú mlieko a odstredenú mlieko v prášku určené na kŕmenie zvierat a predaj takéhoto odstredeného mlieka v prášku³ tak, aby prílohy k týmto nariadeniam týkajúce sa metód analýzy mohli byť zahrnuté do tohto nariadenia.

(2) Požiadavky na zloženie a kvalitu mlieka a mliečnych výrobkov ustanovené podľa nariadenia (ES) č. 1255/1999 musia byť overené, aby sa zabezpečilo, že budú prísne dodržiavané.

(3) Referenčné metódy pre takéto overovania sú často metódy uverejnené medzinárodnými organizáciami ako CEN, IDF, ISO a AOAC International, ktoré ich pravidelne aktualizujú. V niektorých prípadoch sa ustanovuje referenčná metóda spoločenstva, zatiaľ čo v ostatných prípadoch pravidlá spoločenstva referenčnú metódu nešpecifikujú. Za účelom zabezpečenia jednotného uplatňovania referenčných metód sa každý rok vypracuje zoznam referenčných metód a používať sa môžu len metódy uvedené v tomto zozname.

¹ OJ L 160, 26.6.1999, s. 48.

² OJ L 333, 24.12.1999, s. 11.

³ OJ L 340, 31.12.1999, s. 3.

(4) Používanie rutinných metód sa nevylučuje. Je preto potrebné špecifikovať podmienky pre ich použitie.

(5) Tiež je potrebné stanoviť bežné metódy na zabezpečenie jednotných postupov hodnotenia výsledkov analýz, sensorického hodnotenia daných výrobkov a prehodnocovania sporných výsledkov.

(6) Pre niektoré analýzy v súčasnosti neexistujú medzinárodne akceptované overené referenčné metódy, a preto nie sú dostupné žiadne informácie o rozdieloch medzi výsledkami analýz dosiahnutými v rôznych laboratóriách. Je preto potrebné stanoviť metódy spoločenstva, ktoré budú náležite potvrdené podľa medzinárodných pravidiel a ktoré sa aplikujú ako referenčné metódy.

(7) Nariadenie Komisie (ES) č. 2571/97 z 15. decembra 1997 o predaji masla za znížené ceny a poskytovaní pomoci pre smotanu, maslo a koncentrované maslo používané pri výrobe cukrárskeho pečiva, zmrzliny a iných potravín¹ v znení poslednej novelizácie nariadením (ES) č. 635/2000² upravuje sledovanie stopových látok v smotane, masle a koncentrovanom masle za určitých okolností za účelom zabezpečenia správneho konečného použitia týchto výrobkov. Keďže sledovanie je dôležité pre riadne fungovanie systému a za účelom zabezpečenia rovnakého zaobchádzania so zúčastnenými prevádzkovateľmi, je potrebné ustanovenie bežných metód na sledovanie stopových látok v týchto produktoch.

(8) Podľa nariadenia Komisie (EHS) č. 3143/85 z 11. novembra 1985 o predaji za znížené ceny intervenčného masla určeného na priamu spotrebu vo forme koncentrovaného masla³ v znení poslednej novelizácie nariadením (ES) č. 101/1999⁴, nariadením Komisie (EHS) č. 429/90 z 20. februára 1990 o poskytovaní pomoci prostredníctvom pozvánky na tender pre koncentrované maslo určené na priamu spotrebu v spoločenstve⁵ v znení poslednej novelizácie nariadením (ES) č. 124/1999⁶ a nariadením (ES) č. 2571/97, sa do koncentrovaného masla stopové látky pridávajú pod dohľadom. Na zabezpečenie správneho zloženia výrobkov je nutné striktné dodržiavať súlad s požiadavkami na sledovanie týchto látok v koncentrovanom masle. Je preto potrebné stanoviť spoločnú metódu zisťovania takýchto látok.

(9) Podľa článku 9 nariadenia (ES) č. 1255/1999 je možné poskytovať pomoc na súkromné skladovanie pre syry vyrobené z ovčieho mlieka. Podľa článku 31 uvedeného nariadenia je možné poskytovať osobitné vrátenie peňazí pre tieto produkty. Syry vyrobené z ovčieho mlieka, kozieho mlieka a byvolieho mlieka a zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka je možné do spoločenstva dovážať z niektorých tretích krajín podľa preferenčných dohôd. S ohľadom na horeuvedené ustanovenia sú potrebné vhodné kontroly na overenie toho, že dané produkty neobsahujú kravské mlieko. Je preto potrebné ustanoviť referenčnú metódu spoločenstva na zisťovanie kravského mlieka bez toho, aby bolo dotknuté používanie rutinných metód ak tieto vyhovujú určitým kritériám.

¹ OJ L 350, 20.12.1997, s. 3.

² OJ L 76, 25.3.2000, s. 9.

³ OJ L 298, 12.11.1985, s. 9.

⁴ OJ L 11, 16.1.1999, s. 14.

⁵ OJ L 45, 21.2.1990, s. 8.

⁶ OJ L 16, 21.1.1999, s. 19.

(10) Podľa nariadenia Komisie (EHS) č. 2921/90 z 10. októbra 1990 o poskytovaní pomoci pre odstredenú mlieko používané na výrobu kazeínu a kazeínátov¹ v znení poslednej novelizácie nariadením Komisie (ES) č. 2654/1999² je nutné zistiť neprítomnosť koliforiem. Medzinárodne uznanou referenčnou metódou na zisťovanie koliforiem v mlieku a mliečnych výrobkoch je medzinárodná norma IDF 73A: 1985. Táto norma je však uplatniteľná iba v modifikovanej forme na zisťovanie koliforiem v určitom množstve výrobku. Preto bola ustanovená referenčná metóda spoločenstva na zisťovanie koliforiem založená na horeuvedenej norme.

(11) Nariadenie Rady (EHS) č. 2658/87 z 23. júla 1987 o tarifnej a štatistickej nomenklatúre a o spoločnej colnej tarife³ v znení poslednej novelizácie nariadením (ES) č. 254/2000⁴ stanovuje rôzne výšky cla pre kŕmne zmesi spadajúce pod oddelenie tarify č. 2309 v závislosti od obsahu mlieka v nich. Na zabezpečenie jednotného uplatňovania uvedených pravidiel je potrebné stanoviť všeobecne uznanú metódu analýzy obsahu laktózy určenú na povinné používanie vo všetkých členských štátoch.

(12) Podľa nariadenia (ES) č. 1255/1999 maslo a odstredenú mlieko v prášku určené na intervenciu alebo, v prípade odstredenej mlieka v prášku, na použitie ako krmivo pre zvieratá, musia vyhovovať určitým požiadavkám na kvalitu. Je potrebné ustanoviť referenčné metódy na overenie splnenia týchto požiadaviek.

(13) Implementácia niektorých z týchto metód uvedených v tomto nariadení po prvýkrát si bude vyžadovať prechodné obdobie. Uplatňovanie týchto metód sa preto odkladá.

(14) Riadiaci výbor pre mlieko a mliečne výrobky neposkytol stanovisko v termíne stanovenom jeho predsedom,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

HLAVA 1

VŠEOBECNÉ USTANOVENIA

Článok 1

Rozsah a oblasť uplatňovania

Toto nariadenie ustanovuje pravidlá uplatňovania metód chemickej, fyzickej a mikrobiologickej analýzy a senzorickeho hodnotenia mlieka a mliečnych produktov, ktoré sa použijú podľa úpravy upravenej pri spoločnej organizácii trhu s mliekom a mliečnymi výrobkami založenou nariadením (ES) č. 1255/1999. Taktiež stanovuje niektoré z týchto metód.

Článok 2

Zoznam metód

1. Príloha 1 tohto nariadenia obsahuje zoznam referenčných metód použiteľných na analýzu uvedenú v článku 1.

¹ OJ L 279, 11.10.1990, s. 22.

² OJ L 325, 17.12.1999, s. 10.

³ OJ L 256, 7.9.1987, s. 1.

⁴ OJ L 28, 3.2.2000, s. 16.

2. Komisia aktualizuje zoznam najmenej jedenkrát za rok v súlade s postupom uvedeným v článku 42 nariadenia (ES) č. 1255/1999.

Článok 3 Rutinné metódy

Rutinné metódy je možné používať na analýzy požadované pravidlami spoločenstva za predpokladu, že tieto sú riadne kalibrované a pravidelne kontrolované proti referenčnej metóde.

Na kontrolu výsledkov získaných rutinnými metódami, ktoré sú blízko limitom špecifikovaným v príslušných nariadeniach, je možné uplatniť postup uvedený v prílohe II.

V sporných prípadoch sú rozhodujúce výsledky získané referenčnou metódou.

Článok 4 Potvrdzovanie referenčných metód

1. Referenčné metódy sa potvrdia ak vyhovujú vopred stanoveným kritériám presnosti týkajúcich sa limitu opakovateľnosti a reprodukovateľnosti.

2. Ak nebola referenčná metóda stanovená v príslušných nariadeniach potvrdená, členské štáty stanovujú dočasný limit reprodukovateľnosti.

Tento limit sa získa podľa postupu uvedeného v prílohe III(b). Počas prvých 18 mesiacov po nadobudnutí účinnosti tohto nariadenia však môžu členské štáty používať ekvivalentný postup.

Súlady s limitom sa kontroluje najmenej jedenkrát za rok.

3. Ak výsledky uplatňovania potvrdenej referenčnej metódy alebo metód s dočasnými údajmi o presnosti ukazujú prekročenie limitu, výsledky analýzy je možné overiť použitím metódy popísanej v prílohe IV na určenie kritickej odchýlky od daného limitu.

Článok 5 Prijateľnosť výsledkov analýzy

1. Analýzy sa uskutočňujú v laboratóriách so zavedeným interným postupom kontroly kvality v súlade s postupom uvedeným v prílohe V(a) alebo postupom ekvivalentnej úrovne.

Podrobný popis aplikovaného postupu musí byť v laboratóriu k dispozícii k nahliadnutiu.

2. Laboratóriá stanovujú vlastné kritériá presnosti v rámci merania pre všetky metódy podľa:

(a) postupu popísaného v prílohe V(b), alebo

(b) uverejneného potvrdeného postupu so stanovenou opakovateľnosťou.

Súlady s limitom reprodukovateľnosti sa musí kontrolovať najmenej jedenkrát za rok za použitia postupu popísaného v prílohe III(a).

Druhý pododsek sa netýka laboratórií, ktoré sa počas roka podieľali na programe testovania dokonalosti.

3. Laboratórne správy o výsledkoch analýzy musia obsahovať dostatočné informácie na vyhodnotenie výsledkov, ktoré sa vykoná v súlade s prílohami IV a VIII.

4. Výsledky analýzy sa považujú za prijateľné, ak boli získané v súlade s kritériami prijateľnosti popísanými v internom postupe kontroly kvality uvedenom v odseku 1 a kritériami presnosti uvedenými v odseku 2.

Článok 6 Senzorické hodnotenie

1. Pre maslo sa uplatňujú metódy na kontrolu činnosti expertov a spoľahlivosť výsledkov popísané v prílohe VI. Postup uvedený v prílohe VII sa uplatňuje ako referenčná metóda pre senzorické hodnotenie.

2. Pre mlieko a mliečne výrobky okrem masla je referenčnou metódou určenou na používanie členskými štátmi na senzorické hodnotenie buď norma IDF 99C/1997 alebo iné porovnateľné metódy, ktoré členské štáty oznámia Komisii.

Postupy popísané v prílohe VI je možné používať na kontrolu výkonu hodnotiteľov a spoľahlivosť výsledkov.

Článok 7 Odber vzoriek a spory o výsledkoch analýz

1. Pre analýzy požadované pravidlami spoločenstva sa odoberajú dvojité vzorky.

2. Postup popísaný v prílohe VIII sa použije v prípadoch, kedy výsledky analýzy nie sú akceptované prevádzkovateľom.

HLAVA II

METÓDY ANALÝZY

Článok 8 Obsah vody, beztukovej sušiny/tuku v masle

1. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu vody v masle sa použije metóda analýzy popísaná v prílohe IX.

2. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu beztukovej sušiny v masle sa použije metóda analýzy popísaná v prílohe X.

3. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu tuku v masle sa použije metóda analýzy popísaná v prílohe XI.

Článok 9 Stopové látky

1. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu vanilínu v koncentrovanom masle, masle a smotane sa použije metóda analýzy popísaná v prílohe XII.
2. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu etyl esteru beta-apo-8' karotenickej kyseliny v koncentrovanom masle a masle sa použije metóda analýzy popísaná v prílohe XIII.
3. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu beta sitosterolu alebo stigmasterolu v koncentrovanom masle a masle sa použije metóda analýzy popísaná v prílohe IX.
4. Do koncentrovaného masla, masla a smotany boli pridané stopové látky v súlade s relevantnými pravidlami spoločenstva vtedy, ak získané výsledky sú v súlade so špecifikáciami odseku 8 príloh uvedených v odsekoch 1, 2 a 3.

Článok 10

Zisťovanie kazeínu z kravského mlieka

1. Na overenie toho, že syr, ktorý musí byť vyrobený výlučne z ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka alebo zo zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka, neobsahuje v skutočnosti aj kazeín z kravského mlieka, sa použije referenčná metóda analýzy uvedená v prílohe XV.

Prítomnosť kazeínu z kravského mlieka sa potvrdí, ak zjavný obsah kazeínu z kravského mlieka vo vzorke je rovný alebo vyšší ako obsah v referenčnej vzorke obsahujúcej 1% kravského mlieka podľa popisu v prílohe XV.

2. Na zisťovanie kazeínu z kravského mlieka v syroch podľa odseku 1 je možné použiť rutinné metódy ak:

- (a) detekčný limit je 0,5% alebo menej,
- (b) neexistujú žiadne nesprávne pozitívne výsledky,
- (c) kazeín z kravského mlieka je zistiteľný s požadovanou citlivosťou aj po dlhých dobách zretia, ku ktorým môže dôjsť pri bežných obchodných podmienkach.

Ak požiadavka uvedená pod písmenom (b) nie je splnená, akákoľvek vzorka s pozitívnym výsledkom sa musí analyzovať referenčnou metódou.

Ak požiadavka uvedená pod písmenom (c) nie je splnená pre jeden z typov syrov uvedených v odseku 1, tento syr sa musí analyzovať referenčnou metódou.

Článok 11

Zisťovanie koliforiem

1. Na zisťovanie prítomnosti koliforiem v masle, odstredenom mlieku v prášku, kazeíne a kazeinátach sa používa referenčná metóda analýzy popísaná v prílohe XVI.

2. Na zisťovanie koliforiem je možné použiť rutinné metódy ak sú získané výsledky porovnateľné s výsledkami získanými referenčnou metódou popísanou v uvedenej prílohe. Rutinné metódy musia mať najmä vhodný detekčný limit. Nesprávne negatívne výsledky sa nesmú vyskytnúť. Ak nie je možné vylúčiť výskyt nesprávnych pozitívnych výsledkov, akýkoľvek pozitívny výsledok musí byť potvrdený použitím referenčnej metódy.

Článok 12
Obsah laktózy

Metóda stanovovania obsahu laktózy vo výrobkoch spadajúcich pod CN kód 2309 je popísaná v prílohe XVII.

Článok 13
Zisťovanie syridlovej srvátky

1. Metóda na zisťovanie syridlovej srvátky v odstredenom mlieku v prášku určenom na verejné skladovanie je popísaná v prílohe XVIII.

2. Metóda na zisťovanie syridlovej srvátky v odstredenom mlieku v prášku a zmesiach určených na použitie ako krmivo pre zvieratá je popísaná v prílohe XIX.

Článok 14
Zisťovanie cmaru

Metóda na zisťovanie cmaru v odstredenom mlieku v prášku je popísaná v prílohe XX.

Článok 15
Antimikrobiotické reziduá

Metóda na zisťovanie antibiotických a sulfonamid/dapsonových reziduí v odstredenom mlieku v prášku je popísaná v prílohe XXI.

Článok 16
Obsah odstredeného mlieka v prášku

Metóda na zisťovanie odstredeného mlieka v prášku v krmných zmesiach je popísaná v prílohe XXII.

Článok 17
Zisťovanie škrobu

Metóda na zisťovanie škrobu v odstredenom mlieku v prášku, denaturovanom mliečnom prášku a krmných zmesiach je popísaná v prílohe XXIII.

Článok 18
Vlhkosť kyslého cmaru v prášku

Metóda na stanovenie vlhkosti kyslého cmaru v prášku určeného na použitie v krmných zmesiach je popísaná v prílohe XXIV.

Článok 19

Zisťovanie cudzích tukov

Metóda na zisťovanie cudzích tukov v mliečnych tukoch je popísaná v prílohe XXV.

HLAVA III

ZÁVEREČNÉ USTANOVENIA

Článok 20

Zmeny a doplnenia k nariadeniu (ES) č. 2771/1999

Nariadenie (ES) č. 2771/1999 sa mení a dopĺňa takto:

1. Prvá veta článku 4(1) sa nahrádza nasledovným: "Príslušné orgány kontrolujú kvalitu masla použitím metód popísaných v prílohe I a na základe vzoriek odobratých v súlade s pravidlami stanovenými v prílohe IV."
2. V prílohe I sa poznámka pod čiarou 2 nahrádza nasledovným: "Pozri prílohu I k nariadeniu (ES) 213/2001."
3. Prílohy II a III sa vypúšťajú.
4. V predposlednej vete prílohy IV.2 sa slová "s prílohou III" nahrádzajú slovami "s prílohou VII k nariadeniu (ES) č. 213/2001."

Článok 21

Zmeny a doplnenia k nariadeniu (ES) č. 2779/1999

Nariadenie (ES) č. 2779/1999 s dopĺňa takto:

1. Článok 20(1), (2), (3) a (4) sa nahrádza nasledovným:

"1. Obsah odstredeného mlieka v prášku v zmesiach a kŕmnych zmesiach sa stanovuje testovaním každej vzorky najmenej dvakrát použitím metódy analýzy popísanej v prílohe XXII nariadenia (ES) č. 213/2001, doplnenej kontrolami uvedenými v článku 17(3) tohto nariadenia. Ak sa vyskytne odchýlka medzi výsledkami týchto kontrol, smerodajný je výsledok kontroly na mieste.

2. Neprítomnosť syridlovej srvátky sa dokazuje použitím metód popísaných v prílohe XIX nariadenia (ES) č. 213/2000.

3. Obsah škrobu v kŕmnych zmesiach sa stanovuje kontrolami uvedenými v článku 17(3) tohto nariadenia, ktoré musia byť doplnené metódou analýzy popísanou v prílohe XXIII nariadenia (ES) č. 213/2001.

4. Vlhkosť kyslého cmaru v prášku sa stanovuje použitím metódy analýzy popísanej v prílohe XXIV nariadenia (ES) č. 213/2001."

2. Prílohy III, IV V a VI sa vypúšťajú.

Článok 22
Zrušenia

Rušia sa nariadenia (EHS) č. 1216/68, (EHS) č. 3942/92, (ES) č. 86/94, (ES) č. 2721/95, (ES) č. 1854/96, (ES) č. 1080/96, (ES) č. 1081/96, (ES) č. 1082/96, (ES) č. 880/98 a (ES) č. 1459/98.

Odkazy na zrušené nariadenia sa menia na odkazy na toto nariadenie.

Článok 23
Nadobudnutie účinnosti

Toto nariadenie nadobúda účinnosť v siedmy deň po uverejnení v Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev.

Metódy uvedené v prílohách III, IV.4, V, VI a VIII sa uplatňujú 18 mesiacov po nadobudnutí účinnosti tohto nariadenia.

Toto nariadenie je záväzné vo svojej celistvosti a je priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 9. januára 2001

Za Komisiu

Franz Fischler

člen Komisie

Príloha I
(Článok 2)

ZOZNAM REFERENČNÝCH METÓD

Index

min. = minimum, max. = maximum, príloha = príloha k citovanému nariadeniu, SNF = netučná sušina, FFA = voľné tučné kyseliny, PV = hodnota peroxidu, A = vzhľad, F = chuť, C = konzistencia, TBC = celkový počet baktérií, therm = termofilický počet baktérií, MS = členský štát, IDF = Medzinárodná federácia pre mliečne výrobky, ISO = Medzinárodná organizácia pre štandardizáciu, IUPAC = Medzinárodná únia čistej aplikovanej chémie, ADPI = Americký inštitút pre mliečne výrobky, SCM = sladené kondenzované mlieko, EMC = vyparené mlieko alebo smotana, MSNF = netučná sušina mlieka.

Časť A

Nariadenie komisie	Výrobok	Parameter	Limit	Referenčná
nariadenie (ES) č. 2771/1999 verejné skladovanie (OJ L 333, 24.12.1999, str. 11)	nesolené maslo	mliečne tuky voda SNF FFA (max.) PV (max.) koliformy nemliečny tuk sterolové stopové látky iné stopové látky - vanilín - etyl ester karotenickej kyseliny - triglyceridy enantickej kyseliny senzorické vlastnosti disperzia vody	min. 82% do 16% do 2% 1,2 mmole/ 100g tuku 0,3meq kyslíka/ 1000g tuku Nezistiteľné v 1g Nezistiteľné Trigliceridovou analýzou Nezistiteľné Nezistiteľné Nezistiteľné Nezistiteľné Najmenej 4 z 5 bodov pre A, G a C Najmenej 4 body	príloha XI príloha IX príloha X norma IDF norma IDF (anglická v príloha XV príloha XX príloha XI príloha XII príloha XII IUPAC 2,3 príloha VII norma IDF
nariadenie (ES) č. 2771/1999 súkromné skladovanie	nesolené maslo	mliečne tuky voda	min. 82% do 16%	príloha XI príloha IX
nariadenie (ES) č. 2771/1999 súkromné skladovanie	solené maslo	mliečne tuky voda soľ	min. 80% do 16% do 2%	príloha XI príloha IX norma IDF
nariadenie (ES) č. 2571/97 (OJ L 350, 20.12.1997, str. 3)	nesolené maslo	mliečne tuky voda stopové látky: - steroly - vanilín - etyl ester karotenickej kyseliny - triglyceridy enantickej kyseliny	min. 82% do 16%	príloha XI príloha IX príloha XI príloha XII príloha XII IUPAC 2,3
nariadenie (ES) č. 2571/97	solené maslo	mliečne tuky voda soľ stopové látky: - steroly - vanilín	min. 80% do 16% do 2%	príloha XI príloha IX norma IDF príloha XI príloha XII

		- etyl ester karotenickej kyseliny - triglyceridy enantickej kyseliny		príloha XII IUPAC 2,3
nariadenie (ES) č. 2571/97	koncentrované maslo	mliečne tuky vlhkosť a MSNF FFA PV (max.) nemliečny tuk chuť pach iné stopové látky: - steroly - vanilín - etyl ester karotenickej kyseliny - triglyceridy enantickej kyseliny	min. 99,8% do 0,2% do 0,35% (oleic) 0,5meq kyselíka / 1000g tuku neprítomnosť čistá bez cudzích pachov bez neutralizačných prvkov, antioxidantov a konzervačných látok	norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF norma 74A (anglická v príloha XX príloha XI príloha XII príloha XII IUPAC 2,3
nariadenie (ES) č. 2571/97	smotana	tuk stopové látky: - steroly - vanilín - etyl ester karotenickej kyseliny - triglyceridy enantickej kyseliny	35%	norma IDF metódy sch kompetenti príloha XII metódy sch kompetenti IUPAC 2,3
nariadenie (EHS) č. 429/90 (OJ L 45, 21.2.1990, str. 8)	koncentrované maslo	mliečne tuky SNF stopové látky - stigmaterol (95%) -stigmaterol (85%) - triglyceridy enantickej kyseliny - etyl ester butyrickej kyseliny a stigmaterolu - lecitín (E322) NaCl FFA PV (max.) chuť pach iné	min. 96% do 2% 15g/100kg koncentrovaného masla 17g/100kg koncentrovaného masla 1,1kg/100kg koncentrovaného masla pozri prílohu, bod 1(c) do 0,5% do 0,75% do 0,35% (oleic) do 0,5meq kyselíka / 1000g tuku	metódy sch kompetenti metódy sch kompetenti príloha XI príloha XI IUPAC 2,3 príloha XI metódy sch kompetenti norma IDF norma IDF norma IDF (anglická v
nariadenie (EHS) č. 2191/81	nesolené maslo	mliečne tuky	min. 82%	príloha XI

(OJ L 213, 1.8.1981, str. 20)		voda	do 16%	príloha IX
nariadenie (EHS) č. 2191/81	solené maslo	mliečne tuky voda soľ	min. 80% do 16% do 2%	príloha XI príloha IX norma IDF
článok 9 a hlava II nariadenia (ES) č. 1255/1999	syr vyrobený z ovčieho a/alebo kozieho mlieka	kravské mlieko	<1%	príloha XV
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha I - kyslý kazeín	voda tuk voľná kyslosť	do 12% do 1,75% do 0,3% (laktická)	norma IDF norma IDF norma IDF
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha I - syridlový kazeín	voda tuk popol	do 12% do 1% min. 7,5%	norma IDF norma IDF norma IDF
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha I - kazeináty	voda mliečny proteín tuk a popol	do 6% min. 88% do 6%	norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha II - kyslý kazeín	voda tuk voľná kyslosť TBC (max.) koliformy therm (max.)	do 10% do 1,5% do 0,2% (laktická) 30000 l/g neprítomnosť v 0,1g 5000 l/g	norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF príloha XV norma IDF
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha II - syridlový kazeín	voda tuk popol TBC (max.) koliformy therm (max.)	do 8% do 1% min. 7,5% 30000 l/g neprítomnosť v 0,1g 5000 l/g	norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF príloha XV norma IDF
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha II - kazeináty	voda mliečny proteín tuk a popol TBC (max.) koliformy therm (max.)	do 6% min. 88% do 6% 30000 l/g neprítomnosť v 0,1g 5000 l/g	norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF príloha XV norma IDF
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha III - kazeináty	voda mliečny proteín tuk laktóza popol TBC (max.) koliformy therm (max.)	do 6% min. 85% do 1,5% do 1% do 6,5% 30000 l/g neprítomnosť v 0,1g 5000 l/g	norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF 90:1979 norma IDF príloha XV norma IDF
nariadenie (ES) č. 2799/1999 (OJ L 340, 31.12.1999, str. 3)	kŕmne zmesi a odstredené mlieko v prášku (SMP) (pre použitie v krmive pre zvieratá)	voda (kyslý cmar v prášku) proteín voda (SMP) tuky (SMP) syridlová srvátka (SMP) škrob (SMP) voda (zmesi) tuky (zmesi)	do 5% 31,4% (min.) netučnej sušiny do 5% do 11% neprítomnosť neprítomnosť do 5% netučnej sušiny -	norma IDF norma IDF norma IDF príloha XI príloha XX norma IDF direktíva k (OJ L 15, 1

		syridlová srvátka (zmesi obsah SMP (konečného výrobku) tuky (v konečnom výrobku) škrob (v konečnom výrobku) meď (v konečnom výrobku)	neprítomnosť min. 50% min. 2,5% alebo 5% min. 2% 25ppm	príloha XI príloha XX smernica k príloha XX smernica k (OJ L 206,
nariadenie (ES) č. 322/96 (OJ L 45, 23.2.1996, str. 5)	SMP (sprej)	tuk proteín voda kyslosť (N/10 NaOH) laktáty fosfát rozpustnosť spálené čiastočky TBC koliformy cmar syridlová srvátka kyslá srvátka antimikrobiálne činidlá	do 1% 31,4% (min.) netučnej sušiny do 3,5% do 19,5ml do 150mg/100g negatívny do 0,5ml pri 24°C disk B min. (15mg) 40000/1g negatívne/0,1g negatívny negatívna negatívna	norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF norma IDF norma ISO norma IDF ADPI:199C norma IDF príloha XV príloha XX príloha XV metódy sch kompetenti príloha XX

Poznámka prekl.: symbolom "..." sú označené zložité rovnice.

Príloha II
(Článok 3)

KONTROLA VÝSLEDKOV ZÍSKANÝCH RUTINNÝMI METÓDAMI, KTORÉ SÚ BLÍZKO
LIMITOM ŠPECIFIKOVANÝM V NARIADENIACH PRE POŽIADAVKY NA ZLOŽENIE A
KVALITU

Ak m_0 je limitom pre požiadavky na zloženie a kvalitu špecifikované v nariadení, rozhodujúci limit (L) je

$$L = m_0$$

ak $R_{Rout}/R_{Ref} > 1$

R_{Rout} : limit reprodukovateľnosti rutinnej metódy

R_{Ref} : limit reprodukovateľnosti referenčnej metódy

Ak m_0 je horný limit a $R_{Rout} / R_{Ref} > 1$, tento rozhodujúci limit sa získa použitím vzorca

$$L = m_0 - [(R_{Rout} / R_{Ref}) - 1] \cdot CrD95$$

Ak za rovnakých podmienok je m_0 spodný limit, tento rozhodujúci limit sa získa použitím vzorca

$$L = m_0 + [(R_{Rout} / R_{Ref}) - 1] \cdot CrD95$$

pričom CrD95 je kritická odchýlka referenčnej metódy (pozri prílohu IV)

Ak m_0 je horný limit, konečný výsledok nad rozhodujúcim limitom získaný použitím rutinnej metódy sa musí nahradiť konečným výsledkom získaným použitím referenčnej metódy. Tento konečný výsledok musí byť založený najmenej na rovnakom počte analýz/vzoriek ako konečný výsledok získaný rutinnou metódou.

Ak m_0 je spodný limit, rovnaký postup sa musí použiť pre konečný výsledok pod rozhodujúcim limitom získaný použitím rutinnej metódy

Poznámka

Postup popísaný vyššie je možné použiť ak neexistujú žiadne zistiteľné matricové efekty.

Matricové efekty sa dajú zistiť nasledovným spôsobom: pre každú vzorku používanú na kalibráciu sa stanoví rozdiel (w_i) medzi výsledkami získanými referenčnou metódou a výsledkami získanými rutinnou metódou.

Štandardná odchýlka sa počíta zo vzorca

$$s = \dots$$

m: počet vzoriek použitých na kalibráciu

sa porovná s aritmetickým priemerom štandardnej odchýlky opakovateľnosti referenčnej a rutinej metódy.

$S_r = \dots$

Matricový efekt nie je možné vylúčiť, ak

...

pričom

$f = m$ (f: počet stupňov voľnosti)

alfa = pravdepodobnosť omylu; alfa = 0,05.

V tomto prípade sú pred stanovením rozhodujúceho limitu potrebné ďalšie merania.

Príloha III
(Články 4 a 5)

(a) Postup na stanovenie zhody s bežným limitom reprodukovateľnosti (Chemická analýza)

Zhoda s limitom reprodukovateľnosti sa kontroluje porovnaním laboratórných výsledkov s výsledkami skúseného laboratória¹, získanými z rovnakej vzorky. V oboch laboratóriách sa vykoná dvojité meranie a výsledky sa hodnotia použitím vzorca:

...

pričom:

CrD95: kritická odchýlka (P=0,95)

y_1 s čiarou: aritmetický priemer dvoch výsledkov získaných v laboratóriu 1

y_2 s čiarou: aritmetický priemer dvoch výsledkov získaných v laboratóriu 2

R: limit reprodukovateľnosti: stanovuje sa interpoláciou

r: limit opakovateľnosti: ak sa presnosť mení podľa úrovne.

Ak je prekročená kritická odchýlka, do dvoch mesiacov je potrebné vykonať ďalší pokus. Ak výsledky druhého pokusu nespĺňajú limit reprodukovateľnosti, musia kompetentné orgány vykonať príslušné kroky.

(b) Postup na získanie dočasného limitu reprodukovateľnosti (Chemická analýza)

Dočasný limit reprodukovateľnosti (R_{prov}) sa získava použitím nasledovného vzorca:

...

pričom

y_1 s čiarou: priemer dvoch výsledkov získaných v laboratóriu 1

y_2 s čiarou: priemer dvoch výsledkov získaných v laboratóriu 2 (pozri prílohu IIIa)

r. limit opakovateľnosti alebo dočasný limit opakovateľnosti.

Poznámky:

1. R_{prov} sa môže použiť na výpočet kritických odchýlok (pozri prílohu VI)
2. R_{prov} sa rovná $2r$ ak je vypočítaná hodnota R_{prov} menšia ako $2r$.
3. Ak je vypočítaná hodnota väčšia ako $3r$ alebo väčšia ako dvojnásobok hodnoty R predpovedanej z Horwitzovej rovnice*, potom je hodnota R_{prov} neprijateľne vysoká a nemôže sa použiť na výpočet kritickej odchýlky.

¹ Skúsené laboratórium je vo všeobecnosti také laboratórium, ktoré sa úspešne podieľalo buď na potvrdení testovacej metódy alebo na teste dokonalosti.

* Horwitzova rovnica:

...

pričom:

RSD R: relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti

c: koncentrácia vyjadrená ako desiatkový zlomok (príklad: 10g/100g = 0,1)

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

4. R_{prov} je potrebné stanoviť minimálne jedenkrát za rok na základe výsledkov získaných v dvoch laboratóriách (pozri prílohu IV)
5. Na výpočet kritických odchýliek sa musí použiť stredná hodnota R_{prov} . Pravidlá v bodoch 2 a 3 platia pre strednú hodnotu R_{prov} .

Limit reprodukovateľnosti (hodnota R) sa získa z vypočítanej hodnoty RSD R nasledovne

$R = \dots$

x s čiarou: aritmetický priemer získaných výsledkov

Niekoľko vypočítaných hodnôt RSD R (príklady)

koncentrácia	RSD R (%)
1g/100g	4
0,01g/100g	8
1 mg/1000g	16

Koncentrácia analytu 1g/100g získa

$$R = 0,0283 \cdot 1 \cdot 4 = 0,11 \text{ g/100 g}$$

HODNOTENIE VÝSLEDKOV ANALÝZY ZÍSKANÝCH POTVRDENÝMI METÓDAMI

Ak výsledok analýzy ukazuje, že bol prekročený limit, vypočíta sa aritmetický priemer dvoch alebo viacerých výsledkov. Sleduje sa pritom nasledovný postup:

1. V prípadoch, kedy výsledok analýzy predstavuje jediný výsledok, je potrebné uskutočniť druhú analýzu v podmienkach opakovateľnosti. Ak nie je obe analýzy možné vykonať v podmienkach opakovateľnosti, je potrebné vykonať ďalšiu duplicitnú analýzu v podmienkach opakovateľnosti a použiť tieto výsledky na hodnotenie zhody kritickej odchýlky.

2. Stanoví sa absolútna hodnota rozdielu medzi aritmetickým priemerom výsledkov získaných v podmienkach opakovateľnosti a limitom. Absolútna hodnota rozdielu väčšia ako kritická odchýlka znamená, že analyzovaná vzorka nespĺňa požiadavky.

Kritická odchýlka sa stanovuje použitím nasledovného vzorca:

...

pričom:

y s čiarou: aritmetický priemer získaných výsledkov

m_0 : limit

n: počet analýz/vzoriek

Ak sa presnosť mení podľa úrovne, je možno potrebné interpoláciou stanoviť r a R.

Konečný výsledok zaznamenaný pre vzorku musí ukazovať zhodu s limitom.

Konečné výsledky

- v rozpätí m_0 a ... ak je limitom maximum;
- v rozpätí m_0 a ..., ak je limitom minimum

by sa preto mali vyskytovať len výnimočne.

Konečné výsledky v rámci uvedených rozpätí sú akceptovateľné len ak sa vyskytnú najviac jedenkrát na každých päť vzoriek analyzovaných na jednu dodávku. Ak sa na jednu dodávku analyzuje menej ako päť vzoriek, akceptovateľný je jeden výsledok v rámci uvedeného rozpätia.

3. Ak sa konečný výsledok x vypočítava použitím vzorca $x = y_1 \pm y_2$ (príklad: voda + obsah beztukovej sušiny v masle na výpočet obsahu tuku) pričom y_1 a y_2 sú konečnými výsledkami jedného typu analýzy, potom sa celkové limity opakovateľnosti a reprodukovateľnosti r_x a R_x konečných výsledkov x vypočítajú:

$r_x = \dots$

$R_x = \dots$

pričom r_1 a r_2 sú limity opakovateľnosti a R_1 a R_2 sú limity reprodukovateľnosti pre y_1 a y_2 .

x sa porovnáva s limitom m_0 podľa pravidiel špecifikovaných v bodoch 1 a 2. Kritická odchýlka sa stanoví použitím vzorca:

...

pričom x je aritmetický priemer získaných výsledkov x_1 .

4. Ak sa konečný výsledok vypočíta použitím vzorca

$$x = y_1 / y_2$$

(príklad: tuk v sušine syra)

pričom y_1 a y_2 sú konečné výsledky jedného typu analýzy, potom sa celkové limity opakovateľnosti a reprodukovateľnosti r_x a R_x môžu vypočítať takto:

$$r_x = \dots$$

$$R_x = \dots$$

$$\mu_x = \dots$$

μ_1 : limit cieľovej hodnoty pre y_1 (príklad: tuk)

μ_2 : limit cieľovej hodnoty pre y_2 (príklad: sušina)

$$r_{*1} = \dots$$

$$r_{*2} = \dots$$

pričom

r_1 : limit opakovateľnosti y_1

r_2 : limit opakovateľnosti y_2

$$R_{*1} = \dots$$

$$R_{*2} = \dots$$

pričom:

R_1 : limit reprodukovateľnosti y_1

R_2 : limit reprodukovateľnosti y_2

Postupy pre výpočet r_x a R_x sú použiteľné len ak sú relatívne limity opakovateľnosti a reprodukovateľnosti (r_{*1} , r_{*2} , R_{*1} , R_{*2}) menšie alebo rovné 0,15.

x sa porovnáva s limitom μ_2 podľa pravidiel špecifikovaných v bodoch 1 a 2. Kritická odchýlka sa určí použitím vzorca:

...

pričom x s čiarou je aritmetický priemer výsledkov x získaných v chronologickom poradí.*

* Poznámka: Ak sa napríklad získajú výsledky y_{11} , y_{12} , y_{21} a y_{22} , musí sa vypočítať aritmetický priemer y_{11}/y_{21} a y_{12}/y_{22} .

INTERNÁ KONTROLA (Článok 5)

(a) Postup internej kontroly kvality (Internal Quality Control - IQC) (chemická analýza)

Definícia kontrolného materiálu

Materiál používaný pre účely IQC je podrobený rovnakému, alebo súčasťou rovnakého postupu ako testované materiály.

Kontrolným materiálom môže byť:

- certifikovaný referenčný materiál,
- interný referenčný materiál,
- materiál overený medzilaboratórnym testom,
- spevnený materiál.

Postup stanovenia IQC

Laboratórium zavedie IQC podľa postupu popísaného v dokumente IUPAC "Harmonizované postupy pre internú kontrolu kvality v analytických laboratóriách".¹

IQC obsahuje zahrnutie kontrolných materiálov do analytického postupu alebo opakovanie analýzy testovacej vzorky. Kontrolné materiály musia byť svojim chemickým zložením podobné testovacím vzorkám a musia byť adekvátne stabilné počas obdobia testovania. Musí byť preukázané, že pre analýzu môžu byť vhodne rozdelené na rovnaké časti a že sú v koncentrácii analytu vhodnej pre účely testovania.

Kontrolný materiál musí byť vložený minimálne jedenkrát v každom kole analýzy a získaná hodnota musí byť vyznačená do kontrolného diagramu na meranie dlhodobých chýb. Laboratórium ďalej pravidelne preukazuje súlad s podmienkami opakovateľnosti v rámci kola. Toto je možné dosiahnuť dvojitou analýzou kontrolných a/alebo testovacích materiálov. Výsledky týchto analýz sa porovnávajú s akýmkoľvek publikovanými limitmi opakovateľnosti a existujúcimi údajmi o internej presnosti.

Ak sa používajú kontrolné materiály, hodnoty získané z medzikolovej analýzy kontrolného materiálu musia byť vyznačené do Shewartovho diagramu (ISO 8258(1991)) s príslušnými kontrolnými limitmi. Akčné limity musia byť stanovené na

$$x \pm 3s_t$$

kde s_t je celková štandardná odchýlka

varovné limity na

$$x \pm 2s_t$$

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

Celková štandardná odchýlka:

$s_t = \dots$

pričom:

s_b : štandardná odchýlka medzi kolami
 s_w : štandardná odchýlka v rámci kola analýzy
 n : počet určovaní

V prípadoch, kedy sa kontrolné materiály nepoužívajú (napr. kvôli nedostatočnej stabilite), sa musí analyzovať najmenej jeden z testovacích materiálov dvakrát v každom kole.

Absolútna odchýlka získaná z dvojitej analýzy v jednom kole (pozri prílohu III) musí byť vyznačená do diagramu. Stredná čiara je $1,128s_w$, spodný limit je 0, horný limit (akčný limit) je $3,686s_w$, pričom s_w je štandardná odchýlka v rámci kola analýzy.

Ak je rozpätie koncentrácie veľké, mal by kontrolný postup zahŕňať materiály s nízkymi a vysokými hodnotami.

Ak testovací materiál pokrýva široký rozsah koncentrácií analytu, laboratórium určí vzťah medzi presnosťou a úrovňou. Ak je presnosť priamo úmerná úrovni, následná kontrola by mala byť založená na relatívnej presnosti (t.j. absolútny rozdiel ako percento strednej hodnoty).

Nesprávne podmienky analytického systému vzniknú, ak sa vyskytne jedna z nasledovných možností:

- A. súčasná vyznačená hodnota je mimo akčných limitov,
- B. súčasná hodnota a predchádzajúca hodnota sú mimo varovných limitov, ale v rámci akčných limitov,
- C. pri použití kontrolných materiálov deväť hodnôt po sebe je na rovnakej strane strednej čiary.

Laboratórium musí na nesprávne podmienky zareagovať nasledovne:

- A. zastavením analýzy vykonávaných diagnostických testov a nápravné kroky, a
- B. odmietnutím kola výsledkov a opätovnou analýzou testovacích materiálov.

(b) Postup výberu interného kontrolného materiálu a stanovenia interných limitov presnosti (chemická analýza)

Údaje o presnosti v laboratóriu je možné získať opätovnou analýzou kontrolných materiálov a/alebo opätovnou analýzou testovacích vzoriek.

Laboratóriá by mali na stanovenie parametrov presnosti pre variáciu v rámci a mimo kola pre následné použitie pri zostavovaní kontrolných diagramov používať nasledovný postup. Laboratória tiež môžu používať alternatívne postupy za podmienky, že môžu náležite preukázať odvodenie spoľahlivých údajoch o presnosti.

1. Výber kontrolných materiálov

Ak je pre laboratórium vhodné použitie kontrolného materiálu, je nutné najprv získať údaje za účelom stanovenia limitov. Ak je to možné, používajú sa certifikované referenčné materiály (certified reference materials - CRMs). Vybrané kontrolné materiály sa analyzujú v podmienkach opakovateľnosti v rámci kola vrátane vhodných CRMov s opakovaním a náhodne. Ak použitie tohto prístupu nie je možné, laboratóriá sa zúčastnia testovania dokonalosti a určia konsenzuálne stredné hodnoty (pridelené hodnoty), ktoré sa považujú za konvenčnú strednú hodnotu, s ktorou sa spája rozumná neistota. Iné postupy zahŕňajú pridelenie pravdivej hodnoty formuláciou alebo použitím posilnených kontrolných materiálov.

Ak ďalej laboratórium pravidelne vykonáva tento typ analýzy a už má zavedenú štatistickú kontrolu, akékoľvek nové kontrolné materiály (napr. požadované kvôli nedostatku zásob) musia byť získané s odkazom na analýzy, ktoré sú kontrolované za použitia existujúcich materiálov.

2. Pridelenie limitov

Po výbere kontrolného materiálu ho laboratórium použije na stanovenie hodnôt presnosti v rámci kola a medzi kolami.

Minimálnou požiadavkou na stanovenie presnosti v rámci kola je dvojitá analýza kontrolného materiálu minimálne 12 krát. Dvojitá analýza sa vykonáva v podmienkach opakovateľnosti, t.j. s rovnakým operátorom, rovnakými reagentmi atď. Dvojitá kontrola kontrolného materiálu sa robí náhodne v rámci kola analýzy. Každá dvojitá analýza sa vykonáva v iný deň počas určitého obdobia na dosiahnutie rozumnej variácie medzi kolami pri zohľadnení normálnych variácií, napr. reagentov, rekalibrácie nástrojov a ak je to možné aj rôznych analytikov.

Poznámka: Použitie údajov o variáciách medzi kolami, ktoré nie sú úplne reprezentatívne môže viesť k nepotrebnéj replikácii analýzy kvôli príliš tesne stanoveným limitom. Laboratórium prezentujúce údaje o presnosti, ktoré sú príliš nepresné, môže takto nevyhovieť predpísaným limitom pre referenčné metódy, očakávať slabé výkony pri porovnaní s inými laboratóriami a nemusí poskytovať údaje vhodné na daný účel.

2.1. Stanovenie presnosti v rámci kola

2.1.1. Presnosť v rámci kola ak je kontrolný materiál dostupný

Dvojité údaje (minimálne 12 duplikátov) sa najprv podrobia Cochranovmu testu maximálnej variancie. Tento zahŕňa porovnanie štvorca maximálneho rozsahu duplikátov so súčtom štvorcov rozsahov.

$c = \dots$

pričom

$d_1 =$ rozdiel medzi duplikátmi.

Hodnota Cochranovho kritéria C sa porovná s tabuľkovou hodnotou (ISO 5725 (1994)). Ak hodnota vybočuje z uvedeného rámca, výsledok je potrebné preskúmať a vysvetliť, napr. či nešlo o technickú chybu, chybu vo výpočte alebo pri uskutočnení testu, analýzu nesprávnej vzorky, a pod. Ak je vysvetlenie technickej chyby také, že vylučuje nahradenie pochybného výsledku, výsledok je nutné vyradiť. Ak zostávajú nesprávne hodnoty, ktoré nie je možné vysvetliť, tieto sa ponechajú ako správne a vylúčia sa štatistické odchýlky. Laboratórium potom získa náhradné hodnoty.

Ak je laboratórium spokojné so správnosťou údajov, štandardná odchýlka v rámci kola s_w sa získa nasledovne:

pre každý pár x_{i1} , x_{i2} duplicitných údajov p sa vypočíta suma duplikátov

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

a rozdiel medzi duplikátmi

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

a zráta sa

$$A = \dots$$

$$B = \dots$$

$$C = \dots$$

Odhad štandardnej odchýlky v rámci kola je

$$s_w = \dots$$

Interný limit presnosti je $2,8 s_w$.

Ak sa používa referenčná metóda, interný limit presnosti sa porovnáva s publikovaným limitom opakovateľnosti. Laboratórium musí spĺňať požiadavky referenčnej metódy. Nesplnenie tejto požiadavky je nutné prešetriť.

Stanovené limity sa považujú za provizórne a je potrebné ich prehodnotiť.

2.1.2. Presnosť v rámci kola ak kontrolný materiál nie je k dispozícii

Laboratórium môže zvoliť stanovenie presnosti v rámci kola dvojitou analýzou reprezentatívnych testovacích vzoriek (najmenej 12 dvojitých analýz). V prípadoch, kedy nie je možné použitie kontrolných materiálov, napr. kvôli nestabilite, je nutné duplicitné údaje zhromaždiť touto metódou.

Poznámka: Predpokladá sa, že analýzy pokrývajú relatívne úzke rozpätie hodnôt a preto je možné jednu hodnotu aplikovať na všetky vzorky. V prípadoch, kedy je rozpätie výsledkov väčšie a presnosť závisí od úrovne, by laboratória mali preveriť použitie relatívnych štandardných odchýlok.

Údaje sa podrobia Cochranovmu testu ako v bode 2.1.1. Ak je laboratórium spokojné so správnosťou údajov, štandardná odchýlka v rámci kola a interný limit presnosti sa získajú postupom uvedeným v časti 2.1.1.

Štandardná odchýlka v rámci kola s_w sa môže tiež použiť na zostavenie kontrolných diagramov (pozri prílohu II). Stanovené limity sa považujú za provizórne a je potrebné ich prehodnotiť.

2.2. Stanovenie presnosti medzi kolami

Vypočítajte priemernú hodnotu ($s_1/2$) pre každý pár a podrobte ich Grubbsovmu testu (ISO 5725 (1994)). Kritéria odmietnutia/akceptovania pre hodnoty vybočujúce z rámca sú popísané v časti 2.1.1. Laboratórium musí za každú odmietnutú hodnotu získať náhradnú hodnotu. Ak je laboratórium spokojné so správnosťou údajov, štandardná odchýlka medzi kolami s_b sa získa nasledovne:

$$s_b = \dots$$

alebo 0 ak je výraz pod odmocninou záporný.

Celková štandardná odchýlka s_t sa používa na vypracovanie kontrolných diagramov pre priemer n pokusov (pozri prílohu II). Stanovené limity sa považujú za provizórne a je potrebné ich prehodnotiť.

3. Kontrola počiatkových limitov

Kontrolné limity stanovené podľa uvedených postupov sa považujú za počiatkové odhady.

Za účelom aktualizácie limitov stanovených na základe akceptovateľnej presnosti v rámci kola (časť 2.1.2.) sa zozbierajú ďalšie duplicitné údaje o testovacích vzorkách. Interval pred prehodnotením závisí od frekvencie analýzy. Údaje by sa mali prehodnotiť po získaní ďalších 10 duplikátov. Všetky údaje sa potom podrobia Cochranovmu testu a limity sa upravujú na základe novej hodnoty štandardnej odchýlky. Ďalšie rozhodnutia o platnosti kontrolných limitov sa musia uskutočniť vo svetle nových údajov.

Prehodnotenie počiatkových údajov získaných pre presnosť medzi kolami tiež závisí od frekvencie analýzy. Po získaní desiatich bodových údajov z analýzy kontrolného materiálu pri frekvencii jednej analýzy na dodávku by sa počiatkový predpoklad uskutočnený o štandardnej odchýlke a strednej hodnote mal prehodnotiť.

Všetky údaje sa podrobia Grubbsovmu testu na zistenie údajov vybočujúcich z rámca. Stredná hodnota a štandardná odchýlka sa prepočítajú na základe nových údajov.

Okrem tohto kroku laboratórium použije Cusumov diagram (BS S700: (1984) a dodatok 5480 (1987) na preverenie akýchkoľvek problémov, ktoré môžu byť spojené s napr. starnutím reagentov. Akýkoľvek výsledok spadajúci mimo Cusumovej "V mask" limitov musí byť preverený.

Nové limity (stredná hodnota a štandardná odchýlka) musia byť podrobené pravidelnej kontrole použitím Cusumovho postupu. Akýkoľvek náznak, že platnosť kontrolného materiálu je spochybnená, sa musí podrobne preskúmať.

4. Oznamovanie údajov o presnosti

Laboratóriá musia zaslať príslušnému štátnemu orgánu nasledovné informácie:

- použitá metóda,
- štandardná odchýlka v rámci kola s_w a interný limit presnosti,
- štandardná odchýlka medzi kolami s_b ,
- celková štandardná odchýlka s_1 ,
- počet analýz zahrnutých pri získavaní údajov o presnosti.

(Článok 6)

HODNOTENIE EXPERTOV A SPOĽAHLIVOSŤ VÝSLEDKOV SENZORICKEJ ANALÝZY

Pri použití bodovacích metód (norma IDF 99C:1997) sa používajú nasledovné postupy.

(a) Stanovenie "indexu opakovateľnosti"

Expert v období 12 mesiacov analyzuje najmenej desať vzoriek ako slepé duplikáty. Toto sa zvyčajne uskutočňuje počas viacerých stretnutí. Výsledky pre jednotlivé vlastnosti výrobku sa hodnotia použitím nasledovného vzorca:

$$w_1 = \dots$$

pričom:

w_1 : index opakovateľnosti

x_{i1} : body pre prvé hodnotenie vzorky x_i

x_{i2} : body pre druhé hodnotenie vzorky x_i

n : počet vzoriek.

Vzorky určené na hodnotenie by mali odrážať široké rozpätie kvality. w_1 by nemalo prekročiť hodnotu 1,5 (5 bodové stupnice).

(b) Stanovenie "indexu odchýlok"

Tento index sa používa na kontrolu, či expert používa rovnakú stupnicu pre hodnotenie kvality ako skúsená skupina expertov. Body získané expertom sa porovnávajú s priemerom bodov získaných skupinou expertov.

Na hodnotenie výsledkov sa používa nasledovný vzorec:

$$D_1 = \dots$$

pričom:

x_{i1} , x_{i2} : pozri časť (a)

\bar{x}_{i1} s čiarou, \bar{x}_{i2} s čiarou. priemer bodov skupiny expertov pre prvé a druhé hodnotenie vzorky x_i

n : počet vzoriek (najmenej desať za 12 mesiacov).

Vzorky určené na hodnotenie by mali odrážať široké rozpätie kvality. D_1 by nemalo prekročiť hodnotu 1,5 (5 bodové stupnice).

Členské štáty musia oznámiť akékoľvek ťažkosti spojené s aplikovaním tohto postupu.

(c) Porovnanie výsledkov získaných v rôznych regiónoch členského štátu a v rôznych členských štátoch

Ak je to vhodné, najmenej jedenkrát za rok je potrebné uskutočniť test na porovnanie výsledkov získaných expertmi z rôznych regiónov. Ak sú pozorované významné odchýlky, je potrebné vykonať potrebné kroky na identifikovanie dôvodov a dosiahnuť porovnateľné výsledky.

Členské štáty môžu uskutočniť testy na porovnanie výsledkov získaných ich vlastnými expertmi a expertmi zo susedných členských štátov. Významné odchýlky by mali viesť k podrobnému prešetreniu s cieľom dosiahnutia porovnateľných výsledkov.

Členské štáty o výsledkoch týchto porovnaní informujú komisiu.

Príloha VII
(Článok 6)

SENZORICKÉ HODNOTENIE MASLA

1. Rozsah

Účelom tohto postupu pre senzorické hodnotenie masla je stanovenie jednotnej metódy aplikovateľnej vo všetkých členských štátoch.

2. Definície

Senzorické hodnotenie znamená skúmanie atribútov výrobku zmyslovými orgánmi.

Panel znamená skupinu vybraných expertov pracujúcich počas hodnotenia bez vzájomnej komunikácie a bez vzájomného ovplyvňovania.

Bodovanie znamená senzorické hodnotenie panelom, za použitia bodovej stupnice. Musí sa použiť nomenklatúra kazov.

Známkovanie znamená klasifikáciu kvality, ktorá sa vykonáva na základe bodovania.

Kontrolné dokumenty: dokumenty používané na zaznamenanie jednotlivých počtov bodov pre každú vlastnosť a konečnú známku produktu. (Tento dokument sa tiež môže použiť na zaznamenanie chemického zloženia.)

3. Testovacia miestnosť

3.1. Je potrebné vykonať príslušné kroky na to, aby experti neboli v testovacej miestnosti rušení vonkajšími faktormi.

3.2. Testovacia miestnosť nesmie obsahovať žiadne cudzie pachy a musí sa dať ľahko čistiť. Steny musia mať svetlú farbu.

3.3. Testovacia miestnosť a jej osvetlenie musia byť také, aby neboli ovplyvnené vlastnosti výrobkov určených na bodovanie. Miestnosť musí mať vhodné zariadenie na kontrolu teploty.

4. Výber expertov

Expert musí poznať maslové výrobky a musí byť kompetentný na vykonanie senzorického známkovania. Jeho kompetentnosť pravidelne (najmenej jedenkrát za rok) hodnotí príslušný orgán.

5. Požiadavky na panel

Počet expertov v paneli by mal byť nepárny, najmenej traja. Väčšina musia byť zamestnanci príslušného orgánu alebo oprávnené osoby, ktoré nie sú zamestnané v mliekárenskom priemysle.

Pred hodnotením je potrebné zohľadniť nasledovné faktory za účelom dosiahnutia optimálnych výkonov subjektov

- experti nesmú trpieť chorobou, ktorá by mohla ovplyvniť ich výkon. V takom prípade sa daný expert v paneli nahradí iným.
- experti sa musia dostaviť načas aby sa zúčastnili hodnotenia a zabezpečiť dostatok času na vykonanie hodnotenia
- experti nesmú používať látky so silnou arómou, ako napríklad parfém, vodu po holení, dezodorant, atď. a mali by sa vyhýbať jedlám so silnou chuťou (napr. korenené jedlá), atď.
- experti nesmú počas pol hodiny pred hodnotením fajčiť, jesť alebo piť nič okrem vody.

6. Určovanie hodnoty každej charakteristiky

6.1. Sensorické hodnotenie sa vykonáva vo vzťahu k nasledovným trom charakteristikám: vzhľad, konzistencia a chuť.

Vzhľad zahŕňa nasledovné tri vlastnosti: farba, viditeľná čistota, rast plesní a disperzia vody. Disperzia vody sa testuje podľa normy IDF 112A:1989.

Konzistencia zahŕňa nasledovné vlastnosti: stálosť a roztierateľnosť.

Na hodnotenie konzistencie masla sa môžu použiť fyzikálne metódy. Komisia predpokladá budúcu harmonizáciu týchto metód.

Chuť a vôňa zahŕňa nasledovné vlastnosti: chuť a vôňa.

Významná odchýlka od odporúčenej teploty znemožňuje spoľahlivé hodnotenie konzistencie a chuti. Teplota má veľký význam.

6.2. Každá charakteristika sa musí sensoricky hodnotiť osobitne. Bodovanie sa uskutočňuje podľa tabuľky 1.

6.3. Môže byť žiadúce, aby za účelom dosiahnutia jednotnosti experti spoločne bodovali pred začatím hodnotenia vzhľad, konzistenciu a chuť na jednej alebo viac referenčných vzorkách.

6.4. Bodovanie na prijateľnosť je nasledovné

	maximum	požadované
vzhľad	5	4
konzistencia	5	4
chuť	5	4

Ak sa nedosiahnu požadované body, je nutné poskytnúť popis kazu. Body poskytnuté každým expertom pre každú charakteristiku musia byť zaznamenané v kontrolnom dokumente. Výrobok sa akceptuje alebo odmieta na základe väčšinového rozhodnutia. Prípady, kedy rozdiely medzi jednotlivými bodovaniami pre každý atribút sú väčšie ako susedné body by sa nemali vyskytnúť často (nie viackrát ako jedenkrát na 20 vzoriek). V opačnom prípade vedúci panelu skontroluje kompetentnosť panelu.

7. Dozor

Za celý proces je zodpovedný vedúci panelu, ktorý musí byť oficiálnym zamestnancom príslušného orgánu a môže byť členom panelu. Musí zaznamenávať jednotlivé bodovania pre každú charakteristiku do kontrolného dokumentu a potvrdzovať, či výrobok je akceptovaný alebo odmietnutý.

8. Výber a príprava vzorky

8.1. Je žiadúce, aby bola počas hodnotenia identita vzoriek utajená, aby sa tým predišlo možnej predpojatosti.

Tento krok vykoná vedúci panelu pred hodnotením bez prítomnosti ostatných členov panelu.

8.2. Ak sa senzorické hodnotenie vykonáva v studenom sklade, vzorka sa odoberie skúšačom masla. Ak sa senzorické hodnotenie vykonáva na inom mieste ako v studenom sklade, odoberie sa najmenej 500g vzorka.

8.3. Počas hodnotenia má maslo mať teplotu 10 až 12°C. Veľkým odchýlkam je potrebné sa za každú cenu vyhnúť.

9. Nomenklatúra

Pozri priloženú tabuľku 2.

Tabuľka 1: Bodovanie masla

		Vzhľad				Konzistencia				Chuť a aróma	
body	č. ¹	poznámky	body/ trieda kvality	č.1 6	poznámky	body/ trieda kvality	č.16	poznámky			
5		<i>veľmi dobrý</i> ideálny typ najvyššia kvalita (rovnomerne suché)	5		<i>veľmi dobrá</i> ideálny typ najvyššia kvalita (dobro roztierateľné)			<i>veľmi dobré</i> ideálny typ najvyššia kvalita (absolútne čistá najlepšia vôňa)			
4		<i>dobrý</i> ² bez viditeľných kazov	4	17 18	<i>dobrá</i> ¹⁷ tvrdé mäkké	4		<i>dobrá</i> ¹⁷ bez viditeľných kazov			
3		<i>primeraný</i> (mierne kazy) 1 voľná vlhkosť 2 nejednotné, dvojfarebné 3 prúžkované 4 škvrnité, mramorované 5 ťakaté 6 separácia oleja 7 príliš farebný 8 slabý, otvorený povrch	3	14 15 16 17 18	<i>primeraná</i> (mierne kazy) 14 krátke, krehké, drobivé 15 pastovité, cestovité, mastné 16 lepkavé 17 tvrdé 18 mäkké	3	21 22 25 27 33 34 35	<i>dobré</i> (mierne kazy) 21 nejasné 22 cudzia príchuť 25 kyslé 27 pečená chuť, škrobovitá chuť 33 chuť po krmive 34 surové, horké 35 presolené			
2		<i>zlý (zreteľné kazy)</i> 1 voľná vlhkosť 3 prúžkované 4 škvrnité, mramorované 5 ťakaté 6 separácia oleja 10 cudzie látky 11 plesnivé 12 nerozpustená soľ	2	14 15 16 17 18	<i>zlý (zreteľné kazy)</i> 14 krátke, krehké, drobivé 15 pastovité, cestovité, mastné 16 lepkavé 17 tvrdé 18 mäkké	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	<i>zlý (zreteľné kazy)</i> 21 nečisté 22 cudzia príchuť 23 zatuchnuté 25 kyslé 32 oxidovaná príchuť, kovová príchuť 33 chuť po krmive 34 surové, horké 35 presolené 36 plesnivé, zhnité 38 chemická príchuť			
1		<i>veľmi zlé (výrazné kazy)</i> 1 voľná vlhkosť 3 prúžkované 4 škvrnité, mramorované 5 ťakaté 6 separácia oleja 7 príliš farebné 9 granulovité 10 cudzie látky 11 plesnivé 12 nerozpustená soľ	1	14 15 16 17 18	<i>veľmi zlé (výrazné kazy)</i> 14 krátke, krehké, drobivé 15 pastovité, cestovité, mastné 16 lepkavé 17 tvrdé 18 mäkké	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	<i>veľmi zlé (výrazné kazy)</i> 22 cudzia príchuť 24 syrová, mliečna príchuť 25 kyslé 26 droždiovité 28 plesnivá chuť 29 zhnité 30 olejnaté, rybnaté 31 lojovité 32 oxidovaná príchuť, kovová príchuť 34 surové, horké 36 plesnivé, zhnité 37 sladovité 38 chemická príchuť			

¹ Tabuľka 2.² Kazy uvedené v kategórii "dobrý" sú veľmi malými odchýlkami od ideálneho typu.

Tabuľka 2: Tabuľka kazov masla

I. Vzhľad

1. voľná vlhkosť
2. nejednotné, dvojfarebné
3. prúžkované
4. škvrnité, mramorované
5. fľakaté
6. separácia oleja
7. príliš farebné
8. slabý, (otvorená textúra)
9. granulovité
10. cudzie látky
11. plesnivé
12. nerozpustená soľ

II. Konzistencia

14. krátke, krehké, drobivé
15. pastovité, cestovité, mastné
16. lepkavé
17. tvrdé
18. mäkké

III. Chuť a aróma

20. bez chuti
21. nečisté¹
22. cudzia príchuť
23. zatuchnuté
24. syrová, mliečna príchuť
25. kyslé
26. drožd'ovité
27. (a) pečená chuť, (b) škrobovitá chuť
28. plesnivá chuť
29. zhnité
30. olejnaté, rybnaté
31. lojovité
32. (a) oxidovaná príchuť (b) kovová príchuť
33. chuť po krmive
34. surové, horké
35. presolené
36. plesnivé, zhnité
37. sladovité
38. chemická príchuť

¹ Toto označenie by sa malo používať čo najzriedkavejšie a len ak sa kaz nedá vyjadriť presnejšie.

2001

Príloha VIII

(Článok 7)

POSTUP APLIKOVATEĽNÝ PRI SPORNÝCH VÝSLEDKOCH ANALÝZY (chemická analýza)

1. Na požiadanie operátora je možné do siedmich dní od oznámenia výsledkov prvej analýzy uskutočniť ďalšiu analýzu za predpokladu, že sú k dispozícii zapečatené duplicitné vzorky výrobku a že tieto boli riadne uskladnené u príslušného orgánu.

2. Príslušný orgán pošle tieto vzorky do druhého laboratória na požiadanie a náklady prvého laboratória. Toto druhé laboratórium musí byť autorizované na vykonávanie oficiálnych analýz a musí mať dokladovanú schopnosť na dané analýzy. Táto schopnosť musí byť dokumentovaná úspešnou účasťou na kolaboratívnych štúdiách, testoch dokonalosti alebo medzilaboratórných porovnaníach. Druhé laboratórium musí používať referenčnú metódu. Výsledky získané z oboch laboratórií sa hodnotia nasledovne:

(a) Ak obe laboratória spĺňajú požiadavky opakovateľnosti a reprodukovateľnosti

Ako konečný výsledok sa zaznamená aritmetický priemer výsledkov testov z oboch laboratórií. Tento konečný výsledok sa hodnotí zohľadnením kritickej odchýlky použitím nasledovného vzorca:

...

pričom:

y s čiarou: aritmetický priemer všetkých výsledkov získaných v oboch laboratóriách

m_0 : limit

R: reprodukovateľnosť

r: opakovateľnosť

n_1 : počet výsledkov získaných v laboratóriu 1

n_2 : počet výsledkov získaných v laboratóriu 2

Poznámka: Ak sa konečný výsledok počíta použitím vzorca

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

(pozri prílohu IV(3) a (4)), namiesto R^2 a r^2 sa do vzorca dosadia R_x^2 a r_x^2 .

(b) Ak obe laboratória spĺňajú požiadavku opakovateľnosti, ale nie požiadavku reprodukovateľnosti

Ak druhá analýza potvrdí prvú, analyzovaná vzorka sa odmietne ako nevyhovujúca. V opačnom prípade sa vzorka akceptuje.

(c) Ak požiadavku opakovateľnosti spĺňa len jedno laboratórium

Na rozhodnutie o akceptovaní analyzovanej vzorky sa použije konečný výsledok laboratória vyhovujúceho požiadavke opakovateľnosti.

(d) Ak ani jedno laboratórium nespĺňa požiadavku opakovateľnosti, ale požiadavka reprodukovateľnosti je splnená

Platí (a).

(e) Ak ani jedno laboratórium nespĺňa požiadavku opakovateľnosti ani požiadavku reprodukovateľnosti

Analyzovaná vzorka sa akceptuje, ak k tomuto záveru vedú výsledky získané z jedného laboratória.

(f) Ak boli výsledky získané nepotvrdenými metódami

Analyzovaná vzorka sa akceptuje, ak k tomuto záveru vedú výsledky získané z jedného laboratória.

3. Výsledky druhej analýzy oznámi príslušný orgán prvému laboratóriu v čo najkratšom čase. Ak sa analyzovaná vzorka odmietne, náklady druhej analýzy znáša prvé laboratórium.

4. Ak operátor môže do piatich dní od odberu vzorky dokázať, že postup odberu vzorky nebol uskutočnený správne, odber vzorky sa musí opakovať tam, kde je to možné. Ak odber vzorky nie je možné opakovať, akceptuje sa analyzovaná vzorka.

STANOVENIE OBSAHU VODY V MASLE

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Táto referenčná metóda špecifikuje metódu stanovenia obsahu vody v masle.

2. Zdroj

Norma IDF 50C:1995 - Mlieko a mliečne výrobky - Metódy odberu vzoriek

3. Definícia

Obsah vody v masle: strata hmotnosti po ukončení zahrievacieho procesu špecifikovaného v tejto norme. Vyjadruje sa v gramoch na 100 gramov.

4. Princíp

Vyparovanie vody z testovanej vzorky za prítomnosti pemzy pri teplote 102°C v sušiackej peci.

5. Prístroje a materiály

Bežné laboratórne prístroje a najmä:

5.1. Analytická váha, citlivosť 1 mg.

5.2. Sušička vybavená účinným sušiacim činidlom (napríklad čerstvo vysušený silicový gél s hygroskopickým indikátorom).

5.3. Sušiacia pec, ventilovaná, s termostatickou kontrolou, fungujúca v celom sušiacom priestore pri teplote 102±2°C.

5.4. Sklenené, porcelánové alebo nehrdzavejúce kovové misky s výškou približne 20 mm, s priemerom od 60 do 80 mm.

5.5. Pemza, granulovaná, umytá, s priemerom 0,8-10 mm.

6. Odber vzorky

Pozri IDF 50C:1995.

7. Postup

7.1. Príprava testovacej vzorky

Laboratórnu vzorku zahrejte v uzavretej sklenenej alebo vhodnej plastovej nádobe, zaplnenej do polovice až dvoch tretín, na teplotu, pri ktorej vzorka zmäkne dostatočne na umožnenie úplného premiešania do homogénneho stavu (buď mechanickým miešačom alebo ručne). Teplota pri miešaní

by nemala prekročiť 35°C. Vzorku ochladíte na teplotu okolia. Čo najskôr po ochladení otvorte nádobu so vzorkou a pred vážením ju trochu premiešajte (nie dlhšie ako 10 sekúnd) vhodným nástrojom, napríklad lyžicou alebo vareškou.

7.2. Stanovenie obsahu vody

7.2.1. Na misku (5.4.) položte približne 10g pemzy.

7.2.2. Misku s pemzou sušte v sušičke (5.3.) pri teplote $102\pm 2^{\circ}\text{C}$ aspoň po dobu jednej hodiny.

Poznámka: Časy sušenia uvedené v bodoch 7.2.2., 7.2.5. a 7.2.7. začnú plynúť, keď teplota v sušičke dosiahne $102\pm 2^{\circ}\text{C}$.

7.2.3. Misku nechajte vychladnúť v sušičke (5.2.) na izbovú teplotu a odvážte ju na najbližší 1 mg.

7.2.4. Na misku pridajte na najbližší 1 mg dávka testovacej vzorky o hmotnosti približne 5 g.

7.2.5. Misku položte do sušiacej pece pri teplote $102\pm 2^{\circ}\text{C}$ a nechajte ju tam tri hodiny.

7.2.6. Misku nechajte vychladnúť v sušičke na izbovú teplotu a odvážte ju na najbližší 1 mg.

7.2.7. Proces sušenia opakujte v hodinových intervaloch za súčasného chladenia a váženia podľa bodu 7.2.6., pokiaľ nedosiahnete konštantnú hmotnosť (zmena hmotnosti neprevyšujúca 1 mg).

V prípade nárastu hmotnosti počítajte s najnižšou zaznamenanou hmotnosťou.

8. Výpočet výsledkov

8.1. Metóda výpočtu a vzorec

Obsah vody W vypočítate ako percento hmotnosti použitím nasledovného vzorca:

$W = \dots$

pričom

m_0 je hmotnosť misky s pemzou (7.2.3.) v gramoch

m_1 je hmotnosť testovacej vzorky, misky a pemzy pred sušením (7.2.4.) v gramoch

m_2 je hmotnosť testovacej vzorky, misky a pemzy po sušení (7.2.7.) v gramoch

Výsledok zaokrúhlite na jedno desatinné miesto.

8.2. Opakovateľnosť

Absolútny rozdiel medzi výsledkami dvoch osobitných výpočtov uskutočnených naraz alebo rýchlo po sebe rovnakým operátorom v rovnakých podmienkach na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,2%.

8.3. Reprodukovateľnosť

Absolútny rozdiel medzi výsledkami dvoch osobitných a nezávislých výpočtov uskutočnených dvomi operátormi pracujúcimi v rôznych laboratóriách na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,3%.

9. Správa o teste

Správa o teste špecifikuje použitú metódu a získané výsledky. Uvádzajú sa v nej tiež všetky prevádzkové údaje nešpecifikované v tejto medzinárodnej norme alebo považované za nepovinné spolu s podrobnosťami o všetkých udalostiach, ktoré mohli ovplyvniť výsledky. Správa o teste obsahuje všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

STANOVENIE OBSAHU BEZTUKOVEJ SUŠINY V MASLE

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Táto referenčná metóda špecifikuje metódu stanovenia beztukovej sušiny v masle.

2. Zdroj

Norma IDF 50C:1995 - Mlieko a mliečne výrobky - Metódy odberu vzoriek

3. Definície

Obsah beztukovej sušiny v masle: percento hmotnosti látok stanovené špecifikovaným postupom. Vyjadruje sa v gramoch na 100 gramov.

4. Princíp

Vyparovanie vody zo známej hmotnosti masla, extrakcia tuku ľahkou ropou a váženie rezídua.

5. Reagent

Ľahká ropa s rozsahom varu medzi 30 a 60°C. Reagent po vyparení 100 ml nesmie zanechať viac ako 1 mg rezídua.

6. Prístroje a materiály

6.1. Analytická váha, citlivosť 1 mg.

6.2. Sušička vybavená účinným sušiacim činidlom (napríklad čerstvo vysušený silicový gél s hygroskopickým indikátorom).

6.3. Sušiacia pec, ventilovaná, s termostatickou kontrolou, fungujúca v celom sušiacom priestore na teplote $102 \pm 2^\circ\text{C}$.

6.4. Sklenené, porcelánové alebo nehrdzavejúce kovové misky s výškou približne 20 mm, s priemerom od 60 do 80 mm, vybavené sklenenou miešacou tyčkou.

6.5. Filtračný téglík zo spekaného skla s priemerom pórov 16 až 40 μm s odsávacou bankou.

7. Odber vzorky

Pozri IDF 50C:1995.

8. Postup

8.1. Príprava testovacej vzorky

Laboratórnu vzorku zahrejte v uzavretej sklenenej alebo vhodnej plastovej nádobe, naplnenej do polovice až dvoch tretín, na teplotu, pri ktorej vzorka zmäkne dostatočne na umožnenie úplného premiešania do homogénneho stavu (buď mechanickým miešačom alebo ručne). Teplota pri miešaní by nemala prekročiť 35°C. Vzorku ochlaďte na okolitú teplotu. Čo najskôr po ochladení otvorte nádobu so vzorkou a pred vážením ju trochu premiešajte (nie dlhšie ako 10 sekúnd) vhodným nástrojom, napríklad lyžicou alebo vareškou.

8.2. Stanovenie obsahu sušiny

8.2.1. Misku spolu s tyčkou (6.4.) a téglikom (6.5.) sušte v sušiackej peci (6.3.) po dobu jednej hodiny. Tieto predmety nechajte vychladnúť v sušičke a spolu ich odvážte (t.j. misku, tyčku a téglik) na najbližší 1 mg (m_0).

Poznámky: Na vychladnutie zvyčajne stačí 45 minút.

Ak sa na jednu dodávku testuje viac ako jedna testovacia vzorka, je dôležité, aby sa na každú dávku testovacej vzorky používala rovnaká kombinácia misky, tyčky a téglika.

8.2.2. Odoberte téglik a zaznamenajte hmotnosť misky a tyčky na najbližší 1 mg (m_1).

8.2.3. Na misku pridajte na najbližší 1 mg dávky testovacej vzorky o hmotnosti približne 5g (8.1.) (m_2).

8.2.4. Misku (s tyčkou a maslom) položte do sušiackej pece pri teplote $102\pm 2^\circ\text{C}$ a nechajte ju tam cez noc.

8.2.5. Misku (8.2.3.) nechajte vychladnúť na izbovú teplotu.

8.2.6. Do misky pridajte 15 ml teplej (približne 25°C) ropy a použitím sklenenej tyčky odstráňte čo najviac usadeniny na miske. Preložte roztok do téglika a prefiltrujte ho cez saciu banku.

8.2.7. Postup uvedený v bode 8.2.6. zopakujte ešte štyrikrát. Ak na povrchu misky nie sú žiadne stopy tuku, počas štvrtého opakovania premiestnite čo najviac usadeniny do téglika. V opačnom prípade opakujte postup uvedený v bode 8.2.6. až po úplné odstránenie všetkých stôp po tuku.

8.2.8. Usadeninu spláchnite v tégliku 25 ml teplej ľahkej ropy.

8.2.9. Misku, tyčku a téglik sušte spolu v sušiackej peci pri teplote $102\pm 2^\circ\text{C}$ po dobu 30 minút.

8.2.10. Nechajte vychladnúť v sušičke na izbovú teplotu a odvážte na najbližší 1 mg.

8.2.11. Kroky uvedené v bodoch 8.2.9. a 8.2.10. opakujte, pokiaľ pre misku, tyčku a téglik nedosiahnete konštantnú hmotnosť (zmena hmotnosti neprevyšujúca 1 mg).

9. Vyjadrenie výsledkov

9.1. Výpočet obsahu beztukovej sušiny

Obsah beztukovej sušiny SNF vypočítate ako percento hmotnosti použitím nasledovného vzorca:

pričom

m_0 je hmotnosť prázdnej misky so sklenenou tyčkou a téglikom pemzou (8.2.1.) v gramoch

m_1 je hmotnosť prázdnej misky so sklenenou tyčkou (8.2.2.) v gramoch

m_2 je hmotnosť dávky testovacej vzorky a misky so sklenenou tyčkou (8.2.3.) v gramoch

m_3 je konečná hmotnosť v miskes tyčkou a téglikom obsahujúcim usadeninu (8.2.11.) v gramoch

Výsledok zaokrúhlite na jedno desatinné miesto.

9.2. Opakovateľnosť

Absolútny rozdiel medzi výsledkami dvoch osobitných výpočtov uskutočnených naraz alebo rýchlo po sebe rovnakým operátorom v rovnakých podmienkach na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,1%.

9.3. Reprodukovateľnosť

Absolútny rozdiel medzi dvoma osobitnými a nezávislými výsledkami získanými dvoma operátormi pracujúcimi v rôznych laboratóriách na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,2%.

10. Správa o teste

Správa o teste špecifikuje použitú metódu a získané výsledky. Uvádzajú sa v nej tiež všetky prevádzkové údaje nešpecifikované v tejto medzinárodnej norme alebo považované za nepovinné spolu s podrobnosťami o všetkých udalostiach, ktoré mohli ovplyvniť výsledky. Správa o teste obsahuje všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

Poznámka:

Ak sa analyzuje solené maslo, pridaná soľ sa považuje za beztukovú sušinu. Na stanovenie obsahu mliečnej beztukovej sušiny sa obsah pridanej soli musí odpočítať od obsahu beztukovej sušiny. Vypočítané hodnoty presnosti pre stanovenie obsahu mliečnej beztukovej sušiny sú:

opakovateľnosť: $r = 0,104\%$

reprodukovateľnosť: $R = 0,206\%$.

Je možné vyvodit' záver, že hodnoty presnosti získané z postupu stanovenia obsahu beztukovej sušiny sú platné pre stanovenie obsahu mliečnej beztukovej sušiny.

Príloha XI
(Článok 8)

STANOVENIE OBSAHU TUKU V MASLE

Obsah tuku sa získa nepriamo stanovením obsahu vody a beztukovej sušiny podľa príloh IX a X.
Percento hmotnosti tuku sa rovná

$$100 - (W + SNF)$$

pričom

W: percento hmotnosti vody

SNF: percento hmotnosti beztukovej sušiny.

Vypočítané hodnoty presnosti pre stanovenie obsahu tuku sú:

Opakovateľnosť: $r = 0,22\%$

reprodukovateľnosť: $R = 0,36\%$

Príloha XII
(Článok 9)

STANOVENIE OBSAHU VANILÍNU V KONCENTROVANOM MASLE, MASLE ALEBO SMOTANE VYSOKOVÝKONNOU KVAPALNOU CHROMATOGRAFIOU

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Metóda popisuje postup kvantitatívneho stanovenia obsahu vanilínu v koncentrovanom masle, masle alebo smotane.

2. Princíp

Extrakcia známeho množstva vzorky zmesou isopropanolu/etanolu/acetonitrilu (1:1:2). Zrazenie väčšiny tuku schladením pri teplotách v rozmedzí -15°C až -20°C a následné odstredenie.

Po zriedení vodou stanovenie obsahu vanilínu vysokovýkonnou kvapalnou chromatografiou (HPLC).

3. Prístroje

Bežné laboratórne prístroje a najmä nasledovné:

3.1. mraznička fungujúca v teplotnom rozsahu -15°C až -20°C ;

3.2. striekačky s 2 ml obsahom;

3.3. membránové mikrofiltre s veľkosťou pórov $0,45\ \mu\text{m}$, odolné voči roztoku obsahujúcemu 5% extrakčného roztoku (4.4.);

3.4. systém kvapalnej chromatografie pozostávajúci z čerpadla (tok $1\ \text{ml}/\text{min.}$), injektora ($20\ \mu\text{l}$ injekcia, automatická alebo manuálna), UV detektora (fungujúceho pri $306\ \text{nm}$, $0,01\ \text{AU}$ celá stupnica), zapisovača alebo integrátoru a stĺpkového termostatu fungujúceho pri teplote 25°C ;

3.5. analytický valec ($250\ \text{mm} \times 4,6\ \text{mm ID}$) zabalený s LICHrospherom RP 18 (Merck $5\ \mu\text{m}$) alebo ekvivalentný;

3.6. ochranný valec (cca. $20\ \text{mm} \times 3\ \text{mm ID}$), zabalený s Perisorbom RP 18 (30 až $40\ \mu\text{m}$) alebo ekvivalentný.

4. Reagenty

Všetky reagenty musia byť schválenej analytickej kvality.

4.1. Isopropanol

4.2. Etanol 96% (v/v)

4.3. Acetonitril

4.4. Extrakčný roztok

Zmiešajte isopropanol (4.1.), etanol (4.2.) a acetonitril (4.3.) v pomere 1:1:2 (v/v).

4.5. Vanilín (4-hydroxy-3metoxybenzaldehyd)

4.5.1. Vanilínový zásobný roztok (= 500 µg/ml)

S presnosťou na 0,1 mg odvážte približne 50 mg (CM mg) vanilínu (4.5.) do 100 ml odmernej banky, pridajte 25 ml extrakčného roztoku (4.4.) a doplňte vodou.

4.5.2. Vanilínový štandardný roztok (= 10µg/ml).

Pipetujte 5 ml vanilínového zásobného roztoku (4.5.1.) do 250 ml odmernej banky a doplňte vodou.

4.6. Metanol, v HPLC kvalite

4.7. Kyselina octová, ľadová

4.8. Voda, v HPLC kvalite

4.9. HPLC mobilná fáza

Zmiešajte 300 ml metanolu (4.6.) s približne 500 ml vody (4.8.) a 20 ml kyseliny octovej (4.7.) v 1000 ml odmernej banke a doplňte vodou (4.8.). Prefiltrujte cez 0,45 µm filter (3.3.).

5. Postup

5.1. Príprava testovacej vzorky

5.1.1. Maslo

Zohrejte vzorku pokým sa nezačne topiť. Vyhnite sa lokálnemu prehriatiu nad 40°C. Ak vzorka dostatočne spružnie, pretrepaním ju homogenizujte. Pred odberom vzorky maslo premiešajte po dobu 15 sekúnd. Na najbližší 1 mg odvážte približne 5 g (SM g) masla do 100 ml odmernej banky.

5.1.2. Koncentrované maslo

Okamžite pred odberom vzorky umiestnite nádobu s koncentrovaným maslom do pece pri teplote 40 až 50°C pokým sa úplne nerozpustí. Vzorku premiešajte vírením alebo miešaním, vyhnite sa pritom vytvoreniu vzduchových bublín príliš silným miešaním. Na najbližší 1 mg odvážte približne 4 g (SM g) koncentrovaného masla do 100 ml odmernej banky.

5.1.3. Smotana

Vzorku zohrejte vo vodnom kúpeli alebo inkubátore na teplotu 35 až 40°C. Tuk rovnomerne rozmiestnite vírením a podľa potreby aj miešaním. Vzorku rýchlo ochladte na 20±2°C. Vzorka by mala vyzeráť homogénne, v opačnom prípade je potrebné postup zopakovať. Na najbližší 1 mg odvážte približne 10 g (SM g) smotany do 100 ml odmernej banky.

5.2. Príprava testovacieho roztoku

Do dávky testovacej vzorky (5.1.1., 5.1.2. alebo 5.1.3.) pridajte približne 75 ml extrakčného roztoku (4.4.), miešajte alebo silno pretrepte po dobu približne 15 minút a doplňte extrakčným roztokom (4.4.) Približne 10 ml tohto extraktu preneste do testovacej skúmavky vybavenej ventilom. Skúmavku vložte do mrazničky (3.1.) a nechajte ju tam približne 30 minút. Studený extrakt odstredzte po dobu 5 minút pri približne 2000 rpm a ihneď zlejte. Zliaty roztok ochladzte na izbovú teplotu. 5 ml zliateho roztoku pipetujte do 100 ml odmernej banky a doplňte vodou. Vhodné množstvo prefiltrujte cez membránový mikrofilter (3.3.). Filtrát je pripravený na stanovenie obsahu pomocou HPLC.

5.3. Kalibrácia

Do 100 ml odmernej banky pipetujte 5 ml vanilínového štandardného roztoku (4.5.2.). Pridajte 5 ml extrakčného roztoku (4.4.) a doplňte vodu po značku. Tento roztok obsahuje 0,5 µg/ml vanilínu.

5.4. Stanovenie obsahu pomocou HPLC

Chromatografický systém nechajte stabilizovať po dobu asi 30 minút. Injektujte štandardný roztok (5.3.). Toto opakujte pokým rozdiel v ploche vrcholu alebo výške vrcholu medzi dvomi následnými injekciami nedosiahne menej ako 2%. V popísaných podmienkach je čas viazania vanilínu približne 9 minút. Štandardný roztok (3.3.) analyzujte duplicitne injektovaním 20 µl. Injektujte 20 µl testovacích roztokov (5.2.). Stanovte plochu alebo výšku získaného vanilínového vrcholu. Duplicitnú injektáž štandardného roztoku (5.3.) opakujte po 10 injekciách testovacích vzoriek (5.2.).

6. Výpočet výsledkov

Vypočítajte priemernú plochu vrcholu (alebo výšku)(AC) vrcholov vanilínu spojených s duplicitnými injekciami pre každú dávku testovacích roztokov (spolu štyri plochy alebo výšky).

Vypočítajte reakčný faktor (R):

$$R = AC / CM$$

pričom CM je hmotnosť vanilínu v mg (4.5.1.).

Obsah (mg/kg) vanilínu (C) v testovacej vzorke dostanete takto:

$$C = \dots$$

pričom

AS = plocha vrcholu vanilínu testovacej vzorky

SM = hmotnosť testovacej vzorky v g (5.1.1., 5.1.2. alebo 5.1.3.).

Ak sa na vanilín analyzuje smotana, koncentrácia stopovej látky sa vyjadruje ako mg stopovej látky / kg mliečneho tuku. Toto sa dosiahne vynásobením C faktorom 100/f. f je obsah tuku v smotane v percentách (m/m).

20 = faktor, ktorý zohľadňuje roztoky štandardnej a testovacej vzorky

0,96 = korekčný faktor pre obsah tuku v prvom roztoku testovacej vzorky.

Poznámka: Namiesto plochy vrcholu sa môžu použiť výšky vrcholu (pozri 8.3.).

7. Presnosť metódy

7.1. Opakovateľnosť (r)

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 16 mg/kg.

7.2. Reprodukovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 27 mg/kg.

8. Tolerančné limity

8.1. Na kontrolu homogénnosti sa odoberú tri vzorky z kontrolovaného výrobku.

8.2. Stopová látka získaná buď z vanilky alebo syntetického vanilínu:

8.2.1. Miera vstrebávania pre 4-hydroxy-3-metoxybenzaldehyd je 250 g na tonu koncentrovaného masla alebo masla. Ak sa kontroluje smotana, miera vstrebávania je 250 g na tonu mliečného tuku.

8.2.2. Na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 221 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania),
- 159 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania).

8.3. Stopová látka získaná výlučne z vanilkových bôbov alebo ich integrálnych extraktov:

8.3.1. Miera vstrebávania pre 4-hydroxy-3-metoxybenzaldehyd je 100 g na tonu koncentrovaného masla alebo masla. Ak sa kontroluje smotana, miera vstrebávania je 100 g na tonu mliečného tuku.

8.3.2. Na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 79 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania),
- 54 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania).

Koncentrácia stopovej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 79 mg/kg a 54 mg/kg.

9. Poznámky

9.1. Opakovateľnosť r je hodnota, pod ktorou je možné so špecifikovanou pravdepodobnosťou očakávať, že sa bude absolútny rozdiel nachádzať medzi výsledkami dvoch testov získaných rovnakou metódou na rovnakom testovacom materiáli v rovnakých podmienkach (rovnaké prístroje,

rovnaké laboratórium a v krátkom časovom intervale); za neprítomnosti iných vplyvov je pravdepodobnosť 95%.

9.2. Reprodukovateľnosť R je hodnota, pod ktorou je možné so špecifikovanou pravdepodobnosťou očakávať, že sa bude absolútny rozdiel nachádzať medzi výsledkami dvoch testov získaných rovnakou metódou na rovnakom testovacom materiáli v rôznych podmienkach (rôzni operátori, rôzne prístroje, rôzne laboratóriá a/alebo rôzny čas); za neprítomnosti iných vplyvov je pravdepodobnosť 95%.

9.3. Získanie pridaného vanilínu na hodnote 250 mg/kg maslového oleja sa pohybuje medzi 97 a 103,8. Priemerný zistený obsah bol 99,9% so štandardnou odchýlkou 2,7%.

9.4. Štandardný roztok obsahuje 5% extrakčného roztoku na kompenzáciu rozšírenia vrcholu zapríčineného prítomnosťou 5% extrakčného roztoku testovacích vzoriek. Toto umožňuje kvantifikáciu výškou vrcholu.

9.5. Analýza je založená na lineárnej kalibračnej línii s nulovým prienikom.

Použitím vhodných roztokov štandardného roztoku (4.5.2.) sa linearita skontroluje pri prvom vykonaní analýzy a potom v pravidelných intervaloch a po zmenách zariadenia HPLC alebo jeho oprave.

STANOVENIE OBSAHU ETYL ESTERU BETA-APO-8'-KAROTENICKEJ KYSELINY V KONCENTROVANOM MASLE A MASLE SPEKTROMETRIOU

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Metóda popisuje postup na kvantitatívne stanovenie obsahu etyl esteru beta-apo-8'-karotenickej kyseliny (apo-karotenický ester) v koncentrovanom masle a masle. Apo-karotenický ester je súčtom všetkých látok prítomných v extrakte vzoriek získaných v podmienkach popísaných v metóde, ktoré absorbujú svetlo pri 440 nm.

2. Princíp

Maslový tuk sa rozpustí v ľahkej rope a absorpcia sa meria pri 440 nm. Obsah apo-karotenického esteru sa stanovuje odkazom na externú normu.

3. Prístroje

3.1. Pipety - s mierkou, s objemom 0,25, 0,50, 0,75 a 1,0 ml.

3.2. Spektrofotometer - vhodný pre použitie pri hodnote 440 nm (a 447-449 nm) a vybavený bunkami s dĺžkou optickej stopy 1 cm.

3.3. Odmerné banky, 20 ml a 100 ml.

3.4. Analytická váha, citlivosť 0,1 mg.

4. Reagenty

Všetky reagenty musia byť schválenej analytickej kvality.

4.1. Suspenzia apo-karotenického esteru.

4.1.1. Obsah suspenzie stanovte nasledovne:

Do odmernej banky (100 ml) odvážte približne 400 mg, rozpustíte v 20 ml chloroformu (4.4.) a doplňte objem cyklohexánom (4.5.) Rozriedte 5 ml tohto roztoku na 100 ml cyklohexánom (roztok A). Rozriedte 5 ml roztoku A na 100 ml cyklohexánom. Zmerajte absorpciu pri 447-449 nm (merajte maximum proti cyklohexánu ako nulovej hodnote použitím buniek s dĺžkou optickej stopy 1 cm).

Obsah apo-karotenického esteru (%) = $A_{\max} \cdot 40000 / A \cdot 2550$

A_{\max} = absorpcia meraného roztoku na maxime

A = hmotnosť vzorky (g)

2550 = referenčná hodnota A (1%, 1 cm)

Čistota suspenzie je P (%).

Poznámka: Suspenzia apo-karotenického esteru je citlivá na vzduch, teplo a svetlo. V uzavretej pôvodnej nádobe (zapečatenej dusíkom) sa môže na chladnom mieste skladovať približne 12 mesiacov. Po otvorení je nutné obsah použiť čo najrýchlejšie.

4.1.2. Štandardný roztok apo-karotenického esteru, približne 0,2 mg/ml

Na najbližší 0,1 mg odvážte približne 0,1 g suspenzie apo-karotenického esteru (4.1.1.) (Wg), rozpustíte ju v ropnom liehu (4.2.), preložte do banky s objemom 100 ml a doplňte po značku ropným liehom.

Tento roztok obsahuje (W.P)/10mg/ml apo-karotenického esteru.

Poznámka: Roztok sa musí skladovať na tmavom a chladnom mieste. Nepoužitý roztok po jednom mesiaci odstráňte.

4.2. Ropný lieh (40 - 60°C).

4.3. Sulfát sodný, anhydričkový, granulárny, predtým vysušený pri 102°C počas dvoch hodín.

4.4. Chloroform.

4.5. Cyklohexán

5. Postup

5.1. Príprava testovacej vzorky

5.1.1. Koncentrované maslo

Roztopte vzorku v peci pri teplote približne 45°C.

5.1.2. Maslo

Vzorku roztopte v peci pri teplote približne 45°C a prefiltrujte reprezentatívne množstvo cez filter obsahujúci približne 10 g anhydričkého sulfátu sodného (4.3.) v prostredí chránenom pred silným prirodzeným a umelým svetlom a s teplotou 45°C. Zozbierajte vhodné množstvo maslového tuku.

5.2. Stanovenie obsahu

Na najbližší 1 mg odvážte približne 1 g koncentrovaného masla (alebo extrahovaného maslového tuku (5.1.2.)) (Mg). Preneste ho do 20 ml (Vml) odmernej banky za použitia ropného liehu, doplňte po značku a dôkladne premiešajte.

Preneste primerané množstvo do 1 cm bunky a zmerajte absorpciu pri 440 nm proti nulovej hodnote ropného liehu. Koncentráciu apo-karotenického esteru v roztoku získate odkazom na kalibračný graf (C μ /ml).

5.3. Kalibračný graf

Pipetujte 0, 0,25, 0,5, 0,75 a 1 ml štandardného roztoku apo-karotenického esteru (4.1.2.) do piatich 100 ml baniek. Roztok rozriedte ropným liehom (4.2.) a premiešajte.

Približné koncentrácie roztokov sa pohybujú od 0 do 2 µg/ml a presne sa vypočítajú odkazom na koncentráciu štandardného roztoku (4.1.2.) (W.P)/10 mg/ml. Absorpciu merajte pri 440 nm proti nulovej hodnote ropného liehu (4.2.)

Hodnoty absorpcie preneste na os y proti koncentráciám apo-karotenického esteru na osi x.

6. Výpočet výsledkov

6.1. Obsah apo-karotenického esteru vyjadrený v mg/kg výrobku sa vypočíta nasledovne:

Koncentrované maslo: (C.V)/M

Maslo: 0,82 (C.V)M

pričom

C = obsah apo-karotenického esteru, µg/ml, odvodený z kalibračného grafu (5.3.)

V = objem (ml) testovacieho roztoku (5.2.)

M = hmotnosť (g) dávky testovacej vzorky (5.2.)

0,82 = korekčný faktor pre obsah maslového tuku v masle.

7. Presnosť metódy

7.1. Opakovateľnosť

7.1.1. Analýza masla

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 1,4 mg/kg.

7.1.2. Analýza koncentrovaného masla

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 1,6 mg/kg.

7.2. Reprodukovateľnosť

7.2.1. Analýza masla

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 4,7 mg/kg.

7.2.2. Analýza koncentrovaného masla

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 5,3 mg/kg.

7.3. Zdroj údajov o presnosti

Údaje o presnosti boli stanovené pokusom uskutočneným v roku 1995, na ktorom sa podieľalo 11 laboratórií, a pri ktorom sa použilo 12 vzoriek (šesť slepých duplikátov) pre maslo a 12 vzoriek (šesť slepých duplikátov) pre koncentrované maslo.

8. Tolerančné limity

8.1. Na kontrolu správneho obsahu stopovej látky sa z výrobku obsahujúceho stopovú látku odoberú tri vzorky obsahujúce stopovú látku.

8.2. Maslo

8.2.1. Miera vstrebávania pre maslo pri zohľadnení jeho absorpcie je 22 mg/kg.

8.2.2. Výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku sa použijú na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 18 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania),
- 13 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania).

Koncentrácia stopovej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 18 mg/kg a 13 mg/kg.

8.3. Koncentrované maslo

8.3.1. Miera vstrebávania pre koncentrované maslo pri zohľadnení jeho absorpcie je 24 mg/kg.

8.3.2. Výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku sa použijú na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 20 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania),
- 14 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania).

Koncentrácia stopovej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 20 mg/kg a 14 mg/kg.

STANOVENIE OBSAHU SITOSTEROLU ALEBO STIGMASTEROLU V MASLE ALEBO KONCENTROVANOM MASLE KAPILÁRNOU PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Metóda popisuje postup pre kvantitatívne stanovenie obsahu sitosterolu alebo stigmasterolu v masle a koncentrovanom masle. Sitosterol predstavuje súčet beta-sitosterolu a 22 dihydro-beta-sitosterolu, iné sitosteroly sa považujú za nepodstatné.

2. Princíp

Maslo alebo koncentrované maslo sa zmydlia hydroxidom draselným v etanolicom roztoku a nezmydliteľná časť sa extrahuje dietyl éterom.

Steroly sa transformujú na trimetyl-silylové étery a analyzujú sa kapilárnou plynovou chromatografiou s odkazom na internú normu/betulín.

3. Prístroje

3.1. 150 ml banka na zmydľovanie vybavená kondenzátorom so spätným tokom so sklenenými spojmami.

3.2. 500 ml separačné lieviky.

3.3. 250 ml banky.

3.4. Lieviky na vyrovnávanie tlaku, s objemom 250 ml alebo podobné, na zber odpadového dietyl éteru.

3.5. Sklenený valec, 350 mm x 20 mm vybavený zátkou zo spečeného skla.

3.6. Vodný kúpeľ alebo izoobal.

3.7. Reakčné fioly, 2 ml.

3.8. Plynový chromatograf vhodný na použitie s kapilárnym valcom, vybavený rozdeľovacím systémom pozostávajúcim z:

3.8.1. termostatickej komory pre odmerné valce schopnou udržiavať požadovanú teplotu s presnosťou $\pm 1^{\circ}\text{C}$;

3.8.2. vyparovacej jednotky s nastaviteľnou teplotou;

3.8.3. ionizačného detektora plameňa a konvertora - zosilňovača (3.8.3.).

3.8.4. integrátor - zapisovač vhodný na použitie s konvertorom - zosilňovačom (3.8.3.).

3.9. Kapilárny valec z taveného oxidu kremičitého celý potiahnutý BP1 alebo ekvivalentom v rovnakej hrúbke 0,25 μm ; valec musí byť schopný riediť trimetyl-silylové deriváty lanosterolu a sitosterolu. Vhodný je BP1, dĺžka 12 m, vnútorný priemer 0,2 mm.

3.10. Mikrostriekačka na plynovú chromatografiu s tvrdou ihlou a s objemom 1 μl .

4. Reagenty

Všetky reagenty musia byť schválenej analytickej kvality. Použitá voda musí byť destilovaná alebo aspoň ekvivalentnej čistoty.

4.1. Etanol, minimálne 95% čistoty.

4.2. Hydroxid draselný, 60% roztok. Rozpusťte 600 g hydroxidu draselného (minimálne 85%) vo vode a doplňte vodou do jedného litra.

4.3. Betulín, minimálne 99% čistoty.

4.3.1. Roztoky betulínu v dietyl éteri (4.4.)

4.3.1.1. Koncentrácie betulínového roztoku používané na stanovenie obsahu sitosterolu by mali byť 1 mg/ml.

4.3.1.2. Koncentrácie betulínového roztoku používané na stanovenie obsahu stigmasterolu by mali byť 0,4 mg/ml.

4.4. Dietyl éter, analytickej čistoty (bez peroxidov alebo rezíduí).

4.5. Sulfát sodný, anhydričný, granulárny, predtým vysušený pri teplote 102°C po dobu dvoch hodín.

4.6. Silylátujúci reagent, napríklad TRI-SIL (dostupný od firmy Pierce Chemical Co., Cat. No. 49001) alebo ekvivalentný. (Dôležité: TRI-SIL je horľavý, toxický, korozívny a možno aj karcinogénny. Laboratórni pracovníci musia byť oboznámení s bezpečnostnými údajmi o TRI-SIL-e a musia vykonať príslušné preventívne kroky.)

4.7. Lanosterol

4.8. Sitosterol, známej čistoty, nie menej ako 90% (P).

Poznámka 1: Čistota štandardných materiálov používaných na kalibráciu sa stanovuje použitím metódy normalizácie. Predpoklad je, že všetky steroly prítomné vo vzorke sú prítomné na chromatograme, celková plocha vrcholov predstavuje 100% sterolových zložiek a že steroly dávajú rovnaké reakcie detektora. Linearita systému sa musí overiť na daných rozpätiach koncentrácií.

4.8.1. Sitosterolový štandardný roztok - pripravte roztok obsahujúci na najbližší 0,001 mg/ml približne 0,5 mg/ml (W1) sitosterolu (4.8.) v dietyl éteri (4.4.).

4.9. Stigmasterol, známej čistoty, nie menej ako 90% (P).

4.9.1. Stigmasterolový štandardný roztok - pripravte roztok obsahujúci na najbližší 0,001 mg/ml približne 0,2 mg/ml (W1) sitosterolu (4.9.) v dietyl éteri (4.4.).

4.10. Rozlišovacia testovacia zmes. Pripravte roztok obsahujúci 0,05 mg/ml lanosterolu (4.7.) a 0,5 mg/ml sitosterolu (4.8.) v dietyl éteri (4.4.).

5. Metóda

5.1. Príprava štandardných roztokov na chromatografiu. Interný štandardný roztok (4.3.1.) sa musí pridať do príslušného sterolového štandardného roztoku v rovnakom čase kedy sa pridáva do zmydlenej vzorky (pozri 5.2.2.).

5.1.1. Sitosterolový štandardný chromatografický roztok: do dvoch reakčných fiol (3.7.) prelejte 1 ml sitosterolového štandardného roztoku (4.8.1.) a dietyl éter odstráňte prúdom dusíka. Pridajte 1 ml interného roztoku (4.3.1.1.) a dietyl éter odstráňte prúdom dusíka.

5.1.2. Stigmasterolový štandardný chromatografický roztok: do dvoch reakčných fiol (3.7.) prelejte 1 ml stigmasterolového štandardného roztoku (4.9.1.) a dietyl éter odstráňte prúdom dusíka. Pridajte 1 ml interného roztoku (4.3.1.2.) a dietyl éter odstráňte prúdom dusíka.

5.2. Príprava nezmydliteľných častí

5.2.1. Roztopte vzorku masla pri teplote nepresahujúcej 35°C, vzorku dôkladne premiešajte.

Na najbližší 1 mg odvážte približne 1 g masla (W_1) alebo koncentrovaného masla (W_2) do 150 ml banky (3.1.). Pridajte 50 ml etanolu (4.1.) a 10 ml roztoku hydroxidu draselného (4.2.). Pripevnite kondenzátor so spätným tokom a po dobu 30 minút zohrievajte na teplote približne 75°C. Kondenzátor odpojte a banku ochladte na približne izbovú teplotu.

5.2.2. Ak sa stanovuje obsah sitosterolu, do banky pridajte 1 ml interného štandardného roztoku (4.3.1.1.), alebo (4.3.1.2.) ak sa stanovuje obsah stigmasterolu. Dôkladne premiešajte. Obsah banky prelejte do 500 ml separačného lievika (3.2.), banku umyte 50 ml vody a 250 ml dietyl éteru (4.4.). Separačný lievik dôkladne pretrepte po dobu dvoch minút a umožnite separáciu vrstiev. Spodnú vodnatú vrstvu zlejte a éterovú vrstvu zmyte pretrepaním so štyrmi po sebe nasledujúcimi 100 ml dávkami vody.

Poznámka 2: Aby nedošlo k vytvoreniu emulzie, je dôležité, aby sa prvé dve dávky vody aplikovali opatrne (10 okruhov). Tretia dávka sa môže pretrepať dôkladne po dobu 30 sekúnd. Ak sa vytvorí emulzia, táto sa dá zničiť pridaním 5-10 ml etanolu. V prípade pridanej etanolu je potrebné uskutočniť ďalšie dve dôkladné pretrepania vodou.

5.2.3. Čistú éterovú vrstvu bez mydla prelejte cez sklenený valec (3.5.) obsahujúci 30 g anhydričného sulfátu sodného (4.5.). Éter zberajte do 250 ml banky (3.3.). Pridajte jednu protinárarovú granulu a nechajte vypariť takmer do sucha vo vodnom kúpeli alebo izoobale za súčasného zberu odpadových látok.

Poznámka 3: Ak sa extrakty vzoriek vysušia úplne pri príliš vysokej teplote, môže dôjsť k stratám sterolu.

5.3. Príprava trimetyl-silylových éterov

5.3.1. Zvyšný éterový roztok prelejte z banky do 2 ml reakčnej fioly (3.7.) s 2 ml dietyl éteru a éter odstráňte použitím prúdu dusíka. Banku umyte dvomi ďalšími 2 ml dávkami dietyl éteru, prelejte ho do fioly a éter odstraňujte dusíkom.

5.3.2. Vzorku silylujte pridaním 1 ml TRI-SIL-u (4.6.). Fiolu uzavrite a silne pretrepte kým sa obsah nerozpustí. Ak obsah fioly nie je úplne rozpustený, zohrejte ho na 65-70°C. Pred injektovaním do plynového chromatografu fiolu odstavte na najmenej päť minút. Silylujete štandardné roztoky rovnako ako vzorky. Rozlišovacia testovacia zmes (4.10.) silylujte rovnakým spôsobom ako vzorky.

Poznámka 4: Silylácia sa musí uskutočniť v prostredí bez prítomnosti vody. Neúplnú silyláciu betulínu naznačuje druhý vrchol blízky vrcholu betulínu.

Silylácii prekáža prítomnosť etanolu. K tomu môže dôjsť nedostatočným odstránením v extrakčnej fáze. Ak tento problém pretrváva, je v extrakčnej fáze potrebné vykonať piate premytie dôkladným pretrepaním po dobu 30 sekúnd.

5.4. Analýza plynovou chromatografiou

5.4.1. Výber prevádzkových podmienok

Plynový chromatograf nastavte v súlade s pokynmi výrobcu.

Orientačné prevádzkové podmienky sú nasledovné:

- teplota valca: 265°C
- teplota injektora: 265°C
- teplota detektora: 300°C
- prietoková miera plynu: 0,6ml/min.
- tlak vodíka: 84 kPa
- tlak vzduchu: 155 kPa
- rozdelenie vzorky: od 10:1 do 50:1; pomer rozdelenia musí byť optimalizovaný v súlade s pokynmi výrobcu a linearitou reakcie detektora a potom overený cez dané rozpätie koncentrácií.

Poznámka 5: Osobitne dôležité je pravidelné čistenie injekčnej vložky.

- množstvo injektovanej látky: 1 µl roztoku TMSE.

Pred začatím analýzy umožnite vyváženie systému a dosiahnutie stabilnej reakcie.

Tieto podmienky je potrebné meniť podľa vlastností valca a plynového chromatografu za účelom získania chromatogramov, ktoré budú vyhovovať nasledovným kritériám:

- vrchol sitosterolu sa náležite odvodí z lanosterolu. Graf 1 ukazuje typický chromatogram, ktorý by mal byť získaný zo silylatovanej rozlišovacej testovacej zmesi (4.10)
- relatívne časy väzby nasledovných sterolov by mali byť približne:

cholesterol: 1,0
stigmasterol: 1,3
sitosterol: 1,5
betulín: 2,5

- čas väzby pre betulín by mal byť približne 24 minút.

5.4.2. Analytický postup

Injektujte 1 µl silylátovaného štandardného roztoku (stigmasterolu alebo sitosterolu) a nastavte kalibračné parametre integrátora.

Injektujte ďalší 1 µl silylátovaného štandardného roztoku na stanovenie reakčných faktorov vo vzťahu k betulínu.

Injektujte 1 µl silylátovaného roztoku vzorky a merajte plochy vrcholov. Každé kolo chromatografie musí byť oddelené injekciou štandardného roztoku.

V každom oddelenom kole by malo byť šesť injekcií vzorky.

Poznámka 6: Integrácia vrcholu stigmasterolu by mala zahŕňať každý dozvuk podľa definície uvedenej v bodoch 1, 2 a 3 v grafe 2b.

Integrácia vrcholu sitosterolu by mala zahŕňať plochu vrcholu 22 dihydro-beta-sitosterolu (stigmastanol), ktorý vznikne ihneď po sitosterole (pozri graf 3b) pri hodnotení celkového sitosterolu.

6. Výpočet výsledkov

6.1. Stanovte plochu vrcholov sterolov a betulínu v oboch štandardných roztokoch oddeľujúcich kolo a vypočítajte R1:

$R1 = \text{priemerná plocha vrcholu sterolu v štandardnom roztoku} / \text{priemerná plocha vrcholu betulínu v štandardnom roztoku}$

Stanovte plochu vrcholu sterolu (stigmasterol alebo sitosterol) a vrcholu betulínu vo vzorke a vypočítajte R2:

$R2 = \text{plocha vrcholu sterolu vo vzorke} / \text{plocha vrcholu betulínu vo vzorke}$

$W1 = \text{obsah sterolu v štandardnom roztoku (mg) obsiahnutého v 1 ml štandardného roztoku (4.8.1. alebo 4.9.1.)}$

$W2 = \text{hmotnosť vzorky (g) (5.2.1.)}$

$P = \text{čistota štandardného sterolu (4.8. alebo 4.9.)}$

Obsah sterolu vo vzorke (mg/kg) = ...

7. Presnosť metódy

7.1. Maslo

7.1.1. Opakovateľnosť

7.1.1.1. Stigmasterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 23 mg/kg.

7.1.2. Reprodukovateľnosť

7.1.1. Stigmasterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 31,9 mg/kg.

7.1.2. Sitosterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 8,7% v pomere k strednej hodnote analýzy.

7.1.3. Zdroj údajov o presnosti

Údaje o presnosti boli stanovené pokusom uskutočneným v roku 1992, na ktorom sa podieľalo osem laboratórií, a pri ktorom sa použilo šesť vzoriek (tri slepé duplikáty) pre stigmasterol a šesť vzoriek (tri slepé duplikáty) pre sitosterol.

7.2. Koncentrované maslo

7.2.1. Opakovateľnosť

7.2.1.1. Stigmasterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 3,6% v pomere k strednej hodnote analýzy.

7.2.2. Reprodukovateľnosť

7.2.1. Stigmasterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 25,3 mg/kg.

7.2.2. Sitosterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 8,9% v pomere k strednej hodnote analýzy.

7.3. Zdroj údajov o presnosti

Údaje o presnosti boli stanovené pokusom uskutočneným v roku 1991, na ktorom sa podieľalo deväť laboratórií, a pri ktorom sa použilo šesť vzoriek (tri slepé duplikáty) pre stigmasterol a šesť vzoriek (tri slepé duplikáty) pre sitosterol.

8. Tolerančné limity

8.1. Na kontrolu správneho obsahu stopovej látky sa z výrobku obsahujúceho stopovú látku odoberú tri vzorky obsahujúce stopovú látku.

8.2. Maslo

8.2.1. Stigmasterol

8.2.1.1. Miera vstrebávania pre stigmasterol je 150 g najmenej 95% čistého stigmasterolu na tonu masla, t.j. 142,5 mg/kg, alebo 170 g najmenej 85% čistého stigmasterolu na tonu masla, t.j. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku sa použijú na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 116 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania pre 95% čistý stigmasterol),
- 118 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania pre 85% čistý stigmasterol),
- 81 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania pre 95% čistý stigmasterol).
- 82 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania pre 85% čistý stigmasterol).

Koncentrácia stopovej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 116 mg/kg a 81 mg/kg alebo 118 mg/kg a 82 mg/kg .

8.2.2. Sitosterol

8.3.1. Miera vstrebávania pre sitosterol je 600g najmenej 90% čistého sitosterolu na tonu masla, t.j. 540 mg/kg.

8.2.2.2. Výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku sa použijú na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 486 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania pre 90% čistý sitosterol),
- 358 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania pre 90% čistý sitosterol).

Koncentrácia stopovej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 486 mg/kg a 358 mg/kg.

8.2. Koncentrované maslo

8.3.1. Stigmasterol

8.3.1.1. Miera vstrebávania pre stigmasterol je 150 g najmenej 95% čistého stigmasterolu na tonu masla, t.j. 142,5 mg/kg, alebo 170 g najmenej 85% čistého stigmasterolu na tonu masla, t.j. 144,5 mg/kg.

8.3.1.2. Výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku sa použijú na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 120 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania pre 95% čistý stigmasterol),
- 122 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania pre 85% čistý stigmasterol),
- 84 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania pre 95% čistý stigmasterol).
- 86 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania pre 85% čistý stigmasterol).

Koncentrácia stopovej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 120 mg/kg a 84 mg/kg alebo 122 mg/kg a 86 mg/kg .

8.3.2. Sitosterol

8.3.1. Miera vstrebávania pre sitosterol je 600g najmenej 90% čistého sitosterolu na tonu masla, t.j. 540 mg/kg.

8.3.2.2. Výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku sa použijú na kontrolu miery a homogenity obsahu stopovej látky a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s nasledovnými limitmi (kritická odchýlka pre hladinu pravdepodobnosti 95% (DCr95) zohľadnená):

- 486 mg/kg (95% minimálnej miery vstrebávania pre 90% čistý sitosterol),
- 358 mg/kg (70% minimálnej miery vstrebávania pre 90% čistý sitosterol).

Koncentrácia stopovej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 486 mg/kg a 358 mg/kg.

Graf 1

Chromatogram rozlišovacej testovacej zmesi

Uprednostňuje sa úplné rozlíšenie, t.j. čiara vrcholu pre lanosterol by sa mala vrátiť na základnú čiaru pred znázornením vrcholu sitosterolu, hoci neúplné rozlíšenie je tiež prijateľné.

os y: FID reakcia detektora

os x: čas (min.)

Graf 2a

Štandardný roztok stigmasterolu

os y: FID reakcia detektora

os x: čas (min.)

betulín (interná norma)

Graf 2b

Vzorka masla denaturovaná stigmasterolom

os y: FID reakcia detektora

os x: čas (min.)

Poznámka: Integrácia vrcholu stigmasterolu by mala zahŕňať každý dozvuk podľa definície uvedenej v bodoch 1, 2 a 3.

Graf 3a

Štandardný roztok sitosterolu

Graf 3b

Vzorka masla denaturovaná beta-sitosterolom

Poznámka: beta-sitosterol často obsahuje nečistotu (označuje sa ako stigmastanol), ktorá sa ukazuje ihneď po beta-sitosterole. Plochy týchto dvoch vrcholov by sa pri hodnotení prítomnosti beta-sitosterolu mali spočítavať.

Príloha XV

(Článok 10)

REFERENČNÁ METÓDA ZISŤOVANIA KRAVSKÉHO MLIEKA A KAZEINÁTU V SYROCH VYROBENÝCH Z OVČIEHO MLIEKA, KOZIEHO MLIEKA ALEBO BYVOLIEHO MLIEKA A ZO ZMESÍ KOZIEHO, OVČIEHO A BYVOLIEHO MLIEKA

1. Rozsah

Zisťovanie kravského mlieka a kazeinátu v syroch vyrobených z ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka a zo zmesí kozieho, ovčieho a byvolieho mlieka izoelektrickým zameriavaním γ -kazeínov po plazminolýze.

2. Oblasť aplikácie

Metóda je vhodná na citlivé a špecifické zisťovanie prírodného a tepelne upraveného mlieka a kazeinátu v čerstvých a zrejúcich syroch vyrobených z ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka a zo zmesí kozieho, ovčieho a byvolieho mlieka. Nie je vhodná na zisťovanie falšovania mlieka a syra koncentrátmi tepelne upravených hovädzích srvátkových proteínov.

3. Princíp metódy

3.1. Izolácia kazeínov zo syra a referenčných štandardných roztokov.

3.2. Rozpustenie izolovaných kazeínov a vystavenie plazmínovému (EC.3.4.21.7) oddeľovaniu.

3.3. Izoelektrické zameranie plazmínovaných kazeínov za prítomnosti močoviny a farbenie proteínov.

3.4. Hodnotenie zafarbených γ_3 a γ_2 -kazeínových vzorov (dôkaz prítomnosti kravského mlieka) porovnaním vzoru získaného zo vzorky s vzormi získanými z rovnakého gélu z referenčných štandardných roztokov obsahujúcich 0% a 1% kravského mlieka.

4. Reagenty

Ak nie je uvedené inak, musia sa použiť chemikálie analytickej kvality. Voda musí byť dvojnásobne destilovaná alebo ekvivalentnej čistoty.

Poznámka: Nasledovné podrobnosti platia pre laboratórne pripravené polyakrylamidové gély obsahujúce močovinu s rozmermi 265x125x0,25 mm. Ak sa používajú iné rozmery gélu, podmienky separácie môže byť nutné upraviť.

Izoelektrické zameriavanie

4.1. Reagenty pre výrobu polyakrylamidových gélov obsahujúcich močovinu

4.1.1. Zásobný gélový roztok

Rozpusťte:

4,85 g akrylamidu

0,15 g N, N'-metylén-bis-akrylamidu (BIS)
48,05 g močoviny
15 g glycerolu (87% w/w)

vo vode, doplňte vodou do 100 ml a uskladnite vo fľaši z hnedého skla v chladničke.

Poznámka: Namiesto uvedených pevne stanovených hmotností neurotoxických akrylamidov je radšej možné použiť predmiešaný roztok akrylamidu/BIS dostupný v predaji. Ak takýto roztok obsahuje 30% w/v akrylamidu a 0,8% w/v BIS, namiesto uvedených presne stanovených hmotností sa na vytvorenie roztoku musí použiť 16,2 ml. Trvanlivosť zásobného roztoku je maximálne 10 dní; ak jeho vodivosť je viac ako 5 μ S, je potrebné ho deionizovať premiešaním s 2 g Amberlitu MB-3 po dobu 30 minút a potom prefiltrovať cez 0,45 μ m membránu.

4.1.2. Gélový roztok

Gélový roztok pripravte zmiešaním aditív a amfolytov so zásobným gélovým roztokom (pozri 4.1.1.)

9 ml zásobného roztoku
24 mg beta-alanínu
500 μ l amfolytu pH 3,5-9,5¹
250 μ l amfolytu pH 5-7¹⁹
250 μ l amfolytu pH 6-8¹⁹

Gélový roztok zmiešajte a odstráňte plyn po dobu dvoch až troch minút v ultrazvukovom kúpeli alebo vo vákuu.

Poznámka: Pripravte gélový roztok tesne pred jeho použitím (pozri 6.2).

4.1.3. Katalytické roztoky

4.1.3.1. N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín (Temed).

4.1.3.2. 40% w/v ammonium persulphate (PER):

Rozpusťte 800 g PER vo vode a pridajte vodu do 2 ml.

Poznámka: Vždy používajte čerstvo pripravený PER roztok.

4.2. Kontaktná kvapalina

Kerozín alebo kvapalný parafín

4.3. Anódový roztok

Vo vode rozpusťte 5,77 g kyseliny fosforečnej (85% w/w) a pridajte vodu do 100 ml.

4.4. Katódový roztok

¹ Osobitne vhodnými na dosiahnutie požadovanej separácie γ -kazeínov sa ukázali produkty Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) a Resolyte® pH 5-7 a pH 6-8 (BDH, Merck).

Vo vode rozpustíte 2 g hydroxidu sodného a pridajte vodu do 100 ml.

Príprava vzorky

4.5. Reagenty na izoláciu proteínu

4.5.1. Rozpusťte kyselinu octovú (25 ml ľadovej kyseliny octovej doplňte vodou do 100 ml.)

4.5.2. Dichlórometán

4.5.3. Acetón

4.6. Ustálený roztok rozpúšťajúci proteíny

Rozpusťte

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

24,03 g močoviny

250 mg dithiothreitolu

vo vode a doplňte do 50 ml.

Poznámka: Skladujte v chladničke, maximálna trvanlivosť je jeden týždeň.

4.7. Reagenty pre plazmínové oddelenie kazeínov

4.7.1. Ustálený roztok uhličitanu amónneho

Titrujte roztok 0,2 mol/l hydrogénuhličitanu amónneho (1,58g / 100 ml vody) obsahujúci 0,05 mol/l kyseliny tetraetyléndiaminoctovej (EDTA, 1,46 g/100 ml) s 0,2 mol/l roztokom uhličitanu amónneho (1,92 g / 100 ml vody) obsahujúcim 0,05 mol/l EDTA na pH 8.

4.7.2. Hovädzí plazmín (EC.3.4.21.7), aktivita minimálne 5 U/ml.

4.7.3. Roztok kyseliny epsilon-aminokapronovej na inhibíciu enzýmov.

Rozpusťte 2,624 kyseliny epsilon-aminokapronovej (kyselina 6-amino-n-hexánová) v 100 ml 40% (v/v) etanolu.

4.8. Štandardné roztoky

4.8.1. Certifikované referenčné štandardné roztoky zmesi syridlom upraveného odstredeného ovčieho a kozieho mlieka obsahujúceho 0% a 1% kravského mlieka sú dostupné v Inštitúte komisie pre referenčné materiály a merania (adresa: Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440 Geel, Belgium).

4.8.2. Príprava dočasných laboratórnych štandardných roztokov pre syridlom upravené byvolie mlieko obsahujúce 0% a 1% kravského mlieka.

Odstredené mlieko sa pripraví odstredením buď byvolieho alebo kravského surového mlieka pri parametroch 37°C, 2500 g, 20 minút. Po rýchlom ochladení skúmavky a jej obsahu na 6 až 8°C sa úplne odstráni horná vrstva tuku. Na prípravu 1% štandardného roztoku, pridajte do 495 ml byvolieho odstredeného mlieka 5 ml kravského odstredeného mlieka v 1 l vaničke, pridaním roztoku kyseliny mliečnej (10% w/v) upravte pH na 6,4. Upravte teplotu na 35°C a pridajte 100 µl tel'acieho syridla (aktivita syridla 1:10000, c. 3000 U/ml), miešajte 1 minútu a nádobu zakrytú hliníkovou fóliou nechajte stáť 1 hodinu pri teplote 35°C, aby sa vytvoril emar. Po vytvorení emaru celé syridlom upravené mlieko vysušte mrazom bez predošlej homogenizácie alebo zliatia srvátky. Po sušení je roztok vhodný na vytvorenie homogénneho prášku. Na prípravu 0% štandardného roztoku uskutočnite rovnaký postup s použitím pravého byvolieho odstredeného mlieka. Štandardné roztoky sa musia skladovať pri teplote -20°C.

Poznámka: Pre prípravou štandardného roztoku je vhodné skontrolovať čistotu byvolieho mlieka izoelektrickým zameraním kazeínov ošetrovaných plazmínom.

Reagenty na farbenie proteínov

4.9. Ustaločovač

Vo vode rozpustíte 150 g kyseliny trichlorooctovej a doplňte na 1000 ml.

4.10. Roztok na odfarbovanie

Rozriedte 500 ml metanolu a 200 ml ľadovej kyseliny octovej na 2000 ml s destilovanou vodou.

Poznámka: Roztok na odfarbovanie pripravte každý deň čerstvý; dá sa pripraviť zmiešaním rovnakých objemov zásobných roztokov 50% (v/v) metanolu a 20% (v/v) ľadovej kyseliny octovej.

4.11. Roztoky na farbenie

4.11.1. Roztok na farbenie (zásobný roztok 1)

Rozpusťte 3 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) v 1000 ml 90% (v/v) metanolu použitím mechanického miešača (približne 45 minút), prefiltrujte cez dva strednorýchlostné zložené filtre.

4.11.2. Roztok na farbenie (zásobný roztok 2)

V 1000 ml 20% (v/v) kyseliny octovej rozpustíte 5 g pentahydrátu sulfátu meďnatého.

4.11.3. Roztok na farbenie (pracovný roztok)

Ihneď pred farbením zmiešajte 125 ml z oboch zásobných roztokov (4.11.1, 4.11.2.).

Poznámka: Roztok na farbenie by mal byť pripravený v deň použitia.

5. Vybavenie

5.1. Sklenené doštičky (265x125x4 mm); gumový valček (šírka 15 cm); vyrovnávací tabuľka.

5.2. Fólia na gél (265x125 mm).

5.3. Krycia fólia (280x125 mm). Na oba dlhé konce upevnite pás lepiacej pásky (280x6x0,25mm) (pozri obrázok 1).

5.4. Elektrozameriavacia komora s chladiacou doskou (napr. 265x125 mm) a vhodným zdrojom energie (? 2,5kV) alebo automatické elektroforézne zariadenie.

5.5. Cirkulačný kryostat s termostatickou kontrolou na $12 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

5.6. Odstredivka nastaviteľná na 3000 g.

5.7. Elektródy (? 265mm dlhé).

5.8. Plastické ponorné fľaše na anódový a katódový roztok.

5.9. Aplikátory vzoriek (10x5 mm, viskózový papier alebo papier s nízkou absorpciou proteínov).

5.10. Nožnice, skalpely a pinzety z nerezovej ocele.

5.11. Misky zo skla alebo nerezovej ocele na farbenie a odfarbovanie (napr. 280x150 mm podnosy na nástroje).

5.12. Nastaviteľný tyčový homogenizér (priemer hriadeľa 10 mm), rozsah rpm 8000 až 20000.

5.13. Magnetický miešač.

5.14. Ultrazvukový kúpeľ.

5.15. Zváračka filmu.

5.16. 25 μl mikropipety.

5.17. Vákuový koncentrátor alebo mrazový sušič.

5.18. Termostaticky kontrolovaný vodný kúpeľ, nastaviteľný na 35 a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, s možnosťou pretrepania.

5.19. Densitometer na hodnoty $\lambda = 634$ nm.

6. Postup

6.1. Príprava vzorky

6.1.1. Izolácia kazeínov

Odvážte 5 g suchého syra alebo referenčných roztokov do 100 ml odstredovacej skúmavky, pridajte 60 ml destilovanej vody a homogenizujte tyčovým homogenizérom (8000 až 10000 rpm). Hodnotu pH upravte na 4,6 rozpustenou kyselinou octovou (4.5.1.) a odstred'ite (5 minút, 3000 g). Zlejte tuk

a srvátku, rezíduum homogenizujte pri 20000 rpm v 40 ml destilovanej vody s pH upraveným na 4,5 rozpustenou kyselinou octovou (4.5.1.), pridajte 20 ml dichlórometánu (4.5.2.), opäť homogenizujte a odstredíte (5 minút, 3000 g). Stierkou odstráňte vrstvu kazeínu, ktorá sa nachádza medzi vodnou a organickou vrstvou (pozri obrázok 2) a zlejte obe vrstvy. Kazeín rehomogenizujte v 40 ml destilovanej vody (pozri vyššie) a 20 ml dichlórometánu (4.5.2.) a odstredíte. Tento postup opakujte pokým nebudú obe extrakčné vrstvy bezfarebné (dva až trikrát)- Proteínové rezíduum homogenizujte s 50 ml acetónu (4.5.3.) a prefiltrujte cez strednorýchlostný zložený filtračný papier. Rezíduum z filtra zmyte dvoma osobitnými 25 ml dávkami acetónu a nechajte vyschnúť na vzduchu alebo prúdom dusíka, a potom ho rozdrvte na jemný prášok v maziari.

Poznámka: Suché izoláty kazeínu je potrebné skladovať pri -20°C.

6.1.2. Plazmínové delenie beta-kazeínov na intenzifikáciu γ -kazeínov

V 0,5 ml ustáleného roztoku uhličitanu amónneho (4.7.1.) rozpusťte 25 mg izolovaných kazeínov (6.1.1.) a 20 minút homogenizujte napr. použitím ultrazvuku. Zohrejte na 40°C a pridajte 10 μ l plazmínu (4.7.2.), zmiešajte a inkubujte 1 hodinu pri teplote 40°C za stáleho pretrepávania. Na inhibovanie enzýmu pridajte 20 μ l roztoku kyseliny epsilonaminokapronovej (4.7.3.), pridajte 200 mg pevnej močoviny a 2 mg ditiotreitolu.

Poznámka: Na dosiahnutie väčšej symetrie v zameraných kazeínových pásoch je vhodné roztok po pridaní kyseliny epsilonaminokapronovej mrazom vysušiť a rezíduá potom rozpustiť v 0,5 ml ustáleného roztoku rozpúšťajúceho proteíny (4.6.)

6.2. Príprava močoviny obsahujúcej polyakrylamidové gély

Pomocou niekoľkých kvapiek vody umiestnite fóliu na gél (5.2.) na sklenenú doštičku (5.1.) a prebytočnú vodu odstráňte papierovým obrúskom. Na ďalšiu doštičku umiestnite rozpernú vložku (0,25 mm) rovnakým spôsobom kryciu fóliu (5.3.). Doštičku horizontálne umiestnite na vyrovnávaciu tabuľku.

Do pripraveného a odvdzdušeného gélového roztoku (4.1.2.) pridajte 10 μ l Temedu (4.1.3.1.), premiešajte a pridajte 10 μ l roztoku PER (4.1.3.2.), dôkladne premiešajte a ihneď rovnomerne vylejte do stredu krycej fólie. Jeden okraj fólie na gél položte na kryciu fóliu a pomaly ju spustite tak, aby sa medzi doštičkami vytvoril rovnomerný gélový film bez bubliniek (obrázok 3). Opatrne spustite fóliu na gél použitím tenkej stierky a na vrch ako závažie umiestnite ďalšie tri sklenené doštičky. Po ukončení polymerizácie (približne 60 minút) presuňte polymerizovaný gél na fóliu na gél spolu s krycou fóliou naklonením sklenených doštičiek. Opačnú stranu fólie na gél pozorne očistite, aby ste odstránili gélové rezíduá a močovinu. Gélový "sendvič" upevnite do filmovej rúrky a uskladnite v chladničke (maximálne šesť týždňov).

Poznámka: Krycia fólia s rozpernou vložkou sa dá znovu použiť. Polyakrylamidový gél sa môže rozdeliť na menšie kúsky, čo sa odporúča ak je len málo vzoriek alebo ak sa používa automatické elektroforézne zariadenie (dva gély s rozmermi 4,5x5 cm).

6.3. Izoelektrické zameriavanie

Chladiaci termostat nastavte na 12°C. Opačnú stranu fólie na gél očistite kerozínom, potom kvapnite niekoľko kvapiek kerozínu (4.2.) do stredu chladiaceho bloku. Potom naň položte gélový sendvič, vyhnite sa prítom tvorbe bubliniek. Prebytočný kerozín odstráňte a odložte kryciu fóliu. Elektródové

pásky ponorte do elektródových roztokov (4.3., 4.4.), odrežte na dĺžku gélu a umiestnite na dané miesta (vzdialenosť elektród - 9,5 cm).

Podmienky izoelektrického zameriavania:

6.3.1. Rozmery gélu 265x125x0,25 mm

Krok	Čas (min.)	Voltáž (V)	Prúd (mA)	Výkon (W)	Volthodiny (Vh)
1. predzameriavanie	30	maximálne 2500	maximálne 15	konštantne 4	c. 300
2. zameriavanie vzorky ¹	60	maximálne 2500	maximálne 15	konštantne 4	c. 1000
3. konečné zameriavanie	60	maximálne 2500	maximálne 5	maximálne 20	c. 3000
	40	maximálne 2500	maximálne 6	maximálne 20	c. 3000
	30	maximálne 2500	maximálne 7	maximálne 25	c. 3000

¹ Aplikácia vzorky: po predzameriavaní (krok 1), pipetujte 18 µl vzorky a štandardného roztoku na aplikátory vzorky (10x5 mm), umiestnite ich na gél v 1 mm intervaloch od seba a 5 mm pozdĺžne od anódy a zľahka pritlačte. Zameriavanie uskutočnite pri horeuvedených podmienkach, po 60 minútach zameriavania vzorky opatrne odstráňte aplikátory vzorky.

Poznámka: Ak sa zmení hrúbka alebo šírka gélov, hodnoty prúdu a výkonu je potrebné vhodne upraviť (napr. dvojnásobok hodnoty pre elektrický prúd a výkon ak sa používa gél s rozmermi 265x125x0,5 mm).

6.3.2. Príklad nastavenia pre automatické elektroforézne zariadenie (2 gély, 5x4,5 cm), elektródy bez pásov sa aplikujú priamo na gél.

Krok	Voltáž	Prúd	Výkon	Teplota	Volthodiny
1. predzameriavanie	1000 V	10 mA	3,5 W	8°C	85 Vh
2. zameriavanie vzorky	250 V	5 mA	2,5 W	8°C	30 Vh
3. zameriavanie	1200 V	10 mA	3,5 W	8°C	80 Vh
4. zameriavanie	1500 V	5 mA	7 W	8°C	570 Vh

Aplikátor vzorky vložte pri kroku 2 pri 0 Vh.

Aplikátor vzorky odložte pri kroku 2 pri 30 Vh.

6.4. Farbenie proteínov

6.4.1. Ustálenie proteínov

Ihneď po vypnutí zariadenia odstráňte elektródové pásky a gél ihneď vložte do misky na farbenie/odfarbovanie naplnenej 200 ml ustáľovačom (4.9.), za stáleho pretrepávania odložte na 15 min.

6.4.2. Umývanie a farbenie gélovej doštičky

Dôkladne odstráňte ustáľovač a gélovú doštičku umyte dvakrát po 30 sekúnd so 100 ml roztokom na odfarbovanie (4.10). Odlejte roztok na odfarbovanie a misku naplňte 250 ml roztokom na farbenie (4.11.3.); jemným pretrepávaním nechajte farbiť po dobu 45 minút.

6.4.3. Odfarbenie gélovej doštičky

Odlejte roztok na farbenie, gélovú doštičku dvakrát umyte použitím 100 ml roztoku na odfarbovanie (4.10.), potom potrepte s 200 ml roztoku na odfarbovanie po dobu 15 minút a odfarbovací postup opakujte najmenej dva alebo trikrát, pokiaľ nie je pozadie čisté a bezfarebné. Potom gélovú doštičku opláchnite destilovanou vodou (2x2 minúty) a nechajte vysušiť na vzduchu (2 až 3 hodiny) alebo sušičom na vlasy (10 až 15 minút).

Poznámka 1: Ustálenie, umývanie, farbenie a odfarbovanie vykonajte pri teplote 20°C. Vyššie teploty nepoužívajte.

Poznámka 2: Ak sa uprednostní citlivejšie strieborné farbivo (napr. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code No. 17-1150-01), kazeínové vzorky ošetrené plazmínom sa musia rozpúšťať na 5 mg/ml.

7. Hodnotenie

Hodnotenie sa uskutočňuje porovnaním vzorov proteínov neznámej vzorky s referenčným štandardným roztokom na rovnakom géli. Zisťovanie kravského mlieka v syroch z ovčieho mlieka, kozieho mlieka, byvolieho mlieka a zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka sa uskutočňuje cez γ_3 a γ_2 -kazeíny, ktorých izoelektrické body sa pohybujú medzi pH 6,5 a pH 7,5 (obrázky 4 a, b, obrázok 5). Detekčný limit je menej ako 0,5%.

7.1. Vizuálny odhad

Pri vizuálnom hodnotení množstva kravského mlieka je na dosiahnutie rovnakej úrovne intenzity ovčích, kozích a/alebo byvolích γ_3 a γ_2 -kazeínov (pozri hodnoty γ_2 E,G,B a γ_3 E,G,B na obrázkoch 4 a, b, a obrázku 5) vhodné upraviť koncentrácie vzoriek a štandardných roztokov. Potom je možné množstvo kravského mlieka (menej ako, rovné a viac ako 1%) v neznámej vzorke odhadnúť priamo porovnaním intenzity kravských γ_3 a γ_2 -kazeínov (pozri hodnoty γ_2 C a γ_3 C na obrázkoch 4 a, b, a obrázku 5) s 0% a 1% referenčnými štandardnými roztokmi (ovčie, kozie) alebo dočasnými laboratórnymi štandardnými roztokmi (byvolie).

7.2. Denzitometrický odhad

Ak je to možné, na stanovenie pomeru plochy vrcholu kravských k ovčím, kozím a/alebo byvolím γ_3 a γ_2 -kazeínom použite denzitometriu (5.19.) (pozri obrázok 5). Túto hodnotu porovnajte s pomerom plochy vrcholu γ_3 a γ_2 -kazeínov 1% referenčného štandardného roztoku (ovčie, kozie) alebo dočasného laboratórneho štandardného roztoku (byvolie) analyzovanými na rovnakom géli.

Poznámka: Metóda funguje uspokojivo, ak je jasný pozitívny signál pre oba kravské γ_3 a γ_2 -kazeíny v 1% referenčnom štandardnom roztoku ale nie v 0% referenčnom štandardnom roztoku. Ak nie, postup optimalizujte presným sledovaním jeho krokov.

Vzorka sa hodnotí ako pozitívna ak sa oba kravské γ_3 a γ_2 -kazeíny alebo zodpovedajúce pomery plochy vrcholu rovnajú alebo sú väčšie ako úroveň 1% referenčného štandardného roztoku.

8. Zdroje

1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., DiLucca A., Bocca A.: *Použitie plazmínu na zvýšenie citlivosti zisťovania kravského mlieka v ovčom a/alebo kozom syre gélovým izoelektrickým zameriavaním g²-kazeínov*. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Moio L., Chianese L., Spagna Musso S., Bocca A., DelGiovine L.: *Kontrolná metóda na zisťovanie kravského mlieka v ovčom a byvolom syre použitím imunoblotácie*. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: *Citlivé zisťovanie kravského mlieka v ovčom a kozom mlieku a syre nosičom amfolytu - a nosičom amfolytu/imobilizovaným pH spádom - izoelektrické zameriavanie g-kazeínov použitím plazmínu ako signálneho zosilňovača*. v: *Electrophoresis-Forum 89* (B.J. Radola, ed.) str. 389-393., Bode Verlag, Mníchov (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: *Zisťovanie kravského mlieka v ovčom a kozom mlieku alebo syre použitím izoelektrického zameriavania polyakrylamidových gélov s obsahom močoviny*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: *Izoelektrické zameriavanie na veľmi tenkých vrstvách 50-100mm polyakrylamidových gélov na silanizovanom skle alebo polyesterových filmoch*. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

Obrázok 1: Schematický náčrt krycej fólie

spacer tape = oddeľovací pás
polyester sheet = polyesterová fólia

Obrázok 2: Kazeínová vrstva medzi vodnou a organickou vrstvou po odstred'ovaní

Obrázok 3: Postup vytvorenia veľmi tenkých polyakrilamidových gélov

a = oddeľovací pás (0,25 mm); b = krycia fólia (5.3.); c, e = sklenené doštičky (5.1.); d = gélový roztok (4.1.2.); f = fólia na gél (5.2.)

Obrázok 4a: Izoelektrické zameriavanie kazeínov ošetrovaných plazmínom z ovčieho a kozieho syra obsahujúcich rôzne množstvá kravského mlieka.

% CM - percento kravského mlieka, C = krava, E = ovca, G = koza

znázornená je horná časť izoelektricky zameraného gélu

Obrázok 4b: Izoelektrické zameriavanie kazeínov ošetrovaných plazmínom zo syra vyrobeného zo zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka s obsahom rôznych množstiev kravského mlieka.

% CM = percento kravského mlieka; 1+ = vzorka obsahujúca 1% kravského mlieka s pridaním čistého kravského kazeínu v strede stopy; C = krava, E = ovca, G = koza, B = byvol.

Znázornená je celková separačná vzdialenosť izoelektricky zameraného gélu.

Obrázok 5: Preloženie denzitogramov štandardných roztokov (STD) a vzoriek syra vyrobeného zo zmesi ovčieho a kozieho mlieka po izoelektrickom zameraní.

a,b = štandardné roztoky obsahujúce 0 a 1% kravského mlieka, c-g = vzorky syra obsahujúce 0,1,2,3 a 7% kravského mlieka, C = krava, E = ovca, G = koza.

Horná časť izoelektricky zameraného gélu bola meraná pri $\lambda = 634$ nm.

2001

Príloha XVI

(Článok 11)

REFERENČNÁ METÓDA NA ZISŤOVANIE KOLIFORIEM V MASLE, ODSSTREDENOM MLIEKU V PRÁŠKU, KAZEÍNE A KAZEINÁTOCH

Ak sa na prítomnosť koliforiem testuje maslo, do kultúry sa zaočkujú vzorky zodpovedajúce 1 g masla.

Ak sa na prítomnosť koliforiem testujú odstredenú mlieko v prášku alebo kazeín/kazeináty, do kultúry sa zaočkujú vzorky s hmotnosťou 0,1 g.

Aplikuje sa norma IDF 73A:1985, metóda B s nasledovnými modifikáciami:

1) Príprava vzorky je podľa normy IDF 122B:1992. Pre kyslý kazeín sa môže tiež použiť postup prípravy vzorky popísaný v norme IDF 73A:1985.

2) Inkubujú a hodnotia sa len skúmavky so zaočkovanými vzorkami s hmotnosťou 1 g (maslo) alebo 0,1 g (odstredenú mlieko v prášku, kazeín/kazeináty). Nerobia sa žiadne iné roztoky.

Hodnotenie výsledkov

Tri negatívne výsledky:

Požiadavka splnená

Dva alebo tri pozitívne výsledky:

Požiadavka nespĺnená

Dva negatívne výsledky:

Analyzujú sa dve ďalšie vzorky s hmotnosťou 1 g (maslo) alebo 0,1 g (odstredenú mlieko v prášku, kazeín/kazeináty).

Ak sú posledné dva výsledky negatívne, požiadavka je splnená, v opačnom prípade požiadavka splnená nie je.

Poznámka

Obsah koliforiem: v priemere 1/10 g pre maslo; 1/g pre odstredenú mlieko v prášku, kazeín/kazeináty.

Výsledky naznačujúce splnenie požiadavky sa získavajú s pravdepodobnosťou 93%.

Obsah koliforiem: 1/g pre maslo; 1/0,1 g pre odstredenú mlieko v prášku, kazeín/kazeináty.

Výsledky naznačujúce splnenie požiadavky sa získavajú s pravdepodobnosťou 91%.

METÓDA STANOVENIA OBSAHU LAKTÓZY VO VÝROBKOCH SPADAJÚCICH POD KÓD CN 2309¹

ČASŤ I

1. Oblasť aplikácie

Metóda sa aplikuje v prípadoch, kedy obsah laktózy presahuje 0,5%.

2. Princíp

Rozpusťte cukry vo vode. Umožnite pôsobenie kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*); to ponechá laktózu v neporušenom stave. Po prečistení a filtrácii stanovte Luff-Schoorlovou metódou obsah laktózy v tomto roztoku.

3. Reagenty

Tiosulfát sodný 0,1N

Indikátor: roztok škrobu. Do 1 litra vriacej vody pridajte 5 g rozpustného škrobu (ako ochranné činidlo sa môže použiť 10 mg jodidu ortuťnatého) a 30 ml vody; zmes ponechajte vo vare po dobu troch minút; nechajte vychladnúť.

Roztok jodidu draselného AR pri 30% (w/v)

Roztok kyseliny sírovej 6N

Luff-Schoorlov reagent:

(a) v 100 ml vody rozpusťte 25 g bezželezitého pentahydrátu sulfátu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

(b) v 50 ml vody rozpusťte 50 g monohydrátu kyseliny citrónovej ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

(c) v približne 300 horúcej vody rozpusťte 143,8 g anhydričného uhličitanu sodného (Na_2CO_3) a nechajte vychladnúť.

Do (c) pridajte (b), mierne pretrepte a pridajte (a). Doplňte do 1 litra, nechajte cez noc postáť a potom prefiltrujte. Skontrolujte normálnosť takto získaného reagentu (Cu 0,1N, Na_2CO_3 2N). hodnota pH musí byť približne 9,4.

Carrezov I roztok: vo vode rozpusťte 23,8 g $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej a doplňte do 100 ml.

Carrezov II roztok: vo vode rozpusťte 10,6 g $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a doplňte do 100 ml.

Zrnká pemzy, ošetrované vo vare kyselinou chlorovodíkovou kyselinou, umyté vodou a vysušené. Suspenzia *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g čerstvých kvasiniek v 100 ml vody (v chladničke skladujte maximálne jeden týždeň).

¹ Nariadenie (EEC) č. 222/88.

4. Postup

Na najbližší 1 mg odvážte 1 g vzorky určenej na analýzu; umiestnite ju do kalibrovanej 100 ml banky. Pridajte 25 až 30 ml vody. Banku umiestnite do vriaceho vodného kúpeľa na 30 minút, potom ju nechajte vychladnúť na približne 35°C.

Pridajte 5 ml kvasinkovej suspenzie¹ a pretrepte. Kalibrovanú banku a jej obsah nechajte vo vodnom kúpeli pri teplote 38 až 40°C po dobu dvoch hodín.

Po fermentácii ju ochlaďte na teplotu približne 20°C. Pridajte 2,5 ml Carrezovho I roztoku a pretrepte po dobu 30 sekúnd; potom pridajte 2,5 ml Carrezovho II roztoku a opäť pretrepte po dobu 30 sekúnd. Doplnite vodou do 100 ml, premiešajte a filtrujte. Pipetujte maximálne 25 ml filtrátu, najlepšie s obsahom 40 až 80 mg laktózy; podľa potreby doplnite vodou do 25 ml a Luff-Schoorlovou metódou stanovte obsah anhydickej laktózy.

Uskutočnite aj slepý test len s kvasinkami.

¹ Pre produkty obsahujúce viac ako 40% fermentovateľného cukru pridajte väčšie množstvo suspenzie.

1. Stanovenie obsahu laktózy Luff-Schoorlovou metódou

Pipetujte 25 ml Luff-Schoorlovho reagentu a vložte ho do 300ml Erlenmeyerovej banky; pridajte presne 25 ml prečisteného roztoku.

Po pridaní dvoch zrníek pemzy zohrejte, ručne pretrepávajte nad otvoreným ohňom priemernej výšky a kvapalinu uveďte do varu na približne 2 minúty. Erlenmeyerovu banku ihneď umiestnite na drôtené pletivo s azbestovou doskou, pod ktorým bol predtým zapálený oheň. Toto reguluje zahrievanie výlučne dna Erlenmeyerovej banky; potom nasadíte kondenzátor so spätným tokom. Od toho okamihu varte presne desať minút. Ihneď nechajte ochladiť v studenej vode a po približne piatich minútach testujte nasledovne:

Do kvapaliny pridajte 10 ml jodidu draselného a ihneď potom, ale opatrne (keďže môže dôjsť k vytvoreniu veľkej peny), pridajte 25 ml kyseliny sírovej 6N.

Testujte tiosulfát sodný pokým sa neobjaví tmavožltá farba a ku koncu testu pridajte indikátor škrobu.

Rovnaký test vykonajte so zmesou presne 25 ml Luff-Schoorlovho reagentu a 25 ml vody po pridaní 10 ml jodidu draselného a 25 ml kyseliny sírovej 6N, tento krát bez varenia.

Použitím nasledovnej tabuľky stanovte množstvo laktózy v mg zodpovedajúce rozdielu medzi výsledkami oboch testov (vyjadrené v ml tiosulfátu sodného 0,1N).

Tabuľka

Tabuľka pre 25 ml Luff-Schoorlovho reagentu (pozri podmienky uvedené v texte)

1. Tiosulfát sodný 0,1 N

2. Laktóza C₁₂H₂₂O₁₁

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

11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
		3,8	23	88,0	4,1

ZISŤOVANIE PRÍTOMNOSTI SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V ODSSTREDENOM MLIEKU V PRÁŠKU URČENOM NA VEREJNÉ SKLADOVANIE STANOVENÍM GLYKOMAKROPEPTIDOV VYSOKOVÝKONNOU KVAPALNOU CHROMATOGRAFIOU (HPLC)

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Táto metóda umožňuje zisťovanie prítomnosti syridlovej srvátky v odstredenom mlieku v prášku určenom na verejné skladovanie zistením obsahu glykomakropeptidov.

2. Zdroj

Medzinárodná norma ISO 707 - Mlieko a mliečne výrobky - metódy odberu vzoriek, v súlade s pokynmi uvedenými v poslednom odseku prílohy I(2)(c).

3. Definícia

Obsah glykomakropeptidov v odstredenom mlieku v prášku: obsah látok stanovený metódou popísanou nižšie, vyjadrený ako percento hmotnosti.

4. Princíp

- Obnovenie odstredeného mlieka v prášku, odstránenie tuku a proteínov trichloroctovou kyselinou, nasledované odstredením;
- Stanovenie množstva glykomakropeptidov (GMP) v látke vysokovýkonnou kvapalnou chromatografiou (HPLC);
- Hodnotenie výsledkov získaných pre vzorky odkazom na štandardné vzorky pozostávajúce z odstredeného mlieka v prášku s alebo bez pridania srvátkového prášku známeho percenta.

5. Reagenty

Všetky reagenty musia byť schválenej analytickej kvality. Voda musí byť destilovaná alebo aspoň ekvivalentnej čistoty.

5.1. Roztok kyseliny trichloroctovej

Vo vode rozpustíte 240 g kyseliny trichloroctovej(Cl_3COOH) a doplníte do 1000 ml.

5.2. Eluačný roztok, pH 6,0

V približne 700 ml vody rozpustíte 1,74 g hydrogénfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 12,37 g dihydrogénfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a 21,41 g sulfátu sodného (Na_2SO_4). Podľa potreby upravte pH na hodnotu 6,0 použitím roztoku kyseliny fosforečnej alebo hydroxidu draselného.

Doplňte vodou do 1000 ml a homogenizujte.

Eluačný roztok pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s priemerom pórov 0,45 μm .

5.3. Vyplachovacie rozpúšťadlo

Jeden diel acetonitrilu (CH_3CN) zmiešajte s deviatimi dielmi vody. Zmes pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s priemerom pórov $0,45\mu\text{m}$.

Poznámka: Použiť sa môže akékoľvek iné vyplachovacie rozpúšťadlo s baktericídnyim účinkom, ktoré neovplyvňuje rozlišovaciu schopnosť odmerného valca.

5.4. Štandardné vzorky

5.4.1. Odstredené mlieko v prášku vyhovujúce požiadavkám tohto nariadenia (t.j. [0]).

5.4.2. To isté odstredené mlieko v prášku upravené 5% (m/m) srvátkou v prášku syridlového typu štandardného zloženia (t.j. [5]).

6. Prístroje

6.1. Analytická váha

6.2. Odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2200 g, vybavená uzavierateľnými odstred'ovacími skúmavkami s objemom približne 25 ml.

6.3. Mechanický pretrepávač.

6.4. Magnetický miešač.

6.5. Sklenené lieviky s priemerom približne 7 cm.

6.6. Filtračné papiere so strednou filtráciou, s priemerom približne 12,5 cm.

6.7. Sklenené zariadenie na filtráciu s membránovým filtrom s priemerom pórov $0,45\mu\text{m}$.

6.8. Pipety s odmerkou umožňujúca prenos 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A, alebo ISO/R 835).

6.9. Termostatický vodný kúpeľ nastavený na $25\pm 0,5^\circ\text{C}$.

6.10. Zariadenie na HPLC pozostávajúce z

6.10.1. Čerpadla.

6.10.2. Injektora automatického alebo manuálneho s kapacitou 15 až $30\mu\text{l}$.

6.10.3. Dvoch valcov TSK 2000-SW v sérii (dĺžka 30 cm, vnútorný priemer 0,75 cm) alebo ekvivalentných valcov a predvalca (3 cm x 0,3 cm) zabalených s I125 alebo materiálom s ekvivalentnou efektívnosťou.

6.10.4. Termostatickej stĺpovej pece nastavenej na $35\pm 1^\circ\text{C}$.

6.10.5. UV detektora s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou, umožňujúceho merania pri 205 nm s citlivosťou 0,008A.

6.10.6. Integrátora umožňujúceho integráciu medzi spodnými krivkami.

Poznámka: Práca s valcami skladovanými pri izbovej teplote je možná, avšak ich rozlišovacia schopnosť je tak nižšia. V takom prípade by sa teplota mala pohybovať o menej ako $\pm 5^{\circ}\text{C}$ v každom z rozpätí analýzy.

7. Odber vzoriek

7.1. Medzinárodná norma ISO 707 - Mlieko a mliečne výrobky - metódy odberu vzoriek, v súlade s pokynmi uvedenými v poslednom odseku prílohy I(2)(c).

7.2. Vzorky uschovajte v podmienkach zabraňujúcim ich znehodnoteniu alebo zmene zloženia.

8. Postup

8.1. Príprava testovacej vzorky

Mlieko v prášku vložte do nádoby s objemom približne dvojnásobku objemu prášku vybavenej vzduchotesným vekom. Nádobu ihneď zatvorte. Prášok dobre premiešajte opakovaným prevracaním nádoby.

8.2. Testovacia vzorka

Odvážte $2,000 + 0,001$ g testovacej vzorky do odstred'ovacej skúmavky (6.2.)

8.3. Odstránenie tukov a proteínov

8.3.1. Do dávky testovacej vzorky pridajte 20 g teplej vody (50°C). Prášok rozpusťte pretrepaním po dobu piatich minút použitím mechanického pretrepávača (6.3.). Skúmavku ochlad'ite na 25°C .

8.3.2. Po dvoch minútach pridajte 10 ml roztoku kyseliny trichloroctovej za súčasného miešania magnetickým miešačom (6.4.). Skúmavku umiestnite do vodného kúpeľa (6.9.) a ponechajte na 60 minút.

8.3.3. Odstred'ite (6.2.) po dobu 10 minút pri 2200 g, alebo prefiltrujte cez papier (6.6.) a odstráňte prvých 5 ml filtrátu.

8.4. Chromatografické testovanie

8.4.1. Do prístroja na HPLC (6.10.) nastaveného na prietok 1 ml eluačného roztoku (5.2.) za minútu injektujte 15 až 30 μl presne odmeraného supernatantu alebo filtrátu (8.3.3.).

Poznámky:

1. Eluačný roztok (5.2.) počas chromatografickej analýzy udržiavajte na 85°C za účelom uchovania eluačného roztoku bez plynov a zabránenia rastu baktérií. Vykonať môžete akékoľvek preventívne kroky s podobným účinkom.
2. Valce opláchnite vodou počas každého prerušenia. Eluačný roztok (5.2.) v nich nikdy nenechávajte.

Pred každým prerušením dlhším ako 24 hodín prepláchnite valce vodou, potom ich umyte roztokom (5.3.) po dobu najmenej troch hodín pri prietoku 0,2 ml za minútu.

8.4.2. Výsledky chromatografickej analýzy testovacej vzorky (E) sa získajú vo forme chromatogramu, v ktorom je vrchol označený časom viazania RT nasledovne:

Vrchol II: Druhý vrchol chromatogramu s RT približne 12,5 minút.

Vrchol III: Tretí vrchol chromatogramu zodpovedajúci GMP s RT $15,5 \pm 1,0$ minút.

Vrchol IV: Štvrtý vrchol chromatogramu s RT približne 17,5 minúty.

Kvalita valcov môže pri jednotlivých vrcholoch ovplyvniť čas viazania.

Integrátor (6.10.6.) automaticky vypočíta plochu A jednotlivých vrcholov:

A_{II} : plocha vrcholu II,

A_{III} : plocha vrcholu III,

A_{IV} : plocha vrcholu IV.

Pred kvantitatívnou interpretáciou je dôležité preskúmať vzhľad každého chromatogramu za účelom zistenia akýchkoľvek abnormalít zapríčinených buď poruchou prístroja alebo valcov alebo pôvodom a povahou analyzovanej vzorky.

V prípade pochybností analýzu zopakujte.

8.5. Kalibrácia

8.5.1. Na štandardných vzorkách (5.4.) použite postup popísaný v bodoch 8.2. až 8.4.2.

Použite čerstvo pripravené roztoky, pretože GMP v 8% trichloroetovom prostredí degradujú. Strata sa odhaduje na 0,2% za hodinu pri 30°C.

8.5.2. Pred chromatografickou analýzou vzoriek pripravte valce opakovanou injektážou štandardnej vzorky (5.4.2.) do roztoku (8.5.1.) pokým plocha a čas viazania vrcholy zodpovedajúceho GMP nie sú konštantné.

8.5.3. Injektovaním rovnakého množstva filtrátov (8.5.1.) ako pri vzorkách stanovte reakčné faktory R.

9. Výpočet výsledkov

9.1. Metóda výpočtu a vzorce

9.1.1. Výpočet reakčných faktorov R:

Vrchol II: $R_{II} = 100 / A_{II}[0]$

Vrchol IV: $R_{IV} = 100 / A_{IV} [0]$

pričom:

R_{II} a R_{IV} = reakčné faktory vrcholov II a IV,

$A_{II}[0]$ a $A_{IV} [0]$ = plochy vrcholov II a IV štandardnej vzorky [0] získané v bode 8.5.3.

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

pričom

R_{III} = reakčný faktor vrcholu III

$A_{III} [0]$ a $A_{III} [5]$ = plochy vrcholu III štandardných vzoriek [0] a [5] získané v bode 8.5.3.

W = množstvo srvátky v štandardnej vzorke [5], t.j. 5.

9.1.2. Výpočet relatívnej plochy vrcholov vo vzorke (E)

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

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

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

pričom:

$S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = relatívne plochy vrcholov II, III a IV vzorky [E]

$A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$, $A_{IV} [E]$ = plochy vrcholov II, III a IV vzorky [E] získané v bode 8.4.2.

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = reakčný faktor vypočítaný v bode 9.1.1.

9.1.3. Výpočet relatívneho času viazania vrcholu III vzorky [E]

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

pričom:

$RRT_{III}[E]$ = relatívny čas viazania vrcholu III vzorky [E]

$RT_{III}[E]$ = čas viazania vrcholu III vzorky [E] získaný v bode 8.4.2.

$RT_{III}[5]$ = čas viazania vrcholu III kontrolnej vzorky získaný v bode 8.5.3.

9.1.4. Pokusy ukázali, že existuje lineárny vzťah medzi relatívnym časom viazania vrcholu III, t.j. $RRT_{III}[E]$ a percentom srvátky v prášku do 10%.

- $RRT_{III}[E]$ je < 1000 ak je obsah srvátky > 5%;
- $RRT_{III}[E]$ je ? 1000 ak je obsah srvátky ? 5%.

Povolená odchýlka pre hodnoty RRT_{III} je $\pm 0,002$.

Hodnota $RRT_{III}[E]$ sa zvyčajne mierne odchyľuje od 1034. V závislosti od stavu valcov môže táto hodnota dosiahnuť 1000 ale musí byť vždy väčšia.

9.2. Výpočet percenta syridlovej srvátky v prášku vo vzorke:

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

pričom

W = percento m/m syridlovej srvátky vo vzorke [E];

$S_{III}[E]$ = relatívna plocha vrcholu III testovacej vzorky [E] získaná podľa bodu 9.1.2.;

1,3 = predstavuje priemernú relatívnu plochu vrcholu III vyjadrenú v gramoch syridlovej srvátky na 100 g v nefalšovanom odstredenom mlieku v prášku rôzneho pôvodu. Táto hodnota bola dosiahnutá pokusne.

$S_{III}[0]$ predstavuje relatívnu plochu vrcholu III rovnú $R_{III} \times A_{III}[0]$. Tieto hodnoty boli získané v bodoch 9.1.1. a 8.5.3.

$(S_{III}[0] - 0,9)$ predstavuje korekciu, ktorú treba urobiť pre priemernú relatívnu plochu 1,3 ak sa $S_{III}[0]$ nerovná 0,9. Pokusne sa zistilo, že priemerná relatívna plocha vrcholu III kontrolnej vzorky [0] je 0,9.

9.3. Presnosť postupu

9.3.1. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených naraz alebo rýchlo po sebe rovnakým analytikom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,2% m/m.

9.3.2 Reprodukovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch osobitných a nezávislých výpočtov získaných v dvoch rôznych laboratóriách na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,4% m/m.

9.4. Interpretácia

9.4.1. Neprítomnosť srvátky predpokladajte ak relatívna plocha vrcholu III, $S_{III}[E]$, vyjadrená v gramoch syridlovej srvátky na 100 g výrobku je $\geq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$

pričom

2,0 je maximálna hodnota povolená pre relatívnu plochu vrcholu III zohľadňujúca relatívnu plochu vrcholu III, t.j. 1,3, neistotu z dôvodu variácií v zložení odstredeneho mlieka v prášku a reprodukovateľnosti metódy (9.3.2.).

$(S_{III}[0] - 0,9)$ je korekcia, ktorú je treba urobiť ak plocha $S_{III}[0]$ je odlišná od 0,9 (pozri bod 9,2).

9.4.2. Ak je relatívna plocha vrcholu III, $S_{III}[E] > 2,0 (S_{III}[0] - 0,9)$, a relatívna plocha vrcholu II, $S_{II}[E] \geq 160$, obsah syridlovej srvátky stanovte podľa bodu 9.2.

9.4.3. Ak je relatívna plocha vrcholu III, $S_{III}[E] > 2,0 (S_{III}[0] - 0,9)$ a relatívna plocha vrcholu II, $S_{II}[E] \geq 160$, stanovte celkový obsah proteínov (P%); potom preskúmajte grafy 1 a 2.

9.4.3.1. Údaje získané po analýze vzoriek nefalšovaných odstredenej mliek v prášku s vysokým celkovým obsahom proteínov sa nachádzajú v grafoch 1 a 2.

Neprerušovaná čiara predstavuje lineárnu regresiu, ktorej koeficienty sú vypočítané podľa metódy najmenších štvorcov.

Prerušovaná čiara stanovuje horný limit relatívnej plochy vrcholu III s pravdepodobnosťou nepresiahnutia v 90% prípadov.

Rovnice pre prerušovanú čiaru v grafoch 1 a 2 sú:

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

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

pričom

S_{III} je relatívna plocha vrcholu III vypočítaná buď podľa celkového obsahu proteínov alebo podľa relatívnej plochy vrcholu $S_{II}[E]$,

P% je celkový obsah proteínov vyjadrený v percentách podľa hmotnosti,

$S_{II}[E]$ je relatívna plocha vzorky vypočítaná v bode 9.1.2.

Tieto rovnice sú ekvivalentné hodnote 1,3 uvedenej v bode 9.2.

Rozdiel (T_1 a T_2) medzi zistenou relatívnou plochou $S_{III}[E]$ a relatívnou plochou S_{III} sa vyjadruje prostredníctvom nasledovných vzorcov:

$$T_1 = \dots$$

$$T_2 = \dots$$

9.4.3.2. Ak T_1 a/alebo T_2 sú 0 alebo menej, prítomnosť syridlovej srvátky sa nedá stanoviť.

Ak T_1 a T_2 presahujú hodnotu 0, syridlová srvátka je vo vzorke prítomná.

Obsah syridlovej srvátky sa počíta podľa nasledovného vzorca:

$$W = T_2 + 0,91$$

pričom

0,91 je vzdialenosť na vertikálnej osi medzi neprerušovanou a prerušovanou čiarou.

Graf 1 Odstredené mlieko v prášku

os x - celkový obsah proteínov (%)

os y - vrchol III

Graf 2 Odstredené mlieko v prášku

os x - vrchol II

os y - vrchol III

STANOVENIE OBSAHU PEVNEJ SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V ODSTREDENOM MLIEKU V PRÁŠKU A ZMESIACH UVEDENÝCH V NARIADENÍ (EC) Č. 2799/1999

1. Účel: zistenie prídania pevnej syridlovej srvátky do

- (a) odstredeného mlieka v prášku definovaného v článku 2 nariadenia (EC) č. 2799/1999, a
- (b) zmesí definovaných v článku 4 nariadenia (EC) č. 2799/1999.

2. Zdroj: Medzinárodná norma ISO 707.

3. Definícia

Obsah pevnej syridlovej srvátky sa definuje ako percento hmotnosti stanovené podľa uvedeného postupu.

4. Princíp

V súlade s prílohou XVIII sa stanoví obsah glykomakropeptidu A. Vzorky s pozitívnymi výsledkami sa analyzujú na glykomakropeptid A vysokovýkonnou kvapalnou chromatografiou s reverznou fázou (postup HPLC). Hodnotenie výsledkov sa získa odkazom na štandardné vzorky pozostávajúce z odstredeného mlieka v prášku s a bez obsahu známeho percenta srvátky v prášku. Výsledky vyššie ako 1% (m/m) ukazujú na prítomnosť pevnej syridlovej srvátky.

5. Reagenty

Všetky reagenty musia byť schválenej analytickej kvality. Voda musí byť destilovaná alebo aspoň ekvivalentnej čistoty. Acetonitril musí byť spektroskopickkej alebo HPLC kvality.

Reagenty potrebné na tento postup sú popísané v prílohe XVIII tohto nariadenia.

Reagenty pre reverznú fázu HPLC.

5.1. Roztok kyseliny trichloroctovej

Vo vode rozpustíte 240 g kyseliny trichloroctovej (CCl_3COOH) a doplňte do 1000 ml.

5.2. Eluenty A a B

Eluent A: do 1000 ml banky dajte 150 ml acetonitrilu (CH_3CN), 20 ml izopropanolu ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) a 1,00 ml kyseliny trifluóroctovej (TFA, CF_3COOH). Doplníte vodou do 1000 ml.

Eluent B: do 1000 ml banky dajte 550 ml acetonitrilu (CH_3CN), 20 ml izopropanolu ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) a 1,00 ml TFA. Doplníte vodou do 1000 ml. Roztok pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s pórmí s priemerom 0,45 μm .

5.3. Konzervácia valca

Po analýze sa valec prepláchne eluentom B (cez spád) a následne sa prepláchne acetonitrilom (cez spád po dobu 30 minút). Valec sa skladuje v acetonitrile.

5.4. Štandardné vzorky

5.4.1. Odstredené mlieko v prášku spĺňajúce požiadavky na verejné skladovanie (t.j. (0)).

5.4.2. To isté odstredené mlieko v prášku upravené 5% (m/m) srvátkou syridlového typu v prášku štandardného zloženia (t.j. (5)).

5.4.3. To isté odstredené mlieko v prášku upravené 50% (m/m) srvátkou syridlového typu v prášku štandardného zloženia (t.j. (50)).¹

6. Prístroje

Prístroje potrebné pre tento postup sú uvedené v prílohe XVIII tohto nariadenia.

6.1.1. Analytická váha.

6.2. Odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2200 g, vybavená uzavierateľnými odstred'ovacími skúmavkami s objemom približne 50 ml.

6.3. Mechanický pretrepávač fungujúci pri 50°C.

6.4. Magnetický miešač.

6.5. Sklenené lieviky s priemerom približne 7 cm.

6.6. Filtračné papiere so strednou filtráciou, s priemerom približne 12,5 cm.

6.7. Sklenené zariadenie na filtráciu s membránovým filtrom s priemerom pórov 0,45µm.

6.8. Pipety s odmerkou umožňujúce prenos 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A, alebo ISO/R 835) alebo systém schopný prenosu 10 ml kvapaliny do dvoch minút.

6.9. Termostatický vodný kúpeľ nastavený na 25±0,5°C.

6.10. Zariadenie na HPLC pozostávajúce z:

6.10.1. Dvojitého spádového čerpaceho systému.

6.10.2. Injektora automatického alebo manuálneho s kapacitou 100 µl.

6.10.3. Valca Dupont Protein Plus (dĺžka 25 cm, vnútorný priemer 0,46 cm) alebo ekvivalentného valca založeného na pemze s veľkými pórmi pre reverznú fázu.

6.10.4. Termostatickej stĺpovej pece nastavenej na 35±1°C.

¹ Srvátka syridlového typu v prášku štandardného zloženia a tiež upravené odstredené mlieko v prášku sú dostupné u NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL –6710 BA Ede. Môžu však byť použité aj iné prášky s výsledkami ekvivalentnými NIZO práškom.

6.10.5. UV detektora s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou, umožňujúceho merania pri 210 nm (v prípade potreby sa môže použiť vyššia vlnová dĺžka do 220 nm) s citlivosťou 0,02A.

6.10.6. Integrátora umožňujúceho integráciu medzi spodnými krivkami.

Poznámka: Práca s valcom pri izbovej teplote je možná, za predpokladu teplotných výkyvov menej ako $\pm 1^{\circ}\text{C}$ v opačnom prípade dochádza k príliš veľkým variáciám času viazania GMP_A .

7. Odber vzorky

7.1. Vzorky sa musia odberať v súlade s postupom stanoveným v medzinárodnej norme ISO 707. Členské štáty však môžu použiť aj inú metódu odberu vzoriek za predpokladu, že táto je v zhode s princípmi horeuvedenej normy.

7.2. Vzorka skladujte v podmienkach vylučujúcich znehodnotenie alebo zmenu zloženia.

8. Postup

8.1. Príprava vzorky

Mlieko v prášku vložte do nádoby s objemom približne dvojnásobku objemu prášku vybavenej vzduchotesným vekom. Nádobu ihneď zatvorte. Prášok dobre premiešajte opakovaným prevracaním nádoby.

8.2. Testovacia vzorka

Odvážte $2,00 \pm 0,001$ g testovacej vzorky do odstred'ovacej skúmavky (6.2.) alebo vhodnej banky s uzáverom (50 ml).

8.3. Odstránenie tukov a proteínov

8.3.1. Do dávky testovacej vzorky pridajte 20 g teplej vody (50°C). Prášok rozpust'ete pretrepaním mechanickým pretrepávačom po dobu piatich minút alebo po dobu 30 minút v prípade kyslého cmaru (6.3.). Skúmavku vložte do vodného kúpeľa (6.9.) a nechajte vyrovnat' na 25°C .

8.3.2. Dve minúty sústavne pridávajte 10 ml roztoku kyseliny trichloroctovej (5.1.) za súčasného intenzívneho miešania magnetickým miešačom (6.4.). Skúmavku umiestnite do vodného kúpeľa (6.9.) a odložte na 60 minút.

8.3.3. Odstred'ujte (6.2.) po dobu 10 minút pri 2200 g, alebo prefiltrujte cez papier (6.6.) a odstráňte prvých 5 ml filtrátu.

8.4. Chromatografické testovanie

8.4.1. Analýzu HPLC vykonajte podľa popisu v prílohe XVIII. Ak získate negatívny výsledok, analyzovaná vzorka neobsahuje pevnú syridlovú srvátku v zistiteľných množstvách. Ak je výsledok pozitívny, musí sa vykonať postup HPLC s reverznou fázou popísaný nižšie. Prítomnosť kyslého cmaru v prášku môže zapríčiniť vznik falošných pozitívnych výsledkov. Metóda HPLC s reverznou fázou túto možnosť vylučuje.

8.4.2. Pred uskutočnením analýzy HPLC s reverznou fázou je potrebné optimalizovať spádové podmienky. Optimálnym časom viazania pre GMP_A pre spádové systémy s mŕtvym objemom 6 ml (objem od bodu, kedy sa rozpúšťadlá spoja do objemu injekčnej slučky, vrátane) je 26 ± 2 minúty. Pre spádové systémy s nižším mŕtvym objemom (napr. 2 ml) sa za optimálny čas viazania považuje 22 minút.

Vezmite roztoky štandardných vzoriek (5.4.) bez a s 50% syridlovou srvátkou.

Do prístroja HPLC nastaveného na spádové podmienky uvedené v tabuľke 1 injektujte 100 μ l supernatantu alebo filtrátu (8.3.3.).

Tabuľka 1

Podmienky predbežného spádu pre optimalizáciu chromatografie

Čas (min.)	Tok (ml/min.)	%A	%B	Krivka
počiatočný	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lineárna
32	1,0	10	90	lineárna
37	1,0	10	90	lineárna
42	1,0	90	10	lineárna

Porovnanie dvoch chromatogramov by malo odhaliť miesto vrcholu GMP_A .

Počiatočné zloženie rozpúšťadla určeného na normálny spád (pozri 8.4.3.) je možné vypočítať nasledovným vzorcom:

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

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

pričom

RT_{gmpA} : čas viazania GMP_A v predbežnom spáde

10: počiatočné %B predbežného spádu

2,5: %B v polovici mínus %B na začiatku normálneho spádu

13,5: stredný čas predbežného spádu

26: požadovaný čas viazania GMP_A .

6: pomer sklonov predbežného a normálneho spádu.

30: %B na počiatku mínus %B po 27 minútach v predbežnom spáde.

27: čas predbežného spádu.

8.4.3. Vezmite roztoky testovacích vzoriek.

Do prístroja HPLC nastaveného na prietok eluačného roztoku (5.2.) 1 ml za minútu injektujte 100 μ l presne odmeraného supernatantu alebo filtrátu (8.3.3.).

Zloženie eluentu na začiatku analýzy sa získa z bodu 8.4.2. Zvyčajne je okolo A:B = 76:24 (5.2.). Ihneď po injektáži sa začne lineárny spád, ktorý spôsobí o 5% vyššie percento B po 27 minútach. Následne sa začne lineárny spád, ktorý spôsobí v zložení eluentu zmenu na 90% B za päť minút. Toto zloženie sa udržiava po dobu piatich minút, kedy sa zloženie zmení prostredníctvom lineárneho

spádu po piatich minútach na počiatočné zloženie. V závislosti od vnútorného objemu čerpaceho systému je možné ďalšiu injeckiu uskutočniť po 15 minútach od dosiahnutia počiatočných podmienok.

Poznámky

1. Čas viazania glykomakropeptidu je 26 ± 2 minút. Toto je možné dosiahnuť upravovaním počiatočných a konečných podmienok prvého spádu. Rozdiel v %B medzi počiatočnými a konečnými podmienkami však musí zostať 5%B.
2. Eluenty by mali byť dostatočne odplynené a v takom stave by mali aj zostať. Je to dôležité pre riadne fungovanie spádového čerpaceho systému. Štandardná odchýlka času viazania vrcholu GMP by mala byť menšia ako 0,1 minúty ($n=10$).
3. Po každých piatich vzorkách sa injektuje referenčná vzorka (5), ktorá sa tiež používa na výpočet nového reakčného faktora R (9.1.1.).

8.4.4. Výsledky chromatografickej analýzy testovacej vzorky (E) sa získajú vo forme chromatogramu, v ktorom je vrchol GMP označený časom viazania približne 26 minút.

Integrátor (6.10.6) automaticky vypočíta výšku vrcholu H vrcholu GMP. V každom chromatograme je potrebné skontrolovať umiestnenie základnej čiary. Ak je základná čiara umiestnená nesprávne, analýzu alebo integráciu je potrebné opakovať.

Pred kvantitatívnou interpretáciou je dôležité preskúmať vzhľad každého chromatogramu za účelom zistenia akýchkoľvek abnormalít zapríčinených buď poruchou prístroja alebo valcov alebo pôvodom a povahou analyzovanej vzorky. V prípade pochybností analýzu zopakujte.

8.5. Kalibrácia

8.5.1. Postup popísaný v bodoch 8.2 až 8.4.4. aplikujte na štandardné vzorky (5.4.1. a 5.4.2). Použite čerstvo pripravené roztoky, pretože GMP v prostredí 8% kyseliny trichloroctovej pri izbovej teplote degraduje. Pri 4°C je roztok stabilný po dobu 24 hodín. V prípade dlhých sérií analýz je v automatickom injektore vhodné použitie schladeného podnosu na vzorky.

Poznámka

Krok 8.4.2. je možné vynechať ak %B v počiatočných podmienkach je známe z predchádzajúcich analýz.

Chromatogram referenčnej vzorky (5) by mal byť rovnaký ako na obrázku 1. Na tomto obrázku vrcholu GMP_A predchádzajú dva malé vrcholy. Je rozhodujúce dosiahnuť podobnú separáciu.

8.5.2. Pred chromatografickou analýzou vzoriek injektujte 100 μ l štandardnej vzorky bez syridlovej srvátky (0) (5.4.1.).

Chromatogram by nemal ukazovať vrchol v čase viazania vrcholu GMP_A .

8.5.3. Injektovaním rovnakého množstva filtrátu (8.5.1) ako pri vzorkách stanovte reakčné faktory R.

9. Výpočet výsledkov

9.1. Metóda výpočtu a vzorce

Výpočet reakčného faktora R:

vrchol GMP: $R = W/H$

pričom

R = reakčný faktor vrcholu GMP

H = výška vrcholu GMP

W = množstvo srvátky v štandardnej vzorke (5).

9.2. Výpočet percenta syridlovej srvátky v prášku vo vzorke

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

pričom

W(E) = percento (m/m) syridlovej srvátky vo vzorke (E)

R = reakčný faktor vrcholu GMP (9.1.1.)

H(E) = výška vrcholu GMP vzorky (E)

Pevná syridlová srvátka je prítomná ak W(E) je väčšie ako 1% a rozdiel medzi časom viazania a časom viazania v štandardnej vzorke (5) je menší ako 0,2 minúty.

9.3. Presnosť postupu

9.3.1. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených naraz alebo rýchlo po sebe rovnakým analytikom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,2% m/m.

9.3.2 Reprodukovateľnosť

Zatiaľ nebola stanovená.

9.3.3. Linearita

Od 0 do 16% syridlovej srvátky by sa mal dosiahnuť lineárny vzťah s koeficientom korelácie $> 0,99$.

9.4. Interpretácia

9.4.1. Srvátka sa považuje za prítomnú ak výsledok získaný v bode 9.2. je väčší ako 1% m/m a ak sa čas viazania vrcholu GMP od času viazania v štandardnej vzorke (5) líši o menej ako 0,2 minúty. 1% limit je stanovený v súlade s ustanoveniami bodov 9.2. a 9.4.1. prílohy V k nariadeniu (EEC) č. 625/78.

Tabuľka 1 Štandardná vzorka Ni-4,6

os x – čas (min.)

os y – absorpcia (220 nm)

ODSTREDENÉ MLIEKO V PRÁŠKU: KVANTITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU FOSFATIDYLSEŘÍNU A FOSFATIDYLETANOLAMÍNU

Metóda: HPLC s reverznou fázou

1. Účel a oblasť aplikácie

Metóda popisuje postup kvantitatívneho stanovenia obsahu fosfatidylserínu (PS) a fosfatidyletanolamínu (PE) v odstredenom mlieku v prášku (SMP) a je vhodná na zisťovanie pevného cmaru v SMP.

2. Definícia

Obsah PS + PE: hmotnostná časť látky stanovená použitím tu popísaného postupu. Výsledok sa vyjadruje v miligramoch phosphatidylethanolamine dipalitoylu (PEDP) na 100 g prášku.

3. Princíp

Extrakcia aminofosfolipidov metanolom z obnoveného mlieka v prášku. Stanovenie obsahu PS a PE ako derivátov o-ftaldialdehydu (OPA) HPLC s reverznou fázou (RP) a zisťovaním fluorescencie. Kvantifikácia obsahu PS a PE v testovacej vzorke odkazom na štandardnú vzorku obsahujúcu známe množstvo PEDP.

4. Reagenty

Všetky reagenty musia byť schválenej analytickej kvality. Voda musí byť destilovaná alebo aspoň ekvivalentnej čistoty ak nie je inak uvedené.

4.1. Štandardný materiál: PEDP, najmenej 99% čistoty

Poznámka: štandardný materiál sa musí skladovať pri teplote -18°C .

4.2. Reagenty pre prípravu štandardnej a testovacej vzorky

4.2.1. Metanol triedy HPLC.

4.2.2. Chloroform triedy HPLC.

4.2.3. Triptamín-monohydrochlorid

4.3. Reagenty pre derivatizáciu o-ftaldialdehydu

4.3.1. Hydroxid sodný, vodný roztok 12M.

4.3.2. Kyselina bórová, vodný roztok 4M upravený na pH 10 hydroxidom sodným (4.3.1).

4.3.3. 2-merkptoetanol.

4.3.4. o-ftaldialdehyd (OPA)

4.4. Rozpúšťadlá eluentu HPLC

Eluenty musia byť pripravené použitím reagentov HPLC kvality.

4.4.1. Voda HPLC kvality

4.4.2. Metanol fluorometricky testovanej čistoty

4.4.3. Tetrahydrofurán

4.4.4. Dihydrogénfosforečnan sodný

4.4.5. Octan sodný

4.4.6. Kyselina octová

5. Prístroje

5.1. Analytická váha

5.2. Vaničky s objemom 25 a 100 ml

5.3. Pipety s kapacitou 1 a 10 ml

5.4. Magnetický miešač

5.5. Pipety s odmerkou, s kapacitami 0,2, 0,5 a 5 ml

5.6. Banky so objemom 10, 50 a 100 ml

5.7. Striekačky, objem 20 a 100 μ l

5.8. Ultrazvukový kúpeľ

5.9. Odstredivka nastaviteľná na 27000 x g

5.10. Sklenené fioly s objemom približne 5 ml

5.11. Odmerný valec, objem 25 ml.

5.12. pH-meter

5.13. Vybavenie na HPLC

5.13.1. Spádový čerpací systém nastaviteľný na 1 ml/ min pri 200 bar.

5.13.2. Autosampler s derivatizačnou schopnosťou

5.13.3. Stĺpový ohrievač nastavený na 30°C.

5.13.4. Detektor fluorescencie nastavený na vlnovú dĺžku excitácie 330 nm a vlnovú dĺžku emisie 440 nm.

5.13.5. Integrátor alebo program na spracovanie dát umožňujúci meranie plochy vrcholu.

5.13.6. A Lichrosphere - 100 valec (250x4,6 mm) alebo ekvivalentný valec zabalený s oktadecilsilánom (C18), veľkosť častíc 5 µm.

6. Odber vzoriek

Odber vzoriek sa musí vykonať v súlade s normou IDF 50F:1985.

7. Postup

7.1. Príprava interného štandardného roztoku

Do 100 ml banky (5.6.) odvážte $30 \pm 0,1$ mg Triptamín-monohydrochloridu (4.2.3.) a po značku doplňte metanolom (4.2.1.). Do 10 ml banky (5.6.) pipetujte 1 ml (5.3.) tohto roztoku a doplňte po značku metanolom (4.2.1.) za účelom získania 0,15 mM koncentrácie triptamínu.

7.2. Príprava roztoku testovacej vzorky

Do 25 ml vaničky (5.2.) odvážte $1000 \pm 0,001$ g vzorky SMP. Pri 40°C pipetou (5.3.) pridajte 10 ml destilovanej vody a premiešajte magnetickým miešačom (5.4.) po dobu 30 minút za účelom rozpustenia všetkých hrudiek. Do 10 ml banky (5.6.) pipetujte 0,2 ml (5.5.) obnoveného mlieka, použitím striekačky (5.7.) pridajte 100 µl 0,15 mM roztoku triptamínu (7.1.) a doplňte metanolom (4.2.1.) Opatrne premiešajte prevracaním a vložte do ultrazvukového kúpeľa (5.8.) na 15 minút. Odstredte (5.9.) pri 27000 x g po dobu 10 minút a supernatant zozbierajte do sklenenej fioly (5.10.).

Poznámka: Roztok testovacej vzorky sa do vykonania analýzy HPLC skladuje pri teplote 4°C.

7.3. Príprava externej štandardnej vzorky.

Do 50 ml vaničky (5.2.) odvážte 55,40 mg PEDP (4.1.) a použitím odmerného valca (5.11.) pridajte približne 25 ml chloroformu (4.2.2.). Uzavretú banku zohrejte na 50°C a opatrne premiešajte pokým sa PEDP nerozpustí. Banku ochlaďte na 20°C, doplňte metanolom (4.2.1.) a premiešajte prevracaním. Do 100 ml banky (5.6.) pipetujte 1 ml (5.3.) tohto roztoku a doplňte metanolom (4.2.1.) Do 10 ml banky (5.6.) pipetujte 1 ml (5.3.) tohto roztoku, pridajte 100 µl (5.7.) 1,015 mM roztoku triptamínu a doplňte metanolom (4.2.1.). Premiešajte prevracaním.

Poznámka: Roztok referenčnej vzorky sa do vykonania analýzy HPLC skladuje pri teplote 4°C.

7.4. Príprava derivatizujúceho reagentu

Do 10 ml banky (5.6.) odvážte $25 \pm 0,1$ mg OPA (4.3.4.), pridajte 0,5 ml (5.5) metanolu (4.2.1.) a opatrne premiešajte pokým sa OPA nerozpustí. Po značku doplňte roztokom kyseliny bórovej (4.3.2.) a striekačkou (5.7.) pridajte 20 µl 2-mercaptoetanolu (4.3.3.).

Poznámka: Derivatizujúci reagent sa skladuje pri teplote 4°C v tmavej fiole a je stabilný po dobu jedného týždňa.

7.5. Analýza HPLC

7.5.1. Rozpúšťadlá eluentu (4.4)

Rozpúšťadlo A:

Roztok 0,3 mM dihydrogén fosforečnanu sodného a roztok 3 mM acetátu sodného (s pH upraveným kyselinou octovou na 6,5): metanol: tetrahydrofurán = 558:440:2 (v/v/v)

Rozpúšťadlo B:

Metanol

7.5.2. Navrhované hodnoty eluenčného spádu

Čas (min.)	Rozpúšťadlo A (%)	Rozpúšťadlo B (%)	Prietok (ml/min)
počiatočný	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

Poznámka: Za účelom dosiahnutia rozlíšenia znázorneného na obrázku 1 si eluenčný spád môže vyžadovať miernu modifikáciu.

Teplota valca: 30°C.

7.5.3. Injekčný objem: 50 µl derivatizujúceho reagentu a 50 µl roztoku vzorky.

7.5.4. Vyrovnávanie valca

Pri dennom spúšťaní systému prepláchnite valec 100 % rozpúšťadlom B po dobu 15 minút, potom nastavte pomer A:B = 40:60 a vyrovnajte pri 1 ml/min po dobu 15 minút. Vykonajte prázdne kolo injekčnou metanolu (4.2.1.).

Poznámka: Pred dlhodobým uskladnením valec prepláchnite zmesou metanolu a chloroformu v pomere 80:20 (v/v) po dobu 30 minút.

7.5.5. Stanovenie obsahu PS + PE v testovacej vzorke

7.5.6. Vykonajte postup chromatografickej analýzy pri udržaní konštantného času medzi kolami za účelom dosiahnutia konštantných časov viazania. Po každých 5-10 roztokoch testovacej vzorky injektujte externý štandardný roztok (7.3.) za účelom hodnotenia reakčného faktora.

Poznámka: Valec je potrebné každé 20-25. kolo vyčistiť prepláchnutím 100 % rozpúšťadla B (7.5.1.) najmenej po dobu 30 minút.

7.6. Stav integrácie

7.6.1. Vrchol PEDP

PEDP sa eluuje ako jeden vrchol. Plochu vrcholu stanovte integráciou medzi spodnými krivkami.

7.6.2. Vrchol tryptamínu

Tryptamín sa eluuje ako jeden vrchol (Obrázok 1). Plochu vrcholu stanovte integráciou medzi spodnými krivkami.

7.6.3. Skupiny vrcholov PS a PE

Za popísaných podmienok (obrázok 1) sa PS eluuje ako dva hlavné čiastočne nerozlíšené vrcholy s jedným menším vrcholom pred nimi. PE sa eluuje ako tri hlavné čiastočne nerozlíšené vrcholy. Plochu každého zhluky vrcholov stanovte so základnou čiarou podľa obrázka 1.

8. Výpočet a vyjadrenie výsledkov

Obsah PS a PE v testovacej vzorke sa vypočíta nasledovne

$C = \dots$

pričom

C = obsah PS alebo PE (mg/100 g prášku) v testovacej vzorke

A_1 = plocha vrcholu PEDP roztoku štandardnej vzorky (7.3.)

A_2 = plocha vrcholu PS alebo PE roztoku testovacej vzorky (7.2.)

T_1 = plocha vrcholu tryptamínu roztoku štandardnej vzorky (7.3.)

T_2 = plocha vrcholu tryptamínu roztoku testovacej vzorky (7.2.)

9. Presnosť

Poznámka: Hodnoty pre opakovateľnosť boli vypočítané podľa normy IDF.¹ Provizórny limit reprodukovateľnosti bol vypočítaný podľa postupu definovaného v Prílohe III(b) k tomuto nariadeniu.

9.1. Opakovateľnosť

Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti, ktorá vyjadruje variabilitu nezávislých výsledkov analýz získaných rovnakým analytikom pri použití rovnakých prístrojov v rovnakých podmienkach a

¹ Medzinárodná norma IDF 135B.1991. Mlieko a mliečne výrobky. Vlastnosti presnosti analytických metód. Náčrt postupu kolaboratívnej štúdie.

na rovnakom testovacom materiáli za krátky časový interval, nesmie presiahnuť 2%. Ak sa dva výsledky získajú za týchto podmienok, relatívna odchýlka medzi týmito dvoma výsledkami nesmie byť väčšia ako 6% aritmetického priemeru výsledkov.

9. 2. Reprodukovateľnosť

Ak dva výsledky získajú operátori v dvoch rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov v rôznych podmienkach analýzy testovacej vzorky, relatívna odchýlka medzi týmito dvoma výsledkami nesmie byť väčšia ako 11% aritmetického priemeru výsledkov.

10. Zdroje

10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M. : Zisťovanie prítomnosti pevného cmaru v odstredenom mlieku v prášku HPLC kvantifikáciou aminofosfolipidov. Sci.Tech. Latt.-Cas. 39,395 (1988).

Obrázok 1: Vzor HPLC OPA derivátov fosfatidylserínu (PS) a fosfatidyletanolamínu (PE) v metanolovom extrakte obnoveného odstredeného mlieka v prášku. Znázornený je stav integrácie pre vrcholy PS, PE a tryptamínu (interná štandardná vzorka).

os x = minúty

os y = fluorescencia (náhodné jednotky)

ZISŤOVANIE ANTIBIOTICKÝCH A SULFONAMID/DAPSONOVÝCH REZIDUÍ V ODSSTREDENOM MLIEKU V PRÁŠKU

Použije sa test sledovania mikrobiálneho inhibítora použitím *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactic* C953 ako testovacieho mikroorganizmu, dostatočne citlivý na zistenie 4 µg Benzylpenicilínu a 100 µg sulfamidínu v mlieku. V predaji sú dostupné testovacie sady a môžu sa použiť ak majú požadovanú citlivosť na Benzylpenicilín a sulfamidín.¹

Na testovanie sa používa obnovené odstredenú mlieko v prášku (1 g prášku + 9 ml destilovanej vody). Test s vykonáva podľa popisu uvedeného v IDF - Bulletin č. 258/1991, časť 1, kapitola 2 alebo podľa pokynov výrobcu testovacej sady.

Pozitívne výsledky sa interpretujú nasledovne:

1. Opakujte test pridaním penicilinázy do testovacieho systému

Pozitívny výsledok: inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť.

Negatívny výsledok: inhibičnou látkou je beta-laktámové antibiotikum.

2. Opakujte test pridaním p-aminobenzoovej kyseliny do testovacieho systému

Pozitívny výsledok: inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť.

Negatívny výsledok: inhibičnou látkou je sulfonamid/dapson.

3. Opakujte test pridaním penicilinázy + p-aminobenzoovej kyseliny do testovacieho systému

Pozitívny výsledok: inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť.

Negatívny výsledok: inhibičnými látkami sú beta-laktámové antibiotikum a sulfonamid/dapson.

¹ Dôležitá poznámka: Pri analýze odstredeného mlieka v prášku je možné získanie falošných pozitívnych výsledkov. Je preto dôležité overiť, že použitý testovací systém nedáva falošné pozitívne výsledky.

KVANTITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU ODSSTREDENÉHO MLIEKA V PRÁŠKU V KŔMNYCH ZMESIACH ENZYMATICKOU KOAGULÁCIOU PARAKAZEÍNU

1. Účel

Kvantitatívne stanovenie obsahu odstredeného mlieka v prášku v kŕmnych zmesiach enzymatickou koaguláciou parakazeínu.

2. Rozsah

Táto metóda sa aplikuje na kŕmne zmesi obsahujúce minimálne 10% odstredeného mlieka v prášku; veľké množstvá cmaru a/alebo určitých nemliečnych proteínov môžu viesť k nesprávnym výsledkom.

3. Princíp metódy

3.1. Rozpustenie kazeínu nachádzajúceho sa v kŕmnej zmesi extrakciou roztokom citrátu sodného.

3.2. Upravenie koncentrácie iónov vápnika na požadovanú hodnotu na zrazenie parakazeínu; z kazeínu sa parakazeín získa pridaním syridla.

3.3. Obsah dusíka v parakazeínovej zrazenine sa stanoví Kjeldahlovou metódou podľa postupu popísaného v norme IDF 20A:1986; množstvo odstredeného mlieka v prášku sa vypočíta na základe minimálneho obsahu kazeínu 27,5% (pozri 9.1.).

4. Reagenty

Všetky použité reagenty musia byť schválenej analytickej kvality. Voda musí byť destilovaná alebo ekvivalentnej čistoty. S výnimkou syridla (4.5.) nesmú žiadne reagenty obsahovať dusíkaté látky.

4.1. Dihydrát citrátu sodného (roztok 1% w/v)

4.2. Chlorid vápenatý (roztok 2M). V porcelánovej nádobe vhodnej veľkosti (150 až 200 ml) alebo vo vaničke odvážite 20,018 g CaCO_3 (analytická kvalita). Zalejte destilovanou vodou a preneste na vriaci vodný kúpeľ. Pomaly pridajte 50 až 60 ml roztoku HCl (pomer HCl:voda = 1:1) na úplné rozpustenie uhličitanu. Ponechajte na vriacom vodnom kúpeli pokým sa CaCl_2 nevysuší, na odstránenie HCl, ktorá nezreagovala. Preneste s destilovanou vodou do 100 ml odmernej banky a rozried'te po značku. Odmerajte hodnotu pH, ktorá nesmie byť nižšia ako 4,0. Roztok uskladnite v chladničke.

4.3. Hydroxid sodný 0,1 N

4.4. Kyselina chlorovodíková

4.5. Tekuté teľacie syridlo (štandardná sila 1:10 000). Skladujte v chladničke pri teplote 4 až 6°C.

4.6. Reagenty na kvantitatívne stanovenie obsahu dusíka podľa Kjeldahlovej metódy podľa popisu uvedeného v norme IDF 20A:1986.

5. Prístroje

Bežné laboratórne prístroje, vrátane:

5.1. Mažiar alebo homogenizér

5.2. Analytická váha

5.3. Odstredivka (2000 až 3000 rpm) s 50 ml skúmavkami

5.4. Magnetický miešač s (10 až 15 mm) poháňaným kolesom

5.5. 150 až 200 ml vaničky

5.6. 250 a 500 ml banky

5.7. Sklenené lieviky s priemerom 60 až 80 mm

5.8. Vysokorychlostné filtre bez popola s priemerom 150 mm (S.S. 589², S.S. 595 1/2)

5.9. Pipety s rôznym objemom

5.10. Termostaticky nastaviteľný vodný kúpeľ pri teplote 37°C

5.11. pH-meter

5.12. Kjeldahlova sada na spracovanie a destiláciu s stojanom

5.13. 25 ml byretová ihla s odmerkou.

5.14. Plastická fľaša na destilovanú vodu

5.15. Špachtle z nerezovej ocele

5.16. Teplomery

5.17. Sušiacia pec s nastaviteľnou teplotou.

6. Postup

6.1. Príprava vzorky

V mažiari rozdrvte alebo homogenizujte 10 až 20 g vzorky na získanie homogénnej zmesi.

6.2. Rozpustenie mlieka v prášku a separácia nerozpustného rezidua.

6.2.1. Priamo do 50 ml odstredovacej skúmavky odvážte $1,000 \pm 0,002$ g dobre homogenizovanej kýmnej zmesi (6.1.). Pridajte 30 ml roztoku citrátu sodného (4.1.) predhriateho na 45°C. Zmiešajte pomocou magnetického miešača po dobu minimálne 5 minút.

6.2.2. Pri 500 g odstred'ajte (2000 až 3000 rpm) po dobu 10 minút a do 150 až 200 ml vaničky zlejte čistý vodný supernatant tak, aby sa dnu nedostal žiadny materiál zo dna.

6.2.3. Na rezíduu vykonajte ďalšie dve extrakcie podľa rovnakého postupu a extrakty pridajte k prvému.

6.2.4. Ak sa na povrchu vytvorí vrstva oleja, uložte do chladničky pokým sa tuk nespevní a túto vrstvu odstráňte špachtľou.

6.3. Koagulácia kazeínu enzýmami syridla

6.3.1. Za stáleho miešania kvapnite 3,4 ml nasýteného roztoku chloridu vápenatého (4.2.) do celkového vodného extraktu (približne 100 ml). Roztokmi NaOH (4.3.) alebo HCl (4.4.) upravte pH na 6,4-6,5. Vložte do termostaticky nastaviteľného vodného kúpeľa pri teplote 37°C na 15 až 20 minút na dosiahnutie soľnej rovnováhy. Táto sa prejavuje vytvorením ľahkého zákalu.

6.3.2. Kvapalinu prelejte do jednej (alebo dvoch) odstred'ovacích skúmaviek a odstred'ajte pri 2000 g po dobu 10 minút za účelom odstránenia zrazeniny. Supernatant preložte bez umytia usadeniny do jednej (alebo dvoch) odstred'ovacích skúmaviek.

6.3.3. Teplotu supernatant opäť upravte na 37°C. Za stáleho miešania extraktu kvapnite 0,5 ml tekutého syridla (4.5.). Koagulácia sa uskutoční do jednej až dvoch minút.

6.3.4. Vzorku vložte späť do vodného kúpeľa a ponechajte pri teplote 37°C po dobu 15 minút. Vzorku potom z kúpeľa vyberte a koagulát prelomte miešaním. Odstred'ajte pri 2000 g po dobu 10 minút. Supernatant prefiltrujte cez vhodný filtračný papier¹ (Whatman č. 541 alebo ekvivalentný) a filtračný papier si odložte. Zrazeninu umyte v odstred'ovacej skúmavke s 50 ml vody pri teplote približne 35°C premiešaním zrazeniny.

Opäť odstred'ajte pri 2000 g po dobu 10 minút. Supernatant prefiltrujte cez odložený filtračný papier.

6.4. Stanovenie obsahu dusíka v kazeíne

6.4.1. Po umytí preložte zrazeninu na filtračný papier odložený v bode 6.3.4. použitím destilovanej vody. Filtračný papier preneste do Kjeldahlovej banky. Obsah dusíka stanovíte Kjeldahlovou metódou podľa popisu uvedeného v norme IDF 20A:1986.

7. Slepý test

7.1. Pred mineralizáciou Kjeldahlovou metódou podľa popisu uvedeného v norme IDF 20A:1986. pravidelne uskutočňujte slepý test použitím filtračného papiera bez popola (5.8.) navlhčeného zmesou 90 ml (4.1.) roztoku citrátu sodného, 1 ml nasýteného roztoku chloridu vápenatého (4.2.), 0,5 ml kvapalného syridla (4.5.) a umytého 3 x 15 ml destilovanej vody.

7.2. Objem kyseliny použitej v slepom teste sa musí odčítať od objemu kyseliny (4.4.) použitej na titráciu vzorky.

8. Kontrolný test

¹ Používa sa vysokorychlostný filtračný papier bez popola.

8.1. Na testovanie horeuvedeného postupu a reagentov uskutočnite analýzu na štandardnej kŕmnej zmesi so známym obsahom odstredeného mlieka v prášku podľa údajov kolaboratívnej štúdie. Priemerný výsledok duplicitnej analýzy by sa nemal od výsledku kolaboratívnej štúdie líšiť o viac ako 1%.

9. Výpočet výsledkov

9.1. Percento obsahu odstredeného mlieka v prášku v kŕmnej zmesi sa vypočíta použitím nasledovného vzorca

%MMP = ...

pričom N je percento obsahu parakazeínového dusíka; 27,5 je faktor na konverziu stanoveného obsahu kazeínu na percento odstredeného mlieka v prášku; 2,81 a 0,908 sú korekčné faktory získané z regresnej analýzy.

10. Presnosť metódy

10.1. Opakovateľnosť

V najmenej 95% prípadov nesmie dvojitá analýza rovnakej vzorky rovnakým operátorom v rovnakom laboratóriu dávať rozdiely vo výsledkoch rovné alebo väčšie ako 2,3 g odstredeného mlieka v prášku na 100 g kŕmnej zmesi.

10.2. V najmenej 95% prípadov nesmie analýza rovnakej vzorky analyzovaná v dvoch laboratóriách dávať rozdiely vo výsledkoch väčšie ako 6,5 g odstredeného mlieka v prášku na 100 g kŕmnej zmesi.

11. Tolerančný limit

Hodnota CrD95 (kritická odchýlka, 95% limit pravdepodobnosti) sa vypočíta použitím vzorca (ISO 5725):

CrD95 = ...

(R: reprodukovateľnosť, r: opakovateľnosť)

Dvojitá analýza: CrD95 = 4,5 g

Ak sa výsledok chemickej analýzy odlišuje od deklarovaného obsahu odstredeného mlieka o menej ako 4,5 g (dvojitá analýza), dodávka kŕmnej zmesi sa považuje za spĺňajúcu toto ustanovenie nariadenia.

12. Poznámky

12.1. Pridanie veľkého percenta určitých nemliečnych proteínov a najmä sójových proteínov po zohriatí s odstredeným mliekom v prášku môže viesť k príliš vysokým výsledkom kvôli spoločnému zrazeniu s mliečného parakazeínu.

12.2. Pridanie cmaru môže viesť k menším hodnotám kvôli tomu, že sa stanovuje len netučná časť. Pridanie určitých kyslých cmarov môže viesť k omnoho nižším hodnotám kvôli neúplnému rozpusteniu v roztoku citrátu.

12.3. K nízkym výsledkom môžu viesť aj prídavky lecitínu rovné alebo väčšie ako 0,5%.

12.4. Vstrebanie vysokozohriateho odstredeného mlieka v prášku môže viesť k príliš vysokým hodnotám kvôli spoločnému zrazeniu určitých srvátkových proteínov s mliečnym parakazeínom.

KVALITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU ŠKROBU V Odstredenom mlieku v prášku, denaturovanom mlieku v prášku a kŕmnych zmesiach

1. Rozsah

Táto metóda sa používa na zisťovanie prítomnosti škrobu, ktorý je stopovou látkou v denaturovanom mlieku v prášku.

Detekčný limit metódy je približne 0,05 g škrobu na 100 g vzorky.

2. Princíp

Reakcia je založená na reakcii používanej pri jodometrii:

- fixácia koloidov voľného jódu vo vodnom roztoku,
- absorpcia škrobovými čistočkami a tvorbou farby.

3: Reagenty

3.1. Jodný roztok

- jód: 1 g,
- jodid draselný: 2 g,
- destilovaná voda: 100 ml.

4. Prístroje

4.1. Analytická váha

4.2. Vodný kúpeľ

4.3. Testovacie skúmavky, 25 mm x 200 mm

5. Postup

Do testovacej skúmavky (4.3.) odvážte 1 g vzorky, pridajte 20 ml destilovanej vody a pretrepte na rozptýlenie vzorky. Umiestnite do vriaceho vodného kúpeľa (4.2.) a odložte na 5 minút. Vyberte z kúpeľa a nechajte vychladnúť na izbovú teplotu. Pridajte 0,5 ml jódného roztoku (3.1.), pretrepte a pozorujte výslednú farbu.

6. Výsledky

Modré zafarbenie naznačuje prítomnosť prírodného škrobu vo vzorke.

Ak vzorka obsahuje modifikovaný škrob, farba nemusí byť modrá.

7. Poznámky

Farba, jej intenzita a mikroskopický vzhľad škrobu sa líši v závislosti od pôvodu prírodného škrobu (napr. kukurica alebo zemiaky) a typu modifikovaného škrobu prítomného vo vzorke.

Pri prítomnosti modifikovaných škrobov sa farba zmení na fialovú, červenú alebo hnedú podľa stupňa modifikácie kryštalickej štruktúry prírodného škrobu.

STANOVENIE OBSAHU VODY V KYSLOM CMARE V PRÁŠKU

1. Rozsah

Stanovenie obsahu vody v kyslom cmare v prášku určeného pre krmne zmesi pre zvieratá.

2. Princíp

Vzorka sa vysuší vo vákuu. Strata hmotnosti sa stanoví vážením.

3. Prístroje

3.1. Analytická váha

3.2. Nádoby na sušenie z nehrdzavejúceho kovu alebo skla s vrchnákmi zaručujúcimi vzduchotesné uzavretie; pracovný povrch musí umožniť rozmiestnenie vzorky na približne $0,3 \text{ g/cm}^2$.

3.3. Nastaviteľná elektricky vyhrievaná vákuová pec vybavená olejovým čerpadlom a buď mechanizmom na vpúšťanie horúceho suchého vzduchu alebo sušiacim činidlom (napr. oxid vápenatý).

3.4. Sušička s efektívnym sušiacim činidlom.

3.5. Sušiacia pec, ventilovaná, termostaticky nastaviteľná, pri $102 \pm 2^\circ\text{C}$.

4. Postup

V sušiacej peci (3.5.) zohrejte nádobu (3.2.) s vrchnákom po dobu minimálne jednej hodiny. Vrchnák položte na nádobu, ihneď preložte do sušičky (3.4.) a nechajte vychladnúť na izbovú teplotu a odvážte na najbližších 0,5 mg.

Na najbližších 0,5 mg odvážte nádobu (3.2.) s jej vrchnákom. Do zväzenej nádoby na najbližší 1 mg odvážte približne 5 mg vzorky a rovnomerne rozmiestnite. Nádobu bez vrchnáka umiestnite do vákuovej pece (3.3.) predhriatej na 83°C . Aby ste sa vyhli nevhodnému zníženiu teploty pece, nádobu do nej vložte čo najrýchlejšie.

Tlak zvýšte na 100 Torr (13,3 kPa) a pri tomto tlaku nechajte sušiť po dobu štyroch hodín buď v prúde horúceho suchého vzduchu alebo použitím sušiaceho činidla (približne 300 g na 20 vzoriek). V prípade použitia činidla po dosiahnutí predpísaného tlaku odpojte vákuové čerpadlo. Čas sušenia počítajte od času, keď sa teplota v peci vráti na 83°C . Opatrne upravte atmosférický tlak v peci na pôvodnú hodnotu. Pec otvorte, na nádobu ihneď položte vrchnák, nádobu z pece vyberte, nechajte ju vychladnúť v sušičke (3.4.) po dobu 30 až 45 minút a odvážte na najbližší 1 mg. Vo vákuovej peci (3.3.) sušte ďalších 30 minút pri teplote 83°C a znovu odvážte. Rozdiel medzi oboma hmotnosťami nesmie presiahnuť 0,1% vlhkosti.

5. Výpočet

pričom

E = pôvodná hmotnosť testovacej vzorky v gramoch
m = hmotnosť suchej testovacej vzorky v gramoch.

6. Presnosť

6.1. Limit opakovateľnosti

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,4 g vody / 100 g kyslého cmaru v prášku.

7.2. Limit reprodukovateľnosti

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,6 g vody / 100 g kyslého cmaru v prášku.

7.3. Zdroj údajov o presnosti

Údaje o presnosti boli stanovené pokusom uskutočneným v roku 1995, na ktorom sa podieľalo 8 laboratórií, a pri ktorom sa použilo 12 vzoriek (šesť slepých duplikátov).

REFERENČNÁ METÓDA ZISŤOVANIA PRÍTOMNOSTI CUDZÍCH TUKOV V MLIEČNOM TUKU PLYNOVOU CHROMATOGRAFIU TRIGLYCERIDOV - OPRAVA 1

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Táto norma stanovuje metódu zisťovania prítomnosti cudzích tukov, rastlinných aj živočíšnych, ako napríklad hovädzí olej alebo bravčová masť, v mliečnom tuku mliečnych výrobkov plynovou chromatografiou triglyceridov.

Použitím definovaného triglyceridového vzorca sa kvalitatívne a kvantitatívne zistí prítomnosť rastlinných a živočíšnych tukov v čistom mliečnom tuku bez ohľadu na podmienky kŕmenia alebo pridávania.

Poznámka 1: Hoci kyselina maslová (C4) nachádzajúca sa výlučne v mliečnych tukoch umožňuje kvantitatívne odhady malých až stredných množstiev mliečného tuku v rastlinných tukoch, kvalitatívne a kvantitatívne informácie sa dajú len ťažko poskytnúť v rozpätí pridania do výšky najmenej 20% (hmotnostné %) cudzieho tuku v čistom mliečnom tuku z dôvodu veľkej variácie C4, pohybujúcej sa približne od 3,5 do 4,5 % (hmotnostné %).

Poznámka 2: Kvantitatívne výsledky je prakticky možné získať len triglyceridovou analýzou, pretože obsah sterolov v rastlinných tukoch je odlišný kvôli odlišným podmienkam výroby a ošetrovania.

2. Definícia

Cudzie tuky v mliečnom tuku: cudzie tuky podľa definície tejto normy sú všetky rastlinné a živočíšne tuky okrem mliečného tuku.

3. Princíp metódy

Po extrakcii mliečného tuku sa pripraví zásobný roztok. Z tohto roztoku sa plynovou chromatografiou na zabalených valcoch zistí prítomnosť triglyceridov (celkové karbónové čísla). Vložením hmotnostného % molekúl tuku rozličnej veľkosti (C24 - C54 - len párne čísla) do triglyceridového vzorca sa kvalitatívne alebo kvantitatívne zistí prítomnosť cudzích tukov.

Poznámka: Ak existuje záruka dosiahnutia porovnateľných výsledkov, použiť sa môže aj kapilárna plynová chromatografia za dodržania tu popísaného hodnotenia.¹

4. Reagenty

Použiť sa musia chemikálie analytickej kvality.

4.1. Nosný plyn: dusík so stupňom čistoty ? 99,996%.

4.2. Štandardné triglyceridy¹, saturované ako aj cholesterol na štandardizáciu štandardného mliečného tuku podľa časti 6.5.4.

¹ Vhodné metódy už boli popísané. Pozri D. Precht a J. Molquentin: Kvantitatívna triglyceridová analýza použitím krátkych kapilárnych valcov, Chrompack News 4, 16-17 (1993).

4.3. Metanol, bez obsahu vody.

4.4. n-hexán

4.5. n-heptán

4.6. Toluén

4.7. Roztok dimetylchlorosilánu: 50 ml dimetylchlorosilánu sa rozpustí v 283 ml toluénu.

4.8. Spaľovací plyn: vodík a syntetický vzduch.

4.9. Stacionárna fáza, 3-% OV-1 na 125/150 μm (100/120 otvor) Gas ChromQ²

4.10. 10% roztok kakaového masla.

5. Nástroje

Bežné laboratórne prístroje a najmä:

5.1. Vysokoteplotný plynový chromatograf vhodný na teploty najmenej 400-450°C, vybavený detektorom ionizácie plameňa (FID) a kontrolou konštantnej prietokovej hmotnosti nosného plynu. Spaľovací plyn: 30 ml/min H₂, 270 ml/min syntetického vzduchu.

V prípade veľkého prietoku nosného plynu by mala byť dýza plameňa veľmi veľká.

Poznámka: Sklenené vložky FID alebo injekčného systému sa kvôli vysokým teplotám pri triglyceridovej analýze musia často čistiť.

Plynový chromatograf musí byť vybavený septami odolávajúcim vysokým teplotám, ktoré sa dajú často používať a vykazujú nízky stupeň "púšťania".

Poznámka: vhodné sú septy Chromblue (tm) (Chrompack).

Septy je potrebné v pravidelných intervaloch meniť, napr. po približne 100 injekciách alebo ak sa zhorší rozlíšenie (pozri obrázok 4).

5.2. Chromatografický valec

Sklenený valec v tvare U (vnútorný priemer 2 mm, 500 mm dlhý), silanizovaný podľa bodu 6.1. dimetylchlorosilánom za účelom deaktivácie povrchu skla.

Poznámka: Vhodné sú tiež dlhšie (80-200 mm) zabalené valce. Dá sa nimi dosiahnuť trochu väčšia reprodukovateľnosť výsledkov. Na druhej strane stacionárna fáza vykazuje občasné zlomy po

¹ Vhodné produkty sú dostupné v predaji.

² Obchodné značky ako Extrelut, Gas ChromQ, Chrompack sú príkladmi vhodných produktov dostupných v špecializovanom obchode. Táto informácia slúži na jednoduché zvládnutie normy používateľom a nepredstavuje požiadavku na konkrétny výrobok. Indikácia zrna bola preložená do jednotky SI μm podľa normy BS 410:1988 "Britská špecifikácia noriem pre testovacie sitá."

operácii, čo môže viesť na druhej strane k horším kvantitatívnym výsledkom. Ďalej, plameň FID sa ľahko zahasí ako dôsledok požadovaného extrémne vysokého prietoku nosného plynu od 75 do 85 ml/min.

5.3. Zostava pre naplnenie valca (pozri obrázok 1)

Obrázok 1

naplnenie valca

vstup N2

naplniť po značku s OV-1

skrutkovací uzáver s filtrom, proti ktorému sa tlačia sklenené vlákna a stacionárna fáza
sklenený valec určený na naplnenie

5.3.1. Plastický valec s priskrutkovanými uzávermi, vybavený značkou, po ktorú sa môže naplniť požadované množstvo stacionárnej fázy.

5.3.2. Jemné sito (oko s veľkosťou približne 100 µm) so skrutkovacím uzáverom, vhodné na uzavretie skleneného valca podľa obrázka 1.

5.3.3. Deaktivovaná, silanizovaná sklenená vata.

5.3.4. Vibrátor na rovnomernú distribúciu stacionárnej fázy počas plnenia.

5.4. 1 až 3 ml valec Extrelut¹ so silikovým gélom. Tento valec sa dá používať na extrakciu na získanie mliečneho tuku.

5.5. Grafitová zátka 6,4 mm (1/4") s 6 mm závitom

5.6. Zariadenia na silanizáciu skleneného povrchu valca podľa bodu 6.1.

5.6.1. Woulffova fľaša.

5.6.2. Sacie vodné čerpadlo.

5.7. Vodný kúpeľ, nastaviteľný na 50±2°C.

5.8. Skrinka na sušenie, nastaviteľná na 50±2°C a 100±2°C

5.9. Mikrolitrové pipety

5.10. 5 ml pipeta s odmerkou na dávkovanie 1,5 metanolu

5.11. 50 ml banka s oblým dnom

5.12. Erlenmeyerova banka, nominálny objem 50 ml

¹ Pozri poznámku pod čiarou 3 na strane 86 (v origináli)

5.13. Lievik

5.14. Filter s malými pórami

5.15. Rotačný vyparovač.

5.16. Ampulky s nominálnym objemom 1 ml, uzavierateľné hliníkovým uzáverom so septom vo vnútri

5.17. Injekčná striekačka, piest striekačky nesmie dosiahnuť na koniec ihly

Poznámka: Takéto striekačky umožňujú lepšiu reprodukovateľnosť výsledkov.

Za účelom zabránenia znehodnoteniu septa, koniec ihly je potrebné pravidelne kontrolovať (napr. stereomikroskopom)

6. Postup

6.1. Príprava valca (silanizácia)

Po pripojení Woulffovej fľaše (pozri obrázok 2) k saciemu vodnému čerpadlu sa rúrka 2 ponorí do roztoku podľa bodu 4.7. Uzavretím uzávera sa valec naplní, následne sa obe rúrky odložia.

Obrázok 2

Zostava na silanizáciu

water suction pump = sacie vodné čerpadlo

stopcock = uzáver

tube = rúrka 1

rúrka 2

glass column = sklenený valec

dimetyldichlorosilán + toluén

Valec sa pripevní na stojan a pipetou sa doplní roztokom dimetylchlorosilánu.

Po 20-30 minútach sa Woulffova fľaša vymení filtračnou bankou a valec sa vyprázdni pripojením k saciemu vodnému čerpadlu (pozri obrázok 3).

6.2. Naplnenie valca

Potom nasleduje prepláchnutie za pomoci 75 ml toluénu a 50 ml metanolu; prázdny valec sa potom nechá vysušiť v skrinke na sušenie pri teplote 100°C po dobu približne 30 minút.

Obrázok 3

Zostava na prepláchnutie

rúrka 1

rúrka 2

vodné čerpadlo
rinsing agent = preplachovacie činidlo
filter flask = filtračná banka
sklenený valec

Na naplnenie valca sa použije zostava znázornená na obrázku 1. Stacionárna fáza (4.9.) sa napustí do plastického valca až po značku. Spodná časť skleneného valca určeného na naplnenie sa uzavrie približne 1 cm dlhou zátkou zo sklenenej vaty, ktorá bola pred tým silanizovaná a ktorá sa dnu vtlačí oceľovou tyčkou. Potom sa koniec valca nasunie na sitko podľa bodu 5.3.2.

Valec sa pod tlakom (3 bar, s N₂) plní stacionárnou fázou. Na dosiahnutie rovnomerného, stáleho a pevného naplnenia sa počas plnenia valcom pohybuje vibrátor.

Po naplnení sa do druhého konca naplneného valca vtlačí pevná zátka zo silanizovanej sklenenej vaty, vytŕčajúce konce sa odstrihnú a zátka sa špachtľou vtlačí niekoľko milimetrov dovnútra.

6.3. Príprava vzoriek

Na prípravu vzoriek sa používa jedna z troch nasledovných metód:

6.3.1. Izolácia mliečneho tuku z masla

5 až 10 g masla sa roztopí vo vhodnej nádobe vo vodnom kúpeli podľa bodu 5.7. pri teplote 50°C.

50 ml Erlenmeyerova banka a lievnik s vloženým filtrom podľa bodu 5.14. sa v skrinke na sušenie zohrejú na teplotu 50°C. Vrstva tuku vzorky roztopeného masla sa prefiltruje použitím predhriateho zariadenia.

Takýto mliečny tuk je takmer bez fosfolipidov.

6.3.2. Extrakcia tukovej frakcie podľa Röse-Gottliebovej metódy

Extrakcia sa robí buď podľa normy IDF 1C:1987, 16C:1987, 116A:1987 alebo 22B:1987.

S takýmito fosfolipidmi mliečného tuku umožníte dosiahnutie vrcholu cholesterolu, ktorý je zvýšený o približne 0,1%.

Triglyceridové spektrum, cholesterolom štandardizované na 100 je týmto ovplyvnené len do zanedbateľnej miery.

6.3.3. Extrakcia z mlieka použitím valcov silikových gélov

Do 1 až 3 ml Extrelutového valca sa mikrolitrovou pipetou podľa bodu 5.4. aplikuje 0,7 ml vzorky mlieka s teplotou 20°C a umožní sa rovnomerné rozloženie na silikovom géli po dobu približne 5 minút.

Na denaturáciu proteín-lipidových komplexov sa pipetou pridá 1,5 ml metanolu. Následne sa vzorka extrahuje s 20 ml n-hexánu. n-hexán sa pridáva pomaly a v malých množstvách a rozpúšťadlo je zliate a zhromaždené v 50 ml banke s oblým dnom, ktorá bola vysušená na konštantnú známú hmotnosť.

Po extrakcii valec vyprázdňte.

Z eluátu sa vydestilujú rozpúšťadlá rotačným vyparovačom pri teplote vodného kúpeľa 40 až 50°C.

Banka sa vysuší a získaný tuk sa odváži.

Poznámka: Tuková extrakcia pomocou Gerberovej, Weibull-Berntropovej, Schmid-Bondzynski-Ratzlaffovej metódy alebo izoláciou mliečneho tuku použitím detergentu (metóda BDI) nie sú vhodné na triglyceridovú analýzu, pretože týmito metódami môžu do tukovej vrstvy prejsť veľké množstvá parciálnych glyceridov alebo fosfolipidov.

6.4. Príprava roztoku vzorky

Na plynovú chromatografiu sa používa 5% roztok tuku v n-heptáne získaný podľa bodu 6.3. Na prípravu tohto roztoku vzorky sa odvážia zodpovedajúce množstvá vzorky získané podľa bodov 6.3.1. a 6.3.2. a rozpustené v zodpovedajúcich množstvách n-heptánu.

Pri príprave vzorky podľa bodu 6.3.3. sa množstvo n-heptánu určeného na pridanie do vzorky v banke vypočíta na základe odváženia a zvyšku v ňom rozpusteného.

Do ampulky (5.16.) sa vloží približne 1 ml roztoku vzorky.

6.5. Analýza triglyceridovou chromatografiou

Pri vysokých teplotách až do 350°C na eluovanie triglyceridov s dlhým reťazcom C52-C56 sa ľahko vyskytne nárast základnej čiary, najmä ak valce na začiatku neboli vhodne pripravené. Tomuto nárastu základnej čiary pri vysokých teplotách sa dá úplne vyhnúť skombinovaním dvoch valcov alebo odpočítaním základnej čiary.

V takej situácii alebo pri práci s jedným valcom ako aj na sklenené vložky injektora a detektora sa musia použiť grafitové zátky (5.5.).

6.5.1. Korekcia základnej čiary

Na zabránenie nárastu základnej čiary sa používa jedna z nasledovných štyroch metód:

6.5.1.1. Kombinácia valcov

Použijú sa dva balené valce.

6.5.1.2. Korekcia základnej čiary plynovým chromatografom

Nárastu základnej čiary sa dá zabrániť uskutočnením jedného kola chromatografie bez injektáže roztoku tuku a následným odpočítaním uloženej základnej čiary.

6.5.1.3. Korekcia základnej čiary integračným softvérom

Nárastu základnej čiary sa dá zabrániť uskutočnením jedného kola chromatografie bez injektáže roztoku tuku a následným odpočítaním uloženej základnej čiary.

6.5.1.4. Korekcia základnej čiary vhodnou úpravou

Pri adekvátnej počiatkovej úprave valca a približne 20 injekciách s roztoku mliečného tuku je nárast základnej čiary pri vysokých teplotách zvyčajne taký malý, že korekcie základnej čiary nie sú potrebné.

6.5.2. Technika injektáže

Na vyhnutie sa skresľujúcim efektom sa používa technika "horúcej injektáže" na dosiahnutie lepších kvantitatívnych výsledkov s triglyceridovými zložkami s vysokým bodom varu. Roztok tuku sa vtiahne do striekačky a studená ihla striekačky sa pred injektážou zahreje po dobu približne troch sekúnd v hlave injektora. Potom sa obsah striekačky rýchlo injektuje.

Poznámka: Touto technikou injektáže sa znižuje riziko frakcionálneho javu vnútri striekačky alebo injekčného bloku. Priama injektáž do valca v jeho hornej predĺženej zahriatej časti sa nepoužíva, pretože fragmenty septa ako aj znečisťujúce látky, ktoré sa tu akumulujú, sa dajú jednoducho odstrániť použitou technikou pravidelnou výmenou vložky injektora bez odpájania valca.

Za účelom nepoškodenia septa je veľmi dôležité zabrániť ohnutiu konca ihly dotknutím sa dna vamičky so vzorkou (aj keď nie je dobre viditeľné).

Obrázok 4

Triglyceridový chromatogram vzorky mliečného tuku

- (a) zlé rozlíšenie ako následok poškodeného septa
- (b) dobré rozlíšenie

6.5.3. Príprava baleného valca

Počas krokov (a) až (c) sa na zabránenie kontaminácii vrchol valca nepripojí na detektor.

Valce naplnené podľa bodu 6.2. sa upravujú nasledovne:

- (a) 15 minút prúd N₂ 40 ml/min pri teplote 50°C;
- (b) zohrievanie pri 1 K/min až na 355°C pri 10 ml N₂/min.;
- (c) ponechanie pri 355°C na 12 až 15 hodín;
- (d) dve injekcie 1 µl roztoku kakaového masla (4.10.) a príslušný teplotný program;
- (e) 20 injekcií 0,5 µm roztoku mliečného tuku počas dvoch až troch dní podľa bodu 6.4.

Poznámka: Kakaové maslo pozostáva takmer výlučne s triglyceridov s vysokým bodom varu C50 až C56. Injektáž kakaovým maslom slúži na osobitnú úpravu tohto rozpätia s dlhým reťazcom. Pri triglyceridoch s vysokým bodom varu C50 až C54 sa môžu vyskytnúť čiastočné reakčné faktory vo výške približne 1,20. Pri opakovanej injektáži roztoku mliečného tuku sa zvyčajne musí očakávať zníženie počiatkových vysokých reakčných faktorov pre C50 až C54. Pri Triglyceridoch s nízkym acyl-c číslom sa faktory blížia k 1. Pripravujú sa tri páry valcov naplnených podľa bodu 6.2. Upravené valce sa na rutinné testovanie skontrolujú analýzou mliečného tuku.

Následne sa používa pár s najlepšimi kvantitatívnymi výsledkami (reakčný faktor takmer 1). Valce s reakčným faktorom $> 1,2$ sa nepoužívajú.

6.5.4. Kalibrácia

Na kalibráciu sa stanovujú reakčné faktory zodpovedajúcich triglyceridov, ako aj cholesterolu v mliečnom tuku (štandardizovaný tuk) použitím štandardizovaných triglyceridov (aspoň satureované triglyceridy C24, C30, C36, C42, C48 a C54, ako aj cholesterol; radšej aj C50 a C52) Stredné reakčné faktory sa dajú stanoviť matematickou interpoláciou.

Každý deň sa musia uskutočniť dve až tri kalibrácie použitím štandardizovaného tuku. Ak sa získajú takmer identické výsledky, dobre reprodukovateľné kvantitatívne výsledky sa dosiahnu triglyceridovou analýzou vzoriek.

Štandardizovaný tuk má trvanlivosť niekoľko mesiacov pri teplote maximálne -18°C a dá sa preto používať ako štandardná vzorka.

Poznámka: Reakčný faktor každej zložky sa tiež dá stanoviť použitím štandardizovaného tuku s certifikovaným zložením triglyceridov, ako napríklad CRM 519 (anhydričný mliečny tuk), ktorý sa dá získať z Inštitútu pre referenčné materiály a merania v Geeli v Belgicku.

6.5.5. Teplotný program, nosný plyn a iné podmienky triglyceridovej analýzy

Teplotný program: počiatočná teplota valca 210°C , udržať jednu minútu, potom naprogramovať na nárast $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ až po 350°C a konečnú teplotu udržať päť minút.

Teplota detektora a injektora: 370°C .

Poznámka: Teplota detektora, injektora a pece (počiatočná teplota) sa musí udržiavať na konštantnej úrovni (aj cez noc, počas víkendov a sviatkov).

Nosný plyn: dusík, prietok $40\text{ ml}/\text{min}$.

Poznámka: Ak sa používajú 80 cm valce, prietok musí byť minimálne $75\text{ ml}/\text{min}$. Prietok nosného plynu sa musí stále udržiavať (aj cez noc, počas víkendov a sviatkov). Presný prietok nosného plynu sa upravuje tak, aby sa C54 eluoval pri 341°C nezávisle od dĺžky valca.

Doba analýzy. $29,3\text{ minút}$.

Injekčný objem. $0,5\text{ }\mu\text{l}$.

Poznámka: Striekačka musí byť po každej injekcii niekoľkokrát prepláchnutá čistým heptánom.

Stav FID: podľa bodu 5.1.

Poznámka: Detektor ionizácie plameňa sa zapína na začiatku každého pracovného dňa.

7. Integrácia, hodnotenie a kontrola podmienok merania

Triglyceridy s nepárnym acyl-c číslom ($2n+1$) sa kombinujú s predchádzajúcim triglyceridom s párnym číslom ($2n$). Menej reprodukovateľné nízke obsahy C56 sa nezohľadňujú. Zvyšné triglyceridy (plocha vrcholu) 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 hmotnostnom % (g/100 g).

Hodnotenie vrcholov na chromatograme sa robí integrátorom, s ktorým sa dá naznačiť základná čiara. Reintegrácia optimalizovanými integračnými parametrami by mala byť možná.

Obrázky 5 a 6 znázorňujú dva príklady triglyceridového chromatogramu. Obrázok 5 znázorňuje chromatogram, ktorý sa dá dobre zhodnotiť, zatiaľ čo obrázok 6 znázorňuje sporadickú chybu v rozpätí C50 až C54, kde základná čiara je v porovnaní s obrázkom 5 nesprávna. Takéto bežné chyby sa dajú zistiť s vysokým stupňom istoty a dá sa im vyhnúť len použitím integrátora, ktorým je základná čiara naznačená.

Obrázok 5

Triglyceridový chromatogram mliečného tuku so zakreslenou základnou čiarou, ktorý sa dá ľahko hodnotiť

Obrázok 6

Nesprávne integrovaný chromatogram mliečného tuku

nesprávna integrácia

Na kontrolu podmienok merania sa pre rôzne triglyceridy môžu použiť relatívne štandardné odchýlky (RSD: variačný koeficient x 100) uvedené v tabuľke 1. Vypočítané boli z 19 následných analýz rovnakého mliečného tuku.

Tabuľka 1

Relatívne štandardné odchýlky (RSD) obsahov triglyceridu (n=19)

Triglycerid	RSD (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Ak sú RSD omnoho vyššie ako hodnoty uvedené v tabuľke 1, podmienky chromatografie nie sú vhodné a je potrebné overiť septá alebo prietok nosného plynu. Možné tiež je, že sa na sklenenej vate pri vstupe do valca vytvorili malé čiastočky septa alebo valec už nie je vhodný na použitie kvôli zostarnutiu, teplotným vplyvom atď. (pozri obrázok 3).

Poznámka: Hodnoty uvedené v tabuľke 1 nie sú povinné, ale orientačné pre účely kontroly kvality. Ak sa však očakávajú vyššie hodnoty RSD, limity opakovateľnosti a reprodukovateľnosti podľa bodu 11 sa musia napriek tomu dodržať.

8. Kvalitatívne zistenie prítomnosti cudzích tukov

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

najcitlivejším vzorcom pre zistenie prítomnosti bravčovej masti je napríklad

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

Poznámka: Použitím 755 rôznych vzoriek mliečného tuku bolo stanovené s 99% pravdepodobnosťou rozpätie $S = 97,96-102,04$ pre vzorky čistého mliečného tuku so štandardnou odchýlkou $SD = 0,39897$ pre všetky hodnoty S.

Od triglyceridového zloženia vzorky neznámeho tuku takýto vzorec umožňuje bez použitia počítača jednoduchým spôsobom overiť, či uvedený súčet obsahov triglyceridov so zodpovedajúcimi faktormi je mimo rozpätia 97,96-102,04, a teda s najväčšou pravdepodobnosťou ide o vzorku s obsahom 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, hydrogenizovaného 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. (S rovnakými typmi cudzích tukov sa bral do úvahy najnepriaznivejší limit (pozri tabuľku 4)).

Nasledovným celkovým vzorcom je možné pre všetky cudzie tuky dosiahnuť podobne dobré výsledky.

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

Výpočty pre zisťovanie prítomnosti akejkoľvek kombinácie cudzieho tuku v mliečnom tuku ukázali, že napr. hoci v tabuľke uvedený limit pre bravčovú masť je nízky, t.j. 2,7%, iné tuky, ako napríklad kokosový tuk, palmový olej alebo olej z palmovej dužiny s detekčnými limitmi 26,8, 12,5 a 19,3%

môžu týmto vzorcom byť zistené len vtedy, ak do mliečného tuku boli pridané extrémne vysoké množstvá. Toto platí aj pre ostatné vzorce uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Triglyceridové vzorce na zisťovanie prítomnosti rôznych cudzích tukov v mliečnom tuku, uvádzajúce štandardné odchýlky SD pre S

Vzorec pre sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej z pšeničných klíčkov, olej z kukuričných klíčkov, bavlníkový a rybací 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+1,1226.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	

Preto ak je vzorka pravdepodobne zmesou mliečného tuku a jedného zo 14 rôznych cudzích tukov alebo kombinácie týchto cudzích tukov, na kontrolu neznámej vzorky tuku sa musia použiť všetky vzorce uvedené v tabuľke 2 ako aj celkový vzorec (2). Ak sa dosadením triglyceridu vzorky tuku získa hodnota S, ktorá spadá mimo rozpätia čo len jedného z piatich vzorcov uvedených v tabuľke 3, vzorka je pravdepodobne modifikovaným mliečnym tukom. Zistenie prítomnosti cudzieho tuku v mliečnom tuku prostredníctvom jedného zo štyroch vzorcov uvedených v tabuľke 2 neumožňuje dospieť k záverom o type takéhoto cudzieho tuku.

Tabuľka 3

Limity S pre mliečne tuky

Vzorec na zisťovanie	Rozsah S
sójového, slnečnicového, olivového, repkého, ľanového oleja, oleja z pšeničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	98,05-101,95
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	99,42-100,58
palmového oleja a hovädzieho loja	95,90-104,10
bravčovej masti	97,96-102,04

V tabuľke 4 sú uvedené detekčné limity rôznych cudzích tukov s 99% pravdepodobnosťou. Prvý stĺpec ukazuje minimálny detekčný limit pre vzorce pre mliečny tuk z tabuľky 2. V druhom stĺpci sa nachádzajú detekčné limity pre celkový vzorec. Hoci tieto limity sú o niečo vyššie, len tento vzorec je potrebný na zistenie trochu vyšších množstiev cudzích tukov. Všetkými vzorcami sa tiež dajú zistiť kombinácie rôznych cudzích tukov. Rozpätia variácií triglyceridov rôznych cudzích tukov jedného typu nemajú na detekčné limity žiadny významný vplyv.

Poznámka: Rozpätia S sú vypočítané tak, že pri prekročení limitov jednotlivých vzorcov sa prítomnosť cudzieho tuku len predpokladá (pozri tabuľku 4).

Tabuľka 4

99% detekčné limity pridaním cudzieho tuku do mlieka v %

	Jednotlivý vzorec	Celkový vzorec
sójový olej	2,1	4,4
slečnicový olej	2,3	4,8
olivový olej	2,4	4,7
kokosový tuk	3,5	4,3
palmový olej	4,4	4,7
olej z palmovej dužiny	4,6	5,9
repkový olej	2,0	4,4
ľanový olej	2,0	4,0
olej z pšeničných klíčkov	2,7	6,4
olej z kukuričných klíčkov	2,2	4,5
olej z bavlníkových semien	3,3	4,4
bravčová masť	2,7	4,7
hovädzí loj	5,2	5,4
hydrogenizovaný rybací olej	5,4	6,1

9. Kvantitatívne stanovenie obsahu cudzieho tuku

Za účelom získania kvantitatívnych informácií o koncentrácii cudzieho tuku vo vzorke mliečného tuku sa používa nasledovný vzorec

$$X (\%) = 100 \cdot \frac{(100-S)}{(100-SF)}$$

pričom X je množstvo neznámeho cudzieho tuku alebo zmesi cudzích tukov v neznámom mliečnom tuku. S vyplýva z prítomnosti neznámeho cudzieho tuku vložení triglyceridov zmesi cudzieho tuku/mliečného tuku do horeuvedeného celkového triglyceridového vzorca. Ak je v mliečnom tuku prítomný cudzí tuk, za SF sa považuje stredná hodnota S rôznych cudzích tukov pre celkový vzorec; táto stredná hodnota S sa získa dosadením údajov o triglyceridoch čistých cudzích tukov do tohto vzorca a vypočítaním strednej hodnoty (SF = 7,46). Dobré kvantitatívne výsledky o prítomnosti cudzích tukov sa tiež dajú získať použitím vzorca pre palmový olej/hovädzí loj (tabuľka 2) so strednou hodnotou SF = 10,57.

Pri známych typoch cudzieho tuku sa do horeuvedeného vzorca musia dosadiť nasledovné hodnoty S_F a zvolí sa príslušný vzorec z tabuľky 2:

Hodnoty S_F rôznych cudzích tukov

Cudzí tuk	S_F
sójový olej	8,18
slnečnicový olej	9,43
olivový olej	12,75
kokosový tuk	118,13
palmový olej	7,55
olej z palmovej dužiny	112,32
repkový olej	3,30
ľanový olej	4,44
olej z pšeničných klíčkov	27,45
olej z kukuričných klíčkov	9,29
olej z bavlníkových semien	41,18
bravčová masť	177,55
hovädzí loj	17,56
rybací olej	64,12

10. Rozsah aplikácie detekčnej metódy

Popísaná metóda sa dá aplikovať na mlieko a je založená na reprezentatívnosti vzoriek mliečného tuku.

Možná by bola aj veľmi špecifická detekcia, ak by pre reprezentatívny počet vzoriek mliečného tuku boli odvodené vzorce pre rôzne štáty.

Osobitne vhodné podmienky by sa dali získať, ak by v rôznych štátoch vzorce podľa horeuvedeného popisu boli odvodené z reprezentatívneho počtu vzoriek mliečného tuku. V takom prípade nie je použitie zložitých počítačových programov potrebné, ak sa použijú triglyceridové kombinácie uvedené v tabuľke 2 a faktory sa zmenia použitím metódy najmenších štvorcov.

Aplikovaním rozpätí S uvedených v tabuľke 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 mliečného tuku.

Poznámka: Frakcionované mliečne tuky sa vo všeobecnosti uznávajú za nemodifikované mliečne tuky, keď sa modifikácia iba predpokladá, ak sú prekročené uvedené limity. Vzorce naznačujú modifikáciu len pri frakcionovaných mliečnych tukoch s nezvyčajným zložením mliečného tuku, ako napríklad v prípade tvrdej frakcie získanej frakcionáciou fyzikálnymi metódami pri teplotách vysokých približne 30°C s malými zosťatkami len niekoľkých percent alebo frakcionáciou nadkritickým CO₂.

Frakcionácia mliečného tuku sa však dá zistiť použitím iných postupov, napr. diferenciálnou skenovacou kalorimetriou.

11. Presnosť metódy

Stanovená použitím mliečného tuku na základe vzorcov z tabuľky 2 a rozpätí S z tabuľky 3.

11.1. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi hodnotami S dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom na rovnakom testovacom materiáli v rovnakých podmienkach (rovnaká osoba, rovnaké nástroje/rovnaké zariadenie, rovnaké laboratórium):

Tabuľka 6

Limity opakovateľnosti (r) pre rôzne vzorce

Vzorec na zisťovanie	r
sójového, slnečnicového, olivového, repkového, ľanového oleja, oleja z pšeničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	0,67
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	0,12
palmového oleja a hovädzieho loja	1,20
bravčovej masti	0,58
celý vzorec	1,49

11.2. Reprodukovateľnosť

Rozdiel medzi hodnotami S dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách podľa rovnakého postupu na rovnakom testovacom materiáli v rôznych podmienkach (rôzne osoby, rôzne prístroje) v rôznom čase:

Tabuľka 7

Limity reprodukovateľnosti (R) pre rôzne vzorce

Vzorec na zisťovanie	R
sójového, slnečnicového, olivového, repkového, ľanového oleja, oleja z pšeničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	1,08
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	0,40
palmového oleja a hovädzieho loja	1,81
bravčovej masti	0,60
celý vzorec	2,07

Kritická odchýlka

S hodnotami limitov opakovateľnosti (r) a reprodukovateľnosti (R) je možné vypočítať kritickú odchýlku pre všetky rozpätia S z tabuľky 3 (duplicitné analýzy). Hodnoty sú uvedené v tabuľke 8.

Tabuľka 8

Kritické odchýlky pre všetky triglyceridové vzorce

Vzorec na zisťovanie	Rozsah
sójového, slnečnicového, olivového, repkového, ľanového oleja, oleja z pšeničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	97,43-102,57
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	99,14-100,86
palmového oleja a hovädzieho loja	94,91-105,09
bravčovej masti	97,65-102,35
celý vzorec	94,58-105,42

11.4. Prijateľnosť výsledkov

Všetky hodnoty obsahu triglyceridov C24, C26, C28 až C54 ako aj cholesterolu kalibrované na dve desatinné miesta musia byť presne normalizované na 100.

Výsledky duplicitnej analýzy sa používajú ako kontrola opakovateľnosti. Ak absolútny rozdiel medzi dvomi výsledkami S pre všetkých päť triglyceridových vzorcov neprekračuje limit opakovateľnosti r uvedený v tabuľke 6, požiadavka opakovateľnosti je splnená.

Na kontrolu optimálnych podmienok chromatografie a najmä kvality valcov sa musí garantovať, že pri 10 opakovaných kolách rozdiel maximálnej a minimálnej hodnoty S všetkých piatich triglyceridových vzorcov neprekračuje rozpätie $x \cdot r$, pričom $x = 1,58$ (pre 10 kôl, pozri zdroje (16)) a limity opakovateľnosti r pre rôzne vzorce uvedené v tabuľke 6.

12. Citované normy

DIN 10336:1994 Zistenie a overenie prítomnosti cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou chromatografickej triglyceridovej analýzy
norma IDF 1C:1987 Mlieko. Stanovenie obsahu tuku - Röse Gottliebova gravimetrická metóda
norma IDF 16C:1987 Smotana. Stanovenie obsahu tuku - Röse Gottliebova gravimetrická metóda
norma IDF 116A:1987 Zmrzlina na báze mlieka. Stanovenie obsahu tuku - Röse Gottliebova gravimetrická metóda
norma IDF 22B:1987 Odstredené mlieko, srvátka a cmar. Stanovenie obsahu tuku - Röse Gottliebova gravimetrická metóda

13. Zdroje

1. Komisia Európskych spoločenstiev: *Zistenie prítomnosti cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou chromatografickej triglyceridovej analýzy*, dokument č. VI/5202/90-EN, VI/2645/91.

2. Komisia Európskych spoločenstiev: *Kontrola čistoty maslového tuku na 100 rôznych vzorkách rôznych kŕmnych období z 11 krajín EHS*, dok. č. VI/4577/93.
3. Komisia Európskych spoločenstiev: *Hodnotenie výsledkov z prvého, druhého, tretieho, štvrtého, piateho a šiesteho kolaboratívneho pokusu EHS: Stanovenie prítomnosti triglyceridov v mliečnom tuku*, dok.č VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93.
4. Timms, R.E.: *Zisťovanie a kvantifikácia nemliečneho tuku v zmesiach mliečnych a nemliečnych tukov*. Dairy Research 47, 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: *Dôkaz modifikovaného mliečného tuku triglyceridovou analýzou. Dôkaz cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou kombinácií triglyceridov*, 41, 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: *Ku dôkazu cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou triglyceridovej analýzy*. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. príloha 5, 42 29-35 (1987)
7. Precht, D.: *Stanovenie prítomnosti rastlinných tukov alebo živočíšnych zásobných tukov v mliečnom tuku*. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 42 143-157 (1989).
8. Precht D.: *Rýchla extrakcia mliečného tuku*. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 42 119-128 (1990)
9. Precht, D.: *Rýchla plno-chromatografická triglyceridová analýza mliečného tuku*. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 42 139-154 (1990)
10. Precht, D.: *Kontrola čistoty mliečného tuku triglyceridovou plynovou chromatografickou analýzou*. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 43 (3) 219-242 (1991)
11. Precht, D.: *Zisťovanie falšovaného mliečného tuku masnou kyselinou) a triglyceridovou analýzou*. Fat. Sci. Technol. 93 538-544 (1991)
12. Precht, D.: *Zisťovanie cudzieho tuku v mliečnom tuku. Kvalitatívne zisťovanie triacylglycerolovým vzorcom. Kvantitatívne hodnotenie zmesí cudzích tukov*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992)
13. Precht, D.: *Plynová chromatografia triacylglycerolov a iných lipidov na balených valcoch*, v: CRC Handbook of Chromatography: Analysis of lipids, str. 123-138, ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkentin J.: *Kvantitatívna triglyceridová analýza použitím krátkych kapilárnych valcov*, Chromapack News 4 16-17 (1993).
15. Molkentin, J., Precht, D.: *Porovnanie balených a kapilárnych valcov pre kvantitatívnu plynovú chromatografiu triglyceridov v mliečnom tuku*. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: *Aplikovaná Štatistika, Prvá časť, Jednodimenzionálne problémy*, Springer Verlag, Berlin, p. 378 (1970).

ZOZNAM NARIADENÍ UVEDENÝCH V HLAVNOM TEXTE

- Nariadenie komisie (EHS) č. 1216/68 z 9. augusta 1968 ustanovujúce metódu pre stanovenie obsahu laktózy v kŕmnych zmesiach dovezených z tretích krajín¹, zmenená a doplnená nariadením komisie (EHS) č. 222/88 z 22. decembra 1987 o zmene a doplnení určitých opatrení o uplatňovaní spoločnej organizácie trhu s mliekom a mliečnymi výrobkami po zavedení kombinovanej nomenklatúry²;
- Nariadenie komisie (EHS) č. 3942/92 z 22. decembra 1992 ustanovujúce referenčnú metódu na stanovenie obsahu sitosterolu a stigmasterolu v maslovom tuku³, naposledy zmenené a doplnené nariadením komisie (ES) č. 175/1999 novelizujúceho nariadenia (EHS) č. 3942/92, (ES) č. 86/94, (ES) č. 1082/96 a (ES) č. 1459/98, ktorým sa ustanovujú referenčné metódy pre stanovenie obsahu určitých stopových látok v masle, maslovom tuku, maslovom oleji a smotane⁴;
- Nariadenie komisie (ES) č. 86/94 z 19. januára 1994 ustanovujúce referenčnú metódu na stanovenie obsahu sitosterolu a stigmasterolu v masle⁵ v znení nariadenia (ES) č. 175/1999;
- Nariadenie komisie (ES) č. 2721/95 z 24. novembra 1995 ustanovujúce pravidlá aplikácie referenčných a rutinných metód pre analýzu a hodnotenie kvality mlieka a mliečnych výrobkov na spoločnom trhu⁶;
- Nariadenie komisie (ES) č. 1080/96 zo 14. júna 1996 ustanovujúce referenčnú metódu na zisťovanie koliforiem v masle, odstredenom mlieku v prášku a kazeíne/kazeinátach⁷;
- Nariadenie komisie (ES) č. 1081/96 zo 14. júna 1996 ustanovujúce referenčnú metódu na zisťovanie kravského mlieka a kazeinátu v syroch vyrobených s ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka alebo zmesí ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka a zrušujúce nariadenie (EHS) č. 690/92⁸;
- Nariadenie komisie (ES) č. 1082/96 zo 14. júna 1996 ustanovujúce referenčnú metódu na stanovenie obsahu etyl esteru beta-apo-8 karotenickej kyseliny v koncentrovanom masle a masle⁹ v znení nariadenia (ES) č. 175/1999;
- Nariadenie komisie (ES) č. 1854/96 z 26. septembra 1996 ustanovujúce zoznam referenčných metód určených na analýzu a hodnotenie kvality mlieka a mliečnych výrobkov podľa spoločnej organizácie trhu¹⁰ v znení nariadenia (ES) č. 881/1999¹¹;
- Nariadenie komisie (ES) č. 880/98 z 24. apríla 1998 ustanovujúce referenčné metódy na stanovenie obsahu vody, beztukovej sušiny a tuku v masle¹²;
- Nariadenie komisie (ES) č. 1459/98 z 8. júla 1998 ustanovujúce referenčnú metódu stanovenia obsahu vanilínu v koncentrovanom masle, masle alebo smotane¹³ v znení nariadenia (ES) č. 175/1999.

¹ OJ L 198, 10.8.1968, str. 13.

² OJ L 28, 1.2.1988, str. 1.

³ OJ L 399, 31.12.1992, str. 29.

⁴ OJ L 20, 27.1.1999, str. 22.

⁵ OJ L 17, 20.1.1994, str. 7.

⁶ OJ L 283, 25.11.1995, str. 7.

⁷ OJ L 142, 15.6.1996, str. 13.

⁸ OJ L 142, 15.6.1996, str. 15.

⁹ OJ L 142, 15.6.1996, str. 26.

¹⁰ OJ L 246, 27.9.1996, str. 5.

¹¹ OJ L 111, 29.4.1999, str. 24.

¹² OJ L 124, 25.4.1998, str. 16.

¹³ OJ L 193, 9.7.1998, str. 16.

Referenčné metódy uvedené v časti B sa môžu používať na analýzu výrobkov spadajúcich pod ktorékoľvek z nariadení uvedených v stĺpci 1.

Nariadenie komisie	Výrobok	Kód CN	Parameter	Limit
Nariadenie (EHS) č. 2658/87 (OJ L 256, 7.9.1987, str. 1) Nariadenie (EHS) č. 2414/98 (OJ L 299, 10.11.1998, str. 7)	Mlieko a smotana nekoncentrované a neobsahujúce cukor alebo iné sladidlá	0401	Tuk (? 6%)	Limity sú špecifikované popise kódu CN pre špecifický produkt, ďalej špecifikované v ur prípadoch v nariadení komisie (EHS) č. 3846/8 (OJ L 366, 24.12.1987, ; časť 9 exportnej nomenkl alebo nariadení (EHS) č 1374/98 (OJ L 185, 30.6.1998, str
Nariadenie (ES) č. 1374/98 (OJ L 185, 30.6.1998, str. 21) Nariadenie (ES) č. 2508/97 (OJ L 345, 16.12.1997, str. 31) Nariadenie (ES) č. 174/1999 (OJ L 20, 27.1.1999, str. 8)	mlieko a smotana, koncentrované alebo obsahujúce pridaný cukor alebo iné sladidlo	0402	Tuk (> 6%) tuky (kvapalná forma) tuky (pevná forma) proteín sacharóza (normálny obsah) sacharóza (nízky obsah)	
	Cmar, fermentované alebo acidované mlieko a smotana, koncentrované alebo nekoncentrované, obsahujúce pridaný cukor alebo iné sladidlá	0403	pevné látky (SCM) pevné látky (EMC) voda (mlieko a smotana v prášku) tuk proteín sacharóza (normálny obsah) sacharóza (nízky obsah) voda (kyslý cmar v prášku) voda (sladký cmar v prášku) pevné látky (ostatné výrobky)	
	srvátka, koncentrovaná alebo nekoncentrovaná alebo obsahujúca pridaný cukor alebo iné sladidlo; výrobky pozostávajúce z prírodných mliečnych látok	0404	tuk proteín sacharóza (normálny obsah) sacharóza (nízky obsah)	
		0404 90	proteín voda pevné látky (koncentrované výrobky)	
	maslo a iné tuky odvodené z mlieka; nátierky	0405	tuk (ak ?85%) voda	
		maslo	SNF NaCl	

	syr a tvaroh	maslový olej 0406	tuk (ak >99%) voda (ak tuk <99%) tuk pevné látky pevné látky (rikota) NaCl laktóza	
Nariadenie (EHS) č. 2658/87	kŕmne zmesi	2309	laktóza	

Poznámky k zoznamu referenčných metód Európskej únie.

Poznámka 1: Izolácia mliečneho tuku podľa popisu v norme IDF 6B:1989 (ochrana pred svetlom).

Poznámka 2: Nebola stanovená žiadna referenčná metóda.

Poznámka 3: Vzorka sa pripravuje podľa normy IDF 122C:1996 alebo normy IDF 73A:1985.

Poznámka 4: Inkubácia na 48 hodín pri teplote 55°C, je potrebné predísť vyschnutiu kultúry.

Poznámka 5: %SNF=%pevné látky - %tuky

Poznámka 6: Maslo musí korešpondovať so štátnou triedou kvality členského štátu pôvodu uvedenej v prílohe V nariadenia komisie (ES) č. 2771/1999.

Poznámka 7: Smernica komisie 84/8/EHS.

Poznámka 8: Nariadenie komisie (ES) č. 1758/94 (OJ L 183, 19.7.1994, str. 14).

Poznámka 9: Smernica komisie 78/633/EHS.