I

(Akty prijaté podľa Zmluvy o ES/Zmluvy o Euratome, ktorých uverejnenie je povinné)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 273/2008

z 5. marca 2008,

ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá uplatňovania nariadenia Rady (ES) č. 1255/1999 týkajúce sa metód analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov

KOMISIA EURÓPSKYCH 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 výrobkami [1], a najmä na jeho články 10 a 15 a článok 26 ods. 3, článok 29 ods. 1 a článok 31 ods. 4,

keďže:

(1) Nariadením Komisie (ES) č. 213/2001 [2] sa ustanovujú podrobné pravidlá uplatňovania nariadenia Rady (ES) č. 1255/1999 týkajúce sa metód analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov. Z hľadiska technického rozvoja v oblasti analytickej metodiky treba vykonať ďalšie podstatné zmeny. V záujme jasnosti a efektívnosti a z dôvodu počtu a technického charakteru zmien a doplnení by sa malo nariadenie (ES) č. 213/2001 zrušiť a nahradiť novým nariadením.

(2) Požiadavky na zloženie a kvalitu mlieka a mliečnych výrobkov ustanovené podľa nariadenia (ES) č. 1255/1999 musia byť overené, aby sa zabezpečilo ich dôsledné dodržiavanie.

(3) Referenčné metódy takýchto overovaní sú často metódy, ktoré uverejňujú a pravidelne aktualizujú medzinárodné organizácie, ako sú Európsky výbor pre normalizáciu (CEN), Medzinárodná mliekarenská federácia (IDF), Medzinárodná organizácia pre normalizáciu (ISO) a Medzinárodné vedecké združenie pre dokonalosť analýz (AOAC International), a pravidelne aktualizujú. V niektorých prípadoch sa ustanovuje referenčná metóda Spoločenstva, zatiaľ čo v iných prípadoch pravidlá Spoločenstva referenčnú metódu nešpecifikujú. V snahe zabezpečiť jednotné uplatňovanie referenčných metód treba vypracovať zoznam referenčných metód a ustanoviť povinnosť, že Komisia tento zoznam podľa potreby aktualizuje.

(4) Používanie rutinných metód sa nevylučuje. Preto je potrebné špecifikovať minimálne podmienky ich použitia.

(5) Treba ustanoviť aj bežné metódy na zabezpečenie jednotného postupu hodnotenia výsledkov analýz, senzorického hodnotenia daných výrobkov a prehodnocovania sporných výsledkov.

(6) Pre niektoré analýzy v súčasnosti neexistujú medzinárodne akceptované referenčné metódy, a preto nie sú dostupné žiadne informácie o rozdieloch medzi výsledkami analýz dosiahnutými v rôznych laboratóriách. Preto je potrebné ustanoviť metódy Spoločenstva, ktoré boli overené podľa medzinárodných pravidiel a ktoré by sa mali používať ako referenčné metódy.

(7) Nariadením Komisie (ES) č. 1898/2005 [3] sa ustanovujú podrobné pravidlá vykonávania nariadenia Rady (ES) č. 1255/1999, pokiaľ ide o opatrenia na predaj smotany, masla a koncentrovaného masla na trhu Spoločenstva, a ustanovuje sa za určitých okolností používanie značkovacích látok pri smotane, masle a koncentrovanom masle na zabezpečenie správneho konečného použitia týchto výrobkov. Sledovanie je dôležité na správne fungovanie systému. Na zabezpečenie rovnakého zaobchádzania s hospodárskymi subjetkmi treba ustanoviť spoločné metódy na určovanie niektorých z týchto značkovacích látok.

---

[1] Ú. v. ES L 160, 26.6.1999, s. 48. Nariadenie naposledy zmenené a doplnené nariadením (ES) č. 1152/2007 (Ú. v. EÚ L 258, 4.10.2007, s. 3). Nariadenie (ES) č. 1255/1999 sa nahrádza nariadením (ES) č. 1234/2007 (Ú. v. EÚ L 299, 16.11.2007, s. 1) s účinnosťou od 1. júla 2008.

[2] Ú. v. ES L 37, 7.2.2001, s. 1.

[3] Ú. v. EÚ L 308, 25.11.2005, s. 1. Nariadenie naposledy zmenené a doplnené nariadením (ES) č. 1546/2007 (Ú. v. EÚ L 337, 21.12.2007, s. 68).

(8) Podľa článku 9 nariadenia (ES) č. 1255/1999 je možné poskytovať pomoc pre súkromné skladovanie syrov vyrobených z ovčieho mlieka. Podľa článku 31 uvedeného nariadenia je možné poskytnúť na tieto výrobky osobitnú vývoznú náhradu. Syry vyrobené z ovčieho mlieka, kozieho mlieka a byvolieho mlieka a zo zmesí ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka je možné dovážať do Spoločenstva z niektorých tretích krajín podľa preferenčných dohôd. Vzhľadom na uvedené ustanovenia sú potrebné vhodné kontroly, ktorými sa zaručí, že dané výrobky neobsahujú kravské mlieko. Je preto potrebné ustanoviť referenčnú metódu Spoločenstva na zisťovanie kravského mlieka bez toho, aby bolo dotknuté používanie rutinných metód, ak tieto spĺňajú určité kritériá.

(9) Podľa nariadenia Komisie (EHS) č. 2921/90 z 10. októbra 1990 o pomoci pre výrobu kazeínu a kazeinátov z odstredeného mlieka [1] treba zisťovať neprítomnosť koliformiem. Medzinárodne uznávanou referenčnou metódou na zisťovanie koliformiem v mlieku a mliečnych výrobkoch je ISO 4831. Na základe uvedenej normy sa ustanovila referenčná metóda Spoločenstva na zisťovanie koliformiem.

(10) Nariadením Rady (EHS) č. 2658/87 z 23. júla 1987 o colnej a štatistickej nomenklatúre a o Spoločnom colnom sadzobníku [2] sa stanovujú rôzne výšky cla pre kŕmne zmesi patriace do položky colného sadzobníka č. 2309 v závislosti od ich obsahu mlieka. Na zabezpečenie jednotného uplatňovania uvedených pravidiel je potrebné ustanoviť všeobecne uznávanú metódu analýzy obsahu laktózy určenú na povinné používanie vo všetkých členských štátoch.

(11) Podľa nariadenia (ES) č. 1255/1999 maslo a sušené odstredené mlieko určené na intervenciu alebo v prípade sušeného odstredeného mlieka určené na použitie ako krmivo pre zvieratá musí spĺňať určité požiadavky kvality. Je potrebné ustanoviť referenčné metódy na overenie plnenia týchto požiadaviek.

(12) Niektoré metódy sú v tomto nariadení uvedené po prvýkrát. Na správne zavedenie a používanie týchto metód treba poskytnúť laboratóriám dostatočne dlhý čas od nadobudnutia platnosti tohto nariadenia pred ich povinným používaním. Kedykoľvek normalizačná organizácia zreviduje a zverejní referenčnú metódu uvedenú v prílohe I, laboratóriá majú na aktualizáciu svojich analytických postupov podľa novej normy šesť mesiacov.

(13) Opatrenia uvedené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Riadiaceho výboru pre mlieko a mliečnej výrobky,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

KAPITOLA 1

VŠEOBECNÉ USTANOVENIA

Článok 1

Predmet a rozsah pôsobnosti

1. Týmto nariadením sa ustanovujú určité referenčné metódy chemickej, fyzikálnej a mikrobiologickej analýzy a senzorického hodnotenia mlieka a mliečnych výrobkov, ktoré sa budú používať podľa úprav ustanovených v rámci spoločnej organizácii trhu s mliekom a mliečnymi výrobkami zavedenej nariadením (ES) č. 1255/1999 a pravidiel uplatňovania týchto metód.

2. Zoznam referenčných metód uplatniteľných na analýzy uvedené v odseku 1 sa uvádza v prílohe I k tomuto nariadeniu.

3. Komisia aktualizuje zoznam v súlade s postupom uvedeným v článku 42 nariadenia (ES) č. 1255/1999.

Článok 2

Rutinné metódy

Rutinné metódy je možné používať na analýzy požadované pravidlami Spoločenstva za predpokladu, že musia spĺňať rovnaké kritériá ako referenčná metóda a že sa pravidelne kontrolujú porovnávaním s referenčnou metódou. Výsledky sa porovnávajú so zreteľom na opakujúcu sa chybu, opakovateľnosť a reprodukovateľnosť.

V sporných prípadoch sú rozhodujúce výsledky získané referenčnou metódou.

Členské štáty informujú Komisiu o používaní rutinných metód analýzy uvedených v článku 1.

KAPITOLA II

METÓDY ANALÝZY

Článok 3

Hodnotenie súladu zásielky so zákonným limitom

Príloha II k tomuto nariadeniu sa používa na účely zistenia súladu so zákonnými požiadavkami na zloženie s výnimkou analýzy značkovacích látok.

[1] Ú. v. ES L 279, 11.10.1990, s. 22. Nariadenie naposledy zmenené a doplnené nariadením (ES) č. 1487/2006 (Ú. v. EÚ L 278, 10.10.2006, s. 8).

[2] Ú. v. ES L 256, 7.9.1987, s. 1. Nariadenie naposledy zmenené a doplnené nariadením Komisie (ES) č. 1352/2007 (Ú. v. EÚ L 303, 21.11. 2007, s. 3).

Článok 4

Senzorické hodnotenie

1. Pre mlieko a mliečne výrobky s výnimkou masla určeného na verejné skladovanie je referenčnou metódou, ktorú majú členské štáty používať na senzorické hodnotenie, buď norma IDF 99C:1997, alebo iné porovnateľné metódy, ktoré členské štáty oznámia Komisii.

Postupy opísané v prílohe III sa používajú na kontrolu výkonu hodnotiteľov a spoľahlivosť výsledkov senzorických analýz.

2. V prípade masla určeného na verejné skladovanie sa uplatňujú postupy kontroly výkonu hodnotiteľov a spoľahlivosti výsledkov opísané v prílohe III.

Postup ustanovený v prílohe IV sa uplatňuje ako referenčná metóda pre senzorické hodnotenie.

Článok 5

Značkovacie látky

1. Metóda analýzy ustanovená v prílohe V sa používa ako referenčná metóda na určovanie obsahu triglyceridov kyseliny heptánovej v masle, maslovom oleji a smotane.

2. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu vanilínu v koncentrovanom masle, masle a smotane sa používa metóda analýzy ustanovená v prílohe VI.

3. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu etyl-esteru kyseliny beta-apo-8' karoténovej v koncentrovanom masle a masle sa používa metóda analýzy ustanovená v prílohe VII.

4. Ako referenčná metóda na určovanie obsahu β-sitosterolu alebo stigmasterolu v masle a koncentrovanom masle sa používa metóda analýzy ustanovená v prílohe VIII.

5. Koncentrované maslo, maslo a smotana sa považujú za značkované podľa príslušných pravidiel Spoločenstva, ak sú získané výsledky v súlade so špecifikáciami bodov 10 a 11 prílohy V a bodu 8 príloh VI, VII a VIII.

Článok 6

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 kazeín z kravského mlieka, sa používa referenčná metóda analýzy ustanovená v prílohe IX.

Prítomnosť kazeínu z kravského mlieka sa potvrdí, ak je obsah kazeínu z kravského mlieka v analyzovanej vzorke rovnaký alebo vyšší ako obsah v referenčnej vzorke obsahujúcej 1 % kravského mlieka, ako sa ustanovuje v prílohe IX.

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

a) je detekčný limit max. 0,5 % a

b) neexistujú žiadne nesprávne pozitívne výsledky;

c) kazeín z kravského mlieka je zistiteľný s požadovanou citlivosťou aj po dlhých dobách zrenia, ku ktorým môže dôjsť v bežných obchodných podmienkach.

Ak nie je splnená niektorá z uvedených požiadaviek, použijú sa referenčné metódy ustanovené v prílohe IX.

Článok 7

Zisťovanie koliformiem

Koliformy v masle, sušenom odstredenom mlieku, kazeíne a kazeinátoch sa zisťujú v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe X.

Článok 8

Stanovenie obsahu laktózy

Obsah laktózy vo výrobkoch patriacich pod číselný znak KN 2309 sa určuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XI.

Článok 9

Zisťovanie syridlovej srvátky

1. Syridlová srvátka v sušenom odstredenom mlieku určenom na verejné skladovanie sa zisťuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XII.

2. Syridlová srvátka v sušenom odstredenom mlieku a v zmesiach určených na použitie ako krmivo pre zvieratá sa zisťuje v súlade s metódou ustanovenou v prílohe XII. V prípade zisťovania syridlovej srvátky by sa mali uplatniť ustanovenia v prílohe XIII.

Článok 10

Zisťovanie cmaru

Cmar v sušenom odstredenom mlieku sa zisťuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XIV.

Článok 11

Zisťovanie antimikrobiotických rezíduí

Antimikrobiotické rezíduá v sušenom odstredenom mlieku sa zisťujú v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XV.

Článok 12

Zisťovanie obsahu sušeného odstredeného mlieka

Obsah sušeného odstredeného mlieka v kŕmnych zmesiach sa zisťuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XVI.

Článok 13

Zisťovanie škrobu

Škrob v sušenom odstredenom mlieku, denaturovanom mliečnom prášku a kŕmnych zmesiach sa zisťuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XVII.

Článok 14

Určovanie obsahu vlhkosti v sušenej smotane

Obsah vlhkosti v sušenej smotane sa zisťuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XVIII.

Článok 15

Určovanie obsahu vlhkosti kyslého sušeného cmaru

Obsah vlhkosti kyslého cmaru v prášku určeného na použitie v kŕmnych zmesiach sa určuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XIX.

Článok 16

Určovanie čistoty mliečneho tuku

Čistota mliečneho tuku sa určuje v súlade s referenčnou metódou ustanovenou v prílohe XX.

KAPITOLA III

VŠEOBECNÉ A ZÁVEREČNÉ USTANOVENIA

Článok 17

Zabezpečenie kvality

Analýzy sa vykonávajú v laboratóriách, ktoré majú analytický systém zaistenia kvality vrátane interných postupov kontroly kvality. Neakreditované laboratóriá sa zúčastňujú systémov preskúšania odbornosti aspoň raz do roka a ich výsledky sa nesmú odchyľovať o viac ako $2\sigma_R$ (štandardná odchýlka reprodukovateľnosti referenčnej metódy) od konvenčnej hodnoty. Podrobný opis používaných systémov je k dispozícii k nahliadnutiu v laboratóriu.

Laboratóriá, ktoré sú akreditované v súlade s normami uvedenými v článku 12 nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 z 29. apríla 2004 o úradných kontrolách uskutočňovaných s cieľom zabezpečiť overenie dodržiavania potravinového a krmivového práva a predpisov o zdraví zvierat a starostlivosti o zvieratá [1], sú vyňaté z povinnosti zúčastňovať sa preskúšania odbornosti.

Článok 18

Odber vzoriek a spory o výsledkoch analýz

1. Vzorky sa odoberajú v súlade s príslušným nariadením vzťahujúcim sa na posudzovaný výrobok. Ak nie sú uvedené ustanovenia o odbere vzoriek, používajú sa ustanovenia uvedené v ISO 707 | IDF 50, Mlieko a mliečne výrobky – návod na odber vzoriek.

2. Laboratórne správy o výsledkoch analýz musia obsahovať dostatočné informácie na vyhodnotenie výsledkov, ktoré sa vykoná v súlade s prílohami II a XXI.

3. Na analýzy požadované podľa pravidiel Spoločenstva sa odoberajú dvojité vzorky.

4. Postup opísaný v prílohe XXI sa použije v prípadoch, keď hospodársky subjekt neakceptuje výsledky analýzy.

5. Ak môže hospodársky subjekt do piatich pracovných dní od odberu vzorky dokázať, že postup odberu vzorky sa neuskutočnil správne, odber vzorky treba podľa možnosti zopakovať. Ak sa odber vzorky nemôže zopakovať, zásielka sa musí akceptovať.

Článok 19

Prechodné obdobie

Hodnotenie súladu podľa prílohy II k tomuto nariadeniu sa vykoná do 12 mesiacov po tom, ako nariadenie nadobudne účinnosť. Členské štáty v prípade potreby bezodkladne informujú Komisiu, ak sa počas tohto obdobia vyskytne podstatnejší problém s postupom štatistickej kontroly.

Článok 20

Zrušenia

Nariadenie (ES) č. 213/2001 sa zrušuje.

Odkazy na zrušené nariadenia sa vykladajú ako odkazy na toto nariadenie a čítajú sa v súlade s tabuľkou zhody v prílohe XXII.

[1] Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.

Článok 21

Nadobudnutie účinnosti

Toto nariadenie nadobúda účinnosť tretím dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Uplatňuje sa od 31. marca 2008.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 5. marca 2008

Za Komisiu
Mariann FISCHER BOEL
členka Komisie

PRÍLOHA I

(Článok 1)

ZOZNAM REFERENČNÝCH METÓD

Index min. = minimum, max. = maximum, príloha = príloha k citovanému nariadeniu, NS = netučná sušina, HP = hodnota peroxidu, V = vzhľad, Ch = chuť, K = konzistencia, CPB = celkový počet baktérií, Term = termofilický počet baktérií, ČŠ = členský štát, IDF = Medzinárodná federácia pre mliečne výrobky, ISO = Medzinárodná normalizačná organizácia, IUPAC = Medzinárodná únia čistej a aplikovanej chémie, ADPI = Americký inštitút pre mliečne výrobky, SKM = sladené kondenzované mlieko, VMS = vyparené mlieko alebo smotana

ČASŤ A

Nariadenie Komisie	Výrobok	Parameter	Limit [1]	Referenčná metóda	Poznámka
nariadenie (ES) č. 2771/1999 – verejné skladovanie	nesolené maslo	tuk	min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		voda	až do 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		NS	až do 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		kyslosť tuku	1,2 mmol/100 g tuku	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		HP (max.)	0,3 meq. kyslíka/1 000 g tuku	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	poznámka 1
		koliformy	nezistiteľné v 1 g	príloha X	poznámka 3
		nemliečny tuk	nezistiteľné analýzou triglyceridov	príloha XX	
		sterolové značkovacie látky	nezistiteľné, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	príloha VIII	
		Ostatné značkovacie látky			
		— vanilín	nezistiteľné	príloha VI	
		— etyl-ester kyseliny karoténovej	≤ 6 mg/kg	príloha VII	
		— triglyceridy kyseliny heptánovej	nezistiteľné	príloha V	
		senzorické vlastnosti	najmenej 4 z 5 bodov pre V, Ch a K	príloha IV	

Nariadenie Komisie	Výrobok	Parameter	Limit (1)	Referenčná metóda	Poznámka
		disperzia vody	najmenej 4 body	ISO 7586:1985-IDF 112A:1989	
nariadenie (ES) č. 2771/1999 – súkromné skladovanie	nesolené maslo	tuk	min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		voda	až do 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		NS	až do 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
nariadenie (ES) č. 2771/1999 – súkromné skladovanie	solené maslo	tuk	min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		voda	až do 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		NS (okrem soli)	až do 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		soľ	až do 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
nariadenie (ES) č. 1898/2005 kapitola II	nesolené maslo	tuk	min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		nemliečny tuk		Príloha XX	
		voda	až do 16 % m/m	ISO 3727-1 2001|IDF 80-1:2001	
		NS	až do 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		Značkovacie látky:			
		— steroly	pozri prílohu VIII	príloha VIII	
		— vanilín	pozri prílohu VI	príloha VI	
		— etyl-ester kyseliny karoténovej	pozri prílohu VII	príloha VII	
		— triglyceridy kyseliny heptánovej	pozri prílohu V	príloha V	
nariadenie (ES) č. 1898/2005 kapitola II	solené maslo	tuk	min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		nemliečny tuk		Príloha XX	
		voda	až do 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		NS (okrem soli)	až do 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		soľ	až do 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Značkovacie látky:			
		— steroly	pozri prílohu VIII	príloha VIII	
		— vanillín	pozri prílohu VI	príloha VI	

Nariadenie Komisie	Výrobok	Parameter	Limit (1)	Referenčná metóda	Poznámka
		— etyl-ester kyseliny karoténovej	pozri prílohu VII	príloha VII	
		— triglyceridy kyseliny heptánovej	pozri prílohu V	príloha V	
nariadenie (ES) č. 1898/2005 kapitola II	koncentrované maslo	tuk	min. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	
		voda a ns	až do 0,2 % m/m	ISO 5536:2002|IDF 23:2002 (vlhkosť) IDF 24:1964 (NS)	
		kyslosť tuku	1,2 mmol/100 g tuku	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		HP (max.)	0,5 meq. kyslíka/1 000 g tuku	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Poznámka 1
		nemliečny tuk	neprítomný	príloha XX	
		chuť	čistá		
		zápach	bez cudzieho zápachu		
		iné	bez neutralizačných činidiel, antioxidantov a konzervačných látok		
		Značkovacie látky			
		— steroly	pozri prílohu VIII	príloha VIII	
		— vanillín	pozri prílohu VI	príloha VI	
		— etyl-ester kyseliny karoténovej	pozri prílohu VII	príloha VII	
		— triglyceridy kyseliny heptánovej	pozri prílohu V	príloha V	
nariadenie (ES) č. 1898/2005 kapitola II	smotana	tuk	minimum 35 % m/m	ISO 2450:1999 – IDF 16 C:1987	
		nemliečny tuk		príloha XX	
		Značkovacie látky:			
		— steroly	pozri prílohu VIII		poznámka 2
		— vanilín	pozri prílohu VI	príloha VI	
		— etyl-ester kyseliny karoténovej	pozri prílohu VII		poznámka 2
		— triglyceridy kyseliny heptánovej	pozri prílohu V	príloha V	

Nariadenie Komisie	Výrobok	Parameter	Limit ([1])	Referenčná metóda	Poznámka
nariadenie (ES) č. 1898/2005 kapitola III	koncentrované maslo	tuk	min. 96 % m/m		poznámka 2
		nemliečny tuk		príloha XX	
		NS	až do 2 % m/m		poznámka 2
		Značkovacie látky:			
		— stigmasterol (95 % m/m)	15 g/100 kg koncentrovaného masla	príloha VIII	
		— stigmasterol (85 % m/m)	17 g/100 kg koncentrovaného masla	príloha VIII	
		— triglyceridy kyseliny heptánovej	10,34 kg/t koncentrovaného masla	príloha V	
		— etyl-ester kyseliny maslovej a stigmasterol		— etyl-ester kyseliny maslovej — stigmasterol: príloha VIII	poznámka 2
		— etyl-ester kyseliny maslovej a triglyceridy kyseliny heptánovej		— etyl-ester kyseliny maslovej — triglyceridy kyseliny heptánovej: príloha V	poznámka 2
		lecitín (E 322)	až do 0,5 % m/m		poznámka 2
		NaC1	až do 0,75 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		kyslosť tuku	1,2 mmol/100 g tuku	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		HP (max.)	až do 0,5 meq. kyslíka/1 000 g tuku	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	poznámka 1
		chuť	čistá		
		pach	bez cudzieho zápachu		
		iné	neprítomnosť neutralizačných činidiel, antioxidantov a konzervačných látok		
Nariadenie (ES) č. 1898/2005 kapitola IV	nesolené maslo	tuk	min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		voda	až do 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		NS	až do 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
nariadenie (ES) č. 1898/2005 kapitola IV	solené maslo	tuk	min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	

Nariadenie Komisie	Výrobok	Parameter	Limit (1)	Referenčná metóda	Poznámka
		voda	až do 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
		NS (okrem soli)	až do 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	
		soľ	až do 2 % m/m	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
článok 9 a hlava II nariadenia (ES) č. 1255/1999	syr vyrábaný z ovčieho a/alebo kozieho mlieka	kravské mlieko	< 1 % m/m	príloha IX	
Nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha I – Kyslý kazeín	voda	až do 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		tuk	až do 1,75 % m/m	ISO 5543:2004|IDF127:2004	
		voľné kyseliny	až do 0,30 ml roztoku 0,1 N NaOH/g	ISO 5547:1978 – IDF 91:1979	
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha I – Syridlový kazeín	voda	až do 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		tuk	až do 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		popol	min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha I – Kazeináty	voda	až do 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		mliečny proteín	min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978 – IDF 92:1979	
		tuk a popol	až do 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		viazaný popol		ISO 5544:1978 – IDF 89:1979	
		popol		ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha II – Kyslý kazeín	voda	až do 10,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		tuk	až do 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		voľné kyseliny	až do 0,20 ml roztoku 0,1 N NaOH /g	ISO 5547:1978 – IDF 91:1979	
		CPB (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	poznámka 3
		koliformy	neprítomné v 0,1 g	príloha X	poznámka 3
		term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	poznámky 3 a 4
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha II – Syridlový kazeín	voda	až do 8,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		tuk	až do 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		popol	min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
		CPB (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	poznámka 3
		koliformy	neprítomné v 0,1 g	príloha X	poznámka 3

Nariadenie Komisie	Výrobok	Parameter	Limit (1)	Referenčná metóda	Poznámka
		term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	poznámky 3 a 4
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha II – Kazeináty	voda	až do 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		mliečny proteín	min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978 – IDF 92:1979	
		tuk a popol	až do 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004 ISO 5544:1978 – IDF 89:1979 or ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
		CPB (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	poznámka 3
		koliformy	neprítomné v 0,1 g	príloha X	poznámka 3
		term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	poznámky 3 a 4
nariadenie (EHS) č. 2921/90	príloha III – Kazeináty	voda	až do 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		mliečne proteíny	min. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978 – IDF 92:1979	
		tuk	až do 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		laktóza	až do 1,00 % m/m	ISO 5548:2004|IDF 106:2004	
		popol	až do 6,50 % m/m	ISO 5544:1978 – IDF 89:1979 alebo ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
		CPB (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	poznámka 3
		koliformy	neprítomné v 0,1 g	príloha X	poznámka 3
		term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	poznámky 3 a 4
nariadenie (ES) č. 2799/1999	kŕmne zmesi a odstredené sušené mlieko (OSM) (na použitie v krmivách)	voda (kyslý sušený cmar)	až do 5 % m/m	príloha XIX	
		proteín	31,4 % m/m (min.) netučnej sušiny	ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
		voda (OSM)	až do 5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		tuky (OSM)	až do 11 % m/m	ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987	
		syridlová srvátka (OSM)	neprítomná	príloha XIII	poznámka 6
		škrob (OSM)	neprítomná	príloha XVII	
		voda (zmesi)	až do 5 % m/m netučnej látky	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		tuk (zmesi)		smernica Komisie 84/4/EHS (Ú. v. ES L 15, 18.1.1984, s. 29)	

Nariadenie Komisie	Výrobok	Parameter	Limit (1)	Referenčná metóda	Poznámka
		syridlová srvátka (zmesi)	neprítomná	príloha XIII	
		obsah OSM (v konečnom výrobku)	min. 50 % m/m	príloha XVI	
		tuk (v konečnom výrobku)	min. 2,5 % m/m alebo 5 % m/m	smernica Komisie 84/4/EHS (Ú. v. ES L 15, 18.1.1984, s. 29)	poznámka 7
		škrob (v konečnom výrobku)	min. 2 % m/m	príloha XVII	poznámka 8
		meď (v konečnom výrobku)	25 ppm	smernica Komisie 78/633/EHS (Ú. v. ES L 206, 26.7.1987, s. 43)	
nariadenie (ES) č. 214/2001	OSM (sprej)	tuk	až do 1,0 % m/m	ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987	
		proteín	31,4 % (2)m/m (min.) netučnej sušiny	ISO 8968-1/2:2001|IDF 20-1/2:2001	
		voda	až do 3,5 % m/m	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		kyslosť	až do 19,5 ml, 0,1N NaOH, 10 g netučnej sušiny	ISO 6091:1980 – IDF 86:1981	
		laktáty	až do 150 mg/100 g netučnej sušiny	ISO 8069:2005|IDF 69:2005	
		fosfatáza	negatívna	ISO 11816-1:2006|IDF 155-1:2006	
		index nerozpustnosti	až do 0,5 ml pri 24 °C	ISO 8156:2005|IDF 129:2005	
		pripálené častice	disk A alebo B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		CPB	40 000/ g	ISO 4833:2003	poznámka 3
		koliformy	negatívne/0,1 g	príloha X	poznámka 3
		cmar	negatívne	príloha XIV	
		syridlová srvátka	negatívne	príloha XII	
		kyslá srvátka	negatívne		poznámka 2
		antimikrobiálne činitele		príloha XV	

(1) Bez toho, aby boli dotknuté požiadavky v osobitnom nariadení.
(2) Minimálny obsah proteínov od 1. septembra 2009 bude 34 %.

ČASŤ B

Referenčné metódy uvedené v časti B sa môžu uplatniť na analýzu výrobkov, ktorých sa týkajú nariadenia uvedené v stĺpci 1.

Nariadenie Komisie	Výrobok	Číselný znak KN	Parameter	Limit	Referenčná metóda	Poznámka
nariadenie (EHS) č. 2658/87 nariadenie (ES) č. 2535/2001 nariadenie (ES) č. 1282/2006	mlieko a smotana, nekoncentrované bez obsahu pridaného cukru alebo iného sladidla	0401	tuk (≤ 6 % m/m)	limity sú uvedené v opise kódu KN pre konkrétny výrobok, v príslušných prípadoch ďalej definované v nariadení Komisie (EHS) č. 3846/87 (Ú. v. ES L 366, 24.12.1987, s. 1), časť 9 exportnej nomenklatúry, alebo v nariadení (ES) č. 2535/2001 (Ú. v. ES L 341, 22.12.2001, s. 29)	ISO 1211:2001 – IDF 1D:1996	
			tuk (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999 – IDF 16C:1987	
	mlieko a smotana, koncentrované alebo obsahujúce pridaný cukor alebo sladidlo	0402	tuk (v tekutej forme)		ISO 1737:1999 – IDF 13C:1987	
			tuk (v tuhej forme)		ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987	
			proteín		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			sacharóza (normálny obsah)		ISO 2911:2004| IDF 35:2004	
			sacharóza (nízky obsah)			poznámka 2
			sušina (SKM)		ISO 6734:1989 – IDF 15B:1991	
			sušina (VMS)		ISO 6731:1989 – IDF 21B:1987	
			voda (sušené mlieko)		ISO 5537:2004/IDF 26:2004	
			voda (sušená smotana)		príloha XVIII	
	cmar, fermentované alebo acidofilné mlieko a smotana, koncentrované alebo nekoncentrované, obsahujúce pridaný cukor alebo iné sladidlo	0403	tuk		ISO 1211:2001 – IDF 1D:1996 ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987 ISO 2450:1999 – IDF 16 C:1987 ISO 7208:1999 – IDF 22B:1987 ISO 8262 – 3:2005 – IDF 124 – 3:2005	

Nariadenie Komisie	Výrobok	Číselný znak KN	Parameter	Limit	Referenčná metóda	Poznámka
			proteín		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			sacharóza (normálny obsah)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			sacharóza (nízky obsah)			poznámka 2
			voda (kyslý sušený cmar)		príloha XIX	
			voda (sladký sušený cmar)		ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
			sušina (iné výrobky)		metódy schválené príslušným orgánom	
	srvátka, koncentrovaná alebo nekoncentrovaná, alebo obsahujúca či neobsahujúca pridaný cukor alebo iné sladidlo; výrobky z prírodných mliečnych zložiek	0404	tuk		ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987 ISO 2450:1999 – IDF 16C:1987 ISO 7208:1999 – IDF 22B:1987	
			proteín		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			sacharóza (normálny obsah)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			sacharóza (nízky obsah)			poznámka 2
		0404 90	proteín		ISO 8968 1/2 2001|IDF 20-1/2:2001	
			voda		IDF 21B:1987	
			sušina		ISO 6734:1989 – IDF 15B:1991	
			(koncentrované výrobky)		ISO 6731:1989 – IDF 21B:1987	
	maslo a iné mliečne tuky; nátierky z mliečnych výrobkov	0405	tuk (ak ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		maslo	voda		ISO 3727-1:2001|IDF 80-1:2001	
			NS		ISO 3727-2:2001|IDF 80-2:2001	

Nariadenie Komisie	Výrobok	Číselný znak KN	Parameter	Limit	Referenčná metóda	Poznámka
			NaCl		ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
			tuk (ak > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	maslový olej		voda (ak je tuk < 99 % m/m)		ISO 5536:2002|IDF 23:2002	
	syr a tvaroh	0406	tuk		ISO 1735:2004|IDF 5:2004	
			sušina		ISO 5534:2004|IDF 4:2004	
			sušina (Ricotta)		ISO 2920:2004|IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006|IDF 88:2006	
			laktóza		ISO 5765-1/2:2002|IDF 79-1/2:2002	
nariadenie (EHS) č. 2658/87	krmné zmesi	2309	laktóza		príloha XI	

Poznámky k zoznamu referenčných metód Európskej únie
Poznámka 1: Izolovanie mliečneho tuku podľa opisu v ISO 1740:1991 (chrániť pred svetlom).
Poznámka 2: Nebola ustanovená žiadna referenčná metóda. Metódy schválil príslušný orgán.
Poznámka 3: Vzorky treba pripraviť podľa ISO 8261:2001|IDF 122:2001.
Poznámka 4: Inkubačná doba je 48 hodín pri teplote 55 °C, pozor, aby kultúra nevyschla.
Poznámka 5: % m/m NS = % m/m sušiny – % m/m tuku.
Poznámka 6: Smernica Komisie 84/4/EHS.
Poznámka 7: Nariadenie Komisie (ES) č. 2799/1999 (Ú. v. ES L 340, 31.12.1999, s. 3 – 27).
Poznámka 8: Smernica Komisie 78/633/EHS.

PRÍLOHA II

(Článok 3)

HODNOTENIE SÚLADU ZÁSIELKY SO ZÁKONNÝM LIMITOM

1. PRINCÍP

V prípadoch, kde sú podrobné postupy odberu vzoriek ustanovené v príslušných právnych predpisoch, sa tieto postupy dodržiavajú. Vo všetkých ostatných prípadoch sa zo zásielky predloženej na kontrolu použije vzorka najmenej troch náhodne odobraných častí vzorky. Možno pripraviť vzorku pozostávajúcu z viacerých jednotlivých častí. Získaný výsledok sa porovnáva so zákonnými limitnými hodnotami výpočtom 95 % intervalu spoľahlivosti ako 2 x štandardná odchýlka, pričom príslušná štandardná odchýlka závisí od toho, či 1. je metóda overená v medzinárodnej spolupráci s hodnotami pre σr a σ_R, alebo 2. je vypočítaná interná reprodukovateľnosť v prípade interného overovania. Tento interval spoľahlivosti sa potom rovná výsledku neistoty merania.

2. METÓDA JE OVERENÁ PROSTREDNÍCTVOM MEDZINÁRODNEJ SPOLUPRÁCE

V tomto prípade sa stanovila štandardná odchýlka opakovateľnosti σr a štandardná odchýlka reprodukovateľnosti σ_R a laboratórium môže preukázať zhodu s výkonnostnými charakteristikami overenej metódy.

Vypočítajte aritmetický priemer $\bar{x}$ opakovaných meraní *n*.

Vypočítajte rozšírenú neistotu (*k* = 2) $\bar{x}$ ako

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

Ak sa konečný výsledok *x* merania vypočíta podľa vzorca v tvare $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ alebo $x = y_1 / y_2$, treba dodržiavať zvyčajné postupy kombinovania štandardných odchýlok v takýchto prípadoch.

Zásielka nie je v súlade s horným zákonným limitom *UL*, ak

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

inak sa posudzuje ako v súlade s *UL*.

Zásielka nie je v súlade so spodným zákonným limitom *LL*, ak

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

inak sa posudzuje ako v súlade s *LL*.

3. INTERNÉ OVEROVANIE S VÝPOČTOM ŠTANDARDNEJ ODCHÝLKY INTERNEJ REPRODUKOVATEĽNOSTI

V prípadoch, v ktorých sa používajú metódy, ktoré nie sú tomto nariadení vymedzené, a neustanovili sa presné kritériá, treba vykonať internú validáciu. Vo vzorci na výpočet rozšírenej neistoty *U* treba namiesto σ_r a σ_R použiť štandardnú odchýlku internej opakovateľnosti s_{ir} a štandardnú odchýlku internej reprodukovateľnosti s_{iR}.

Rozhodujúce pravidlá sú uvedené v bode 1. Ak však zásielka nie je v súlade so zákonným limitom, meranie treba zopakovať metódou uvedenou v tomto nariadení a dospieť k rozhodnutiu podľa bodu 1.

PRÍLOHA III

(Článok 4)

HODNOTENIE HODNOTITEĽOV A SPOĽAHLIVOSŤ VÝSLEDKOV V SENZORICKÝCH ANALÝZACH

Pri použití bodovacích metód (norma IDF 99C:1997) sa uplatňujú tieto postupy.

A. STANOVENIE „INDEXU OPAKOVATEĽNOSTI“

Hodnotiteľ v období 12 mesiacov vykoná na desiatich dvojitých vzorkách slepé skúšky. Tieto analýzy sa zvyčajne uskutočňujú v rozličných časoch. Výsledky pre jednotlivé vlastnosti výrobku sa hodnotia použitím nasledujúceho vzorca:

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

pričom

w_i: index opakovateľnosti

x_{i1}: body za prvé hodnotenie vzorky x_i

x_{i2}: body za druhé hodnotenie vzorky x_i

n: počet vzoriek

Vzorky, ktoré sa hodnotia, by mali zahŕňať širokú škálu kvality. 1 by nemalo prekročiť hodnotu 1,5 (5-bodovej stupnice).

B. URČOVANIE „INDEXU ODCHÝLKY“

Tento index sa používa na kontrolu, či hodnotiteľ používa rovnakú stupnicu na hodnotenie kvality ako skúsená skupina expertov. Body získané hodnotiteľom sa porovnajú s priemerom bodov získaných skupinou expertov.

Na hodnotenie výsledkov sa používa tento vzorec:

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

pričom

x_{i1}; x_{i2}: pozri oddiel (A)

$\bar{x}_{i1}$; $\bar{x}_{i2}$: priemerný počet bodov skupiny expertov za prvé a druhé hodnotenie vzorky x_i

n: počet vzoriek (najmenej desať za 12 mesiacov)

Vzorky, ktoré sa hodnotia, by mali zahŕňať širokú škálu kvality. D_1 by nemalo prekročiť hodnotu 1,5 (5 bodové stupnice).

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

Ak sa zistí, že jednotliví hodnotitelia prekročili 1,5-bodový limit pre indexy odchýlky alebo opakovateľnosti, expert/experti úradného orgánu musia v niekoľkých nasledujúcich týždňoch vykonať jednu alebo viacero náhodných „opakovane vykonaných“ kontrol vzoriek alebo vykonať jednu kontrolu alebo viac „sprievodných“ kontrol s týmito hodnotiteľmi. Prísne monitorovanie je nevyhnutné na rozhodnutie, či využívať ich služby aj naďalej. Nálezy by sa mali zdokumentovať a zachovať ako dôkaz následne podniknutých krokov.

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, ktoré získali experti z rôznych regiónov. Ak sa spozorujú významné odchýlky, treba vykonať potrebné kroky na identifikovanie dôvodov a dosiahnuť porovnateľné výsledky.

Členské štáty môžu uskutočniť testy na porovnanie výsledkov, ktoré získali ich vlastní hodnotitelia, s výsledkami hodnotiteľov zo susedných členských štátov. Významné odchýlky by mali viesť k podrobnému prešetreniu s cieľom dosiahnuť porovnateľné výsledky.

Členské štáty informujú Komisiu o výsledkoch týchto porovnaní.

PRÍLOHA IV

(Článok 4)

SENZORICKÉ HODNOTENIE MASLA

1. ROZSAH PÔSOBNOSTI

Účelom tohto postupu senzorického hodnotenia masla je ustanovenie jednotnej metódy uplatniteľnej vo všetkých členských štátoch.

Ďalšie podrobnosti o senzorickom hodnotení pozri v súčasnej medzinárodnej norme IDF pre mlieko a mliečne výrobky, IDF 99 – časti 1, 2, 3.

2. VYMEDZENIE POJMOV

Senzorické hodnotenie (posúdenie) znamená preskúmanie atribútov výrobku zmyslovými orgánmi.

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

Hodnotiteľ je definovaný ako osoba vybraná pre svoju schopnosť vykonať senzorický test. Tento druh hodnotiteľa môže mať obmedzené skúsenosti.

Odborný hodnotiteľ je definovaný ako osoba s vysokým stupňom senzorickej citlivosti a skúsenosti so senzorickou metodikou, ktorá je schopná robiť dôsledné a spoľahlivé senzorické hodnotenia rôznych výrobkov. Tento druh hodnotiteľa má dobrú dlhodobú senzorickú pamäť.

Bodovanie znamená, že panel maslo senzoricky hodnotí prostredníctvom 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 každý atribút a konečnú známku výrobku. (Tento dokument sa môže použiť aj na zaznamenanie chemického zloženia.)

3. TESTOVACIA MIESTNOSŤ

Bližšie pozri v ISO 8589 a ISO/DIS 22935-2 | IDF 99-2 ods. 7.

Je potrebné prijať bezpečnostné opatrenia, aby hodnotitelia neboli v testovacej miestnosti ovplyvňovaní vonkajšími faktormi.

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

Testovacia miestnosť a jej osvetlenie musia byť také, aby neovplyvňovali vlastnosti výrobkov, ktoré sa bodujú.

Miestnosť musí byť vybavená vhodným termostatickým ovládačom, ktorý umožňuje udržiavať stálu teplotu masla. V čase posudzovania by malo mať maslo teplotu 12 °C (± 2 °C).

4. VÝBER HODNOTITEĽOV

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

4.1. Podrobné údaje o všeobecných požiadavkách a skríningových testoch, ktoré možno použiť pred oficiálnym využitím nového hodnotiteľa, treba overiť v ISO/DIS 22935-1 | IDF 99-1 ods. 4 (nábor) a ods. 5.1.

Zásadne dôležité je priebežná odborná príprava a pravidelné všeobecné kurzy. Informácie o odbornej príprave panelu pozri v ISO 8586-1.

4.2. Počiatočné školenie by sa malo obsahovať:

— všeobecnú teóriu a praktický význam senzorického hodnotenia,

— metódy, stupnice a opis senzorických dojmov,

— zisťovanie a uznávanie senzorických atribútov a osobitných senzorických termínov,

— základnú odbornú prípravu o výrobe masla,

— potvrdené referenčné hodnoty a vzorky, ktoré majú hodnotiteľovi pomôcť identifikovať osobitné príchute a intenzitu chuti výrobku.

5. POŽIADAVKY NA PANEL

Počet hodnotiteľov v paneli by mal byť nepárny, najmenej traja. Väčšina z nich musí byť zamestnancami príslušného orgánu alebo oprávnenými osobami, ktoré nie sú zamestnané v mliekarenskom priemysle.

Za celý postup zodpovedá vedúci panelu, ktorý sa na činnosti panelu môže zúčastňovať.

Pred hodnotením je potrebné zohľadniť na dosiahnutie optimálnych výkonov subjektov tieto faktory:

— hodnotitelia nesmú trpieť chorobou, ktorá by mohla ovplyvniť ich výkon. V takom prípade sa daný hodnotiteľ v paneli nahradí iným,

— hodnotitelia sa musia dostaviť načas, aby sa zúčastnili hodnotenia, a vyhradiť si dostatok času na vykonanie hodnotenia,

— hodnotitelia nesmú používať látky so silnou vôňou ako parfum, vodu po holení, dezodorant atď. a mali by sa vyhýbať jedlám so silnou chuťou (napr. veľmi koreneným jedlám) atď.,

— hodnotitelia nesmú počas pol hodiny pred hodnotením fajčiť, jesť alebo piť niečo iné než vodu.

6. VÝKON

Všetci hodnotitelia by sa mali zúčastňovať na pravidelných paneloch senzorického hodnotenia, aby si zachovali svoju kompetentnosť. Frekvencia závisí od objemu a množstva masla, a ak je to možné, mesačne by sa malo konať aspoň jedno zasadanie.

Aj skúsení hodnotitelia by sa mali každoročne zúčastňovať na viacerých paneloch, ak je to možné, najmenej raz za štvrťrok.

7. VÝBER A PRÍPRAVA VZORKY

Zásadne dôležité je, aby bola počas hodnotenia identita vzoriek utajená, aby sa tým predišlo možnej predpojatosti. Vzorky by mali byť kódované.

Toto treba zorganizovať pred hodnotením. Požadovaná teplota masla počas prevozu do testovacej miestnosti by mala byť nastavená (6 °C ± 2 °C).

Ak sa senzorické hodnotenie vykonáva v studenom sklade, vzorka sa odoberie vzorkovacou sondou. Ak sa senzorické hodnotenie vykonáva na inom mieste ako v studenom sklade, odoberie sa najmenej 500 gramová vzorka. Počas hodnotenia by malo mať maslo teplotu 12 °C (± 2 °C) (pozri: v ISO/DIS 22935-2 | IDF 99-2 teplota masla pri hodnotení je 14 °C ± 2 °C). V každom prípade je potrebné vyhnúť sa veľkým odchýlkam.

8. URČOVANIE HODNOTY KAŽDÉHO ATRIBÚTU

8.1. Senzorické hodnotenie treba vykonávať vo vzťahu k týmto trom atribútom: vzhľad, konzistencia a chuť.

Vzhľad zahŕňa tieto vlastnosti: farba, viditeľná čistota, neprítomnosť fyzickej kontaminácie, neprítomnosť rastu plesne a jednotnosť disperzie vody. Disperzia vody sa testuje podľa normy IDF 112A/1989.

Konzistencia zahŕňa tieto vlastnosti: masa, textúra a pevnosť. Roztierateľnosť možno sledovať fyzickými prostriedkami, ak si to jednotlivý členský štát želá na uspokojenie požiadaviek zákazníkov. Komisia sa môže v budúcnosti rozhodnúť zharmonizovať metodiku.

Masa je pojem, ktorý sa vzťahuje na súdržnosť výrobku pri konzumácii. Bežne súvisí s pevnosťou a roztierateľnosťou a mala by byť v celom výrobku jednotná. Úzko súvisí s textúrou a je to schopnosť výrobku odolávať vlastnej hmotnosti. Naznačuje ju odolnosť pri krájaní a možno ju merať mechanicky a pocitom v ústach a prstoch.

Chuť je vlastnosť pociťovaná v ústach predovšetkým chuťovými pohárikmi jazyka.

Aróma je vlastnosť pociťovaná nosom a čuchovým zmyslom.

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

Známkovanie masla treba odložiť, ak je teplota mimo odporúčaného rozsahu.

8.2. Každá charakteristika sa musí senzoricky hodnotiť osobitne. Bodovanie treba robiť podľa tabuľky 1.

8.3. Môže byť žiaduce, aby hodnotitelia na dosiahnutie jednotnosti pred začatím hodnotenia spoločne obodovali vzhľad, konzistenciu a chuť jednej alebo viacerých referenčných vzoriek.

8.4. Bodovanie na prijateľnosť je:

Pozri časť 7 – Nomenklatúra a opis kritérií uplatniteľných na body pri bodovaní.

	Maximum	Požadované
Vzhľad	5	4
Konzistencia	5	4
Chuť/aróma	5	4

— Ak sa nedosiahnu požadované body, je nutné poskytnúť opis kazu.

— Body poskytnuté každým hodnotiteľom pre každú charakteristiku musia byť zaznamenané v kontrolnom dokumente.

— Výrobok sa akceptuje alebo odmietne na základe väčšinového rozhodnutia.

— Prípady, keď rozdiely medzi jednotlivými bodovaniami každého atribútu sú väčšie ako susedné body, by sa nemali vyskytovať často (nie viackrát ako jedenkrát na 20 vzoriek). V opačnom prípade vedúci panelu preverí kompetentnosť panelu.

9. DOZOR

Za celý proces je zodpovedný vedúci panelu, ktorý musí byť oficiálnym zamestnancom príslušného orgánu a môže byť členom panelu. Do kontrolného dokumentu musí zaznamenať jednotlivé počty bodov pre každú charakteristiku a potvrdiť, či sa výrobok akceptuje, alebo zamieta.

10. NOMENKLATÚRA

Pozri priloženú tabuľku 2.

11. ZDROJ

FIL-IDF 99C:1997 Sensory evaluation of dairy products by scoring – Reference method (Senzorické hodnotenie mliekarenských výrobkov bodovaním – referenčná metóda)

ISO/DIS 22935 | IDF 99 International Standard for Milk and Milk Products – Sensory analysis – Parts 1 – 3 (Medzinárodná norma pre mlieko a mliečne výrobky – Senzorická analýza – časti 1 – 3)

ISO 8586-1 General guidance for selection, training and monitoring of assessors- Part 1 (Senzorická analýza – Všeobecná smernica na výber, školenie a monitorovanie hodnotiteľov – časť 1)

ISO 8589 Senzorická analýza – Všeobecná smernica na usporiadanie senzorického pracoviska

FIL-IDF 112A:1989 Butter- Determination of water dispersion value (Maslo – určovanie hodnoty disperzie vody)

Tabuľka 1

Bodovanie masla

Vzhľad			Konzistencia			Chuť a aróma		
Body	Číslo [1]	Poznámky	Body (trieda kvality)	Číslo [1]	Poznámky	Body (trieda kvality)	Číslo [1]	Poznámky
5		*Veľmi dobrý* ideálny typ najvyššej kvality (rovnomerne suchý)	5		*Veľmi dobrá* ideálny typ najvyššej kvality (dobre roztierateľná)	5		*Veľmi dobrá* ideálny typ najvyššej kvality (úplne čistá najjemnejšia aróma)
4		*Dobrý* [2] bez viditeľných kazov	4	 17 18	*Dobrá* [2] tvrdá mäkká	4		*Dobrá* [2] bez viditeľných kazov
3	 1 2 3 4 5 6 7 8	*Dostatočný (drobné kazy)* voľná vlhkosť nejednotný dvojfarebný prúžkovaný škvrnitý, mramorový fľakatý separácia oleja príliš farebné slabý, otvorená textúra	3	 14 15 16 17 18	*Dostatočná (drobné kazy)* krátke, krehké, drobivé pastovité, cestovité, mastné lepkavé tvrdé mäkké	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Dostatočná (drobné kazy)* nečisté cudzia príchuť kyslé varivá príchuť, pripálená chuť chuť po krmive surové, horké presolené
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Zlý (viditeľné kazy)* voľná vlhkosť prúžkovaný škvrnitý, mramorový fľakatý separácia oleja cudzie látky plesnivý nerozpustená soľ	2	 14 15 16 17 18	*Zlá (viditeľné kazy)* krátke, krehké, drobivé pastovité, cestovité, mastné lepkavé tvrdé mäkké	2	 21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Zlá (viditeľné kazy)* nečisté cudzia príchuť zatuchnuté kyslé okysličená príchuť, kovová príchuť chuť po krmive surové, horké presolené plesnivé, hnilé chemická príchuť
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Veľmi zlý (silné kazy)* voľná vlhkosť prúžkovaný škvrnitý, mramorový fľakatý separácia oleja príliš farebný granulovitý cudzie látky plesnivý nerozpustená soľ	1	 14 15 16 17 18	*Veľmi zlá (silné kazy)* krátke, krehké, drobivé pastovité, cestovité, mastné lepkavé tvrdé mäkké	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Veľmi zlá (silné kazy)* cudzia príchuť syrová, mliečna príchuť kyslé drožďovité plesnivá príchuť zhnité olejnaté, rybnaté lojovité okysličená príchuť, kovová príchuť surové, horké presolené plesnivé, hnilé sladovité chemická príchuť

[1] Tabuľka 2.

[2] Kazy uvedené pod „dobrý“ sú len veľmi malé odchýlky 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.	nečisté [1]
22.	cudzia príchuť
23.	zatuchnuté
24.	syrová, mliečna príchuť
25.	kyslé
26.	drožďovité
27.	a) varivá príchuť
	b) pripálená príchuť
28.	plesnivá chuť
29.	zhnité
30.	olejnaté, rybnaté
31.	lojovité
32.	a) okysličená 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 najmenej a len ak sa nedá kaz opísať presnejšie.

PRÍLOHA V

(Článok 5)

STANOVENIE OBSAHU TRIGLYCERIDOV KYSELINY HEPTÁNOVEJ V MASLE, MASLOVOM OLEJI A SMOTANE PLYNOVOU CHROMATOGRAFICKOU ANALÝZOU TRIGLYCERIDOV

1. ROZSAH

Týmto sa ustanovuje metóda určovania obsahu triglyceridov kyseliny heptánovej v maslovom oleji, masle a smotane.

2. POJMY A ICH VYMEDZENIA

Obsah kyseliny heptánovej: obsah triglyceridov kyseliny heptánovej určený postupom ustanoveným v tejto metóde.

Poznámka: Obsah kyseliny heptánovej je vyjadrený v kg/t výrobku u maslového oleja a masla a v kg/t mliečneho tuku u smotany.

3. PRINCÍP

Mliečny tuk sa extrahuje z rôznych výrobkov podľa ISO 14156 | IDF 172:2001. Kvantitatívne určovanie obsahu triglyceridov kyseliny heptánovej v extrahovanom tuku sa vykonáva kapilárnou plynovou chromatografiou. Výsledok získaný u vzorky sa hodnotí vo vzťahu k triglyceridom kyseliny hexánovej ako k medzinárodnému štandardu.

Poznámka: Zistilo sa, že uspokojivým interný štandardom je aj tributyrín.

4. REAGENTY

Používajte len reagenty uznaného analytického stupňa.

4.1. n-hexán

4.2. štandardný triglycerid kyseliny hexánovej s čistotou najmenej 99 %

4.3. štandardný triglycerid kyseliny heptánovej s čistotou najmenej 99 %

4.4. bezvodný síran sodný (Na_2SO_4)

5. PRÍSTROJE

Zvyčajné laboratórne vybavenie, konkrétne:

5.1. Analytické váhy s presnosťou na 1 mg

5.2. 10 ml a 20 ml odmerky

5.3. 30 ml odstreďovacie skúmavky

5.4. Rotačný vyparovač

5.5. Pec schopná udržiavať teplotu 50 °C ± 5 °C

5.6. Filtračný papier, stredne porézny, s priemerom okolo 15 cm

5.7. Zariadenie na plynovú chromatografiu

5.7.1. Plynový chromatograf vybavený injektorom „split“ aj „splitless“ alebo injektorom s nástrekom do kolóny („on column“) a plameňovým ionizačným detektorom (FID)

5.7.2. Kolóna na plynovú chromatografiu so stacionárnou fázou, ktorá sa úspešne využíva na separáciu triglyceridov [100 % dimetylpolysiloxán alebo 5 % fenylmetylpolysiloxán (95 % metyl)]. Stacionárnu fázu, dĺžku kolóny (od 4 m do 15 m), vnútorný priemer (od 0,22 mm do 0,50 mm) a hrúbku filmu (0,12 μm alebo viac) zvoľte so zreteľom na laboratórne skúsenosti a použitý systém injektáže. V každom prípade musí pri vybranej kolóne byť pík rozpúšťadla vyznačený oddelene od píku triglyceridu kyseliny hexánovej a rozlíšenie základnej čiary medzi píkmi triglyceridov kyseliny hexánovej a heptánovej. Príklady zostáv sa uvádzajú ďalej.

5.7.2.1. Príklady zostavy s použitím injektoru „split“:

— nosný plyn: hélium,

— hydrostatický tlak kolóny: 100 KPa,

— kolóna: 12 m dlhý kolóna z taveného kremeňa s vnútorným priemerom 0,5 mm a hrúbkou filmu 0,1 μm,

— stacionárna fáza: 100 % dimetylpolysiloxán alebo 5 % fenyldimetylpolysiloxán (95 %) (napr. HT5),

— teplota kolóny: počiatočná teplota 130 °C udržiavaná 1 min. sa zvyšuje rýchlosťou 20 °C/min na 260 °C a potom rýchlosťou 30 °C/min na 360 °C; teplota 360 °C sa udržiava 10 min.,

— teplota detektora: 370 °C,

— teplota injektora: 350 °C,

— pomer rozdelenia: 1:30,

— množstvo injektovanej vzorky: 1 μl.

5.7.2.2. Príklad zostavy s použitím injektora s nástrekom do kolóny

— nosný plyn: vodík (systém konštantného prietoku),

— tlak na hlave kolóny: 89 kPa,

— kolóna: 4 m dlhá kolóna z taveného kremeňa s vnútorným priemerom 0,32 mm a hrúbkou filmu 0,25 μm,

— stacionárna fáza, 5 % fenyl- 95 % dimetylpolysiloxán,

— teplota kolóny: počiatočná teplota 60 °C udržiavaná 2 minúty sa zvyšuje rýchlosťou 35 °C/min na 340 °C a na tejto teplote sa udržiava 5 minút,

— teplota detektora: 350 °C,

— množstvo injektovanej vzorky: 1 μl.

5.8. Injekčná striekačka s objemom 5 μl

6. ODBER VZORIEK

Dôležité je, aby laboratórium získalo vzorku, ktorá je skutočne reprezentatívna a nebola poškodená počas prepravy alebo skladovania.

Odber vzoriek nie je súčasťou metódy uvedenej v tejto medzinárodnej norme. Odporúčaná metóda odberu vzoriek je uvedená v IDF: norma 50C:1995 alebo ISO 707 – 1997 – Mlieko a mliečne výrobky – návod na odber vzoriek.

7. POSTUP

7.1. **Príprava skúšobnej vzorky a skúšobnej dávky**

Postupujte podľa ISO 14156 | IDF 172:2001

7.1.1. *Maslový olej, maslo*

7.1.1.1. Roztopte 50 g až 100 g skúšobnej vzorky v peci (5.5).

7.1.1.2. Do preloženého filtračného papiera vložte 0,5 g až 1,0 g bezvodného síranu sodného (5.4).

7.1.1.3. Tuk prefiltrujte cez filtračný papier s bezvodným síranom sodným a filtrát zachytávajte do banky, ktorú držíte v peci (5.5). Pri dekantácii roztopeného masla na filtračný papier dávajte pozor, aby sa neprenieslo sérum.

7.1.2. *Smotana*

7.1.2.1. Skúšobnú vzorku zahrejte na teplotu 20 °C ± 2 °C.

7.1.2.2. Vzorku dôkladne premiešajte.

7.1.2.3. Zrieďte primerané množstvo skúšobnej vzorky na 100 ml skúšobnej dávky s približne 4-percentným podielom tuku.

7.1.2.4. Pri extrakcii tuku zo smotany postupujte ako u surového mlieka a homogenizovaného mlieka (pozri ISO 14156 | IDF 172:2001, § 8.3).

7.1.2.5. V 10 ml odmerke (5.2) odmerajte 1 g extrahovaného tuku na najbližší 1 mg. Pridajte 1 ml roztoku 7.2.2. Doplňte do 10 ml n-hexánom (5.1) a zhomogenizujte.

7.1.2.6. Do 10 ml odmerky (5.2) nalejte 1 ml roztoku 7.1.1.2 a n-hexánom zrieďte na 10 ml (4.1).

7.2. **Príprava kalibračných noriem**

7.2.1. Rozpustite 100 mg triglyceridu kyseliny heptánovej (4.3) v 10 ml n-hexánu (4.1).

7.2.2. Rozpustite 100 mg triglyceridu kyseliny hexánovej (4.2) v 10 ml n-hexánu (4.1).

7.2.3. Do 10 ml odmerky (5.2) nalejte 1 ml roztoku 7.2.2. Doplňte hexánom na 10 ml (4.1).

7.2.4. Do 10 ml odmerky (5.2) nalejte 1 ml roztoku 7.2.1 a 1 ml roztoku 7.2.2. Doplňte n-hexánom na 10 ml (4.1).

7.2.5. Do 10 ml odmerky (5.2) nalejte 1 ml roztoku 7.2.4 a doplňte n-hexánom na 10 ml (4.1).

7.3. **Chromatografické určenie**

7.3.1. Dvakrát injektujte 1 µl štandardného roztoku 7.2.5.

7.3.2. Injektujte 1 µl roztoku každej vzorky.

Poznámka: Ak používate systém nástreku do kolóny, štandardný roztok aj roztok vzorky musia byť viac zriedené.

7.3.3. Operáciu 7.3.1 opakujte u každej tretej vzorky, aby ste vzorky oddelili opakovanými injekciami štandardného roztoku. Výsledky vychádzajú zo stredného priemeru reakčných faktorov štandardných chromatogramov.

8. VÝPOČET VÝSLEDKOV

Pre každý chromatogram integrujte plochu píkov triglyceridov kyseliny heptánovej a kyseliny hexánovej.

Tieto pokyny dodržiavajte pre každú oddelenú sekvenciu, t. j. pri súbore oddelených vzoriek je štandardná vzorka dvakrát injektovaná bezprostredne pred nimi STD_1 a štandardná vzorka dvakrát injektovaná bezprostredne po nich je STD_2.

8.1. **Kalibrácia**

8.1.1. Vypočítajte reakčný faktor pre každý duplikát STD_1 Rf_1(a) a Rf_1(b):

Rf_1 (a) alebo (b) = (plocha píkov triglyceridov kyseliny hexánovej/plocha píkov triglyceridov kyseliny heptánovej) × 100

Vypočítajte stredný priemer reakčného faktora Rf_1

$$Rf_1 = (Rf_1(a) + Rf_1(b)) / 2$$

8.1.2. Podobne vypočítajte stredný priemer reakčného faktora STD_2 Rf_2.

8.1.3. Vypočítajte stredný priemer reakčného faktora Rf:

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) /2$$

8.2. **Skúšobné vzorky**

Pre každý chromatogram vzorky medzi STD_1 a STD_2 vypočítajte obsah kyseliny heptánovej C (kg/t):

C = (plocha píkov triglyceridov kyseliny heptánovej × Rf × 100)/(plocha píkov triglyceridov kyseliny hexánovej × Wt × 1 000)

pričom

— Wt = hmotnosť odobraného tuku(g),

— 100 = zriedený objem vzorky,

— 1 000 = faktor konverzie (z µg/g na kg/t)

U vzoriek masla zohľadnite obsah tuku v masle a vypočítajte správnu hodnotu koncentrácie, C_{masla} (kg/t masla)

$$C_{masla} = C_{tuku} \times F$$

pričom F je obsah tuku v masle.

9. PRESNOSŤ

Podrobnosti medzilaboratórneho testu masla v súlade s ISO 5725 – 1 a ISO 5725 – 2 o metóde presnosti sú uvedené v bode 12.

Hodnoty limitu opakovateľnosti a reprodukovateľnosti sú vyjadrené pre 95 percentnú úroveň pravdepodobnosti a nemožno ich aplikovať na iné než dané rozsahy a matrice koncentrácie.

9.1. **Opakovateľnosť**

Absolútne rozdiely medzi výsledkami dvoch individuálnych testov získané rovnakou metódou na rovnakom skúšobnom materiáli v rovnakom laboratóriu rovnakého analytika s použitím rovnakého zariadenia v rámci krátkeho časového intervalu sú väčšie než 0,35 kg/t najviac v 5 % prípadov.

9.2. **Reprodukovateľnosť**

Absolútne rozdiely medzi výsledkami dvoch individuálnych testov získané rovnakou metódou na rovnakom skúšobnom materiáli v rôznych laboratóriách rôznych analytikov s použitím rôzneho zariadenia sú väčšie než 0,66 kg/t najviac v 5 % prípadov.

10. TOLERANČNÉ LIMITY: SPODNÉ LIMITY (PRÍPAD NEDOSTATOČNÝCH MNOŽSTIEV)

10.1. **Na kontrolu správneho obsahu značkovacej látky sa z výrobku obsahujúceho značkovaciu látku odoberú tri vzorky.**

10.2. **Maslo a koncentrované maslo**

10.2.1. Miera vstrebávania je 11 kg triglyceridu kyseliny heptánovej s čistotou najmenej 95 % na tonu masla, t. j. 10,45 kg/t.

10.2.2. Na kontrolu miery a homogenity vstrebávania značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 9,51 kg/t (95 % minimálnej miery vstrebávania triglyceridu kyseliny heptánovej s čistotou najmenej 95 %, jedno určenie),

— 6,89 kg/t (70 % minimálnej miery vstrebávania triglyceridu kyseliny heptánovej s čistotou najmenej 95 %, jedno určenie).

— Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou od 9,51 kg do 6,89 kg.

10.3. **Smotana**

10.3.1. Miera vstrebávania je 10 kg triglyceridu kyseliny heptánovej s čistotou najmenej 95 % na tonu mliečneho tuku, t. j. 9,50 kg/t značkovacej látky mliečneho tuku.

10.3.2. Na kontrolu miery a homogenity vstrebávania značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 8,60 kg/t (95 % minimálnej miery vstrebávania triglyceridu kyseliny heptánovej s čistotou najmenej 95 %, jedno určenie),

— 6,23 kg/t (70 % minimálnej miery vstrebávania triglyceridu kyseliny heptánovej s čistotou najmenej 95 %, jedno určenie).

— Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 8,60 kg a 6,23 kg.

11. TOLERANČNÉ LIMITY: HORNÉ LIMITY (PRÍPAD PREKROČENIA MNOŽSTVA O VIAC AKO 20 %)

11.1. **Na kontrolu správneho obsahu značkovacej látky sa z výrobku obsahujúceho značkovacej látku odoberú tri vzorky.**

11.2. **Maslo a koncentrované maslo**

11.2.1. Na kontrolu miery a homogenity vstrebávania značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— horný limit je 12,96 kg/t.

11.3. **Smotana**

11.3.1. Na kontrolu miery a homogenity vstrebávania značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— horný limit je 11,82 kg/t.

12. DODATOČNÉ INFORMÁCIE: ŠTATISTICKÁ ANALÝZA VÝSLEDKOV NA STANOVENIE TRIENANTOÁTU V MASLOVOM TUKU ANALÝZOU TRIGLYCERIDOV

Na stanovenie obsahu trienantoátu v masle s obsahom značkovacích látok boli vykonané štyri kolaboratívne pokusy.

Prvého kola testov sa zúčastnilo deväť laboratórií, ktoré nedostali žiadne špecifikácie analytických metód, ktoré by mali použiť.

Druhého kola testov sa zúčastnilo desať laboratórií, ktoré použili 4 rôzne metódy:

— stanovenie metylheptanoátu pomocou n-nonánu alebo metylnonanoátu ako medzinárodného štandardu,

— stanovenie trienantoátu pomocou trikaproátu ako interného štandardu,

— stanovenie metylheptanoátu pomocou kalibračnej vzorky/zmesi,

— stanovenie metylheptanoátu pomocou kalibračnej zmesi.

Okrem toho sa na analýzu FAME použili dva rôzne postupy metylácie (podľa De Francesca a Christophersona & Glassa).

Na základe získaných výsledkov sa na tretie kolo testov vybrali dve metódy:

— stanovenie metylheptanoátu pomocou n-nonánu alebo metylnonanoátu ako interného štandardu,

— stanovenie trienantoátu pomocou trikaproátu ako interného štandardu.

Z výsledkov 7 laboratórií vyplynulo, že metóda FAME produkuje vysokú variabilitu, a následne sa rozhodlo, že sa bude používať len na stanovenie trienantoátu ako triglyceridu na základe postupu stanovenia trienantoátu pomocou trikaproátu ako interného štandardu. Navyše treba vykonať analýzu triglyceridov kapilárnou kolónou.

Vo štvrtom kole testov sa rozdelili štyri vzorky (A, B, C, D) a výsledky poskytlo deväť laboratórií (tabuľky 1 a 2).

Dve laboratóriá (DE a UE) analyzovali vzorky metódou FAME.

V dôsledku nižšieho počtu laboratórií sa štatistický výpočet vykonal na úplnom súbore údajov (obrázky 1 a 2) vrátane výsledkov FAME, ako aj na údajoch získaných analýzou triglyceridov.

Testy na výrazne odlišné výsledky:

— vzorka A: Dixonov, Cochranov a Grubbsov test na úrovni 1 a 5 % vykázal jeden výrazne odlišný výsledok,

— vzorka B: Grubbsov test na úrovni 5 % vykázal jeden výrazne odlišný výsledok,

— vzorka C: Dixonov a Grubbsov test na úrovni 1 a 5 % ukázal jeden odlišný výsledok,

— vzorka D: Dixonov a Grubbsov test na úrovni 1 a 5 % vykázal jeden výrazne odlišný výsledok.

Výrazne odlišné výsledky sa z výpočtu vylúčili.

Treba poznamenať, že výsledky získané metódou FAME sa v aplikovaných testoch nikdy nepokladali za výrazne odlišné výsledky.

Parametre presnosti

V tabuľkách 1 a 2 sa uvádzajú výsledky všetkých laboratórií a parametre presnosti vypočítané na prijateľný počet (8) laboratórií, ktoré ale nanešťastie nie sú odvodené od rovnakej analytickej metódy.

V tabuľkách 3 a 4 sa uvádzajú výsledky len metódy TG a príslušné parametre presnosti. Prijateľnosť týchto parametrov podlieha akceptácii nízkeho počtu laboratórií (6).

Na obrázkoch 3 a 4 je zachytený trend Sr a SR vypočítaný na 4 vzorky dvoch opísaných súborov údajov.

V tabuľke 5 sa uvádzajú hodnoty Sr a SR spolu s príslušnými spoločnými hodnotami a celkové parametre r a R.

Nakoniec bol vypočítaný kritický rozdiel na 95 percentnej úrovni pravdepodobnosti.

Tabuľka 1

Štatistické výsledky metód TG + FAME*

Vzorka A		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Počet výrazne odlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Výrazne odlišné výsledky	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Stredná hodnota	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Skutočná hodnota	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Opakovateľnosť r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Relatívna opakovateľnosť r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,23
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	2,04
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,84
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	5,71
Vzorka B		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Počet výrazneodlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Výrazne odlišné výsledky	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Stredná hodnota	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Skutočná hodnota	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Opakovateľnosť r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Relatívna opakovateľnosť r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,35
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	2,61
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,99
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	7,31

Tabuľka 2

Štatistické výsledky metód TG + FAME*

Vozrka C		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Počet výrazne odlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Výrazne odlišné výsledky	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Stredná hodnota	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Skutočná hodnota	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Opakovateľnosť r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Relatívna opakovateľnosť r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,17
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	1,82
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,47
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	5,10

Vzorka D		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Počet výrazne odlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Výrazne odlišné výsledky	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Stredná hodnota	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Skutočná hodnota	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Opakovateľnosť r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Relatívna opakovateľnosť r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,24
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	11,43
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,67
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	32,00

Tabuľka 3

Štatistické výsledky metód TG + FAME*

Vzorka A		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Počet výrazne odlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Výrazne odlišné výsledky	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Stredná hodnota	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Skutočná hodnota	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Opakovateľnosť r (95 %)	0,25
					Relatívna opakovateľnosť r %	2,24
					Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,13
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	1,16
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,36
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	3,25
Vzorka B		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Počet výrazne odlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Výrazne odlišné výsledky	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Stredná hodnota	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Skutočná hodnota	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Opakovateľnosť r (95 %)	0,42
					Relatívna opakovateľnosť r %	3,16
					Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,33
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	2,48
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,93
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	6,94

Tabuľka 4

Štatistické výsledky metódy TG

Vzorka C		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Počet výrazne odlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Výrazne odlišné výsledky	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Stredná hodnota	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Skutočná hodnota	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Opakovateľnosť r (95 %)	0,42
					Relatívna opakovateľnosť r %	4,51
					Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,19
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	2,04
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,53
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	5,71
Vzorka D		R_1	R_2	Stred	Počet laboratórií zachovaný po vynechaní výrazne odlišných výsledkov	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Počet výrazne odlišných výsledkov	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Výrazne dlišné výsledky	DK
					Stredná hodnota	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Skutočná hodnota	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Štandardná odchýlka opakovateľnosti (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relatívna opakovateľnosť sd (RSDr%)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Opakovateľnosť r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Relatívna opakovateľnosť r %	12,01
					Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (SR)	0,25
					Relatívna reprodukovateľnosť sd (RSDR%)	11,90
					Reprodukovateľnosť R (95 %)	0,69
					Relatívna reprodukovateľnosť R %	33,32

Tabuľka 5

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť (s FAME)

	Počet laboratórií	Výrazne odlišný výsledok	Opakovateľnosť Sr (95 %)	Reprodukovateľnosť SR (95 %)
Vzorka A	8	1	0,09	0,23
Vzorka B	8	1	0,14	0,35
Vzorka C	8	1	0,14	0,17
Vzorka D	8	1	0,08	0,24
Spoločná hodnota			0,116	0,256
			R	**R**
Spoločná hodnota* 2.8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Minimálna čistota stanovená pre trienantoát = 95 %
Minimálny limit stanovený pre trienantoát v maslovom tuku = 11 kg/t
Vzhľadom na kritický rozdiel 95 % úrovne pravdepodobnosti nemôže byť priemer dvoch výsledkov menší než:
10,05 kg/t v prípade primiešania 95 % trienantoátu.

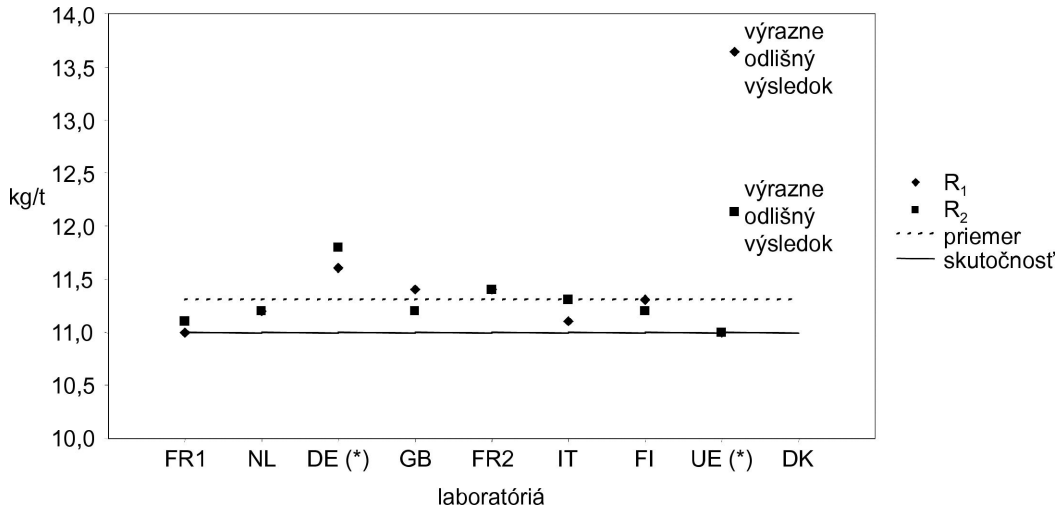
Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť (bez FAME)

	Počet laboratórií	Výrazne odlišný výsledok	Opakovateľnosť Sr (95 %)	Reprodukovateľnosť SR (95 %)
Vzorka A	6	1	0,09	0,13
Vzorka B	6	1	0,15	0,33
Vzorka C	6	1	0,15	0,19
Vzorka D	6	1	0,09	0,25
Spoločná hodnota			0,124	0,237
			r	**R**
Spoločná hodnota * 2.8			**0,347**	**0,663**

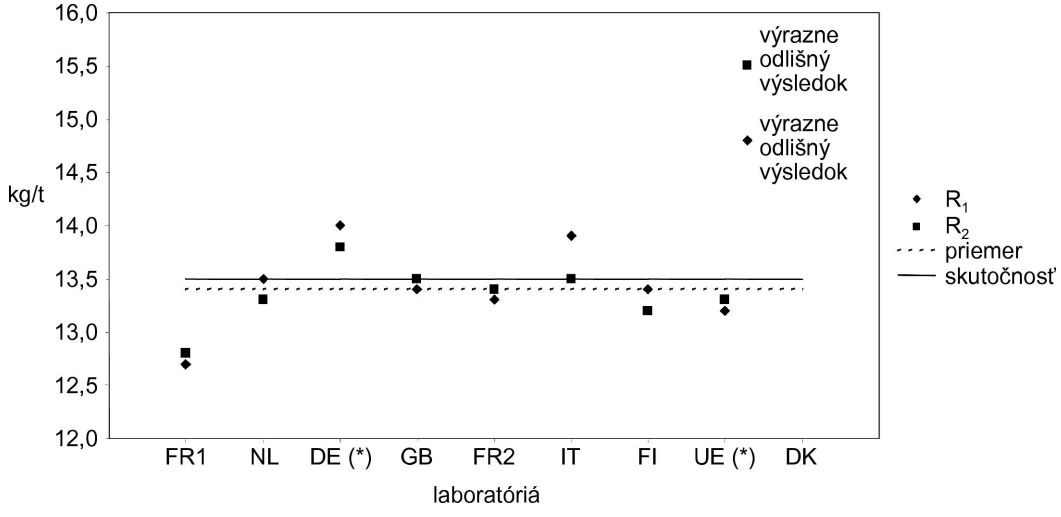
CrD95 = 0,36
Minimálna čistota stanovená pre trienantoát = 95 %
Minimálny limit stanovený pre trienantoát v maslovom tuku = 11 kg/t
Vzhľadom na kritický rozdiel 95 % úrovne pravdepodobnosti nemôže byť priemer dvoch výsledkov menší než:
10,09 kg/t v prípade primiešania 95 % trienantoátu.

Obrázok 1 (*)

Experimentálne výsledky: Vzorka A

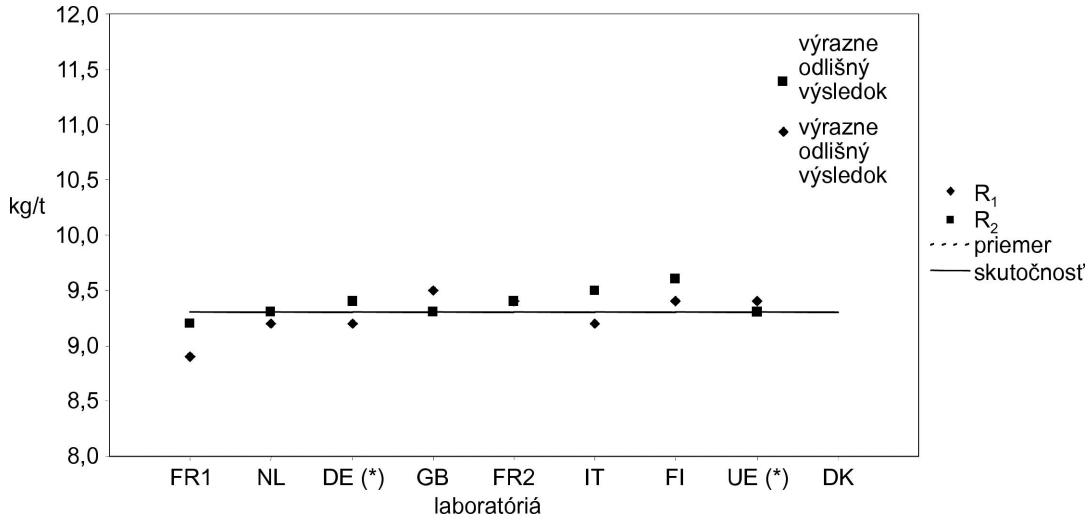


Experimentálne výsledky: Vzorka B

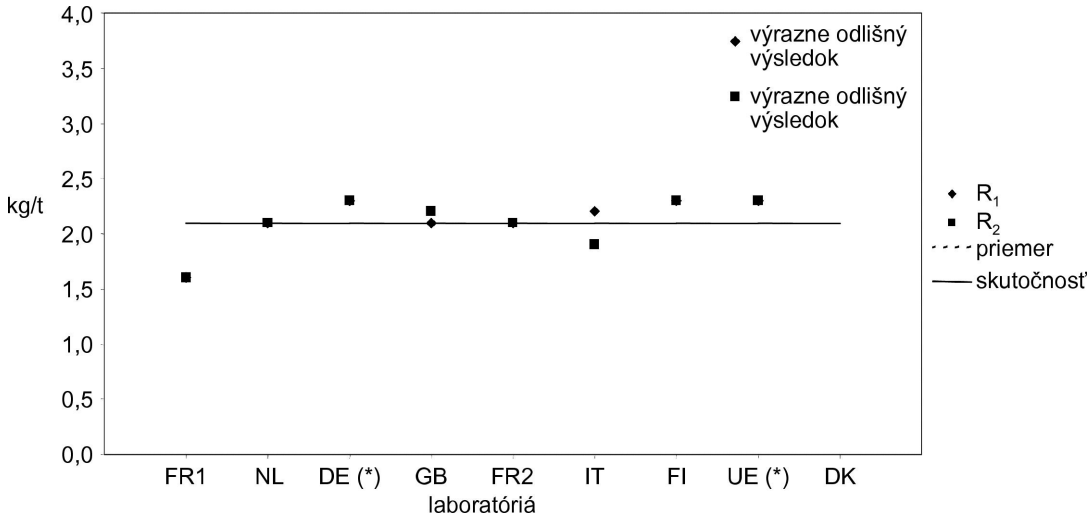


(*) = metóda FAME

Experimentálne výsledky: Vzorka C

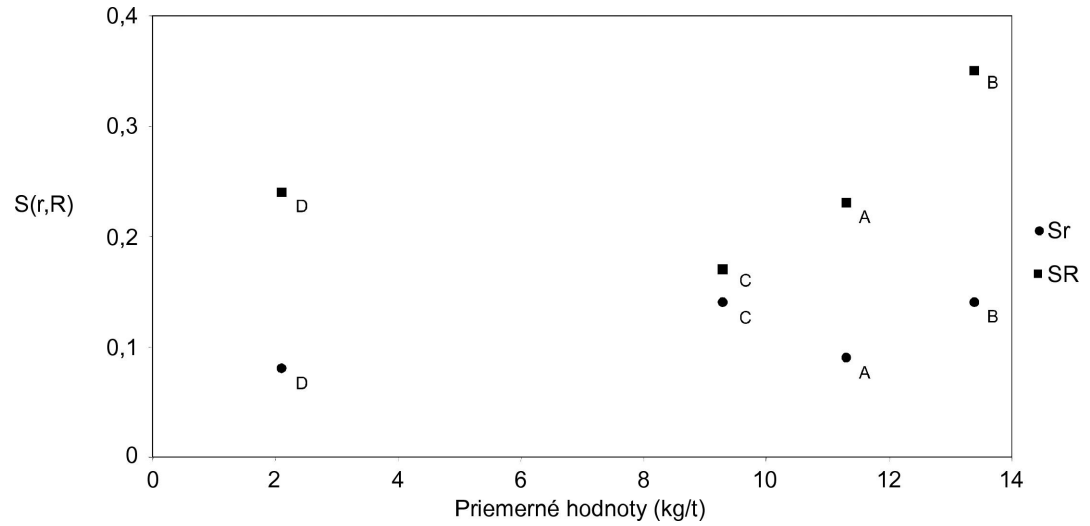


Experimentálne výsledky: Vzorka D



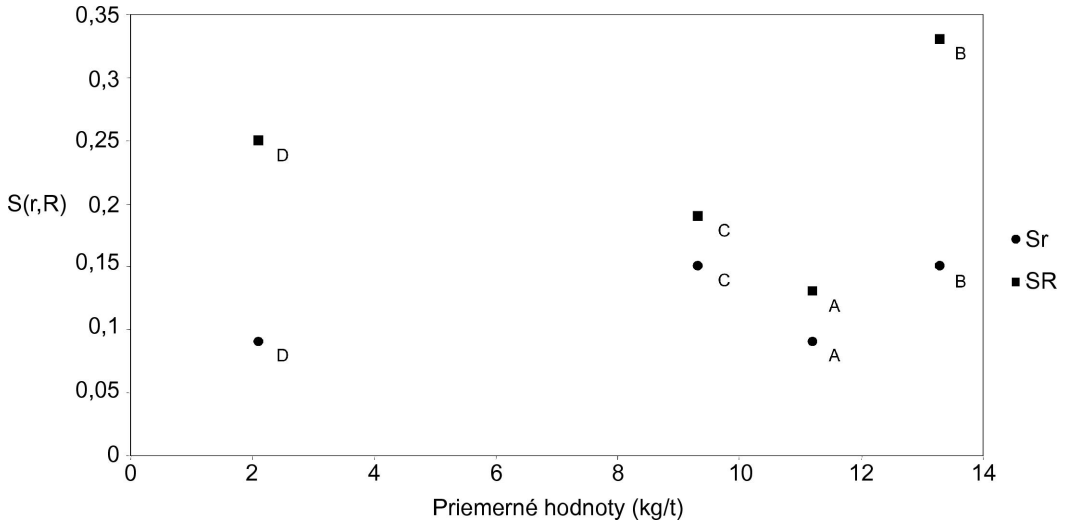
Obrázok 2

Štandardná odchýlka opakovateľnosti a reprodukovateľnosti na rozličných úrovniach (TG + FAME)



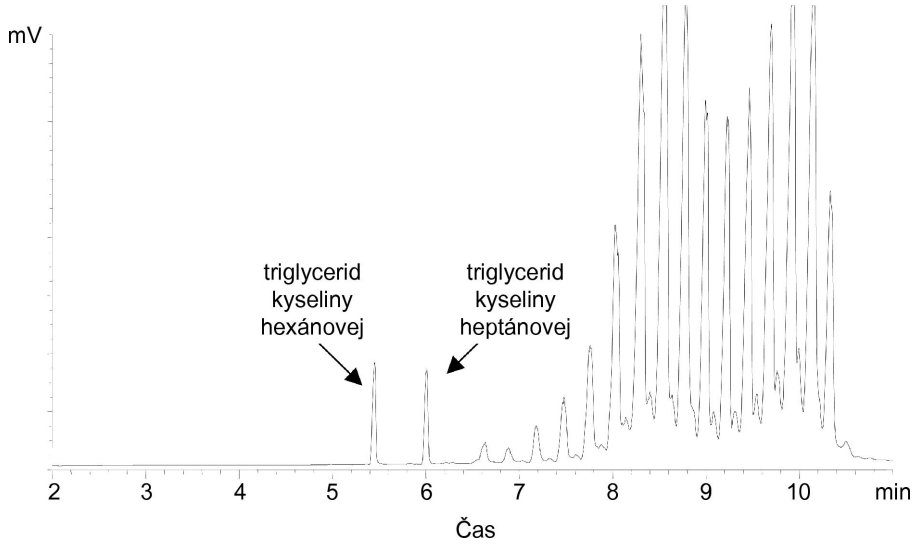
Obrázok 3

Štandardná odchýlka opakovateľnosti a reprodukovateľnosti na rozličných úrovniach (TG)



Obrázok 4

Príklad s použitím injektora s nástrekom priamo do kolóny



PRÍLOHA VI

(Článok 5)

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

1. ROZSAH A OBLASŤ APLIKÁCIE

V tejto časti sa opisuje postup kvantitatívneho stanovenia obsahu vanilínu v koncentrovanom masle, masle alebo smotane.

2. PRINCÍP

Extrakcia známeho množstva vzorky zmesou propán-2-olu/etanolu/acetonitrilu (1:1:2). Zrazenie väčšiny tuku schladením pri teplotách v rozmedzí – 15 °C až – 20 °C s následným odstredením.

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

3. PRÍSTROJE

Bežné laboratórne prístroje, konkrétne:

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

3.2. striekačky s obsahom 2 ml;

3.3. membránové mikrofiltre s veľkosťou pórov 0,45 μm, odolné voči roztoku obsahujúcemu 5 % extrakčného roztoku (4.4);

3.4. systém kvapalinovej chromatografie pozostávajúci z čerpadla (tok 1,0 ml/min.), injektora (20 μl injekcia, automatická alebo manuálna), UV detektora (fungujúceho pri 306 nm, 0,01 AU celá stupnica), zapisovača alebo integrátora a stĺpikového termostatu fungujúceho pri teplote 25 °C;

3.5. analytická kolóna (250 mm × 4,6 mm ID) naplnená LIChrospherom RP 18 (Merck, 5 μm) alebo ekvivalentom;

3.6. ochranná predkolóna (približne 20 mm × 3 mm ID), naplnená zasucha LIChrospherom RP 18 (5 až 10 μm) alebo ekvivalentom;

3.7. odstredivka s výkonom 2 000 ot/min.

4. REAGENTY

Všetky reagenty musia mať schválenú analytickú kvalitu.

4.1. Propán-2-ol

4.2. Etanol 96 % (v/v)

4.3. Acetonitril

4.4. Extrakčný roztok

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

4.5. Vanilín (4-hydroxy-3metoxybenzaldehyd) ≥ 98 %

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 (= 10 μg/ml)*

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

4.5.3. *Metanol, v HPLC kvalite*

4.5.4. *Kyselina octová, ľadová*

4.5.5. *Voda, v HPLC kvalite*

4.5.6. *HPLC mobilná fáza*

Zmiešajte 300 ml metanolu (4.5.3) s približne 500 ml vody (4.5.5) a 20 ml kyseliny octovej (4.5.4) v 1 000 ml odmernej banke a doplňte vodou (4.5.5). Prefiltrujte cez 0,45 μm filter (3.3).

5. POSTUP

5.1. **Príprava vzorky**

5.1.1. *Maslo*

Nahrievajte vzorku, pokým sa nezačne topiť. Teplota nahrievania nesmie presiahnuť 30 °C. Maslo sa v žiadnom prípade nesmie rozložiť na dve fázy. Ak vzorka dostatočne spružnie, pretrepaním ju zhomogenizujte. Pred odberom vzorky maslo miešajte 15 sekúnd. Odvážte najbližší 1 mg približne 5 g (SM g) masla do 100 ml odmernej banky.

5.1.2. *Koncentrované maslo*

Bezprostredne pred odberom vzorky vložte nádobu s koncentrovaným maslom do pece pri teplote 40 až 50 °C, kým sa úplne neroztopí. Vzorku premiešajte vírením alebo miešaním, uistite sa, že nevznikajú vzduchové bublina v dôsledku príliš silného miešania. Odvážte na najbližší 1 mg približne 4 g (SM g) koncentrovaného masla do 100 ml odmernej banky.

5.1.3. *Smotana*

Vzorku zohrejte vo vodnom kúpeli alebo inkubátore pri teplote 35 až 40 °C. Tuk rovnomerne rozmiešajte vírením a v prípade potreby miešaním. Vzorku rýchlo ochlaďte na 20 ± 2 °C. Vzorka by mala vyzerať homogénne, inak treba postup zopakovať. Odvážte na najbližší 1 mg 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 pretrepávajte asi 15 minút a doplňte extrakčným roztokom (4.4). Približne 10 ml tohto extraktu preneste do testovacej skúmavky s ventilom. Skúmavku vložte do mrazničky (3.1) a nechajte ju tam približne 30 minút. Studený extrakt odstreďujte 5 minút pri približne 2 000 ot/min a ihneď zlejte. Zliaty roztok ochlaďte na izbovú teplotu. 5 ml zliateho roztoku pipetujte do 100 ml odmernej banky a doplňte vodou. Vzorku prefiltrujte cez membránový mikrofilter (3.3) pomocou striekačky (3.2). 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. **Analýza HPLC**

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

6. VÝPOČET VÝSLEDKOV

Vypočítajte priemernú plochu píku (alebo výšku) (AC) píkov 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 je daný:

$$C = \left|\left(AS \times 20 \times 0{,}96\right) / \left(SM \times R\right)\right|$$

pričom

AS = plocha alebo výška píku vanilínu testovacej vzorky

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

Poznámka: Ak sa na vanilín analyzuje smotana, koncentrácia značkovacej látky sa vyjadruje ako mg značkovacej látky/kg mliečneho tuku. Tú dosiahnete vynásobením C faktorom 100/f. f je obsah tuku v smotane v percentách (m/m).

20 = faktor, v ktorom sú zohľadnené roztoky štandardnej a testovacej vzorky

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

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

7. PRESNOSŤ METÓDY

7.1. **Opakovateľnosť (r)**

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

7.2. **Reprodukovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených analytikmi v rôznych laboratóriách s 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. Značkovacia látka získaná buď z vanilky, alebo zo syntetického vanilínu

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

8.2.2. Na kontrolu miery a homogenity vstrebávania značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 220,8 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania),

— 158,3 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 220,8 mg/kg a 158,3 mg/kg.

8.3. Značkovacia 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 mliečneho tuku.

8.3.2. Na kontrolu miery a homogenity vstrebávania značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 78,3 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania),

— 53,3 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 78,3 mg/kg a 53,3 mg/kg.

9. POZNÁMKY

9.1. Získanie pridaného vanilínu s hodnotou 250 mg/kg maslového oleja sa pohybuje medzi 97,0 a 103,8. Priemerný zistený obsah bol 99,9 % so štandardnou odchýlkou 2,7 %.

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

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

9.4. Prostredníctvom vhodných roztokov štandardného roztoku (4.5.2) by sa linearita mala kontrolovať pri prvom vykonaní analýzy a potom v pravidelných intervaloch a po zmenách zariadenia HPLC alebo jeho oprave. Pôsobením vlastných enzýmov v nepasterizovanej smotane alebo vo výrobkoch z nej sa môže vanilín rozštiepiť na kyselinu vanilínovú, divanilín a ďalšie zložky.

PRÍLOHA VII

(Článok 5)

SPEKTROMETRICKÉ STANOVENIE ETYL-ESTERU KYSELINY BETA-APO-8'-KAROTÉNOVEJ V KONCENTROVANOM MASLE A MASLE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

V tejto časti sa opisuje postup na kvantitatívne určovanie obsahu etyl-esteru kyseliny beta-apo-8'-karoténovej (apokaroténový ester) v koncentrovanom masle a masle. Apokaroténový ester je súčtom všetkých látok prítomných v extrakte vzoriek získaných v podmienkach opísaných v metóde, ktoré absorbujú svetlo pri 440 nm.

2. PRINCÍP

Maslový tuk sa rozpúšťa v ľahkej rope a absorpčná schopnosť sa meria pri 440 nm. Obsah apokaroténového esteru sa určuje podľa externého štandardu.

3. PRÍSTROJE

3.1. Pipety – so stupnicou, s objemom 0,25, 0,50, 0,75 a 1,0 ml

3.2. Spektrofotometer – vhodný na použitie pri 440 nm (a 447 – 449 nm) a vybavený kyvetami s dĺžkou optickej dráhy 1 cm

3.3. Odmerné banky, 20 ml a 100 ml

3.4. Analytické váhy s citlivosťou 0,1 mg, schopné vážiť na najbližší 1 mg, s odčítateľnosťou po 0,1 mg

3.5. Pec, 45 °C ± 1 °C

3.6. Rýchle filtre bez obsahu popola

4. REAGENTY

Všetky reagenty musia mať schválenú analytickú kvalitu.

4.1. Suspenzia apokaroténového esteru (približne 20 %)

4.1.1. Obsah suspenzie stanovte takto:

Suspenziu zahrejte na 45 °C až 50 °C a homogenizujte v neotvorenej pôvodnej nádobe. Do odmernej banky (100 ml) odvážte približne 400 mg, rozpusťte v 20 ml chloroformu (4.4) a doplňte objem cyklohexánom (4.5). Rozrieďte 5 ml tohto roztoku cyklohexánom na 100 ml (roztok A). Rozrieďte 5 ml roztoku A cyklohexánom na 100 ml. Zmerajte absorpciu pri 447 – 449 nm (merajte maximum oproti cyklohexánu ako nulovej hodnote pomocou kyviet s dĺžkou optickej dráhy 1 cm).

Obsah apokaroténového esteru P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000) / (M_{susp} \times 2\,550)$ **alebo** vývoj: $(Abs_{max} / 2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{max} = absorpcia meraného roztoku na maxime

M_{susp} = hmotnosť suspenzie (g)

2 550 = referenčná hodnota Abs (1 %, 1 cm)

P = čistota (obsahu) suspenzie (%)

Poznámka: Suspenzia apokaroténového esteru je citlivá na vzduch, teplo a svetlo. V uzavretej pôvodnej nádobe (zapečatenej pod dusíkom) sa môže na chladnom mieste skladovať približne 12 mesiacov. Po otvorení treba obsah čo najrýchlejšie spotrebovať.

4.1.2. Štandardný roztok apokaroténového esteru, približne 0,2 mg/ml

Odvážte na najbližší 1 mg približne 0,100 g suspenzie apokaroténového esteru (4.1.1) (W), rozpusťte 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 apokaroténového esteru.

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

4.2. Ropný lieh (40 – 60 °C)

4.3. Síran sodný, bezvodný, granulárny, predtým sušený 2 hodiny pri teplote 102 °C

4.4. Chloroform

4.5. Cyklohexán

5. POSTUP

5.1. **Príprava 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 reprezentatívne množstvo prefiltrujte cez filter obsahujúci približne 10 g bezvodného síranu sodného (4.3) v prostredí chránenom pred silným prirodzeným a umelým svetlom a so stálou teplotou 45 °C. Zozbierajte primerané množstvo maslového tuku.

5.2. **Stanovenie obsahu**

Odvážte na najbližší 1 mg približne 1 g koncentrovaného masla [alebo extrahovaného maslového tuku (5.1.2)] (M). Preneste ho do 20 ml (V) odmernej banky pomocou ropného liehu, doplňte po značku a dôkladne premiešajte.

Preneste primerané množstvo do 1 cm kyvety a zmerajte absorpciu pri 440 nm oproti nulovej hodnote ropného liehu. Koncentráciu apokaroténového esteru v roztoku získate z kalibračnej krivky (C µ/ml).

5.3. **Kalibrácia**

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

Približné koncentrácie roztoku siahajú od 0 do 2 µg/ml a vypočítavajú sa presne podľa koncentrácie štandardného roztoku (4.1.2) (W. × P) / 10 mg/ml. Absorpciu zmerajte pri 440 nm oproti nulovej hodnote ropného liehu (4.2).

Hodnoty absorpcie preneste na os y oproti koncentráciám apokaroténového esteru na osi x. Vypočítajte rovnicu štandardnej krivky.

6. VÝPOČET VÝSLEDKOV

6.1. Obsah apokaroténového esteru vyjadrený v mg/kg výrobku sa vypočíta takto:

Koncentrované maslo (C × V)/M

Maslo 0,82 (C × V)M

pričom

C = obsah apokaroténového esteru v 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 analytikom s použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Analýzaq koncentrovaného masla*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným analytikom s 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 analytikmi v rôznych laboratóriách s použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 4,7 mg/kg.

7.3. **Analýza koncentrovaného masla**

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

7.4. **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 značkovacej látky sa z výrobku obsahujúceho značkovaciu látku odoberú tri vzorky.

8.2. **Maslo**

8.2.1. Miera vstrebávania pri masle pri zohľadnení absorbancie pozadia je 22 mg/kg.

8.2.2. Na kontrolu miery a homogenity obsahu značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 17,7 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania),

— 12,2 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 17,7 mg/kg a 12,2 mg/kg.

8.3. **Koncentrované maslo**

8.3.1. Miera vstrebávania koncentrovaného masla pri zohľadnení absorbancie pozadia je 24 mg/kg.

Na kontrolu miery a homogenity obsahu značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 19,2 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania),

— 13,2 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 19,2 mg/kg a 13,2 mg/kg.

PRÍLOHA VIII

(Článok 5)

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

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

V tejto časti sa opisuje postup kvantitatívneho stanovenia obsahu sitosterolu alebo stigmasterolu v masle a koncentrovanom masle. Sitosterol predstavuje súčet beta-sitosterolu a 22 dihydro-beta-sitosterolu, ostatné sitosteroly sa považujú za nepodstatné.

2. PRINCÍP

Maslo alebo koncentrované maslo sa zmydelnia hydroxidom draselným v etanolovom roztoku a nezmydeliteľná časť sa vyextrahuje dietyléterom.

Steroly sa transformujú na trimetylsilyl-étery a analyzujú sa kapilárnou plynovou chromatografiou na základe internej normy/betulín.

3. PRÍSTROJE

3.1. 150 ml banka na zmydelňovanie vybavená kondenzátorom so spätným tokom so sklenenými spojmi

3.2. 500 ml separačné lieviky

3.3. 250 ml banky

3.4. Lieviky na vyrovnávanie tlaku s objemom 250 ml alebo podobné, na prebytočný dietyléter

3.5. Sklenený valec 350 mm × 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 kapilárnou kolónou, vybavený rozdeľovacím systémom pozostávajúcim z:

3.8.1. termostatickej komory pre odmerné valce, ktorá je schopná udržiavať požadovanú teplotu s presnosťou na 1 °C;

3.8.2. vyparovacej jednotky s nastaviteľnou teplotou;

3.8.3. plameňového ionizačného detektora a konvertora – zosilňovača;

3.8.4. integrátora – zapisovača vhodného na použitie s konvertorom – zosilňovačom (3.8.3).

3.9. Kapilárna kolóna z taveného kremeňa celá pokrytá BP1 alebo ekvivalentom (alebo akákoľvek iná kolóna s minimálne rovnocenným rozlíšením) jednotnej hrúbky 0,25 μm; kolónou sa musia dať riediť trimetylsilyl-deriváty lanosterolu a sitosterolu. Vhodná je kolóna s dĺžkou 12 m a vnútorným priemerom 0,2 mm.

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

4. REAGENTY

Všetky reagenty musia mať schválenú analytickú kvalitu. Použitá voda musí byť destilovaná alebo mať aspoň ekvivalentnú čistotu.

4.1. Etanol, minimálne 95 % čistoty

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

4.3. Betulín, minimálne 99 % čistoty

4.3.1. Roztoky betulínu v dietyléteri (4.4)

4.3.1.1. Koncentrácie betulínového roztoku používané na stanovenie obsahu sitosterolu by mali byť 1,0 mg/ml.

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

4.4. Dietyléter analytickej čistoty (bez peroxidov alebo rezíduí)

4.5. Síran sodný, bezvodný, granulárny, predtým sušený dve hodiny pri teplote 102 °C

4.6. Silanizačný reagent, napríklad TRI-SIL (k dispozícii u Pierce Chemical Co, katalógové číslo 49001) alebo ekvivalent (dôležité: TRI-SIL je nehorľavý, toxický, korozívny a potenciálne karcinogénny. Laboratórni pracovníci musia byť oboznámení s bezpečnostnými údajmi TRI-SIL-u a musia prijať príslušné preventívne opatrenia.)

4.7. Lanosterol

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

Poznámka 1: Čistota štandardných materiálov používaných na kalibráciu sa stanovuje metódou normalizácie. Predpokladom je, že všetky steroly prítomné vo vzorke sú prítomné na chromatograme, celková plocha vrcholov píkov predstavuje 100 % sterolových zložiek a reakcie detektora sú rovnaké na všetky steroly. Linearita systému sa musí overovať na základe daných rozpätí koncentrácií.

4.8.1. Sitosterolový štandardný roztok – pripravte roztok obsahujúci približne 0,5 mg/ml (W_1) sitosterolu (4.8) odvážený na najbližší 0,001 mg/ml v dietyléteri (4.4).

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

4.9.1. Stigmasterolový štandardný roztok – pripravte roztok obsahujúci približne 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterolu (4.9) (odvážený na najbližší 0,001 mg/ml) v dietyléteri (4.4).

4.10. Zmes na test rozlíšenia. Pripravte roztok obsahujúci 0,05 mg/ml lanosterolu (4.7) a 0,5 mg/ml sitosterolu (4.8) v dietyléteri (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 ako do zmydlenej vzorky (pozri 5.2.2).

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

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

5.2. **Príprava nezmydliteľných častí**

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

Odvážte na najbližší 1 mg približne 1 g masla (W_2) 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 30 minút zohrievajte na teplote približne 75 °C. Kondenzátor odpojte a banku ochlaďte približne na izbovú teplotu.

5.2.2. Ak sa stanovuje obsah sitosterolu, do banky pridajte 1,0 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 v 50 ml vody a 250 ml dietyléteru (4.4). Separačný lievik dôkladne pretrepávajte dve minúty, aby sa vrstvy oddelili. Spodnú vodnatú vrstvu zlejte a éterovú vrstvu zmyte pretrepaním so štyrmi po sebe nasledujúcimi 100 ml dávkami vody.

Poznámka 2: Na to, aby sa nevytvorila emulzia je dôležité, aby sa prvé dve dávky vody aplikovali jemne (10 okruhov). Tretia dávka sa môže dôkladne pretrepávať 30 sekúnd. Ak sa vytvorí emulzia, možno ju zničiť pridaním 5 – 10 ml etanolu. Ak sa pridáva etanol, treba vzorku dvakrát dôkladne pretrepať s vodou.

5.2.3. Čistú éterovú vrstvu bez mydla prelejte cez sklenený valec (3.5) obsahujúci 30 g bezvodného síranu sodného (4.5). Éter zberajte do 250 ml banky (3.3). Pridajte jednu protinárazovú granulu a nechajte vypariť takmer do sucha vo vodnom kúpeli alebo izoobale, pričom dbajte na to, aby ste zachytili odpadové rozpúšťadlá.

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

5.3. **Príprava trimetylsilyl-éterov**

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

5.3.2. Vzorku silanizujte pridaním 1 ml TRI-SIL-u (4.6). Fiolu uzavrite a silne pretrepte, až sa obsah rozpustí. Ak sa nerozpustí úplne, ohrejte ho na 65 – 70 °C. Pred injektovaním do plynového chromatografu ho nechajte postáť aspoň päť minút. Štandardné roztoky silanizujte rovnako ako vzorky. Zmes na test rozlíšenia (4.10) silanizujte rovnakým spôsobom ako vzorky.

Poznámka 4: Silanizácia sa musí uskutočniť v prostredí bez prítomnosti vody. Neúplná silanizácia betulínu sa prejaví ako druhý pík blízky píku betulínu.

Silanizácii 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 počas 30 sekúnd.

5.4. **Analýza plynovou chromatografiou**

5.4.1. *Vytvorenie pracovných podmienok*

Plynový chromatograf nastavte v súlade s pokynmi výrobcu.

Orientačné prevádzkové podmienky sú takéto:

— teplota kolóny: 265 °C

— teplota injektora: 265 °C

— teplota detektora: 300 °C

— prietok nosného plynu: 0,6 ml/min.

— tlak vodíka: 84 kPa

— tlak vzduchu: 155 kPa

— delenie vzorky: 10:1 až 50:1; pomer delenia musí byť optimalizovaný v súlade s pokynmi výrobcu a linearitou reakcie detektora a potom overený na základe daného rozpätia koncentrácií

Poznámka 5: Osobitne dôležité je pravidelné čistenie lineru (vložky do injektora).

— množstvo nastrekovanej substancie: 1 µl roztoku TMSE

Pred začatím analýzy nechajte systém vyvážiť, aby ste dosiahli stabilnú reakciu.

Tieto podmienky treba meniť podľa vlastností kolóny a plynového chromatografu na získanie chromatogramov, ktoré spĺňajú tieto kritériá:

— Pík sitosterolu sa primerane odvodí z lanosterolu. Na obrázku 1 je znázornený typický chromatogram, ktorý sa získava zo silizovanej zmesi na test rozlíšenia (4.10).

— Relatívne časy väzby týchto 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 silanizovaného štandardného roztoku (stigmasterolu alebo sitosterolu) a nastavte kalibračné parametre integrátora.

Injektujte ďalší 1 µl silanizovaného štandardného roztoku na určenie reakčných faktorov vo vzťahu k betulínu.

Injektujte 1 µl silanizovaného roztoku vzorky a odmerajte plochy píkov. Na začiatku a konci každej novej chromatografickej analýzy sa musí nastreknúť štandardný roztok.

Dobrým usmernením je nastreknúť štandardný roztok po každých šiestich pokusných vzorkách.

Poznámka 6: Integrácia píku stigmasterolu by mala zahŕňať všetky „chvosty píku“ (tailing) znázornené v bodoch 1, 2 a 3 na obrázku 2b.

Pri posudzovaní celkového zastúpeného sitosterolu by integrácia píku sitosterolu mala zahŕňať plochu píku 22 dihydro-beta-sitosterolu (stigmastanol), ktorý sa eluuje ihneď po sitosterole (pozri obrázok 3b).

6. VÝPOČET VÝSLEDKOV

6.1. Určte plochu píkov sterolov a betulínu v obidvoch štandardných roztokoch na začiatku a konci každého kola a vypočítajte R_1:

R_1 = (priemerná plocha píkov sterolu v štandardnom roztoku)/(priemerná plocha píkov betulínu v štandardnom roztoku)

Určte plochu píku sterolu (stigmasterol alebo sitosterol) a píku betulínu vo vzorke a vypočítajte R_2:

R_2 = (plocha píkov sterolu vo vzorke)/(plocha píkov betulínu vo vzorke)

W_1 = obsah sterolu v štandardnom roztoku (mg) obsiahnutého v 1 ml štandardného roztoku (4.8.1 alebo 4.9.1)

W_2 = hmotnosť vzorky (g) (5.2.1)

P = čistota štandardného sterolu (4.8 alebo 4.9)

Obsah sterolu vo vzorke (mg/kg) = $((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$

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 analytikom s 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 analytikom s použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Reprodukovateľnosť*

7.1.2.1. Stigmasterol

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

7.1.2.2. Sitosterol

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených analytikmi v rôznych laboratóriách s 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 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 analytikom s 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 analytikom s použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 3,6 % v pomere k strednej hodnote analýzy.

7.2.2. *Reprodukovateľnosť*

7.2.2.1. Stigmasterol

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

7.2.2.2. Sitosterol

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

7.2.3. *Zdroj údajov o presnosti*

Údaje o presnosti boli stanovené pokusom uskutočneným v roku 1991, na ktorom sa podieľalo deväť laboratórií a 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 značkovacej látky sa z výrobku obsahujúceho značkovaciu látku odoberú tri vzorky obsahujúce značkovaciu 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. Na kontrolu miery a homogenity obsahu značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 115,8 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania pre 95 % čistý stigmasterol),

— 117,7 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania pre 85 % čistý stigmasterol),

— 80,1 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania pre 95 % čistý stigmasterol),

— 81,5 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania pre 85 % čistý stigmasterol).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 115,8 mg/kg a 80,1 mg/kg alebo 117,7 mg/kg a 81,5 mg/kg.

8.2.2. *Sitosterol*

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

8.2.2.2. Na kontrolu miery a homogenity obsahu značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 482,6 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania pre 90 % čistý sitosterol),

— 347,6 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania pre 90 % čistý sitosterol).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 482,6 mg/kg a 347,6 mg/kg.

8.3. **Koncentrované maslo**

8.3.1. *Stigmasterol*

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

8.3.1.2. Na kontrolu miery a homogenity obsahu značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 118,5 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania pre 95 % čistý stigmasterol),

— 120,4 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania pre 85 % čistý stigmasterol),

— 82,9 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania pre 95 % čistý stigmasterol),

— 84,3 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania pre 85 % čistý stigmasterol).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 118,5 mg/kg a 82,9 mg/kg alebo 120,4 mg/kg a 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitosterol*

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

8.3.2.2. Na kontrolu miery a homogenity obsahu značkovacej látky sa použijú výsledky z troch vzoriek získané z analýzy výrobku a najnižší z týchto výsledkov sa porovná s týmito limitmi:

— 480,9 mg/kg (95 % minimálnej miery vstrebávania pre 90 % čistý sitosterol),

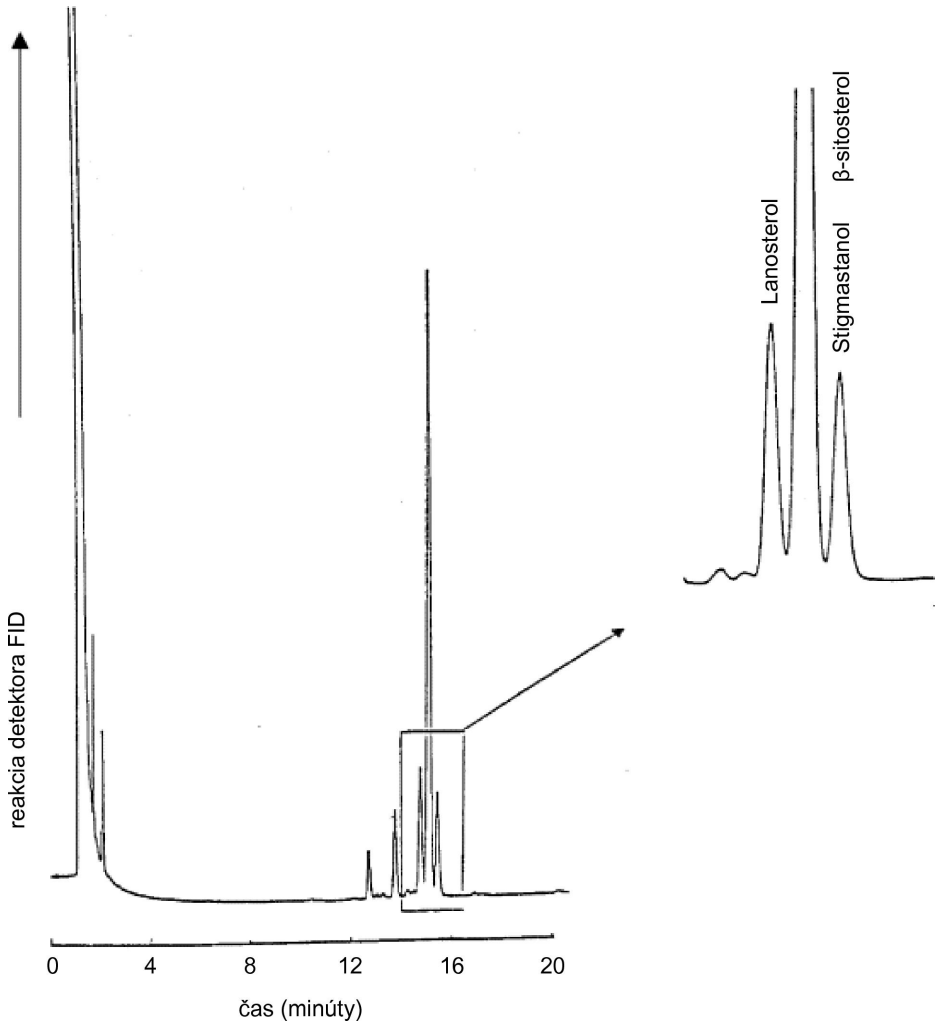
— 345,9 mg/kg (70 % minimálnej miery vstrebávania pre 90 % čistý sitosterol).

Koncentrácia značkovacej látky vo vzorke s najnižším výsledkom sa používa v spojení s interpoláciou medzi 480,9 mg/kg a 345,9 mg/kg.

Obrázok 1

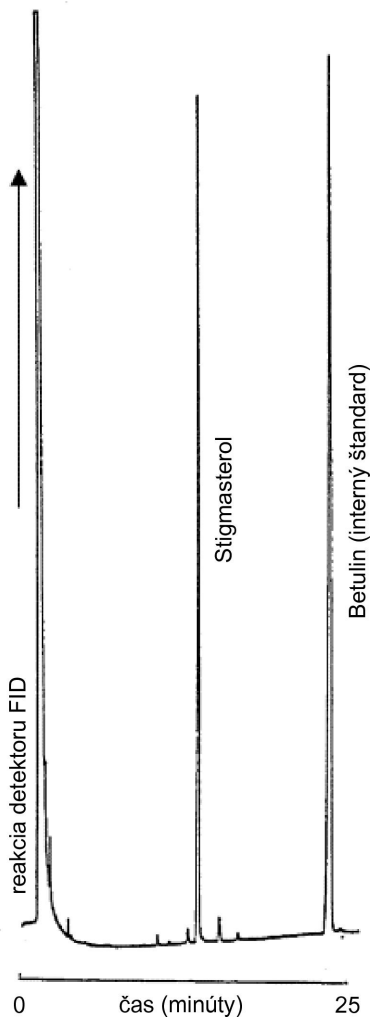
Chromatogram rozlíšenia testovacej zmesi

Uprednostňuje sa úplné rozlíšenie, t. j. pík lanosterolu sa musí vrátiť k základnej línii predtým, ako sa vyznačí pík sitosterolu, neúplné rozlíšenie je však prijateľné tiež.



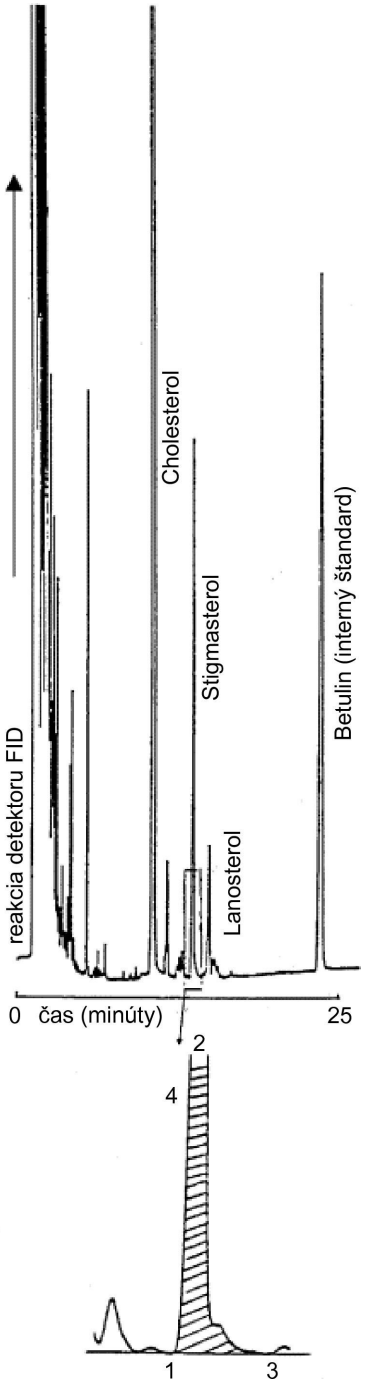
Obrázok 2a

Štandardný roztok stigmasterolu



Obrázok 2b

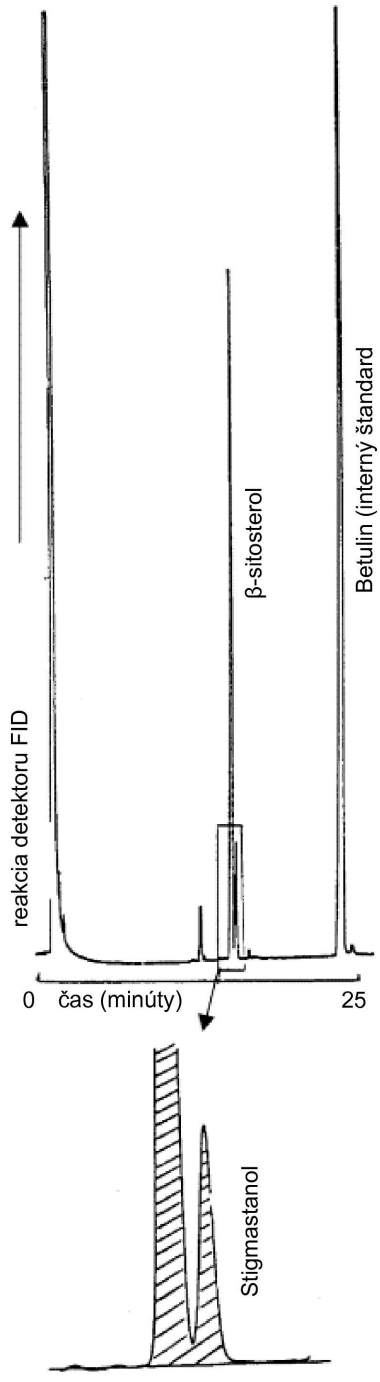
Vzorka masla denaturovaná stigmasterolom



Poznámka: Integrácia píkov stigmasterolu by mala obsahovať všetky prípadné „chvosty píku“ (tailings) znázornené v bodoch 1, 2 a 3.

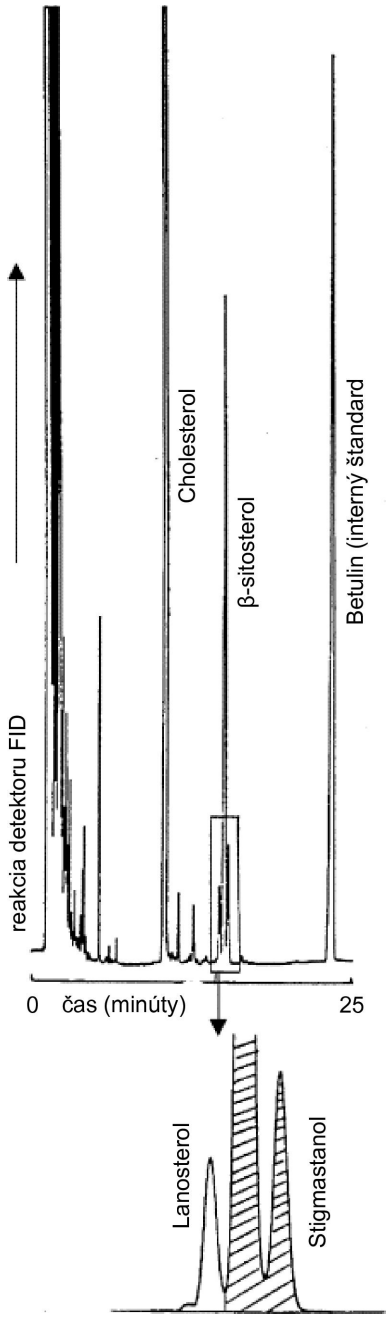
Obrázok 3a

Štandardný roztok sitosterolu



Obrázok 3b

Vzorka masla denaturovaná β-sitosterolom



Poznámka: β-sitosterol často obsahuje nečistotu (určuje sa ako stigmastanol), ktorá sa eluuje bezprostredne po β-sitosterole. Plochy týchto dvoch píkov by sa pri posúdení zastúpeného β-sitosterolu mali spočítať.

PRÍLOHA IX

(Článok 6)

REFERENČNÁ METÓDA ZISŤOVANIA KRAVSKÉHO MLIEKA A KAZEINÁTU V SYROCH VYROBENÝCH Z OVČIEHO MLIEKA, KOZIEHO MLIEKA ALEBO BYVOLIEHO MLIEKA, ALEBO 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, alebo zo zmesí kozieho, ovčieho a byvolieho mlieka izoelektrickým zaostrovaním γ-kazeínov po plazminolýze.

2. OBLASŤ POUŽITIA

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 srvátkových proteínov z kravského mlieka.

3. PRINCÍP METÓDY

3.1. Izolácia kazeínov zo syra a referenčných štandardných vzoriek

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

3.3. Izoelektrické zaostrovanie 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: Tieto údaje sa vzťahujú na laboratórne vyrobené polyakrylamidové gély obsahujúce močovinu z rozmermi 265 × 125 × 0,25 mm. Ak sa použije iná veľkosť a typ gélov, môže byť potrebná úprava podmienok separácie.

Izoelektrické zaostrovanie

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'-metyléndiakrylamidu

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 možno 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 je jeho vodivosť väčšia ako 5 μS, deionizujte ho miešaním s 2 g amberlitu MB-3 počas 30 minút, a potom ho prefiltrujte cez membránu s hrúbkou 0,45 μm.

4.1.2. *Gélový roztok*

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

9,0 ml zásobného roztoku

24 mg β-alanínu

500 µl amfolytu pH 3,5 – 9,5 ([1])

250 µl amfolytu pH 5 – 7 ([1])

250 µl amfolytu pH 6 – 8 ([1])

Gélový roztok zmiešajte a odplyňujte počas dvoch až troch minút v ultrazvukovom kúpeli alebo vo vákuu.

Poznámka: Gélový roztok pripravujte tesne pred 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 peroxodisíran diamónny (PER):

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

Poznámka: Vždy používajte čerstvo pripravený roztok PER.

4.2. **Kontaktná kvapalina**

Kerozín alebo kvapalný parafín

4.3. **Anódový roztok**

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

4.4. **Katódový roztok**

Vo vode rozpusťte 2,00 g hydroxidu sodného a pridajte vodu do 100 ml.

Príprava vzorky

4.5. **Reagenty na izoláciu proteínu**

4.5.1. *Rozpusťte kyselinu octovú (25,0 ml ľadovej kyseliny octovej doplňte vodou do 100 ml)*

4.5.2. *Dichlórometán*

4.5.3. *Acetón*

4.6. **Tlmivý roztok rozpúšťajúci proteíny**

Rozpusťte

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

24,03 g močoviny

250 mg (+-)-(R*,R*)-1,4-disulfanylbután-2,3-diolu

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. *Tlmivý roztok uhličitanu amónneho*

Titrujte roztok 0,2 mol/l hydrogénuhličitanu amónneho (1,58 g/100 ml vody) obsahujúci 0,05 mol/l kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (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.

([1]) Výrobky Ampholine® pH 3,5 – 9,5 (Pharmacia) a Resolyte® pH 5 – 7 a pH 6 – 8 (BDH, Merck) sa ukázali ako mimoriadne vhodné na dosiahnutie požadovanej separácie γ-kaezínov.

4.7.2. *Plazmín z kravského mlieka (EC. 3.4.21.7), činnosť minimálne 5 U/ml*

4.7.3. *Roztok kyseliny ε-aminohexánovej na inhibíciu enzýmov*

Rozpusťte 2,624 kyseliny ε-aminohexánovej (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 (Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440 Geel, Belgicko).*

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, 2 500 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 5,00 ml kravského odstredeného mlieka v 1 l vaničke, pridaním roztoku kyseliny mliečnej (10 % w/v) upravte pH na 6,4. Teplotu nastavte na 35 °C a pridajte 100 µl syridla z teľacích žalúdkov (činnosť syridla 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), miešajte 1 minútu a potom banku prikryte hliníkovou fóliou a nechajte stáť pri teplote 35 °C jednu hodinu, aby sa vytvoril tvaroh. Po vytvorení tvarohu 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: Pred prípravou štandardného roztoku je vhodné skontrolovať čistotu byvolieho mlieka izoelektrickým zaostrením kazeínov ošetrených plazmínom.

Reagenty na farbenie proteínov

4.9. **Ustaľovač**

Vo vode rozpusťte 150 g kyseliny trichlóroctovej a doplňte na 1 000 ml.

4.10. **Roztok na odfarbovanie**

Rozrieďte destilovanou vodou 500 ml metanolu a 200 ml ľadovej kyseliny octovej na 2 000 ml.

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)*

Rozpustite 3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) v 1 000 ml 90 % (v/v) metanolu magnetickou miešačkou (miešajte asi 45 minút), prefiltrujte cez dva stredne rýchle poskladané filtre.

4.11.2. *Roztok na farbenie (zásobný roztok 2)*

V 1 000 ml 20 % (v/v) kyseliny octovej rozpusťte 5,0 g pentahydrátu síranu meďnatého.

4.11.3. *Roztok na farbenie (pracovný roztok)*

Bezprostredne 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 (265 × 125 × 4 mm); gumený valček (šírka 15 cm); vyrovnávacia tabuľka

5.2. Fólia na gél (265 × 125 mm)

5.3. Krycia fólia (280 × 125 mm). Na oba dlhé konce upevnite pás lepiacej pásky (280 × 6 × 0,25 mm) (pozri obrázok 1).

5.4. Elektrozaostrovacia komora s chladiacou doskou (napr. 265 × 125 mm) a vhodným zdrojom energie (≥ 2,5 kV) alebo automatické elektroforézne zariadenie

5.5. Cirkulačný kryostat s termostatickou kontrolou na 12 ± 0,5 °C

5.6. Odstredivka nastaviteľná na 3 000 g

5.7. Elektródy (≥ 265 mm dlhé)

5.8. Plastické ponorné fľaše na anódový a katódový roztok

5.9. Aplikátory vzoriek (10 × 5 mm, viskózový papier alebo papier s nízkou absorpciou proteínov)

5.10. Nerezové nožnice, skalpely a pinzety

5.11. Nerezové alebo sklené misky na farbenie a odfarbovanie (napr. 280 × 150 mm podnosy na nástroje)

5.12. Nastaviteľný tyčový homogenizér (priemer hriadeľa 10 mm), 8 000 až 20 000 ot/min

5.13. Magnetický miešač

5.14. Ultrazvukový kúpeľ

5.15. Zváračka filmu

5.16. 25 µl mikropipety

5.17. Vákuový koncentrátor alebo lyofilizátor

5.18. Termostaticky kontrolovaný vodný kúpeľ nastaviteľný na 35 a 40 ± 1 °C, s možnosťou pretrepania

5.19. Denzitometer na hodnoty λ = 634 nm

6. POSTUP

6.1. **Príprava vzorky**

6.1.1. *Izolácia kazeínov*

Odvážte 5 g suchého syra alebo referenčných roztokov do 100 ml odstreďovacej skúmavky, pridajte 60 ml destilovanej vody a homogenizujte tyčovým homogenizérom (8 000 až 10 000 ot/min). Hodnotu pH upravte na 4,6 rozriedenou kyselinou octovou (4.5.1) a odstreďte (5 minút, 3 000 g). Zlejte tuk a srvátku, rezíduum homogenizujte pri 20 000 ot/min v 40 ml destilovanej vody s pH upraveným na 4,5 rozriedenou kyselinou octovou (4.5.1), pridajte 20 ml dichlórmetánu (4.5.2), opäť homogenizujte a odstreďte (5 minút, 3 000 g). Stierkou odstráňte vrstvu kazeínu, ktorá sa nachádza medzi vodnou a organickou vrstvou (pozri obrázok 2) a zlejte obe vrstvy. Kazeín opäť zhomogenizujte v 40 ml destilovanej vody (pozri vyššie) a 20 ml dichlórmetánu (4.5.2) a odstreďte. 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 stredne rýchly zložený filtračný papier. Rezíduum z filtra zmyte dvoma osobitnými 25 ml dávkami acetónu a nechajte vyschnúť na vzduchu alebo pod prúdom dusíka, a potom ho rozdrvte na jemný prášok v mažiari.

Poznámka: Suché izoláty kazeínu treba skladovať pri – 20 °C.

6.1.2. *Plazmínové delenie β-kazeínov na intenzifikáciu γ-kazeínov*

V 0,5 ml tlmivého 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 µl plazmínu (4.7.2), zmiešajte a inkubujte 1 hodinu pri teplote 40 °C za stáleho pretrepávania. Na inhibovanie enzýmu pridajte 20 µl roztoku kyseliny ε-aminohexánovej (4.7.3), pridajte 200 mg pevnej močoviny a 2 mg (+-)-(R*,R*)-1,4-disulfanylbután-2,3-diolu.

Poznámka: Na dosiahnutie väčšej symetrie v zaostrených kazeínových pásmach je vhodné roztok po pridaní kyseliny ε-aminohexánovej mrazom vysušiť a rezíduá potom rozpustiť v 0,5 ml tlmivého roztoku rozpúšťajúceho proteíny (4.6).

6.2. **Príprava močoviny obsahujúcej polyakrylamidové gély**

Pomocou niekoľkých kvapiek vody rozbaľte fóliu s gélom (5.2) na sklenenú doštičku (5.1) a prebytočnú vodu odstráňte papierovým obrúskom. Na ďalšiu doštičku rozložte rovnakým spôsobom kryciu fóliu (5.3) s rozpernými vložkami (0,25 mm). Doštičku horizontálne položte na vyrovnávaciu tabuľku.

Do pripraveného a odvzdušneného gélového roztoku (4.1.2) pridajte 10 µl Temedu (4.1.3.1), premiešajte a pridajte 10 µl roztoku PER (4.1.3.2), dôkladne premiešajte a ihneď rovnomerne nalejte na stred 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“ zavarte do filmovej rúrky a uskladnite v chladničke (maximálne šesť týždňov).

Poznámka: Krycia fólia s rozpernými vložkami sa dá znovu použiť. Polyakrylamidový gél možno rozrezať na menšie kúsky, čo sa odporúča vtedy, ak je málo vzoriek, alebo ak sa používa automatické elektroforézne zariadenie (dva gély s rozmermi 4,5 × 5 cm).

6.3. **Izoelektrické zaostrovanie**

Termostat chladenia 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, fóliou na gél smerom nadol, vyhnite sa pritom tvorbe bubliniek. Prebytočný kerozín odstráňte a odstráňte kryciu fóliu. Elektródové pásy ponorte do elektródových roztokov (4.3, 4.4), odrežte na dĺžku gélu a umiestnite na dané miesta (vzdialenosť elektród – 9,5 cm).

Podmienky izoelektrického zaostrovania:

6.3.1. *Rozmer gélu 265 × 125 × 0,25 mm*

Krok	Čas (min.)	Napätie (V)	Prúd (mA)	Výkon (W)	Volthodiny (Vh)
1. Predbežné zaostrenie	30	max. 2 500	max. 15	konštantný 4	c. 300
2. Zaostrenie vzorky ([1])	60	max. 2 500	max. 15	konštantný 4	c. 1 000
3. Záverečné zaostrenie	60	max. 2 500	max. 5	max. 20	c. 3 000
	40	max. 2 500	max. 6	max. 20	c. 3 000
	30	max. 2 500	max. 7	max. 25	c. 3 000

([1]) Aplikácia vzorky: Po predbežnom zaostrení (krok 1) napipetujte 18 µl vzorky a štandardného roztoku do aplikátorov vzorky (10 × 5 mm), rozložte ich na gél v 1 mm vzdialenostiach 5 mm pozdĺž anódy a zľahka pritlačte. Vykonajte zameranie podľa uvedených podmienok, po 60 minútach od zamerania vzorky tieto aplikátory opatrne vyberte.

Poznámka: Ak sa zmení hrúbka alebo šírka gélov, hodnoty prúdu a výkonu treba vhodne upraviť (napr. dvojnásobok hodnoty pre elektrický prúd a výkon, ak sa používa gél s rozmermi 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. *Príklad programu napätia pre automatické elektroforézne zariadenie (2 gély, 5 × 4,5 cm), elektródy bez pásov sa aplikujú priamo na gél.*

Krok	Napätie	Prúd	Výkon	Teplota	Volthodiny
1. Predbežné zaostrenie	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Zaostrenie vzorky	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Zaostrenie	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Zaostrenie	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Aplikátor vzorky vložte v kroku 2 pri 0 Vh.

Aplikátor vzorky odložte v kroku 2 pri 30 Vh.

6.4. **Farbenie proteínov**

6.4.1. *Ustálenie proteínov*

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

6.4.2. *Umývanie a farbenie gélovej doštičky*

Dôkladne odstráňte ustaľovač a gélovú doštičku umyte dvakrát po 30 sekúnd 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 45 minút.

6.4.3. *Odfarbenie gélovej doštičky*

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

Poznámka 1: Upevňujte, umývajte, farbite a odfarbujte pri 20 °C. Nepoužívajte vyššie teploty.

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 vykonáva porovnaním vzorov proteínov neznámej vzorky s referenčnými štandardnými vzormi na rovnakom géle. Obsah kravského mlieka v syroch z ovčieho mlieka, kozieho mlieka a bivolieho mlieka a zmesí ovčieho, kozieho a bivolieho mlieka sa zisťuje cez γ_3- a γ_2-kazeíny, ktorých izoelektrické body sú v rozmedzí 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 bivolích γ_2- a γ_3-kazeínov (pozri hodnoty „γ_2- E, G, B“ a „γ_3 E, G, B“ na obrázkoch 4 a, b a na obrázku 5) vhodné upraviť koncentrácie vzoriek a štandardných roztokov. Potom možno posúdiť množstvo kravského mlieka (menej ako 1 %, 1 % alebo viac ako 1 %) v neznámej vzorke priamo porovnaním intenzity kravských γ_3- a γ_2-kazeínov (pozri „γ_3 C“ a „γ_2 C“ na obrázkoch 4 a, b a na obrázku 5) s 0 % a 1 % referenčnými štandardnými vzorkami (ovčie, kozie) alebo s laboratórnymi priebežnými štandardnými vzorkami (bivolie).

7.2. **Denzitometrický odhad**

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

Poznámka: Metóda funguje uspokojivo, ak je jasný pozitívny signál pre kravské γ_2- aj γ_3-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 kravské γ_2- aj γ_3-kazeíny alebo zodpovedajúce pomery plochy píku 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., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2-caseins*. Milchwissenshaft 45, 708 – 711 (1990).

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

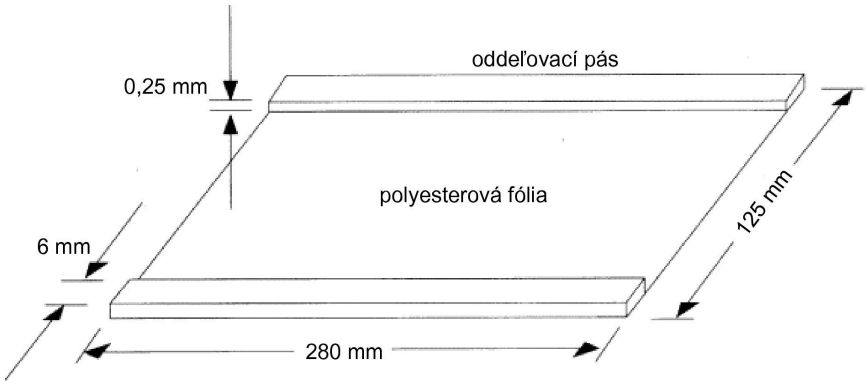
3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. v: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ed.) s. 389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

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

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

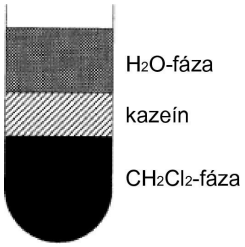
Obrázok 1

Schematický nákres krycej fólie



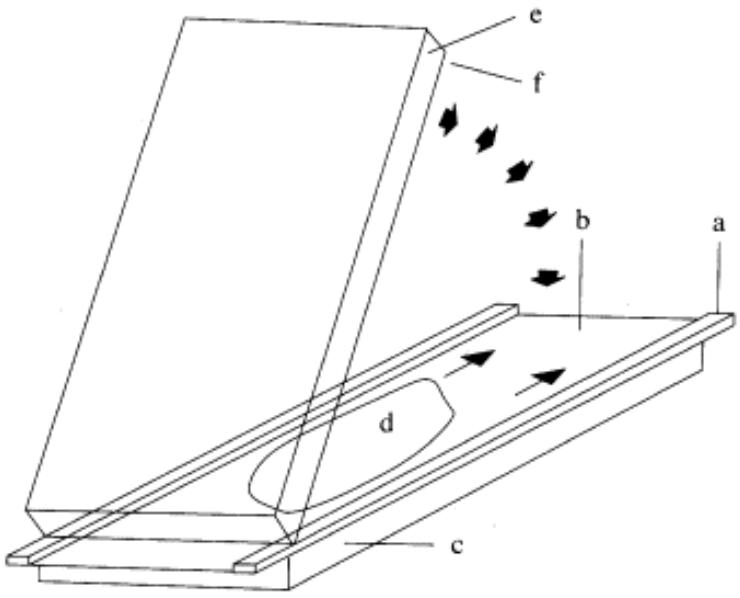
Obrázok 2

Kazeínová vrstva plávajúca medzi vodnou a organickou fázou po odstredení



Obrázok 3

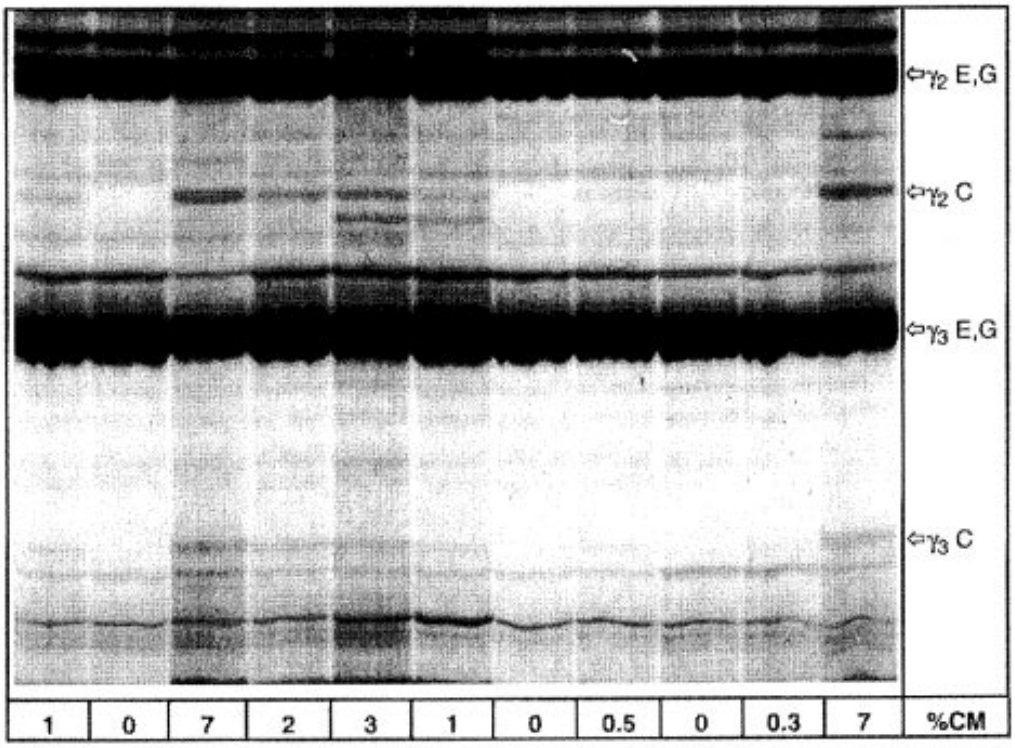
Klapková technika liatia ultratenkých polyakrylamidových gélov



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 zaostrovanie kazeínov ošetrených plazmínom z ovčieho a kozieho syra obsahujúcich rôzne množstvá kravského mlieka

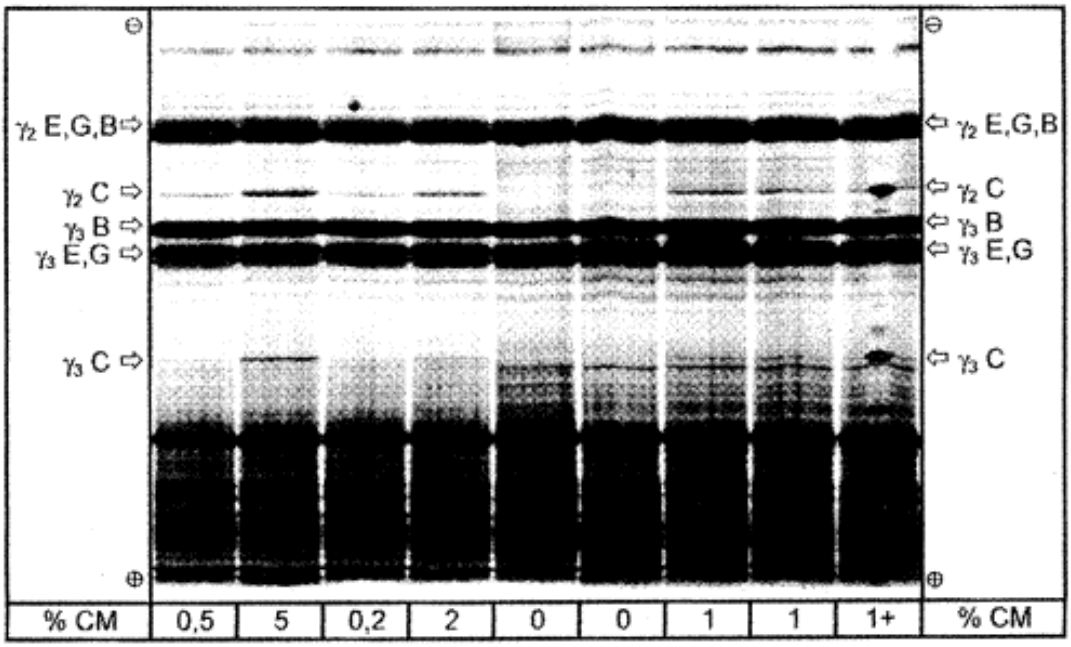


% CM = percento kravského mlieka, C = krava, E = ovca, G = koza

Znázornená je horná polovica IEF gélu.

Obrázok 4b

Izoelektrické zaostrovanie kazeínov ošetrených plazmínom zo syra vyrobeného zo zmesí ovčieho, kozieho a bylolieho mlieka s obsahom rôznych množstiev kravského mlieka

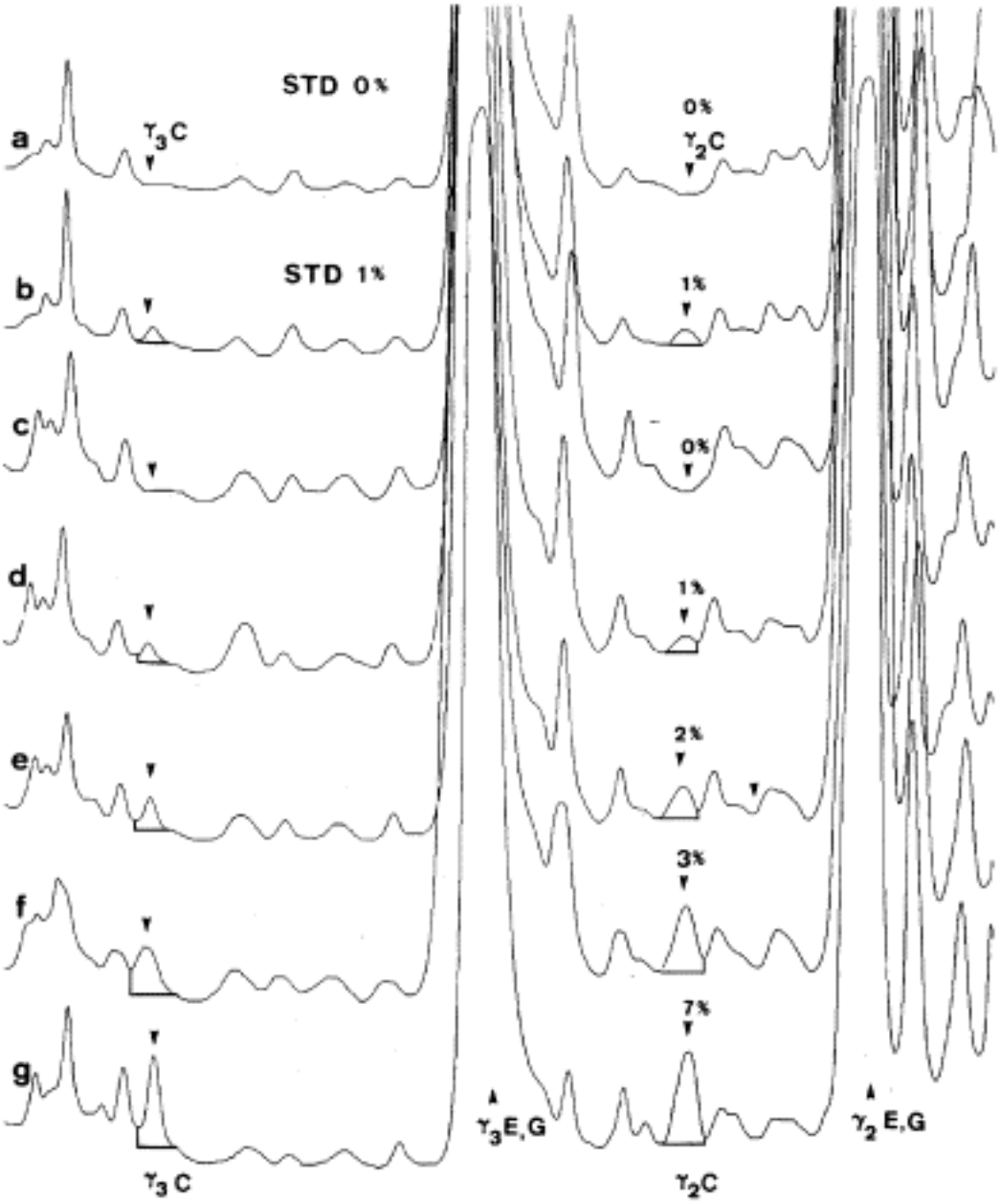


% CM = percento kravského mlieka; 1+ = vzorka obsahujúca 1 % kravského mlieka s pridaním čistého kravského kazeínu v strede stopy; C = krava, E = ovca, G = koza, B = byvol.

Znázornená je celková separačná vzdialenosť izoelektricky zaostreného gélu.

Obrázok 5

Preloženie denzitogramov štandardných roztokov (STD) a vzoriek syra vyrobeného zo zmesi ovčieho a kozieho mlieka po izoelektrickom zaostrení



a, b = štandardné vzorky s obsahom 0 a 1 % kravského mlieka; c – g = vzorky kozích syrov s obsahom 0, 1, 2, 3 a 7 % kravského mlieka. C = krava, E = ovca, G = koza, B = byvol.

Horná polovica IEF gélu bola skenovaná pri λ = 634 nm.

PRÍLOHA X

(Článok 7)

REFERENČNÁ METÓDA ZISŤOVANIA KOLIFORIEM V MASLE, SUŠENOM ODSTREDENOM MLIEKU, KAZEÍNOCH A KAZEINÁTOCH

1. PRÍPRAVA VZORIEK

   Norma ISO 8261

2. POSTUP

   Norma ISO 4831

   Vzorky zodpovedajúce 1 g masla alebo 0,1 g sušeného odstredeného mlieka alebo kazeínom/kazeinátom sa naočkujú do kultúry.

   Do každej vzorky sa naočkujú tri skúmavky.

3. VÝSLEDKY

   Ak 3 skúmavky vyprodukujú 3 negatívne výsledky, výsledok je „vyhovujúci“.

   Ak 3 skúmavky vyprodukujú 2 alebo 3 pozitívne výsledky, výsledok je „nevyhovujúci“.

   Ak 3 skúmavky vyprodukujú 2 negatívne výsledky, analýzu treba dvakrát zopakovať (s dvoma skúmavkami):

   — ak sú 2 výsledky negatívne, výsledok je „vyhovujúci“,

   — ak je aspoň 1 výsledok pozitívny, výsledok je „nevyhovujúci“.

PRÍLOHA XI

(Článok 8)

STANOVENIE LAKTÓZY V KŔMNYCH ZMESIACH

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Stanovenie laktózy v kŕmnych zmesiach.

2. UPOZORNENIE

Obsah laktózy sa definuje ako percento hmotnosti stanovené podľa uvedeného postupu.

3. VYMEDZENIE POJMU

Obsah bezvodnej laktózy je vyjadrený v g/100 g.

4. PRINCÍP

Kŕmna zmes sa obnovuje vodou. Do rozpustenej odváženej alikvotnej časti sa pridá Biggsov roztok, aby sa vyzrážal tuk a frakcie proteínovej zložky kŕmnej zmesi. Vzorka sa prefiltruje (alebo odstredí) a filtrát (alebo supernatant) sa injektuje do kolóny na HPLC s vymieňačom katiónov použitím vody v HPLC kvalite ako mobilnej fázy. Eluovaná laktóza sa zisťuje diferenčným refraktometrom ([i]).

5. REAGENTY

5.1. **Všeobecne**

Pokiaľ nie je uvedené inak, používajte len reagenty uznávanej analytickej triedy a odplynenú vodu v HPLC kvalite.

5.2. **Laktóza**

Monohydrát d-laktózy ($(C_{12}H_{22})O_{11}.H_2O$) môže nasať prídavnú vlhkosť. Pred použitím odmerajte skutočné množstvo vody podľa Karl-Fishera alebo odstráňte prídavnú vlhkosť vložením laktózy do pece na 8 hodín pri teplote 105 °C (týmto ošetrením laktóza nestratí kryštalickú vodu).

5.3. **Koncentrovaný Biggsov/Szijartov roztok** ([ii])

9,10 g dihydrátu octanu zinočnatého ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) a 5,46 g monohydrátu kyseliny trihydrogendodekavolfrámofosforečnej ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) rozriedťe v asi 70 ml s vodou v HPLC kvalite (6.8) v 100 ml odmernej banke.

Pridajte 5,81 ml ľadovej kyseliny octovej (CH_3COOH). Rozriedťe po značku 100 ml vodou v HPLC kvalite (6.8) a zmiešajte. Roztok možno skladovať pri izbovej teplote 1 rok.

5.4. **Riedený Biggsov/Szijartov roztok**

Zriedťe 25 ml koncentrovaného Biggsovho/Szijartovho roztoku (5.3) vodou na 500 ml pomocou odmerky. Roztok možno skladovať pri izbovej teplote 1 mesiac.

5.5. **Príprava vody v HPLC kvalite**

Prefiltrujte ultračistú vodu (6.8) cez vákuový filtračný systém (6.9). Na zlepšenie čerpacieho výkonu a získanie stabilnej základnej línie odplyňujte mobilnú fázu denne pomocou niektorej z dostupných techník, napr. pridaním hélia, pôsobením ultrazvuku, vákuovaním alebo použitím zabudovaného systému odplyňovania.

Poznámka: Aby sa predĺžila životnosť valca, je dôležité, aby bol obsah oxidu uhličitého čo najmenší a aby sa zabránilo jeho opakovanému nasávaniu.

6. PRÍSTROJE

Bežné laboratórne prístroje, konkrétne:

6.1. **Živicová kolóna na HPLC s vymieňačom iónov**

Náplň kolóny: 8 % zosieťovaný kopolymér polystyrén-divinylbenzénu aktivovaný katexovými skupinami na báze olova.

Rozmery kolóny: dĺžka 300 mm, vnútorný priemer asi 8 mm.

Použitie iných priemerov je možné za predpokladu, že sa primeraným spôsobom upraví prietok.

6.2. **Ochranná predkolóna**

Ochranná predkolóna je kombináciou samostatného vymieňača katiónov (H^+) a vymieňača aniónov (CO_3-), pričom oba sú v kolóne s rozmermi asi 30 mm × 4,6 mm (dĺžka × vnútorný priemer) (*napr.* mikroochranné predkolóny v mikroochrannom držiaku), tieto kolóny sú sú spojené v sérií alebo vo forme kombinovanej náplne, ktorá je zložená z AG 50W – X4, – 400 mesh (H^+) a AG3-X4A, 200 – 400 mesh (OH-) v pomere 35:65 (m/m) manuálne plnené do kolóny s rozmermi približne 20 × 9 mm (L-dĺžka × ID-vnútorný priemer).

6.3. **Kolónová piecka**

Piecka schopná udržiavať konštantnú teplotu 85 °C ± 1 °C.

6.4. **Čerpadlo HPLC**

Čerpadlo schopné generovať konštantný prietok (s výkyvmi < 0,5 %) pri 0,2 – 1,0 m/min.

6.5. **HPLC nástrekové zariadenie**

Automatický odoberač vzoriek schopný nastrekovať 25 µL s opakovateľnosťou < 0,5 %.

Alternatívne možno použiť manuálne zariadenie (s rovnakými požiadavkami ako na automatický odoberač vzoriek).

6.6. **Detektqor HPLC**

Vysokocitlivý detektor refrakčného indexu s úrovňou šumu < 5.10^{-9} RI jednotiek.

6.7. **Integqrátor**

Softvér alebo vlastný integrátor na získavanie údajov, spracovanie a generovanie plôch píkov a výšok píkov, ktoré možno previesť na koncentrácie laktózy.

6.8. **Systémq čistenia vody**

Systém schopný zabezpečiť ultračistú vodu (typ 1) s merným odporom >14 MΩ.cm.

6.9. **Systém filtrácie rozpúšťadla**

Systém umožňujúci filtráciu vody pomocou membránového filtra s veľkosťou pórov 0,45 µm.

Poznámka: Mnohé čističky vody (6.8) majú zabudovaný 0,45 alebo 0,2 µm filter. Ďalšiu filtráciu možno vynechať, ak sa táto voda priamo použije.

6.10. **Analytická váha**

Váhy s odčítateľnosťou po 0,1 mg.

6.11. **Vodný kúpeľ**

Vodný kúpeľ schopný udržiavať teplotu na 40 °C (± 0,5).

6.12. **Odstredivka**

Schopná generovať najmenej 3 000 g pre Eppendorfove fioly alebo ekvivalentný, prípadne väčší typ fiol.

6.13. **Banka s objemom 50 ml**

Kapacita 50 ml, trieda A.

Poznámka: Možno použiť aj banky s inou kapacitou so zohľadnením objemového faktora.

6.14. **Banka s objemom 100 ml**

Kapacita 100 ml, trieda A.

6.15. **Odmerná pipeta**

Odmerná pipeta 10 ml

Poznámka: Alternatívne možno použiť manuálny pipetovač s kapacitou 5 ml a dvakrát pridať objem 5 ml reagentu (5.3).

7. ODBER VZORIEK

Dôležité je, aby laboratórium dostalo vzorku odobranú podľa ISO 707/IDF 50 [iii], ktorá je skutočne reprezentatívna a nebola poškodená počas prepravy alebo skladovania.

8. PRÍPRAVA ŠTANDARDNÉHO ROZTOKU LAKTÓZY

8.1. **Štandardný roztok 1**

Presne odvážte (s odčítateľnosťou po 0,1 mg) a následne rozpustite asi 50 mg monohydrátu laktózy (5.2) v odmernej banke s objemom 100 ml (6.14) a doplňte po značku vodou.

8.2. **Štandardný roztok 2**

Rozpustite presne (s odčítaním po 0,1 mg) odvážené množstvo asi 100 mg monohydrátu laktózy (5.2) v odmernej banke s objemom 100 ml (6.14) a doplňte po značku vodou.

Poznámka: Štandardné roztoky možno skladovať najviac 1 týždeň pri teplote asi 5 °C.

9. PRÍPRAVA VZORKY

9.1. **Obnovenie vzorky**

Odvážte asi 5 g prášku do 50 ml banky (6.13) a poznamenajte si hmotnosť s presnosťou na 1 mg (W_1, (11)). Pridajte 50 ml vody a poznamenajte si zvýšenie hmotnosti (W_2 (11)) s presnosťou na 0,01 g. Uzavretú banku vložte na 30 minút do vodného kúpeľa (6.11) a za tento čas ju niekoľkokrát prevráťte. Potom ju nechajte vychladnúť pri izbovej teplote.

9.2. **Spracovanie vzorky**

Vezmite asi 1 g tohto roztoku a uložte ho do 50 ml odmernej banky (6.13), poznamenajte si hmotnosť s presnosťou na 1 mg (W_3 (11)), pridajte 20 ml vody a potom ešte 10 ml zriedeného Biggsovho/Szijartovho reagentu (5.4), doplňte vodou po značku. Počas prvých 30 minút jemne prevráťte banku 5-krát.

Po 1 hodine odoberte alikvotnú časť a odstreďujte (6.12) 3 000 g 10 minút (vyššiu gramáž odstreďujte primerane kratší čas). Alikvotnú časť supernatantu použite na analýzu HPLC.

10. STANOVENIE POMOCOU HPLC

10.1. **Predbežná príprava HPLC**

10.1.1. *Inštalácia kolóny a predkolóny*

Predkolónu (6.2) nainštalujte mimo kolónovej piecky (6.3) a kolónu (6.1) do piecky.

Poznámka: Ak piecka neobsahuje potrubie na predhriatie eluentu, eluent musí pred vstupom do kolóny prejsť asi 15 cm nerezovým potrubím v piecke (je absolútne nevyhnutné, aby sa eluent pre vstupom do valca zahrial, inak dojde k rozšíreniu píku).

10.1.2. *Detektor a počiatočný tok*

Aby ste dostali stabilnú základnú čiarku, zapnite detektor (6.6) najmenej 24 hodín pred začatím analýzy. Vnútornú teplotu detektora nastavte na 35 °C. Prietok nastavte na 0,2 ml/min (6.4) najmenej na 20 minút, pokiaľ sa teplota kolónovej piecky (6.3) nenastaví na izbovú teplotu.

10.1.3. *Kolónová piecka a konečný prietok*

Teplotu kolónovej piecky (6.3) nastavte na 85 °C. Po dosiahnutí tejto teploty po 30 minútach postupne zvyšujte prietok z 0,2 ml/min na 0,6 ml/min (6.4). Nechajte systém, aby sa vyrovnal s týmto prietokom pri teplote 85 °C 2 hodiny alebo dovtedy, kým nedostanete stabilnú základnú čiaru.

10.1.4. *Integrácia*

Starostlivo zvoľte parametre akvizície a integrácie (6.7), ako je rýchlosť údajov, citlivosť, časová konštanta, šírka píku a prah.

Retenčná doba laktózy je asi 11 min.

Poznámka: Mnohé softvérové programy na zhromažďovanie údajov (6.7) umožňujú jednoduché meranie teoretických priehradiek. Teoretické priehradky pre štandar 1 (8.1) merajte pravidelne a kolónu (6.1) vymeňte, keď sa počet priehradiek zníži o 25 % oproti počiatočnej hodnote pri novej kolóne.

10.1.5. *Testovanie ochrannej predkolóny*

Aby ste eliminovali soli zo vzorky, schopnosť ochrannej predkolóny (6.2) pravidelne (najmenej raz v každej sekvencii) kontrolujte prostredníctvom nástreku 25 µl 0,05 % roztoku chloridu sodného. Ochrannú predkolónu treba vymeniť zakaždým, keď sa objavjia píky.

10.2. **Bežné štandardné vzorky**

Na začiatku každej série analýz nastreknite 25 µl (6.5) štandardnej vzorky 1 (8.1) a následne štandardnej vzorky 2 (8.2). Toto opakujte po každej 10 až 20 vzorke, ako aj na konci sekvencie.

10.3. **Bežné vzorky**

Nastreknite 25 µl supernatantu (9.2) vzorky.

11. VÝPOČET A VYJADRENIE VÝSLEDKOV

11.1. **Kalibrácia**

Bežne sa na výpočet výsledkov používajú výšky píkov, ale ak signál obsahuje priveľa šumu, možno použiť plochy píkov (kvantitácia podľa výšky píku je menej ovplyvnená píkmi zložiek v nízkej koncentrácii, ktoré sú čiastočne, ale nie dostatočne oddelené od píkov laktózy).

Softvér (6.7) by mal vypočítať lineárnu kalibračnú krivku, ktorá prechádza cez východiskovú hladinu. Skontrolujte prípadnú nelineárnosť krivky [zjavnú nelineárnosť spôsobuje zrejme chyba v príprave štandardnej vzorky 1 (8.1) alebo 2 (8.2), zlá integrácia a menej pravdepodobne nesprávne fungovanie injektora].

Ako vstupnú hodnotu použite vypočítané koncentrácie laktózy v mg/ml štandardných vzoriek 1 (8.1) a 2 (8.2) ako bezvodnú laktózu.

Sklon (RF) kalibračnej čiary je definovaný plochou/koncentráciou v mg/ml.

11.2. **Vzorky**

Výsledok analýzy sa uvádza v g/100 g a vypočítava pomocou softvéru (6.7) alebo podľa tohto vzorca:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0{,}1$$

pričom

C: koncentrácia laktózy v g/100 g prášku

H: výška píku laktózy vzorky

RF: reakčný faktor (alebo sklon) kalibračného diagramu v mV/mg/ml

W_1: vzorková hmotnosť práškovej vzorky v g (9.1)

W_2: hmotnosť vody v g pridanej do vzorky prášku (9.1)

W_3: vzorková hmotnosť regenerovaného roztoku prášku v g (9.2)

50: objem použitej odmernej banky (9.2)

0,1: prepočet výsledku na g/100 g

12. PRESNOSŤ

Hodnoty získané týmto medzilaboratórnym testom nemožno použiť na iné než uvedené rozsahy a matrice koncentrácie. Hodnoty opakovateľnosti a reprodukovateľnosti sa odvodzujú od výsledku medzilaboratórneho testu vykonaného v súlade s ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Opakovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma výsledkami jednotlivých testov získaný pomocou rovnakej metódy na rovnakom testovanom materiáli v rovnakom laboratóriu rovnakým analytikom používajúcim rovnaké zariadenia v rámci krátkeho časového intervalu sú v najviac 5 % prípadov väčšie než xxx (stanoví sa laboratórnym pokusom) ([v]).

12.2. **Reprodukovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma výsledkami jednotlivých testov získaný pomocou rovnakej metódy na rovnakom testovanom materiáli v rôznych laboratóriách rôznymi analytikmi používajúcimi rôzne zariadenie sú v najviac 5 % prípadov väčšie než 0,5 g/100g (stanoví sa laboratórnym pokusom)

13. ZDROJE

([i]) J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89 – 106.

([ii]) D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

([iii]) Norma ISO 707 (IDF 50), Mlieko a mliečne výrobky – návod na odber vzoriek.

([iv]) ISO 5725 – 1, Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 1: Všeobecné zásady a definície.

([v]) ISO 5725 – 2, Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 2: Základná metóda stanovenia opakovateľnosti a reprodukovateľnosti normalizovanej metódy merania.

PRÍLOHA XII

(Článok 9)

ZISŤOVANIE SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V ODSTREDENOM SUŠENOM MLIEKU NA VEREJNÉ SKLADOVANIE URČOVANÍM KAZEÍNMAKROPEPTIDOV VYSOKOVÝKONNOU KVAPALINOVOU CHROMATOGRAFIOU (HPLC)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda umožňuje zisťovanie prítomnosti syridlovej srvátky v sušenom odstredenom mlieku určenom na verejné skladovanie zisťovaním obsahu *kazeínmakropeptidov*.

2. ZDROJ

Medzinárodná norma ISO 707 – Mlieko a mliečne výrobky – návod na odber vzoriek, v súlade s pokynmi uvedenými v prílohe I ods. 2 písm. c) poslednom odseku.

3. VYMEDZENIE POJMU

Obsah pevnej syridlovej srvátky sa definuje ako percento hmotnosti stanovené podľa obsahu kazeínmakropeptidov uvedeným postupom.

4. PRINCÍP

— Obnovenie sušeného odstredeného mlieka, odstránenie tuku a proteínov kyselinou trichlóroctovou s následným odstredením alebo filtráciou.

— Stanovenie množstva kazeínmakropeptidov (CMP) v supernatante vysokovýkonnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

— Hodnotenie výsledkov získaných zo vzoriek v porovnaní so štandardnými vzorkami pozostávajúce z odstredeného sušeného mlieka s pridaním 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 trichlóroctovej**

Rozrieďte 240 g kyseliny trichloroctovej (CCl_3COOH) vo vode a dolejte do 1 000 ml. Roztok by mal byť čistý a bezfarebný.

5.2. **Elučný roztok, pH 6,0**

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

Doplňte vodou do 1 000 ml a homogenizujte.

Poznámka: Zloženie eluentu možno aktualizovať tak, aby vyhovoval osvedčeniu noriem alebo odporúčaniam výrobcu materiálu na naplnenie kolóny.

Elučný roztok pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s pórmi s priemerom 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 μm.

Poznámka: Použiť sa môže akékoľvek iné vyplachovacie rozpúšťadlo s baktericidálnym účinkom, ktoré neovplyvňuje schopnosť rozlíšenia kolóny.

5.4. **Štandardné vzorky**

5.4.1. *Odstredené sušené mlieko vyhovujúce požiadavkám tohto rozlíšenia (t. j. [0]).*

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

6. PRÍSTROJE

6.1. Analytická váha

6.2. Odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2 200 g, vybavená uzavierateľnými odstreďovacími skúmavkami s objemom približne 50 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 μm

6.8. Pipety s odmerkou umožňujúce prenos 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A, alebo ISO/R 835) alebo dávkovací systém schopný preniesť 10,0 ml kvapaliny za dve minúty

6.9. Dávkovací systém schopný preniesť 20,0 ml vody pri teplote približne 50 °C

6.10. Termostatický vodný kúpeľ nastavený na 25 ± 5 °C

6.11. Zariadenie na HPLC pozostávajúce z:

6.11.1. Čerpadla

6.11.2. Injektora, ručného alebo automatického s kapacitou 15 až 30 μl

6.11.3. Dvoch kolón TSK 2 000-SW v sérii (dĺžka 30 cm, vnútorný priemer 0,75 cm) alebo ekvivalentných kolón (napr. jedného TSK 2 000-SWxl, jedného Agilent Technologies Zorbax 250) a prekolóny (3 cm × 0,3 cm) naplnených I 125 alebo materiálom s ekvivalentnou účinnosťou

6.11.4. Termostatickej kolónovej piecky nastavenej na 35 ± 1 °C

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

6.11.6. Integrátora na meranie výšky píkov

Poznámka: Práca s kolónami skladovanými pri izbovej teplote je možná, avšak ich rozlíšenie je o niečo menšie. V takom prípade by sa teplota mala pohybovať v rámci menej než ± 5 °C v každom z rozpätí analýz.

7. ODBER VZORIEK

7.1. Vzorky sa musia odoberať v súlade s postupom ustanoveným v medzinárodnej norme ISO 707. Členské štáty však môžu použiť aj inú metódu odberu vzoriek za predpokladu, že táto je v zhode so zásadami uvedenej normy.

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

8. POSTUP

8.1. **Príprava vzorky**

Sušené mlieko vložte do nádoby s objemom rovnajúcim sa 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 odstreďovacej skúmavky (6.2) alebo vhodnej banky s uzáverom (50 ml).

8.3. **Odstránenie tukov a proteínov**

8.3.1. Do dávky testovacej vzorky pridajte 20,0 ml teplej vody (50 °C). Prášok rozpusťte pretrepaním počas piatich minút použitím mechanického pretrepávača (6.3). Skúmavku vložte do vodného kúpeľa (6.10) a nechajte ustáliť na 25 °C.

8.3.2. Počas dvoch minút pridajte 10,0 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (5.1) pri teplote asi 25 °C za súčasného intenzívneho miešania magnetickým miešačom (6.4). Skúmavku umiestnite do vodného kúpeľa (6.10) a odložte na 60 minút.

8.3.3. Odstreďte (6.2) počas 10 minút pri 2 200 g, alebo prefiltrujte cez papier (6.6) a odstráňte prvých 5 ml filtrátu.

8.4. **Chromatografické určenie**

8.4.1. Do prístroja na HPLC (6.11) nastaveného na prietok 1,0 ml elučného roztoku (5.2) za minútu injektujte 15 až 30 µl presne odmeraného supernatantu alebo filtrátu (8.3.3).

Poznámka 1: Možno použiť aj iný prietok v závislosti od vnútorného priemeru použitých valcov alebo podľa pokynov výrobcu valca.

Poznámka 2: Elučný roztok (5.2) počas chromatografickej analýzy udržujte na 85 °C s cieľom uchovať elučný roztok bez plynov a zabrániť rastu baktérií. Vykonať môžete akékoľvek preventívne kroky s podobným účinkom.

Poznámka 3: Kolóny opláchnite vodou počas každého prerušenia. Elučný roztok (5.2) v nich nikdy nenechávajte.

Pred každým prerušením dlhším ako 24 hodín prepláchnite kolóny vodou, potom ich umyte roztokom (5.3) počas 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 pík označený retenčným časom RT takto:

Pík II:	Druhý pík chromatogramu s RT približne 12,5 minút.
Pík III:	Tretí pík chromatogramu zodpovedajúci CMP s RT 15,5 minúty.

Kvalita kolóny (kolón) môže pri jednotlivých píkoch podstatne ovplyvniť retenčný čas.

Integrátor (6.11.6) automaticky vypočíta plochu A jednotlivých píkov:

A_{II}:	plocha píku II
A_{III}:	plocha píku III

Pred kvantitatívnou interpretáciou je dôležité preskúmať vzhľad každého chromatogramu s cieľom zistiť akékoľvek abnormality zapríčinené buď poruchou prístroja alebo kolón, alebo pôvodom a povahou analyzovanej vzorky.

V prípade pochybností analýzu zopakujte.

8.5. **Kalibrácia**

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

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

8.5.2. Pred chromatografickou analýzou vzoriek pripravte kolóny opakovanou injektážou štandardnej vzorky (5.4.2) do roztoku (8.5.1), pokým plocha a retenčný čas píku zodpovedajúceho CMP nie sú konštantné.

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

9. VÝSLEDKY

9.1. **Metóda výpočtu a vzorce**

9.1.1. *Výpočet reakčných faktorov R:*

Pík II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

pričom

R_{II} = reakčný faktor píkov II

A_{II} [0] = plochy píkov II štandardnej vzorky [0] získanej v 8.5.3

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

pričom

R_{III} = reakčný faktor píku III

A_{III} [0] a A_{III} [5] = plochy píku III v štandardných vzorkách [0] a [5] získaných v 8.5.3

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

9.1.2. *Výpočet relatívnej plochy píkov 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 píkov II, III a IV vzorky [E]

A_{II} [E], A_{III} [E] = plochy píkov II, III a vzorky [E] získané v bode 8.4.2

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

9.1.3. *Výpočet relatívneho retenčného času píku III vzorky [E]* $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$

pričom

RRT_{III} [E] = relatívny retenčný čas píku III vzorky [E]

RT_{III} [E] = retenčný čas píku III vzorky [E] získaný v bode 8.4.2

RT_{III} [5] = retenčný čas píku III kontrolnej vzorky [5] získaný v bode 8.5.3

9.1.4. Pokusy ukázali, že existuje lineárny vzťah medzi relatívnym retenčným časom píku III, t. j. RRT_{III} [E] a percentom sušenej srvátky pridanej do 10 %.

— RRT_{III} [E] je < 1,000, ak je obsah srvátky > 5 %,

— RRT_{III} [E] je ≥ 1,000, ak je obsah srvátky ≤ 5 %.

Povolená neistota pre hodnoty RRT_{III} je ± 0,002.

Hodnota RRT_{III} [0] sa zvyčajne mierne odchyľuje od 1,034. V závislosti od stavu kolón môže táto hodnota dosiahnuť 1,000 ale musí byť vždy väčšia.

9.2. Výpočet percenta sušenej syridlovej srvátky 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 píku III skúšobnej vzorky [E] získanej ako v 9.1.2
1,3	=	predstavuje relatívnu priemernú plochu píku III vyjadrenú v gramoch syridlovej srvátky na 100 g stanovenú v neporušenom sušenom odstredenom mlieku rôzneho pôvodu. Tento ukazovateľ bol získaný experimentálne.
S_{III} [0]	=	predstavuje relatívnu plochu píku III, ktorá sa rovná $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Tieto hodnoty sú získané v 9.1.1 a 8.5.3.
(S_{III} [0] – 0,9)	=	predstavuje korekciu, ktorú treba urobiť na relatívnej priemernej ploche 1,3, keď sa S_{III} [0] nerovná 0,9. Experimentálne je relatívna priemerná plocha píku III kontrolnej vzorky [0] 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 píku III, S_{III} [E], vyjadrená v gramoch syridlovej srvátky na 100 g výrobku, je ≤ 2,0 + (S_{III} [0] – 0,9), pričom

2,0	=	maximálna povolená hodnota relatívnej plochy píku III so zohľadnením relatívnej plochy píku III, t. j. 1,3, neistota je spôsobená variáciami v zložení sušeného odstredeného mlieka a reprodukovateľnosťou metódy (9.3.2)
(S_{III} [0] – 0,9)	=	korekcia, ktorú treba urobiť, ak je plocha S_{III} [0] iná než 0,9 (pozri bod 9.2)

9.4.2. Ak je relatívna plocha píku III, S_{III} [E] > 2,0 (S_{III} [0] – 0,9) a relatívna plocha píku II, S_{II} [E] ≤ 160, obsah syridlovej srvátky stanovte podľa bodu 9.2.

9.4.3. Ak je relatívna plocha píku III, S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III} [0] – 0,9) a relatívna plocha píku II, S_{II} [E] ≤ 160, určite celkový obsah proteínov (P %); potom preskúmajte grafy 1 a 2.

9.4.3.1. Údaje získané po analýze vzoriek nefalšovaných odstredených sušených mliek 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 píku III s pravdepodobnosťou nepresiahnutia v 90 % prípadov.

Rovnice pre prerušovanú čiaru v grafoch 1 a 2 sú:

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

pričom

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

P % = celkový obsah proteínov vyjadrený v percentách hmotnosti

(S_{II} [E] = 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 týchto vzorcov: $T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)] T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$.

9.4.3.2.

Ak T_1 a/alebo T_2 sú rovné alebo menšie ako nula, nemožno stanoviť prítomnosť syridlovej srvátky.

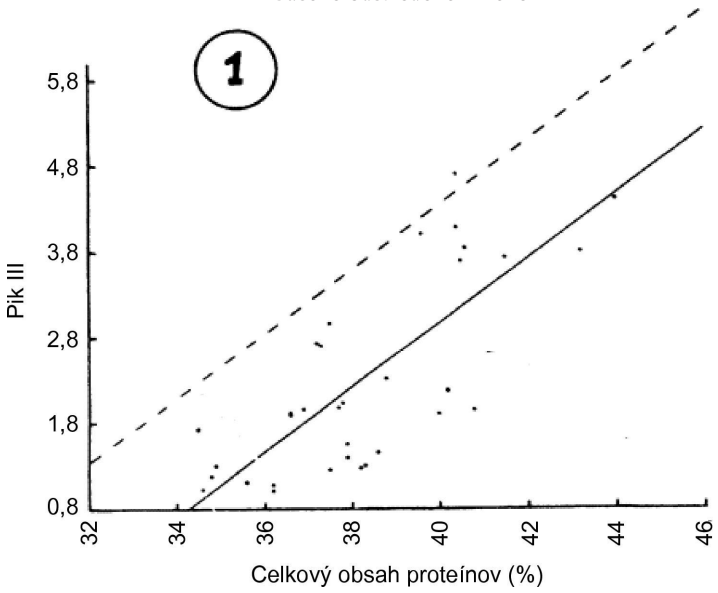
Ak T_1 a T_2 sú vyššie ako nula, syridlová srvátka je prítomná.

Obsah syridlovej srvátky sa počíta podľa vzorca: $W = T_2 + 0{,}91$

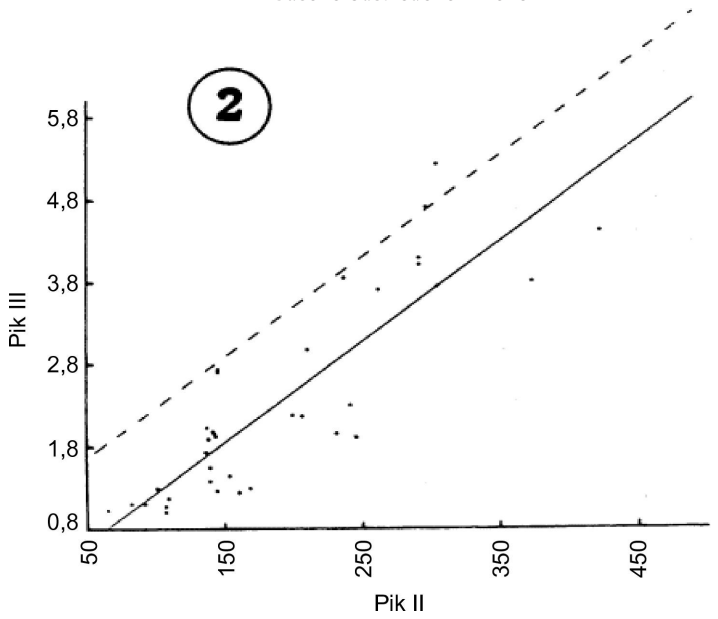
pričom

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

Sušené odstredené mlieko



Sušené odstredené mlieko



PRÍLOHA XIII

(Článok 9)

STANOVENIE PEVNEJ SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V ODSTREDENOM SUŠENOM MLIEKU A V ZMESIACH UVEDENÝCH V NARIADENÍ (ES) č. 2799/1999

1. ÚČEL: ZISTENIE PRIDANIA PEVNEJ SYRIDLOVEJ SRVÁTKY DO

a) odstredeného sušeného mlieka definovaného v článku 2 nariadenia (ES) č. 2799/1999 a

b) zmesí definovaných v článku 4 nariadenia (ES) č. 2799/1999.

2. ZDROJ: MEDZINÁRODNÁ NORMA ISO 707

3. VYMEDZENIE POJMU

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

4. PRINCÍP

Obsah kazeínmakropeptidov sa určuje v súlade s prílohou XII. Vzorky s pozitívnym výsledkom sa analyzujú na kazeínmakropeptid A reverznou fázou postupu vysokovýkonnej kvapalinovej chromatografie (postup HPLC). Alternatívne sa vzorky analyzujú priamo reverznou fázou postupu HPLC. Hodnotenie výsledkov sa získa v porovnaní s štandardnými vzorkami pozostávajúcimi z odstredeného sušeného mlieka s obsahom známeho percenta srvátky v prášku a bez nej. 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 spektroskopickej alebo HPLC kvality.

Reagenty potrebné na tento postup sú popísané v prílohe XII k tomuto nariadeniu.

Reagenty pre reverznú fázu HPLC.

5.1. **Roztok kyseliny trichlóroctovej**

Rozrieďte 240 g kyseliny trichlóroctovej (CCl_3COOH) vo vode a dolejte do 1 000 ml. Roztok by mal byť čistý a bezfarebný.

5.2. **Eluenty A a B**

Eluent A: do 1 000 ml banky dajte 150 ml acetronitrilu (CH_3CN), 20 ml propán-2-olu ($CH_3CHOHCH_3$) a 1,00 ml kyseliny trifluóroctovej (TFA, CF_3COOH). Doplňte vodou do 1 000 ml.

Eluent B: 550 ml acetonitrilu, 20 ml propán-2-olua 1,00 ml TFA vložte do 1 000 ml banky. Doplňte vodou do 1 000 ml. Elučný roztok pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s pórmi s priemerom 0,45 m.

5.3. **Konzervácia kolóny**

Po analýze sa kolóna prepláchne eluentom B (gradientom) a následne sa prepláchne acetonitrilom (gradientom počas 30 minút). Valec sa skladuje v acetonitrile.

5.4. **Štandardné vzorky**

5.4.1. Odstredené sušené mlieko spĺňajúce požiadavky na verejné skladovanie (t. j. [0])

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

5.4.3. *To isté odstredené sušené mlieko upravené 50 % (m/m) sušenou srvátkou syridlového typu štandardného zloženia (t. j. [50])* (1)

6. PRÍSTROJE

Prístroje potrebné pre tento postup sú uvedené v prílohe XII k tomuto nariadeniu.

6.1. Analytická váha

6.2. Odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2 200 g, vybavená uzavierateľnými odstreďovacími skúmavkami s objemom približne 50 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 μm

6.8. Pipety s odmerkou umožňujúce prenos 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A alebo ISO/R 835) alebo systém schopný prenosu 10,0 ml za dve minúty

6.9. Dávkovací systém schopný dodať 20,0 ml vody pri teplote okolo 50 °C

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

6.11. Zariadenie na HPLC pozostávajúce z:

6.11.1. Binárneho gradientového čerpacieho systému

6.11.2. Injektora automatického alebo manuálneho s kapacitou 100 μl

6.11.3. Kolóny Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (dĺžka 25 cm, vnútorný priemer 0,46 cm) alebo ekvivalentnej kolóny založenej na silikagélovom základe s veľkými pórmi pre reverznú fázu

6.11.4. Termostatickej kolónovej piecky nastavenej na 35 ± 1 °C

6.11.5. 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 0,02AU

6.11.6. Integrátora schopného nastaviť integráciu na spoločnú základnú čiaru alebo medzi spodnými časťami krivky

Poznámka: Práca s kolónou pri izbovej teplote je možná za predpokladu, že teplotné výkyvy nie sú väčšie ako 1 °C, v opačnom prípade dochádza k príliš veľkým variáciám retenčného času GMP_A.

7. ODBER VZORIEK

7.1. Vzorky sa musia odoberať v súlade s postupom ustanoveným v medzinárodnej norme ISO 707. Členské štáty však môžu použiť aj inú metódu odberu vzoriek za predpokladu, že táto je v zhode so zásadami uvedenej normy.

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

(1) Sušená srvátka syridlového typu, ako aj upravené odstredené sušené mlieko sa dajú zakúpiť u NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL-6710 BA Ede. Možu sa však použiť sušené prípravky, ktoré vykazujú podobné výsledky ako sušené prípravky firmy NIZO.

8. POSTUP

8.1. **Príprava vzorky**

Sušené mlieko vložte do nádoby s objemom rovnajúcim sa približne dvojnásobku objemu prášku, vybavenej vzduchotesným vekom. Nádobu ihneď zatvorte. Prášok dobre premiešajte opakovaným prevracaním nádoby.

8.2. **Testovacia vzorka**

Odvážte 2,00 ± 0,001 g testovacej vzorky do odstreďovacej skúmavky (6.2) alebo vhodnej banky s uzáverom (50 ml).

Poznámka: V prípade zmesí odvážte také množstvo skúšobnej vzorky, aby odtučnená dávka vzorky zodpovedala 2,00 g.

8.3. **Odstránenie tukov a proteínov**

8.3.1. Do dávky testovacej vzorky pridajte 20,0 ml teplej vody (50 °C). Prášok rozpusťte pretrepaním mechanickým pretrepávačom počas piatich minút alebo počas 30 minút v prípade kyslého cmaru (6.3). Skúmavku vložte do vodného kúpeľa (6.10) a nechajte ustáliť na 25 °C.

8.3.2. Dve minúty sústavne pridávajte 10 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej s teplotou asi 25 °C (5.1) za súčasného intenzívneho miešania magnetickým miešačom (6.4). Skúmavku umiestnite do vodného kúpeľa (6.10) a odložte na 60 minút.

8.3.3. Odstreďte (6.2) počas 10 minút pri 2 200 g, alebo prefiltrujte cez papier (6.6) a odstráňte prvých 5 ml filtrátu.

8.4. **Chromatografické určenie**

8.4.1. Analýzu HPLC vykonajte podľa opisu v prílohe XII. 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 opísaný nižšie. Alternatívne možno priamo použiť metódu HPLC s reverznou fázou. Prítomnosť sušeného kyslého cmaru môže pri použití metódy opísanej v prílohe XII spôsobiť nesprávne pozitívne výsledky. Metóda HPLC s reverznou fázou túto možnosť vylučuje.

8.4.2. Pred uskutočnením analýzy HPLC s reverznou fázou je potrebné optimalizovať podmienky gradientu. Optimálnym retenčným časom pre CMP_A pre gradientové systémy s mŕtvym objemom asi 6 ml (objem od bodu, kedy sa rozpúšťadlá spoja do objemu nástrekovej slučky vrátane) je 26 ± 2 minúty. Pri gradientových systémoch s nižším mŕtvym objemom (napr. 2 ml) sa za optimálny retenčný čas považuje 22 minút.

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

Do prístroja HPLC nastaveného na podmienky gradientu uvedené v tabuľke 1 injektujte 100 µl supernatantu alebo filtrátu (8.3.3).

Tabuľka 1

Podmienky skúšobného gradientu pre optimalizáciu chromatografie

Čas (min)	Prietok (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 píku CMP_A.

Pomocou uvedeného vzorca možno vypočítať počiatočné zloženie rozpúšťadla použitého pri bežnom gradiente (pozri 8.4.3) % B = 10 − 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} − 26) / 6)*30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} − 26) / 6)*1,11

pričom

RT_{cmpA}: retenčný čas GMP_A v skúšobnom gradiente

10: počiatočné % B skúšobného gradientu

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

13,5: stredný čas skúšobného gradientu

26: požadovaný retenčný čas GMP_A

6: pomer sklonov predbežného a normálneho gradientu

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

27: čas skúšobného gradientu

8.4.3. Vezmite roztoky testovacích vzoriek.

Do prístroja HPLC nastaveného na prietok elučného roztoku (5.2) 1,0 ml za minútu injektujte 100 µl 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 nástreku sa začne lineárny gradient, ktorý spôsobí o 5 % vyššie percento B po 27 minútach. Následne sa začne lineárny gradient, ktorý spôsobí v zložení eluentu zmenu na 90 % B za päť minút. Toto zloženie sa udržuje počas piatich minút, keď sa zloženie zmení prostredníctvom lineárneho gradientu po piatich minútach na počiatočné zloženie. V závislosti od vnútorného objemu čerpacieho systému je možné ďalší nástrek uskutočniť po 15 minútach od dosiahnutia počiatočných podmienok.

Poznámka 1: Retenčný čas CMP_A je 26 ± 2 minúty. Toto je možné dosiahnuť upravovaním počiatočných a konečných podmienok prvého gradientu. Rozdiel v % B medzi počiatočnými a konečnými podmienkami však musí zostať 5 % B.

Poznámka 2: Eluenty by mali byť dostatočne odplynené a v takom stave by mali aj zostať. Je to dôležité pre riadne fungovanie gradientového čerpacieho systému. Štandardná odchýlka retenčného času píku CMP_A by mala byť menšia ako 0,1 minúty (n = 10).

Poznámka 3: Po každých piatich vzorkách by sa mala nastreknúť referenčná vzorka (5), ktorá sa 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 pík CMP_A označený retenčným časom približne 26 minút.

Integrátor (6.11.6) automaticky vypočíta výšku píku H píku CMP_A. V každom chromatograme je potrebné skontrolovať umiestnenie základnej čiary. Ak je základná čiara umiestnená nesprávne, analýzu alebo integráciu je potrebné opakovať.

Poznámka: Ak je pík CMP_A dostatočne oddelený od ostatných píkov, treba použiť základnú čiaru medzi spodnými časťami krivky, inak použite kolmice na spoločnú základnú čiaru, ktorých počiatočný bod by mal byť blízko k píku CMP_A (teda nie na t = 0 min.!). Na štandardnú vzorku a vzorky použite integráciu rovnakého typu a v prípade spoločnej základnej čiary skontrolujte jej nespornosť pre vzorky a štandardnú vzorku.

Pred kvantitatívnou interpretáciou je dôležité preskúmať vzhľad každého chromatogramu s cieľom zistiť akékoľvek abnormality zapríčinené buď poruchou prístroja alebo valcov, alebo pôvodom a povahou analyzovanej vzorky. V prípade pochybností analýzu zopakujte.

8.5. **Kalibrácia**

8.5.1. Postup opísaný v bodoch 8.2 až 8.4.4. použite pri štandardných vzorkách (5.4.1 a 5.4.2). Použite čerstvo pripravené roztoky, pretože CMP v prostredí 8 % kyseliny trichlóroctovej pri izbovej teplote degraduje. Pri 4 °C je roztok stabilný počas 24 hodín. V prípade dlhých sérií analýz je v automatickom injektore vhodné použiť schladený podnos 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 píku CMP_A predchádzajú dva malé píky. Je rozhodujúce dosiahnuť podobnú separáciu.

8.5.2. Pred chromatografickou analýzou vzoriek injektujte 100 µl štandardnej vzorky bez syridlovej srvátky [0] (5.4.1).

Chromatogram by nemal ukazovať pík v retenčnom čase píku CMP_A.

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

9. VÝSLEDKY

9.1. **Metóda výpočtu a vzorce**

9.1.1. *Výpočet reakčného faktora R:*

Pík CMP_A: R = W/H

pričom

R = reakčný faktor píku CMP_A

H = výška píku CMP_A

W = množstvo srvátky v štandardnej vzorke [5]

9.2. **Výpočet percenta sušenej syridlovej srvátky vo vzorke**

W(E) = R × H(E)

pričom

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

R = reakčný faktor píku CMP_A (9.1.1)

H(E) = výška píku CMP_A vzorky (E)

Pevná syridlová srvátka je prítomná, ak je W(E) väčšie ako 1 % a rozdiel medzi retenčným časom a retenčným časom 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 a použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,2 % m/m.

9.3.2. *Reprodukovateľnosť*

Neurčená.

9.3.3. *Linearita*

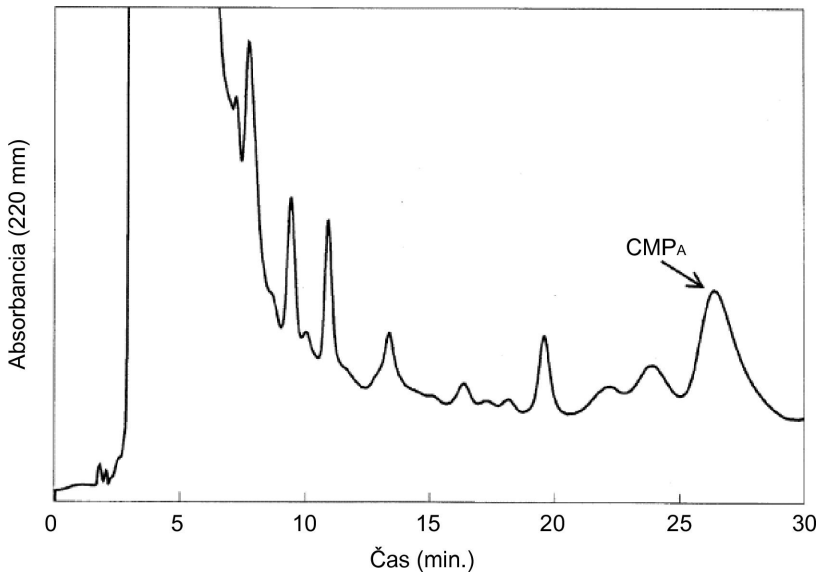
Od 0 do 16 % syridlovej srvátky by sa mal dosiahnuť lineárny vzťah s koeficientom korelácie > 0,99.

9.4. **Interpretácia**

1 % limit je stanovený v súlade s ustanoveniami bodov 9.2. a 9.4.1. prílohy XIX k nariadeniu (EHS) č. 214/2001, ktoré obsahuje neistotu spôsobenú reprodukovateľnosťou.

Tabuľka

Ni – 4,6 štandard



PRÍLOHA XIV

(Článok 10)

ODSTREDENÉ SUŠENÉ MLIEKO: KVANTITATÍVNE STANOVENIE FOSFATIDYLSERÍNU A FOSFATIDYLETANOLAMÍNU

Metóda: HPLC s reverznou fázou

1. ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA

V tejto časti sa opisuje postup kvantitatívneho stanovenia obsahu fosfatidylserínu (PS) a fosfatidyletanolamínu (PE) v odstredenom sušenom mlieku(OSM) a je vhodná na zisťovanie pevného cmaru v OSM.

2. VYMEDZENIE POJMU

Obsah PS +PE: hmotnostná frakcia látky určená pomocou uvedeného postupu. Výsledok sa vyjadruje v miligramoch (R)-[1-[[[(2-aminoetoxy)hydroxyfosforyl]oxy]metyl]etán-1,2-diyl]-dihexadekanoát(PEDP) na 100 g prášku.

3. PRINCÍP METÓDY

Extrakcia aminofosfolipidov metanolom z obnoveného sušeného mlieka. Stanovenie obsahu PS a PE ako derivátov o-ftalaldehyd (OPA) pomocou HPLC s reverznou fázou (RP) a zisťovaním fluorescencie. Kvantifikácia obsahu PS a PE v testovacej vzorke porovnaním s štandardnou vzorkou obsahujúcou 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* minimálne 99 % čistoty.**

Poznámka: Štandardný materiál sa musí skladovať pri teplote –18 °C.

4.2. **Reagenty na prípravu štandardnej a testovacej vzorky**

4.2.1. Metanol triedy HPLC

4.2.2. Chloroform triedy HPLC

4.2.3. 2-(indol-3-yl)etylamín

4.3. **Reagenty pre derivatizáciu o-ftalaldehyd**

4.3.1. Hydroxid sodný, vodný roztok 12 M

4.3.2. Kyselina trihydrogenboritá, vodný roztok 0,4 M upravený na pH 10 hydroxidom sodným (4.3.1)

4.3.3. 2-sulfanyletán-1-ol

4.3.4. o-ftalaldehyd (OPA)

4.4. **Elučné rozpúšťadlá HPLC**

4.4.1. Eluenty musia byť pripravené použitím reagentov HPLC kvality

4.4.2. Voda HPLC kvality

4.4.3. Metanol fluorometricky testovanej čistoty

4.4.4. Tetrahydrofurán

4.4.5. Dihydrogenfosforečnan sodný

4.4.6. Octan sodný

4.4.7. Kyselina octová

5. PRÍSTROJE

5.1. Analytické váhy vážiace na najbližší 1 mg s odčítateľnosťou po 0,1 mg

5.2. Vaničky s objemom 25 a 100 ml

5.3. Pipety s objemom 1 a 10 ml

5.4. Magnetický miešač

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

5.6. Banky so objemom 10, 50 a 100 ml

5.7. Striekačky s objemom 20 a 100 µl

5.8. Ultrazvukový kúpeľ

5.9. Odstredivka schopná prevádzky pri 27 000 × g

5.10. Sklenené fioly s objemom približne 5 ml

5.11. Odmerný valec, objem 25 ml.

5.12. pH-meter s presnosťou na 0,1 pH jednotiek

5.13. Vybavenie pre HPLC

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

5.13.2. Automatický odoberač vzoriek s derivačnou schopnosťou

5.13.3. Ohrievač kolóny schopný udržiavať teplotu kolóny na 30 °C ± 1 °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 píku

5.13.6. Kolóna Lichrosphere – 100 (250 × 4,6 mm) alebo ekvivalentná kolóna naplnená oktadecylsilánom (C 18), veľkosť čiastočiek 5 µm.

6. ODBER VZORIEK

Odber vzoriek sa musí vykonať v súlade s normou ISO 707.

7. POSTUP

7.1. **Príprava interného štandardného roztoku**

7.1.1. Do 100 ml banky (5.6) odvážte 30,0 ± 1 mg 2-(indol-3-yl)etylamín (4.2.3) a po značku doplňte metanolom (4.2.1).

7.1.2. Do 10 ml banky (5.6) pipetujte 1 ml (5.3) tohto roztoku a doplňte po značku metanolom (4.2.1) s cieľom získať 0,15 mM koncentrácie 2-(indol-3-yl)etylamínu.

7.2. **Príprava roztoku testovacej vzorky**

7.2.1. Do 25 ml vaničky (5.2) odvážte 1,000 ± 0,001 g vzorky OSM. Pri 40 °C ± 1 °C pipetou (5.3) pridajte 10 ml destilovanej vody a premiešajte magnetickým miešačom (5.4) počas 30 minút, aby sa rozpustili všetky hrudky.

7.2.2. Do 10 ml banky (5.6) pipetujte 0,2 ml (5.5) obnoveného mlieka, pomocou striekačky (5.7) pridajte 100 µl 0,15 mM roztoku 2-(indol-3-yl)etylamínu (7.1) a doplňte metanolom (4.2.1). Opatrne premiešajte prevracaním a vložte do ultrazvukového kúpeľa (5.8) na 15 minút.

7.2.3. Odstreďte (5.9) pri 27 000 g × g počas 10 minút a supernatant zachyťte do sklenenej fioly (5.10).

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

7.3. **Príprava externej štandardnej vzorky.**

7.3.1. Do 50 ml vaničky (5.6) odvážte 55,4 mg PEDP (4.1) a pomocou odmerného valca (5.11) pridajte približne 25 ml chloroformu (4.2.2). Uzavretú banku zohrejte na 50 °C ± 1 °C a opatrne miešajte, pokým sa PEDP nerozpustí. Banku ochladťe na 20 °C, doplňte metanolom (4.2.1) a premiešajte prevracaním.

7.3.2. Tento roztok pipetujte do 100 ml banky (5.6) a po značku doplňte metanolom (4.2.1). Pipetujte 1 ml (5.3) tohto roztoku do 10 ml banky (5.6), pridajte 100 µl (5.7) 0,15 mM roztoku 2-(indol-3-yl)etylamínu (7.1) a objem doplňte metanolom (4.2.1). Premiešajte obracaním.

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 25,0 ± 0,1 mg OPA (4.3.4), pridajte 0,5 ml (5.5) metanolu (4.2.1) a opatrne miešajte, pokým sa OPA nerozpustí. Po značku doplňte roztokom kyseliny trihydrogenbóritej (4.3.2) a striekačkou (5.7) pridajte 20 µl 2-sulfanyletán-1-olu (4.3.3).

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

7.5. **Analýza HPLC**

7.5.1. *Elučné rozpúšťadlá (4.4)*

Rozpúšťadlo A: roztok 0,3 mM dihydrofosforečnanu sodného a 3 mM roztoku octanu sodného (upraveného na pH 6,5 ± 0,1 kyselinou octovou):metanol:tetrahydrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Rozpúšťadlo B: metanol

7.5.2. *Navrhované hodnoty elučného gradientu*

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: S cieľom dosiahnuť rozlíšenie znázornené na obrázku 1 môže byť nutné mierne prispôsobiť elučný gradient.

Teplota kolóny: 30 °C.

7.5.3. *Objem nástreku: 50 µl derivačného reagentu a 50 µl roztoku vzorky*

7.5.4. *Vyrovnanie kolóny*

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

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

7.5.5. *Stanovenie obsahu PS + PE v testovacej vzorke*

7.5.6. *Vykonajte postup chromatografickej analýzy a dodržiavajte rovnaký čas medzi kolami s cieľom dosiahnuť konštantné retenčné časy. Po každých 5 – 10 roztokoch testovacej vzorky injektujte externý štandardný roztok (7.3) na výpočet reakčného faktora.*

Poznámka: Kolóny je potrebné každé 20. – 25. kolo vyčistiť prepláchnutím 100 % rozpúšťadla B (7.5.1) najmenej počas 30 minút.

7.6. **Stav integrácie**

7.6.1. *Pík PEDP*

PEDP sa eluuje ako jeden pík. Plochu píku stanovte integráciou medzi spodnými časťami krivky.

7.6.2. *Pík 2-(indol-3-yl)etylamínu*

2-(indol-3-yl)etylamínu sa eluuje ako jeden pík (obrázok 1). Plochu píku stanovte integráciou medzi spodnými časťami krivky.

7.6.3. *Skupiny píkov PS a PE*

Za opísaných podmienok (obrázok 1) sa PS eluuje ako dva hlavné čiastočne nerozlíšené píky s jedným menším píkom pred nimi. PE sa eluuje ako tri hlavné čiastočne nerozlíšené píky. Plochu každého zhluku píkov stanovte so základnou čiarou podľa obrázku 1.

8. VÝPOČET A VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Obsah PS a PE v testovacej vzorke sa vypočíta takto: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

pričom

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

A_1 = plocha píku PEDP roztoku štandardnej vzorky (7.3)

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

T_1 = plocha píku 2-(indol-3-yl)etylamínu roztoku štandardnej vzorky (7.3)

T_2 = plocha píku 2-(indol-3-yl)etylamínu roztoku testovacej vzorky (7.2)

9. PRESNOSŤ METÓDY

Poznámka: Hodnoty pre opakovateľnosť boli vypočítané podľa medzinárodnej normy IDF ([1]). Provizórny limit reprodukovateľnosti bol vypočítaný podľa postupu uvedeného 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 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.

([1]) Medzinárodná norma IDF 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure. (Mlieko a mliečne výrobky. Presné charakteristiky analytických metód. Prehľad spoločnej štúdie).

9.2. **Reprodukovateľnosť**

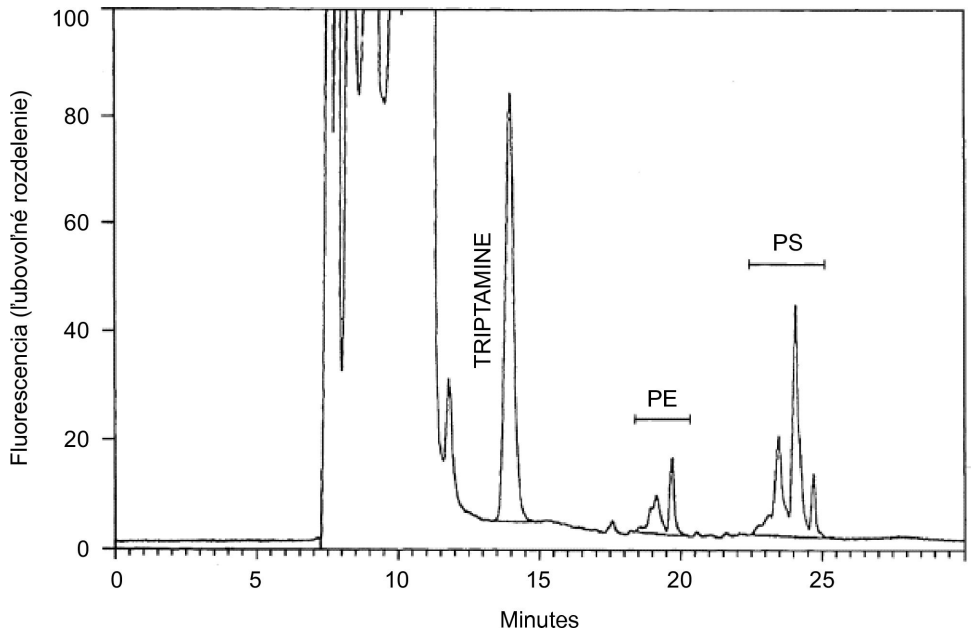
Ak dva výsledky získajú analytici v dvoch rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov v rôznych podmienkach analýzy testovacej vzorky, relatívna odchýlka medzi týmito dvoma výsledkami nesmie byť väčšia ako 11 % aritmetického priemeru výsledkov.

10. ZDROJE

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

Obrázok 1

Vzor HPLC OPA derivátov fosfatidylserínu (PS) a fosfatidyletanolamínu (PE) v metanolovom extrakte obnoveného odstredeného sušeného mlieka. Znázornený je stav integrácie pre píky PS, PE a 2-(indol-3-yl)etylamínu (interná štandardná vzorka).



PRÍLOHA XV

(Článok 11)

ZISŤOVANIE ANTIMIKROBIÁLNYCH REZÍDUÍ V ODSTREDENOM SUŠENOM MLIEKU

Použije sa test sledovania mikrobiálneho inhibítora s použitím *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (rovnaký ako kmeň C953) ako testovacieho mikroorganizmu, dostatočne citlivý na zistenie 4 μg benzylpenicilínu na kg mlieka a 100 μg sulfadimidínu na kg mlieka. V predaji sú dostupné testovacie sady a môžu sa použiť, ak majú požadovanú citlivosť na benzylpenicilín a sulfadimidín.

Na testovanie sa používa obnovené odstredené sušené mlieko (1 g prášku + 9 ml destilovanej vody). Test sa vykonáva podľa opisu v ISO/TS 26844:2006 Milk and milk products – Determination of antimicrobial residues – Tube diffusion test IDF – Bulletin No 258/1991, oddiel 1, kapitola 2 (Mlieko a mliečne výrobky – Určovanie antimikrobiálnych rezíduí – Skúmavkový difúzny test IDF – Bulletin č. 258/1991) alebo podľa pokynov výrobcu testovacej súpravy ([1]).

Pozitívne výsledky sa interpretujú takto:

1. Prítomnosť β-laktámov možno potvrdiť opakovaním testu s pridaním penicilinázy do testovacieho systému ([2]):

   Negatívny výsledok: Inhibičná látka je β-laktámové antibiotikum.

   Pozitívny výsledok zostáva: Inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť, pokračujte bodom 2.

2. Prítomnosť sulfonamidov možno potvrdiť opakovaním testu s pridaním kyseliny 4-aminobenzoovej do testovacieho systému:

   Negatívny výsledok: Inhibičná látka je sulfonamid.

   Pozitívny výsledok zostáva: inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť, pokračujte bodom 3.

3. Prítomnosť kombinácie β-laktámu a sulfonamidu možno potvrdiť opakovaním testu s pridaním penicilinázy + kyseliny 4-aminobenzoovejdo testovacieho systému:

   Negatívny výsledok: Inhibičná látka je β-laktámové antibiotikum a sulfonamid.

   Pozitívny výsledok: Inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť.

([1]) Dôležitá poznámka: Analýzou odstredného sušeného mlieka možno dostať nesprávne pozitívne výsledky. Preto je dôležité preveriť, či použitý testovací systém nevykazuje nesprávne pozitívne výsledky.

([2]) Niektoré β-laktámy sú menej citlivé na β -laktamázu. V takýchto prípadoch sa odporúča dodatočné predbežné spracovanie vzorky (1 ml skúšobnej vzorky s 0,3 ml koncentrátu penázy pri 37 °C na 2 hod.).

PRÍLOHA XVI

(Článok 12)

KVANTITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU ODSTREDENÉHO SUŠENÉHO MLIEKA V KŔMNYCH ZMESIACH ENZYMATICKOU KOAGULÁCIOU PARAKAZEÍNU

1. ÚČEL

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

2. ROZSAH

Táto metóda sa používa pri kŕmnych zmesiach obsahujúcich minimálne 10 % odstredeného sušeného mlieka; 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 nátriumcitrátu.

3.2. Upravenie koncentrácie iónov vápnika na požadovanú hodnotu na zrazenie parakazeínu pridaním syridla.

3.3. Obsah dusíka v parakazeínovej zrazenine sa stanoví Kjeldahlovou metódou podľa postupu opísaného v norme ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001; množstvo odstredeného sušeného mlieka sa vypočíta na základe minimálneho obsahu kazeínu 27,5 % (pozri 8.1).

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 a roztoky obsahovať dusíkaté látky.

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

4.2. Chlorid vápenatý (asi 5 M roztok)

Rozrieďte 75 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ v 100 ml destilovanej vody pretrepaním (pozor na exotermickú reakciu). Nechajte cez noc stáť a potom roztok prefiltrujte. Roztok uskladnite v chladničke.

4.3. Hydroxid sodný 0,1 N

4.4. Kyselina chlorovodíková 0,1 N

4.5. Kvapalné syridlo z teľacích žalúdkov (o sile asi 100 IMCU/ml podľa normy ISO 11815/IDF 157). Skladujte v chladničke pri teplote 4 až 6 °C

4.6. Reagenty na kvantitatívne stanovenie dusíka podľa Kjeldahlovej metódy opísanej v ISO 8968-2:2001|IDF 20-2:2001.

5. PRÍSTROJE

Bežné laboratórne prístroje vrátane:

5.1. Mažiar alebo homogenizér

5.2. Analytické váhy schopné vážiť na najbližší 1 mg, s odčítateľnosťou po 0,1 mg

5.3. Stolná odstredivka (500 g alebo 2 000 až 3 000 ot/min) s 50 ml skúmavkami a 2 000 g

5.4. Magnetický miešač s (10 až 15 mm) s miešacími tyčinkami

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. Rýchle filtre bez obsahu popola s priemerom 150 mm (Whatman č. 41 alebo ekvivalent)

5.9. Pipety s rôznym objemom

5.10. Termostaticky nastaviteľný vodný kúpeľ teploty 37 °C ± 1 °C

5.11. pH meter s presnosťou na 0,1 jednotiek

5.12. Teplomery s presnosťou na 1 °C

6. POSTUP

6.1. **Príprava vzorky**

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

6.2. **Rozpustenie sušeného mlieka a separácia nerozpustného rezídua**

6.2.1. Priamo do 50 ml odstreďovacej skúmavky odvážte 1,000 ± 0,002 g dobre homogenizovanej kŕmnej zmesi (6.1). Pridajte 30 ml roztoku trinátrium-citrátu (4.1) predhriateho na 45 °C ± 2 °C. Miešajte najmenej päť minút magnetickým miešačom alebo silno ručne pretrepávajte.

6.2.2. Pri 500 g odstreďte (2 000 až 3 000 ot/min) počas 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, kým sa tuk nespevní a túto vrstvu odstráňte špachtľou.

6.3. **Koagulácia kazeínu enzýmami syridla**

6.3.1. Za stáleho miešania pridávajte po kvapkách 2 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 ± 1 °C na 15 až 20 minút na dosiahnutie soľnej rovnováhy. Táto sa prejavuje vytvorením ľahkého zákalu.

6.3.2. Kvapalinu prelejte do jednej z odstreďovacích skúmaviek a odstreďte pri 2 000 g počas 10 minút, aby sa odstránila zrazenina. Supernatant preložte bez umytia usadeniny do inej odstreďovacej skúmavky.

6.3.3. Teplotu supernatantu vráťte späť na 37 °C ± 1 °C. Počas miešania extraktu pridávajte po kvapkách 0,5 ml kvapalného syridla (4.5). Koagulácia nastane po dvoch minútach.

6.3.4. Vzorku vložte späť do vodného kúpeľa a nechajte 15 minút pri teplote 37 °C ± 1 °C. Vzorku potom z kúpeľa vyberte a koagulát prelomte miešaním. Odstreďte pri 2 000 g počas 10 minút. Supernatant prefiltrujte cez vhodný filtračný papier (5.8) a filtračný papier si odložte. Zrazeninu umyte v odstreďovacej skúmavke s 50 ml vody pri teplote približne 35 °C premiešaním zrazeniny.

Opäť odstreďte pri 2 000 g na 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 z bodu 6.3.4 pomocou destilovanej vody. Suchý filtračný papier preneste do Kjeldahlovej banky. Obsah dusíka stanovte Kjeldahlovou metódou podľa opisu v norme ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001.

7. SLEPÝ TEST

7.1. Slepý test sa robí pravidelne mineralizáciou podľa Kjeldahlovej metódy opísanej v norme ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001. Filtračný papier bez obsahu popola (5.8) navlhčený zmesou 90 ml (4.1) roztoku kyseliny citrónovej, 2 ml roztoku chloridu vápenatého (4.2), 0,5 ml kvapalného syridla (4.5) sa 3 × premyje 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. VÝSLEDKY

8.1. Percento obsahu odstredeného sušeného mlieka v kŕmnej zmesi sa vypočíta použitím tohto vzorca:

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

pričom

N je percento obsahu parakazeínového dusíka;

27,5 je faktor na konverziu stanoveného obsahu kazeínu na percento odstredeného sušeného mlieka;

2,81 a 0,908 sú korekčné faktory získané z regresnej analýzy.

9. PRESNOSŤ METÓDY

9.1. **Opakovateľnosť**

V najmenej 95 % prípadov nesmú byť rozdiely vo výsledkoch dvojitej analýzy rovnakej vzorky rovnakým analytikom v rovnakom laboratóriu väčšie ako 2,3 g odstredeného sušeného mlieka na 100 g kŕmnej zmesi.

9.2. **Reprodukovateľnosť**

V najmenej 95 % prípadov nesmú byť rozdiely vo výsledkoch analýzy rovnakej vzorky analyzovanej v dvoch laboratóriách väčšie ako 6,5 g odstredeného sušeného mlieka na 100 g kŕmnej zmesi.

10. POZNÁMKY

10.1. Pridanie veľkého percenta určitých nemliečnych proteínov, a najmä sójových proteínov po zohriatí s odstredeným sušeným mliekom môže viesť k príliš vysokým výsledkom kvôli spoločnému zrazeniu s mliečneho parakazeínu.

10.2. 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.

10.3. K nízkym výsledkom môžu viesť aj prídavky lecitínu rovné alebo väčšie ako 0,5 %.

10.4. Zahrnutie odstredeného sušeného mlieka zahriateho na vysokú teplotu môže viesť k privysokým ukazovateľom v dôsledku sprievodného zrážania určitých cmarových proteínov s parakazeínom mlieka.

PRÍLOHA XVII

(Článok 13)

ZISŤOVANIE ŠKROBU V ODSTREDENOM SUŠENOM MLIEKU, DENATUROVANOM SUŠENOM MLIEKU A KŔMNYCH ZMESIACH

1. ROZSAH

Táto metóda sa používa na zisťovanie prítomnosti škrobu, ktorý je značkovacou látkou v denaturovanom sušenom mlieku.

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 čiastočkami a tvorbou farby.

3. REAGENTY

3.1. Jódny roztok

— jód: 1,0 g,

— jodid draselný: 2,0 g,

— destilovaná voda: 100 ml,

— rozrieďte 1,0 g jódu a 2,0 g jodidu draselného vo vode v 100 ml banke s jednou značkou. Doplňte vodou po 100 ml značku a premiešajte.

4. PRÍSTROJE

4.1. Analytická váha

4.2. Vriaci vodný kúpeľ

4.3. Testovacie skúmavky, 25 mm × 200 mm

5. POSTUP

Do testovacej skúmavky (4.3) odvážte na najbližší 0,1 g 1,0 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 jódneho 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.

PRÍLOHA XVIII

(Článok 14)

STANOVENIE OBSAHU VLHKOSTI V SUŠENEJ SMOTANE

1. ROZSAH

V tejto prílohee sa definuje metóda určovania obsahu vlhkosti v sušenej smotane.

2. POJMY A DEFINÍCIE

Na účely tejto prílohy platia tieto vymedzenia pojmov.

Obsah vlhkosti: strata hmotnosti určovaná postupom uvedeným v tejto medzinárodnej norme.

Vyjadruje sa ako percento hmotnosti.

3. PRINCÍP

Skúšobnú dávku vysušte pri 102 ± 2 °C na stálu hmotnosť a odvážením určite stratu hmotnosti.

4. PRÍSTROJE

Bežné laboratórne prístroje, konkrétne:

4.1. Analytické váhy schopné vážiť na najbližší 1 mg s odčítateľnosťou po 0,1 mg.

4.2. Sušiaca pec, dobre vetraná, schopná udržiavať teplotu na 102 ± 2 °C v celom pracovnom priestore.

4.3. Sušička vybavená čerstvo vysušeným silikagélom s hydrometrickým indikátorom alebo iným efektívnym desikantom.

4.4. Nádoby s plochým dnom, hlboké asi 25 mm, s priemerom asi 50 mm, vyrobené z vhodného materiálu (napríklad zo skla, nerezu, niklu alebo hliníka), dodávané s dobre sediacimi otváracími vrchnákmi.

4.5. Fľaše s tesniacimi uzávermi na miešanie laboratórnych vzoriek.

5. ODBER VZORIEK

Dôležité je, aby laboratórium dostalo skúšobnú vzorku, ktorá je skutočne reprezentatívna a nebola poškodená alebo zmenená počas prepravy alebo skladovania.

Odber vzoriek nie je súčasťou metódy uvedenej v tejto medzinárodnej norme. Odporúčaná metóda odberu vzoriek je uvedená v ISO 707|IDF 50.

Vzorku skladujte tak, aby ste zabránili poškodeniu a zmene v zložení.

6. PRÍPRAVA SKÚŠOBNEJ VZORKY

Starostlivo rozmiešajte skúšobnú vzorku opakovaným pretrepávaním a obracaním nádoby (v prípade potreby prelejte pred rozmiešaním všetky skúšobné vzorky do vzduchotesnej nádoby dostatočnej kapacity).

Ak týmto postupom nedosiahnete úplnú homogénnosť, odoberte skúšobné dávky (na dve jednotlivé určenia) z pripravenej skúšobnej vzorky v dvoch miestach čo najďalej od seba.

7. POSTUP

7.1. **Príprava nádoby**

7.1.1. Otvorenú nádobu a vrchnák (4.4) nahrievajte v peci (4.2) nastavenej na 102 ± 2 °C aspoň jednu hodinu.

7.1.2. Vrchnák založte na nádobu, prikrytú nádobu preložte do sušiacej pece (4.3), nechajte vychladnúť na teplotu miestnosti, odvážte na najbližší 1 mg a hmotnosť zaznamenajte s presnosťou na 0,1 mg.

7.2. **Skúšobná dávka**

Do nádoby vložte asi 1 až 3 g pripravenej skúšobnej vzorky (6), zakryte ju vrchnákom, odvážte na najbližší 1 mg a zaznamenajte jej hmotnosť s presnosťou na 0,1 mg.

7.3. **Stanovenie obsahu**

7.3.1. Nádobu odokryte a spolu s vrchnákom ju vložte na 2 hodiny do pece (4.2) nastavenej na 102 ± 2 °C.

7.3.2. Nádobu opäť prikryte vrchnákom, zatvorenú nádobu preložte do sušičky, nechajte vychladnúť na teplotu miestnosti, odvážte na najbližší 1 mg a hmotnosť zaznamenajte s presnosťou na 0,1 mg.

7.3.3. Nádobu otvorte a opäť ju 1 hodinu zahrievajte spolu s vrchnákom v peci. Potom opakujte postup 7.3.2.

7.3.4. Opakujte nahrievanie a váženie dovtedy, kým sa hmotnosť nezníži o 1 mg alebo viac, alebo sa zvýši medzi dvoma následnými váženiami.

Na výpočet použite najnižšiu zaznamenanú hmotnosť.

8. VÝPOČET A VYJADRENIE VÝSLEDKOV

8.1. **Výpočet**

Obsah vlhkosti vyjadrený v g /100 g sa rovná:

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

pričom:

m_0 je hmotnosť nádoby a vrchnáku v gramoch (7.1.2);

m_1 je hmotnosť nádoby, vrchnáku a skúšobnej dávky pred vysušením v gramoch (7.2);

m_2 je hmotnosť nádoby, vrchnáku a skúšobnej dávky po vysušení v gramoch (7.3.4).

Výsledky zaznamenajte na dve desatinné miesta.

9. PRESNOSŤ

Poznámka: Hodnoty opakovateľnosti a reprodukovateľnosti sú odvodené od výsledkov medzilaboratórneho testu (pozri Steiger, G. Bulletin IDF č. 285/1993, s. 21 – 28) vykonaného v súlade s normou IDF 135B:1991. Mlieko a mliečne výrobky – Charakteristiky presnosti analytických metód – Náčrt postupu kolaboratívnej štúdie.

9.1. **Opakovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma nezávislými výsledkami jednotlivých testov získanými s použitím rovnakej metódy na rovnakom skúšobnom materiáli v rovnakom laboratóriu rovnakým analytikom používajúcim rovnaké zariadenie v rámci krátkeho časového intervalu nie sú vo viac ako 5 % prípadoch väčšie ako 0,20 g vlhkosti na 100 g výrobku.

9.2. **Reprodukovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma nezávislými výsledkami jednotlivých testov získanými s použitím rovnakej metódy na rovnakom skúšobnom materiáli v rôznych laboratóriách rôznymi analytikmi používajúcimi rôzne zariadenie nie sú vo viac ako 5 % prípadoch väčšie ako 0,40 g vlhkosti na 100 g výrobku.

10. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste obsahuje

— všetky informácie potrebné na ukončenie identifikácie vzorky,

— použitú metódu odberu vzoriek, ak je známa,

— použitú skúšobnú metódu s odkazom na túto medzinárodnú normu,

— všetky prevádzkové údaje neuvedené v tejto medzinárodnej norme alebo považované za voliteľné, spolu s podrobnými údajmi o akýchkoľvek incidentoch, ktoré mohli ovplyvniť výsledok (výsledky) testu,

získaný výsledok (výsledky), a ak bola skontrolovaná opakovateľnosť, konečný získaný výsledok.

PRÍLOHA XIX

(Článok 15)

STANOVENIE VLHKOSTI V SUŠENOM KYSLOM CMARE

1. ROZSAH

Stanovenie obsahu vody v sušenom kyslom cmare určeného pôvodne pre kŕmne zmesi pre zvieratá.

2. PRINCÍP

Vzorka sa vysuší vo vákuu. Strata hmotnosti sa stanoví vážením.

3. PRÍSTROJE

3.1. Analytické váhy schopné vážiť na najbližší 1 mg s odčítateľnosťou po 0,1 mg

3.2. Nádoby z nehrdzavejúceho kovu alebo skla s vrchnákmi zaručujúcimi vzduchotesné uzavretie; pracovná plocha umožňuje rozmiestnenie vzorky na približne 0,3 g/cm^2.

3.3. Nastaviteľná elektricky vyhrievaná vákuová pec vybavená olejovým čerpadlom a mechanizmom na vháňanie horúceho vzduchu vysušeného cez vežu obsahujúcu napríklad oxid vápenatý alebo síran vápenatý (obsahujúci indikátor vlhkosti)

3.4. Sušička s efektívnym sušiacim činidlom

3.5. Sušiaca pec, ventilovaná, termostaticky nastaviteľná na 102 ± 2 °C

4. POSTUP

V sušiacej peci (3.5) nahrievajte nádobu (3.2) s vrchnákom minimálne jednu hodinu. Vrchnák položte na nádobu, ihneď preložte do sušičky (3.4) a nechajte vychladnúť na izbovú teplotu a odvážte na najbližší 1 mg, hmotnosť zaznamenajte s presnosťou na 0,1 mg.

Otvorte nádobu a vložte do nej asi 5g vzorky a odvážte na najbližší 1 mg, hmotnosť zaznamenajte s presnosťou na 0,1 mg. Nádobu aj s vrchnákom vložte do vákuovej pece (3.3) predhriatej na 83 °C. Aby teplota v peci zbytočne neklesla, nádobu do nej vložte čo najrýchlejšie.

Tlak zvýšte na 100 torrov (13,3 kPa) a pri tomto tlaku nechajte vysušiť na konštantnú hmotnosť (asi 4 hodiny) v prúde horúceho suchého vzduchu.

Čas sušenia počítajte od momentu, keď teplota v peci opätovne dosiahla 83 °C. Opatrne vráťte tlak v peci na atmosférický. Otvorte pec, okamžite nasaďte vrchnák na nádobu, vyberte nádobu z pece, nechajte ju 30 až 45 minút ochladnúť v sušičke (3.4), odvážte na najbližší 1 mg a hmotnosť zaznamenajte s presnosťou na 0,1 mg. Sušte ešte ďalších 30 minút vo vákuovej peci (3.3) pri 83 °C a znova odvážte. Postup nahrievania a váženia opakujte dovtedy, kým sa hmotnosť nádoby s vrchnákom medzi dvoma následnými váženiami nezníži o 1 mg alebo viac, alebo nezvýši. Na výpočet použite najnižšiu zaznamenanú hmotnosť.

5. VÝPOČET

% vlhkosti = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %

pričom

m_0 je hmotnosť nádoby a vrchnáku;

m_1 je hmotnosť nádoby, vrchnáku a skúšobnej dávky pred sušením;

m_2 je hmotnosť nádoby, vrchnáku a skúšobnej dávky po vysušení;

Výsledok zaznamenajte s presnosťou na 0,1 g/100 g.

6. PRESNOSŤ

6.1. **Limit opakovateľnosti**

Absolútny rozdiel medzi dvoma nezávislými výsledkami jednotlivých testov získanými s použitím rovnakej metódy na rovnakom skúšobnom materiáli v rovnakom laboratóriu rovnakým analytikom s použitím rovnakého zariadenia v rámci krátkeho časového intervalu nie je vo viac ako 5 % prípadov väčší než 0,4 g vody/100 g sušeného cmaru.

6.2. **Limit reprodukovateľnosti**

Absolútny rozdiel medzi dvoma nezávislými výsledkami jednotlivých testov získanými s použitím rovnakej metódy na rovnakom skúšobnom materiáli v rôznych laboratóriách rôznymi analytikmi s použitím rôzneho zariadenia nie je vo viac ako 5 % prípadov väčší než 0,6 g vody/100 g sušeného kyslého cmaru.

6.3. **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).

PRÍLOHA XX

(Článok 16)

REFERENČNÁ METÓDA STANOVENIA ČISTOTY MLIEČNEHO TUKU PLYNOVOU CHROMATOGRAFICKOU ANALÝZOU TRIGLYCERIDOV – REVÍZIA 2

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

V tejto časti sa definuje referenčná metóda určovania čistoty mliečneho tuku pomocou plynovej chromatografickej analýzy triglyceridov. Zisťovať možno rastlinné tuky aj živočíšne tuky, napríklad hovädzí loj a bravčovú masť.

Čistota mliečneho tuku sa určuje pomocou rovníc definovaných triglyceridov. V zásade sa táto metóda všeobecne používa pri kravskom mlieku alebo z neho vyrobených výrobkov bez ohľadu na kŕmne, chovné alebo laktačné podmienky. Len výnimočne môže kŕmenie čistými rastlinnými olejmi ako napríklad repkovým olejom mať za následok nesprávne pozitívny výsledok. K nesprávne pozitívnemu výsledku sa môže dospieť aj v prípade mliečnych výrobkov získaných od jednotlivých kráv.

Metóda sa aplikuje predovšetkým na tuk extrahovaný z mliečnych výrobkov údajne obsahujúcich čistý mliečny tuk s nezmeneným zložením, ako je maslo, smotana, mlieko a sušené mlieko. Technologické ošetrenie mliečneho tuku ako napríklad odstránenie cholesterolu alebo frakčná destilácia môže spôsobiť nesprávne pozitívny výsledok. To platí aj pre mliečny tuk získaný z odstredeného mlieka alebo cmaru. Metóda sa nedá vždy použiť na tuk extrahovaný zo syra, lebo proces zrenia môže ovplyvniť zloženie tuku natoľko, že výsledok je nesprávne pozitívny.

Poznámka 1: Kyselina maslová (n-butánová) (C_4) sa vyskytuje výlučne v mliečnom tuku a umožňuje kvantitatívne odhadnúť malé až stredné množstvá mliečneho tuku v rastlinných a živočíšnych tukoch. V dôsledku veľkej variácie v C_4 sa hmotnostná frakcia percentuálne pohybuje približne od 3,1 % do 3,8 %, je však ťažké poskytnúť kvalitatívne a kvantitatívne informácie o cudzom tuku v porovnaní hmotnostnými frakciami čistého mliečneho tuku až do 20 %[1].

Poznámka 2: Kvantitatívne výsledky prakticky nemožno odvodiť od obsahu sterolu v rastlinných tukoch, lebo závisia od podmienok výroby a spracovania. Nejednoznačné je dokonca aj kvalitatívne určenie cudzích tukov pomocou sterolov.

2. VYMEDZENIE POJMU

Čistota mliečneho tuku: neprítomnosť rastlinných a živočíšnych tukov určená postupom uvedeným v tejto norme.

Poznámka: Čistota sa určuje pomocou *S*-hodnôt, ktoré sa vypočítajú zo zloženia triglyceridov. Hmotnostné frakcie triglyceridov sú vyjadrené v percentách.

3. PRINCÍP METÓDY

Tuk extrahovaný z mlieka alebo mliečnych výrobkov sa analyzuje plynovou chromatografiou s použitím náplňovej alebo krátkej kapilárnej kolóny na určovanie triglyceridov oddelených podľa celkového počtu uhlíka. *S*-hodnoty sa vypočítavajú vložením percentuálne vyjadrenej hmotnostnej frakcie tukových molekúl rôznych veľkostí (C_{24} až C_{54}, len párne C čísla) do vhodných rovníc triglyceridov. Ak sú *S*-hodnoty vyššie ako limity stanovené s čistým mliečnym tukom, zistí sa prítomnosť cudzieho tuku.

Poznámka 1: Vhodnosť a ekvivalentnosť náplňovej aj kapilárnej kolóny už bola preukázaná [2 – 4].

Poznámka 2: *S*-hodnota je súčet hmotnostných frakcií triglyceridov, z ktorých každá bola vynásobený definovanými faktormi.

4. REAGENTY

Všetky reagenty musia mať schválenú analytickú kvalitu.

4.1. Nosný plyn: dusík, alebo alternatívne hélium alebo vodík, všetky s čistotou najmenej 99,995 %

4.2. Tukové normy na normalizáciu normy mliečneho tuku podľa článku 7.3.3

4.2.1. Triglyceridové normy, saturované, vhodné výrobky sú dostupné v predaji

4.2.2. Cholesterolová norma

4.3. Metanol (CH_3OH), bezvodný

4.4. n-hexán (CH_3 $(CH_2)4CH_3$)

4.5. n-heptán (CH_3 $(CH_2)5CH_3$)

4.6. Iné plyny: vodík s čistotou najmenej 99,995 %, bez organických nečistôt (C_nH_m < 1 µl/l); syntetický vzduch bez organických nečistôt (C_nH_m < 1 µl/l)

4.7. Bezvodný síran sodný (Na_2SO_4)

5. PRÍSTROJE

Bežné laboratórne prístroje, najmä tieto:

5.1. **Vysokotepelný plynový chromatograf**

Vysokotepelný plynový chromatograf musí byť vhodný pre teploty najmenej 400 °C a vybavený plameňovo-ionizačným detektorom (FID). Septum použité v injektore musí byť odolné voči vysokým teplotám a vykazovať veľmi nízky stupeň unikania. Na kapilárnu plynovú chromatografiu použite injektor s nástrekom na valec. Na pripojenie valca aj injektora a/alebo na detekčné vložky (v príslušných prípadoch) vždy používajte grafitové tesnenia.

5.2. **Chromatografická kolóna**

5.2.1. *Náplňová kolóna*

Použite sklenú kolónu s vnútorným priemerom 2 mm a dĺžkou 500 mm, so stacionárnou fázou 3 % OV-1 na 125 µm až 150 µm (100 až 120 ôk) Gas ChromQ ([1]). Príprava, silanizácia, balenie a úprava náplňovej kolóny sa uvádza v prílohe A.

Alternatívne možno použiť kapilárnu kolónu (5.2.2).

5.2.2. *Kapilárna kolóna*

Použite krátku kapilárnu kolónu, napr. s dĺžkou 5 m s nepolárnou stacionárnou fázou odolnú voči teplote najmenej 400 °C ([2]). Kolónu upravte vykonaním 20 analýz roztoku mliečneho tuku (7.2) v rámci 2 až 3 dní s použitím nastavení uvedených v 7.3.4.2. Potom budú reakčné faktory (7.3.3) blízke 1 a nižšie ako 1,20.

Poznámka: Možno použiť kolóny s rôznymi rozmermi a rôznu nepolárnu stacionárnu fázu odolnú voči vysokým teplotám, pokiaľ ich výkon vyhovuje tejto norme. Pozri aj 7.3.4.2.

5.3. Kolóna extrelut s kapacitou 1 ml až 3 ml naplnená silikagélom potrebným na extrakciu mliečneho tuku len podľa 7.1.3

5.4. Grafitové tesnenia odolné voči teplotám najmenej 400 °C; používajú sa na pripojenie kolóny na plynovú chromatografiu, ako aj vložiek do injektora a/alebo detektora

5.5. Vodný kúpeľ schopný udržiavať teplotu 50 °C ± 2 °C

5.6. Pec schopná prevádzky pri 50 °C ± 2 °C a 100 °C ± 2 °C

5.7. Mikrolitrové pipety

([1]) Príklad vhodného výrobku dostupného v predaji. Táto informácia je uvedená pre informáciu používateľov tejto medzinárodnej normy a nepredstavuje schválenie tohto výrobku.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) je príkladom vhodného výrobku v predaji. Táto informácia sa uvádza na potreby používateľov tejto medzinárodnej normy a nie je schválením tohto výrobku.

5.8. Kalibrovaná pipeta s kapacitou 5 ml

5.9. Banka s okrúhlym dnom s kapacitou 50 ml

5.10. Erlenmeyerova banka s nominálnou kapacitou 250 ml

5.11. Lievik

5.12. Filtračný papier s malými pórmi

5.13. Rotačný vyparovač

5.14. Ampulky s nominálnym objemom 1 ml s polytetrafluoroetylénom vyloženým hliníkovým patentným uzáverom alebo otočným viečkom

5.15. Injekčná striekačka s piestom, ktorý nedosahuje po hrot ihly (náplňová kolóny na plynovú chromatografiu)

Poznámka: S týmito striekačkami sa dosahuje lepšia opakovateľnosť výsledkov.

5.16. Analytické váhy vážiace na najbližší 1 mg s odčítateľnosť po 0,1 mg

6. ODBER VZORIEK

Do laboratória treba poslať reprezentatívnu vzorku. Nemala by sa poškodiť počas prepravy alebo skladovania.

Odber vzoriek nie je súčasťou metódy uvedenej v tejto medzinárodnej norme. Odporúčaná metóda odberu vzoriek je uvedená v ISO 707IDF 505.

7. POSTUP

7.1. **Príprava vzoriek**

Na prípravu skúšobnej vzorky použite jednu z týchto troch metód extrakcie mliečneho tuku.

7.1.1. *Izolácia z masla alebo maslového oleja*

Roztopte 50 g až 100 g skúšobnej vzorky pri 50 °C vo vodnom kúpeli (5.5) alebo peci (5.6). Do poskladaného filtračného papiera (5.12) vložte 0,5 až 1,0 g síranu sodného (4.7). Predhrejte 250 ml Erlenmeyerovu banku a (5.10) a lievik (5.11) s vloženým filtračným papierom vložte do pece (5.6) nastavenej na 50 °C. Vrstvu tuku roztopenej vzorky prefiltrujte, pričom predhriatu banku, lievik a vložený filtrer nechajte v peci. Dávajte pozor, aby sa neprenieslo sérum.

Menšiu skúšobnú vzorku možno použiť len v prípadoch, keď je dostupné obmedzené množstvo skúšobnej vzorky, a postup treba primerane upraviť. Spracovanie menšej skúšobnej vzorky však znamená väčšie riziko získania nereprezentatívnej vzorky.

Poznámka 1: Maslo možno získať zo smotany mútením a dôkladným premytím výsledných maslového zrna.

Poznámka 2: Maslový tuk získaný postupom uvedeným v 7.1.1 skoro nikdy neobsahuje fosfolipidy.

7.1.2. *Extrakcia podľa gravimetrickej metódy Röse–Gottlieba*

Zo skúšobnej vzorky extrahujte tukovú frakciu pomocou gravimetrickej metódy opísanej v jednej z noriem ISO 1211 IDF 001D, ISO 2450IDF 016C alebo ISO 7328IDF 116A.

Poznámka: Ak sú v získanom mliečnom tuku prítomné fosfolipidy, pík cholesterolu je asi o 0,1 % vyšší. Zloženie triglyceridov normalizované na 100 % vrátane cholesterolu je preto len nepatrne ovplyvnené.

7.1.3. *Extrakcia z mlieka použitím kolón zo silikagélu*

Mikrolitrovou pipetou (5.7) pridajte 0,7 ml skúšobnej vzorky s teplotou 20 °C do 1 ml až 3 ml kolóny Extrelut (5.3). Nechajte ju rovnomerne sa rozložiť na silikagéle asi 5 min.

Na denaturáciu proteínovo–lipidových komplexov pridajte do kolóny Extrelut kalibrovanou pipetou (5.8) 1,5 ml metanolu (4.3). Následne extrahujte zo skúšobnej vzorky tukovú frakciu s 20 ml *n*-hexánu (4.4). *n*-hexán pridávajte pomaly v malých množstvách. Vypúšťané rozpúšťadlo zachytávajte do 50 ml banky s okrúhlym dnom (5.9), ktorú ste najprv vysušili na stálu známu hmotnosť odváženú na najbližší 1 mg a hmotnosť zaznamenali s presnosťou na 0,1 mg.

Po extrakcii nechajte kolónu vytiecť, až je úplne prázdna. Rozpúšťadlá vydestilujte z eluátu na rotačnom odparovači (5.13) s vodným kúpeľom nastaveným na teplotu medzi 40 °C a 50 °C. Po vydestilovaní rozpúšťadiel banku s obsahom vysušte, znova odvážte na najbližší 1 mg a hmotnosť zaznamenajte s presnosťou na 0,1 mg. Určite hmotnosť získaného tuku odpočítaním hmotnosti suchej prázdnej banky od získanej hmotnosti.

Poznámka: Na analýzu triglyceridov nie je vhodná extrakcia tuku Gerberovou, Weibull–Berntropovou alebo Schmid–Bondzynski–Ratzlaffovou metódou, ani izolácia mliečneho tuku pomocou detergentov (BDI metóda), lebo do tukovej fázy môžu preniknúť podstatné množstvá parciálnych glyceridov alebo fosfolipidov. V dôsledku toho je použitie tejto medzinárodnej normy pri určitých výrobkoch, najmä u syrov, obmedzené.

7.2. **Príprava roztoku vzorky**

Na plynovú chromatografiu s náplňovou kolónou pripravte 5 % (objemová frakcia) roztok tuku (získaného podľa 7.1) v *n*-hexáne (4.4) alebo *n*-heptáne (4.5). V závislosti od rozmerov kolóny použite pri kapilárnej kolóne (0,53 mm, široký vnútorný priemer) na nástrek do kolóny 1 % alebo nižšiu koncentráciu.

Podľa použitej kolóny a hmotnosti získaného tuku podľa 7.1.3 určite množstvo rozpúšťadla (4.4 alebo 4.5), ktoré treba pridať do skúšobného materiálu v banke na princípe odváženia na najbližší 1 mg a zaznamenaním hmotnosti s presnosťou na 0,1 mg. Zvyšok úplne rozrieďte.

Do ampule (5.14) nalejte asi 1 ml roztoku vzorky.

7.3. **Chromatografické stanovenie triglyceridov**

7.3.1. *Kolísanie základnej čiary*

Aby sa minimalizovalo zvyšovanie základnej čiary, kolónu treba pripraviť podľa 5.2.2 (kapilárna kolóna) alebo prílohy A.4 (náplňová kolóna).

Poznámka: Z dôvodu vysokej teploty kolóny je veľmi pravdepodobné, že analýza triglyceridov zvýši základnú čiaru pri vysokých počtoch uhlíka.

7.3.2. *Technika nástreku*

7.3.2.1. Náplňová kolóna

Aby nedochádzalo k rozdielnym účinkom, na zlepšenie kvantifikácie komponentov triglyceridov s vysokým bodom varu použite techniku horúcej ihly. Ihlu naplňte vzduchom a do striekačky nasajte roztok tuku. Ihlu vložte do injektora. Pred nástrekom ihlu nahrievajte asi 3 sekundy. Potom rýchlo vstreknite obsah striekačky.

7.3.2.2. Kapilárna kolóna

Ak použijete studený nástrek na kolónu (7.3.4.2), vložte ihlu do striekačky a okamžite injektujte. Čas zotrvania ihly v injekčnom porte by mal byť taký, aby nedošlo k veľkému „chvosty píku“ (tailings) píku rozpúšťadla.

Poznámka: Optimálny čas je zvyčajne približne 3 s.

7.3.3. *Kalibrácia*

7.3.3.1. Všeobecne

Na kalibráciu skúšobných vzoriek vykonajte dve až tri analýzy normalizovaného mliečneho tuku na začiatku každého dňa. Na určenie reakčných faktorov RF_{si} (hmotnostná frakcia/plošná frakcia) triglyceridov a cholesterolu použite poslednú analýzu normalizovaného mliečneho tuku a tieto aplikujte na následné skúšobné vzorky (pozri 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

pričom

w_{si} je hmotnostná frakcia vyjadrená ako percento každého triglyceridu alebo cholesterolu v normalizovanom mliečnom tuku;

A_{si} je numerická hodnota plochy píku každého triglyceridu alebo cholesterolu v normalizovanom mliečnom tuku.

Na získanie normalizovaného mliečneho tuku so známym zložením triglyceridov použite postup uvedený v 7.3.3.2 alebo 7.3.3.3.

7.3.3.2. Komerčná norma mliečneho tuku

Najlepším spôsobom stanovenia reakčného faktora každej zložky skúšobnej vzorky je použitie normalizovaného mliečneho tuku s certifikovaným zložením triglyceridov.

Poznámka: Vhodná norma je CRM 519 (bezvodný mliečny tuk), ktorú možno získať z Inštitútu referenčných materiálov a meraní (IRMM), Geel, Belgicko ([1]).

7.3.3.3. Laboratórna norma mliečneho tuku

Pripravte odvážením na najbližší 1 mg asi 1 g zmesi štandardných vzoriek tuku (pozri 4.2, ktoré obsahujú aspoň saturované triglyceridy, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} a C_{54} a cholesterol, plus, prednostne, C_{50} a C_{52}), hmotnosť zaznamenajte s presnosťou na 0,1 mg, aby ste dostali relatívne zloženie triglyceridov podobné mliečnemu tuku.

Opakovane analyzujte roztok zmesi štandardných vzoriek tuku v *n*-hexáne (4.4) alebo *n*-heptáne (4.5) podľa 7.3.4. V rovnakej sekvencii opakovane analyzujte mliečny tuk s priemerným zložením.

Stanovte reakčné faktory triglyceridov zo zmesi štandardných vzoriek tuku. Priebežné reakčné faktory triglyceridov, ktoré nie sú prítomné v zmesi, možno vypočítať matematickou interpoláciou. Reakčné faktory získané z mliečneho tuku použite na získanie normalizovaného zloženia. Takto získaný normalizovaný mliečny tuk má životnosť niekoľko rokov, ak sa skladuje v dusíku pri max. teplote – 18 °C.

7.3.4. *Chromatografické podmienky*

Poznámka: Použitie náplňovej alebo kapilárnej kolóny má všeobecne za následok rozlíšenie podobné obrázku 1. Rozdelenie triglyceridov s párnymi číslami sa normálne nepozoruje a treba sa mu vyhýbať.

7.3.4.1. Náplňová kolóna

a) Teplotný program: Počiatočnú teplotu piecky nastavte na 210 °C. Udržiavajte túto teplotu 1 min. Potom teplotu zvyšuje rýchlosťou 6 °C/min na 350 °C. Túto teplotu (konečnú) udržiavajte 5 minút.

b) Teplota detektora a injektora: obidva nastavte na 370 °C.

c) Nosný plyn: použite dusík s konštantným prietokom asi 40 ml/min. Presný prietok nosného plynu nastavte tak, aby sa C_{54} eluovalo pri 341 °C.

d) Trvanie analýzy: 29,3 min.

e) Objem nástreku: injektujte 0,5 µl 5 % (hmotnostná frakcia) roztoku vzorky.

([1]) Príklad vhodného výrobku dostupného v predaji. Tento údaj sa poskytuje len pre informáciu používateľov tejto medzinárodnej normy a nie je schválením tohto výrobku.

Ak nevykonávate analýzy triglyceridov, počiatočnú teplotu piecky udržiavajte podľa písmena a), teplotu detektora a injektora podľa písmena b) a prietok nosného plynu podľa písmena c) na konštantnej úrovni aj cez noc a víkendy a pracovné voľno. Takto zaistíte najlepšiu výkonnosť kolóny.

7.3.4.2. Kapilárna kolóna

a) Teplotný program: Počiatočnú teplotu piecky nastavte na 80 °C. Udržiavajte túto teplotu 0,5 minúty. Potom teplotu zvýšte rýchlosťou 50 °C/min na 190 °C a ďalej rýchlosťou 6 °C/min na 350 °C. Túto teplotu (konečnú) udržiavajte 5 minút.

b) Teplota detektora: nastavte 370 °C.

c) Nosný plyn: použite dusík s konštantným prietokom asi 3 ml/min.

d) Trvanie analýzy: 34,4 min.

e) Objem nástreku: injektujte 0,5 µl 1 % (hmotnostná frakcia) roztoku vzorky.

Tieto nastavenia udržiavajte aj pri nečinnosti, aby sa zaistil čo najlepší výkon (pozri 7.3.4.1).

Analytické nastavenia uvedené v 7.3.4.2 sú vhodné na použitie s kolónou so širokým otvorom (vnútorný priemer 0,53 mm) podľa 5.2.2. Ak sa použije iný rozmer kolóny alebo fáza, možno vytvoriť iné podmienky.

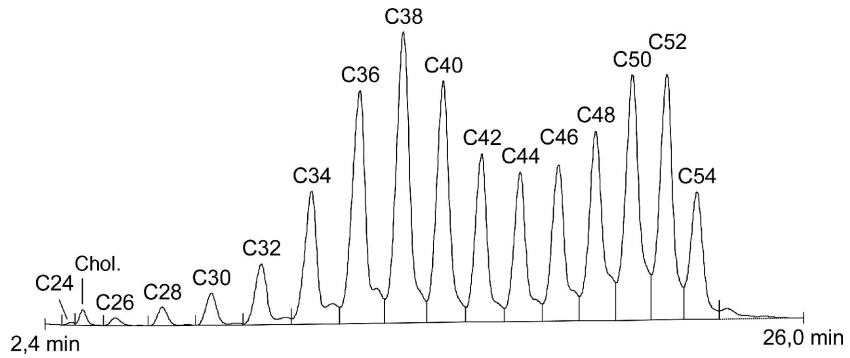
8. INTEGRÁCIA, HODNOTENIE A KONTROLA ANALÝZY

Vyhodnoťte píky chromatogramu integračným systémom schopným vyznačiť a reintegrovať základnú čiaru. Na obrázku je správne integrovaný chromatogram, zatiaľ čo na obrázku 2 je sporadická chyba v základnej čiare končiacej za C_{54}, ktorá ovplyvňuje percento všetkých triglyceridov. Napriek tomu vylúčte z hodnotenia píky eluované po C_{54}.

Triglyceridy zlúčte s nepárnym počtom atómov C v acylovej skupine ($2n + 1$), pred ktorým je triglycerid s párnym číslom ($2n$). Neberte do úvahy nízky obsah C_{56}. Vynásobte percentá plôch zostávajúcich triglyceridov vrátane cholesterolu príslušnými reakčnými faktormi normalizovaného mliečneho tuku (posledná kalibrácia) a spolu znormalizujte na 100 % podľa 9.1.

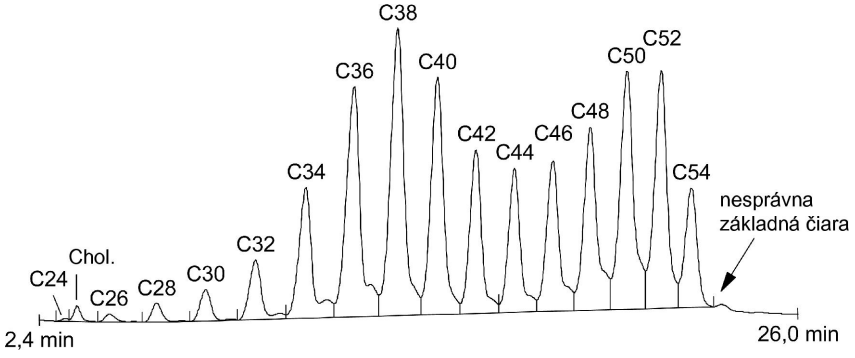
Obrázok 1

Príklad chromatogramu triglyceridov mliečneho tuku so správne nastavenou základnou čiarou



Obrázok 2

Príklad chromatogramu triglyceridov mliečneho tuku s nesprávne nastavenou základnou čiarou



Na kontrolu meracích podmienok porovnajte koeficienty variácie rôznych triglyceridov uvedených v tabuľke 1, vyjadrené v percentách, ktoré vychádzajú z 19 po sebe nasledujúcich analýz rovnakej vzorky mliečneho tuku.

Ak sú koeficienty variácie podstatne vyššie ako hodnoty uvedené v tabuľke 1, chromatografické podmienky nie sú vhodné.

Poznámka: Hodnoty uvedené v tabuľke 1 nie sú povinné, ale orientačné na účely kontroly kvality.

Ak sa však prijmú vyššie hodnoty koeficientov variácie, limity opakovateľnosti a reprodukovateľnosti uvedené v článku 10 sa napriek tomu musia dodržať.

Tabuľka 1

Koeficienty variácie obsahu triglyceridov (19 po sebe idúcich analýz)

Triglycerid	Koeficient variácie v %
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. VÝPOČET A VYJADRENIE VÝSLEDKOV

9.1. **Zloženie triglyceridov**

9.1.1. *Výpočet*

Vypočítajte hmotnostnú frakciu každého triglyceridu (pre i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52}, a C_{54}) a cholesterolu, w_i, vyjadreného ako percento celkového obsahu triglyceridov skúšobnej vzorky pomocou tejto rovnice:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum(A_1 \times RF_{si})} \times 100 \qquad (2)$$

pričom

A_i je numerická hodnota plochy píku každého triglyceridu v skúšobnej vzorke;

RF_{si} je reakčný faktor každého triglyceridu stanovený kalibráciou (7.3.3).

9.1.2. *Vyjadrenie výsledkov*

Výsledky zaznamenajte na dve desatinné miesta.

9.2. **S-hodnoty**

9.2.1. *Výpočet*

9.2.1.1. Vypočítajte *S-hodnoty* v percentách vložením vypočítaného w_i (9.1.1) príslušného percenta triglyceridov do rovníc (3) to (7). Použite všetky rovnice bez ohľadu na druh podozrivého cudzieho tuku.

9.2.1.2. Sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej z pšeničných klíčkov, olej z kukuričných klíčkov, bavlníkový a rybací olej

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Kokosový a palmojadrový tuk

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Palmový olej a hovädzí loj

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Bravčová masť

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6. Súhrn

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Vyjadrenie výsledkov*

Výsledky zapisujte na dve desatinné miesta.

9.3. **Zisťovanie cudzích tukov**

Porovnajte päť *S*-hodnôt získaných podľa 9.2.1 s príslušnými *S*-limitmi uvedenými v tabuľke 2.

Skúšobnú vzorku posudzujte ako čistý mliečny tuk, ak je všetkých päť *S*-hodnôt v rozmedzí limitov uvedených v tabuľke 2. Ak však niektorá *S*-hodnota nespadá do príslušných limitov, predpokladá sa, že vzorka obsahuje cudzí tuk.

Hoci sú jednotlivé rovnice (3) až (6) citlivejšie na určité cudzie tuky než súhrnná rovnica (7) (pozri tabuľku B.1), kladný výsledok získaný len z jednej rovnice (3) až (6) neumožňuje vyvodiť závery o druhu cudzieho tuku.

V prílohe B sa opisuje postup výpočtu obsahu rastlinného alebo živočíšneho tuku v upravenom mliečnom tuku. Tento postup nie je overený a slúži len na informáciu.

Tabuľka 2

S-limity čistých mliečnych tukov

Cudzí tuk	Rovnica	*S*-limity [a]
Sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej z pšeničných klíčkov, olej y kukuričných klíčkov, bavlníkový, rybací olej	(3)	98,05 až 101,95
Kokosový a palmojadrový tuk	(4)	99,42 až 100,58
Palmový olej a hovädzí loj	(5)	95,90 až 104,10
Bravčová masť	(6)	97,96 až 102,04
Spolu	(7)	95,68 až 104,32

[a] Vypočítané na úrovni spoľahlivosti 99 %, takže pridanie cudzieho tuku sa uvádza len vtedy, ak sú prekročené detekčné limity príslušnej rovnice (pozri tabuľku B.1).

10. PRESNOSŤ

10.1. **Medzilaboratórny test**

Hodnoty opakovateľnosti a reprodukovateľnosti boli určené na základe rovníc (3) až (7) s použitím čistého mliečneho tuku a nemusia platiť pre iné než uvedené matrice.

10.2. **Opakovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma výsledkami jednotlivých testov získanými pomocou rovnakej metódy na rovnakom skúšobnom materiáli v rovnakom laboratóriu rovnakým analytikom používajúcim rovnaké zariadenie v krátkom časovom intervale neprekračujú limity uvedené v tabuľke 3 vo viac ako 5 % prípadov.

Tabuľka 3

Limity opakovateľnosti – r pre rovnice (3) až (7)

Cudzí tuk	Rovnica	r %
Sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej y pšeničných klíčkov, olej y kukuričných klíčkov, bavlníkový, rybací olej	(3)	0,67
Kokosový a palmojadrový tuk	(4)	0,12
Palmový olej a hovädzí loj	(5)	1,20
Bravčová masť	(6)	0,58
Spolu	(7)	1,49

10.3. **Reprodukovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma výsledkami jednotlivých testov získanými pomocou rovnakej metódy na rovnakom skúšobnom materiáli v rôznych laboratóriách rôznymi analytikmi s použitím rôzneho zariadenia neprekračujú limity uvedené v tabuľke 4 vo viac ako 5 % prípadov.

Tabuľka 4

Limity reprodukovateľnosti, R pre rovnice (3) až (7)

Cudzí tuk	Rovnica	R %
Sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej y pšeničných klíčkov, olej y kukuričných klíčkov, bavlníkový, rybací olej	(3)	1,08
Kokosový a palmojadrový tuk	(4)	0,40
Palmový olej a hovädzí loj	(5)	1,81
Bravčová masť	(6)	0,60
Spolu	(7)	2,07

11. NEISTOTA MERANIA

Z opakovateľnosti *r* a reprodukovateľnosti *R* možno vypočítať rozšírenú neistotu *S*-hodnoty.

Zahrnutie rozšírenej neistoty (na základe opakovaných analýz) do *S*-limitov tabuľky 2 má za následok rozšírené *S*-limity, ktoré sú uvedené v tabuľke 5.

Tabuľka 5

Rozšírené *S*-limity čistých mliečnych tukov vrátane rozšírenej neistoty

Cudzí tuk	Rovnica	Rozšírené *S*-limity
Sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej y pšeničných klíčkov, olej y kukuričných klíčkov, bavlníkový, rybací olej	(3)	97,36 až 102,64
Kokosový a palmojadrový tuk	(4)	99,14 až 100,86
Palmový olej a hovädzí loj	(5)	94,77 až 105,23
Bravčová masť	(6)	97,65 až 102,35
Spolu	(7)	94,42 až 105,58

12. SPRÁVA O TESTE

V správe o teste sa uvádza:

— všetky údaje potrebné na ukončenie identifikácie vzorky,

— použitú metódu odberu vzoriek, ak je známa,

— použitú metódu testovania s odkazom na túto medzinárodnú normu,

— všetky prevádzkové údaje, ktoré nie sú uvedené v tejto medzinárodnej norme, alebo sa pokladajú za voliteľné, spolu s podrobnými údajmi o všetkých incidentoch, ktoré mohli ovplyvniť výsledok testu(-tov),

— získaný výsledok testu(-tov) a ak sa kontrolovala opakovateľnosť, konečný dosiahnutý citovaný výsledok.

PRÍLOHA A

(normatívna)

PRÍPRAVA NÁPLŇOVEJ KOLÓNY

A.1. REAGENTY A PRÍSTROJE

A.1.1. **Toluén** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2. Roztok **dichlórdimetylsilánu** [$Si(CH_3)_2Cl_2$].

50 ml dichlórdimetylsilánu rozrieďte v 283 ml toluénu (A.1.1).

A.1.3. Roztok **kakaového masla** s hmotnostnou frakciou 5 % kakaového masla v *n*-hexáne (4.4) alebo *n*-heptáne (4.5).

A.1.4. **Stacionárna fáza** 3 % OV-1 na 125 μm až 150 μm (100 až 120 ôk) Gas ChromQ ([1]).

Poznámka: Zrnitosť bola prevedená na mikrometre v súlade s BS 410 (všetky časti)[6].

A.1.5. **Sklená kolóna** s vnútorným priemerom 2 mm a dĺžkou 500 mm v tvare U.

A.1.6. **Prístroj** na plnenie náplňovej kolóny.

A.1.6.1. *Plniaca kolóna* s priskrutkovanými uzávermi, vybavená značkou, po ktorú sa môže naplniť požadované množstvo stacionárnej fázy.

A.1.6.2. *Jemné sito* s veľkosťou otvorov cca 100 μm so skrutkovacím uzáverom vhodným na utesnenie skleného valca podľa obrázka A.3.

A.1.6.3. *Silanizovaná sklená vlna,* deaktivovaná.

A.1.6.4. *Vibrátor* na rovnomernú distribúciu stacionárnej fázy počas plnenia.

A.1.6.5. *Silanizačné prístroje* na silanizáciu skleného povrchu kolóny.

A.1.6.6. *Woulffova fľaša.*

A.1.6.7. *Sacie vodné čerpadlo.*

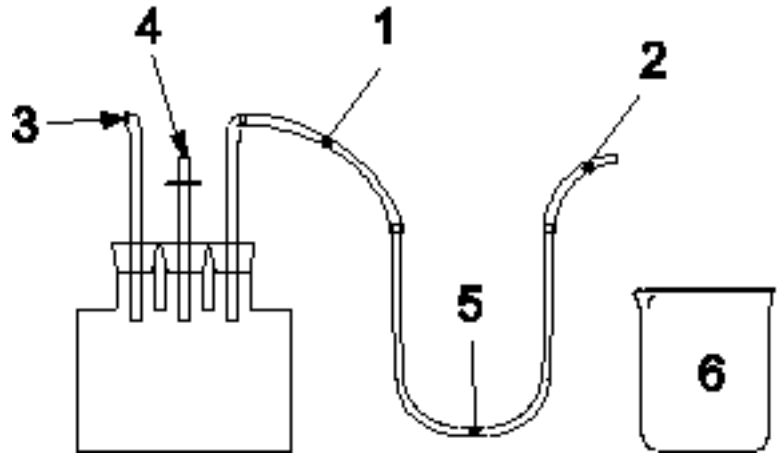
A.2. SILANIZÁCIA (DEAKTIVÁCIA SKLENÉHO POVRCHU)

Po pripojení Woulffovej fľaše (A.1.6.6) k vodnému saciemu čerpadlu (A.1.6.7) ponorte skúmavku 2 (pozri obrázok A.1) do roztoku dichlórdimetylsilánu (A.1.2). Týmto roztokom naplňte kolónu (A.1.5) a zatvorte kohútik. Opäť otvorte kohútik a odstráňte obe skúmavky. Valec pripevnite na stojan. Pomocou pipety ho úplne naplňte roztokom dichlórdimetylsilánu (A.1.2).

([1]) Príklad vhodného výrobku dostupného v predaji. Tento údaj sa uvádza len pre informáciu používateľov tejto medzinárodnej normy a nepredstavuje schválenie tohto výrobku normou ISO alebo IDF.

Obrázok A.

Silanizačný prístroj



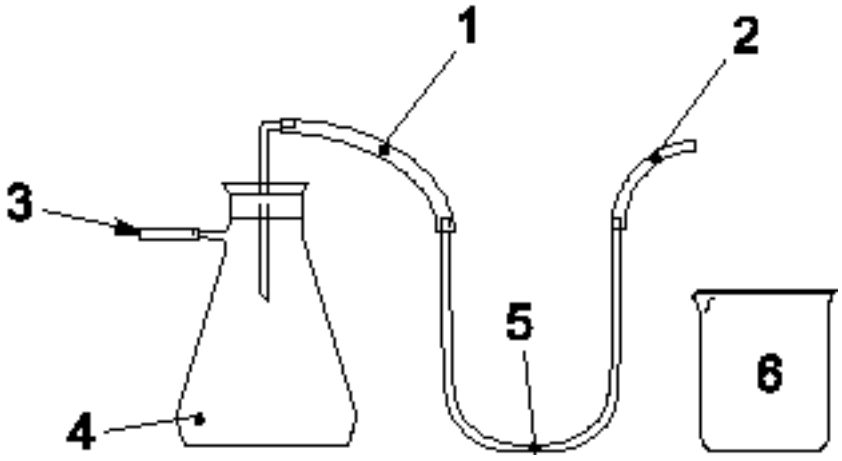
Kľúč

1 skúmavka 1
2 skúmavka 2
3 sacie vodné čerpadlo
4 zatvárací kohútik
5 sklená kolóna
6 dichlórdimetylsilán a toluén

Nechajte kolónu stáť 20 až 30 minút. Potom Woulffovu fľašu zameňte za filtračnú banku. Kolónu pripojte na sacie vodné čerpadlo (A.1.6.7) a vyprázdnite ho (pozri obrázok A.2). Skúmavku 2 ponorte do 75 ml toluénu (A-.1.1) a následne do 50 ml metanolu (4.3) a prázdnu kolónu rozpúšťadlom prepláchnite. Prepláchnutú kolónu sušte v piecke (5.6) nastavenej na 100 °C približne 30 minút.

Obrázok A.

Preplachovacie zariadenie



Kľúč

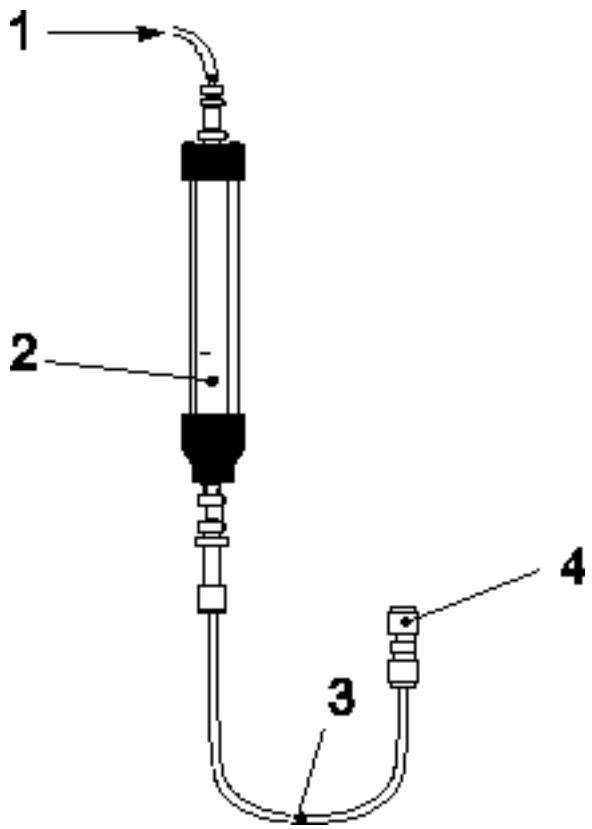
1 skúmavka 1
2 skúmavka 2
3 sacie vodné čerpadlo
4 filtračná banka
5 sklený valec
6 preplachovacie činidlo

A.3. PLNENIE

Kolónu naplňte pomocou prístroja zobrazeného na obrázku A.3. Plniacu kolónu (A.1.6.1) naplňte stacionárnou fázou (A.1.4) až po značku. Spodnú časť sklenej kolóny utesnite približne 1 cm dlhou zátkou zo silanizovanej stlačenej sklenej vlny (A.1.6.3). Koniec valca uzavrite jemným sitom (A.1.6.2).

Obrázok A.

Plnenie sklenej kolóny



Kľúč

1 vstup dusíka

2 plniacu kolónu, ktorú treba naplniť až po značku s OV-1

3 sklená kolóna, ktorá sa má naplniť

4 skrutkovací uzáver s filtrom, oproti ktorému sa natlačí sklené vlákno a stacionárna fáza

Kolónu naplňte pod tlakom (300 kPa a prúdom dusíka) stacionárnou fázou. Na dosiahnutie rovnomerného, stáleho a pevného naplnenia počas plnenia valcom pohybujte vibrátor. Po naplnení vtlačte z druhého konca naplnenej kolóny pevnú zátku zo silanizovanej sklenej vlny (A.1.6.3). Odstávajúce konce prirežte. Zátku vtlačte do valca ešte niekoľko milimetrov pomocou špachtle.

A.4. ÚPRAVA

Počas krokov a) až c) nesmie byť zadný koniec kolóny pripojený k detektoru, aby nedošlo ku kontaminácii. Naplnenú kolónu (A.3) upravte takto:

a) kolónu preplachujte 15 minút dusíkom s prietokom 40 ml/min a piecku na plynovú chromatografiu nastavte na 50 °C;

b) valec zahrievajte rýchlosťou 1 °C/min až na 355 °C, prietok dusíka nastavte na 10 ml/min;

c) valec udržiavajte pri teplote 355 °C 12 až 15 hodín;

d) dvakrát nastreknite 1 µl roztoku kakaového masla (A.1.3) a použite teplotný program pre náplňovú kolónu uvedený v 7.3.4.1;

Poznámka: Kakaové maslo pozostáva skoro výlučne z triglyceridov C_{50} až C_{54} s vysokým bodom varu, a teda úprava valca podľa príslušných reakčných faktorov nie je taká zložitá.

e) v rámci 2 až 3 dní 20-krát nastreknite 0,5 µl roztoku mliečneho tuku podľa 7.2 a použite nastavenia pre náplňovú kolónu uvedené v 7.3.4.1.

— Na analýzu skúšobných vzoriek používajte len valce s reakčnými faktormi blízkymi k 1. Reakčné faktory by nemali byť vyššie než 1,20.

PRÍLOHA B

(informatívna)

KVANTIFIKÁCIA OBSAHU CUDZIEHO TUKU

B.1. VŠEOBECNÉ ÚDAJE

V tabuľke B.1 sa uvádzajú detekčné limity pre rôzne cudzie tuky vypočítané na 99 % úrovni spoľahlivosti. V strednom stĺpci sú detekčné limity pre najlepšiu jednotlivú rovnicu (3) až (6).

Detekčné limity celkovej rovnice (7) uvedené v pravom stĺpci sú o niečo vyššie. Rovnica (7) je v podstate potrebná len na kvantifikáciu cudzieho tuku.

So všetkými rovnicami možno zistiť aj kombinácie rôznych cudzích tukov. Variácia zloženia triglyceridov medzi jednotlivými vzorkami jedného druhu cudzieho tuku nemá zásadný vplyv na detekčné limity.

Ak použijete jednotlivé rovnice aj súhrnnú rovnicu, platia detekčné limity jednotlivých rovníc. *S*-hodnota súhrnnej rovnice je však v niektorých prípadoch potrebná na kvantifikáciu (B.2).

Tabuľka B.1

99 % limity detekcie cudzieho tuku pridaného do mliečneho tuku v percentách

Cudzí tuk	Jednotlivá rovnica %	Súhrnná rovnica %
Sójový olej	2,1	4,4
Slnečnicový olej	2,3	4,8
Olivový olej	2,4	4,7
Kokosový olej	3,5	4,3
Palmový olej	4,4	4,7
Palmojadrový tuk	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
Bavlníkový olej	3,3	4,4
Bravčová masť	2,7	4,7
Hovädzí loj	5,2	5,4
Hydrogenovaný rybací olej	5,4	6,1

B.2. VÝPOČET

Ak je prekročený aspoň jeden z *S*-limitov (tabuľka 2 alebo tabuľka 5), vykonajte len kvantitatívne určenie cudzieho tuku. Na získanie kvantitatívnej informácie vypočítajte v skúšobnej vzorke hmotnostnú frakciu cudzieho tuku alebo hmotnostnú frakciu zmesi cudzích tukov w_f v percentách pomocou tejto rovnice:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (B.1)$$

pričom

S je výsledok získaný vložením údajov o triglyceridoch z mliečneho tuku, do ktorého bol pridaný cudzí tuk alebo zmes cudzích tukov do jednej z rovníc (3) až (7);

S_f je konštanta závislá od druhu pridaného cudzieho tuku.

Ak je druh cudzieho tuku pridaného do mliečneho tuku neznámy, použite všeobecnú S_f-hodnotu 7,46 (tabuľka B.2). Vždy používajte *S*-hodnotu získanú z rovnice (7), aj keď nie sú prekročené jej *S*-limity ale limity inej rovnice.

Pri známych cudzích tukoch vložte do rovnice (B.1) ich individuálne S_f-hodnoty (tabuľka B.2). Na výpočet *S* si zvoľte príslušnú rovnicu cudzieho tuku z rovníc (3) až (6).

Tabuľka B.2

S_f-hodnoty rôznych cudzích tukov

Cudzí tuk	S_f
Neznámy	7,46
Sójový olej	8,18
Slnečnicový olej	9,43
Olivový olej	12,75
Kokosový olej	118,13
Palmový olej	7,55
Palmojadrový tuk	112,32
Repkový olej	3,30
Ľanový olej	4,44
Olej z pšeničných klíčkov	27,45
Olej z kukuričných klíčkov	9,29
Bavlníkový olej	41,18
Bravčová masť	177,55
Hovädzí loj	17,56
Rybací olej	64,12

B.3. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Výsledky testov zaznamenajte na dve desatinné miesta.

Literatúra

1. Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft, 52, 1987, s. 82 – 85.*
2. Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, s. 16 – 17 *Milchwissenschaft, 52, 1987, s. 82 – 85.*
3. Molkentin, J., Precht, D.: Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, s. 265 – 270.
4. Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, s. 791 – 797.
5. ISO 707IDF 50, *Mlieko a mliečne výrobky – návod na odber vzoriek*
6. BS 410:1988, *Testovacie sitá – Technické požiadavky a testovanie*
7. Precht, D.: Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, s. 219 – 242.
8. Precht, D.: Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat. Sci. Technol.*, 93, 1991, s. 538 – 544.
9. DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse*
10. Komisia Európskych spoločenstiev: *Posudzovanie výsledkov prvého, druhého, tretieho, štvrtého, piateho a šiesteho kolaboratívneho pokusu EHS: Určovanie triglyceridov v mliečnom tuku*; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93
11. Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, s. 505 – 510.

PRÍLOHA XXI

(Článok 18)

POSTUP V PRÍPADE SPORNÝCH VÝSLEDKOV ANALÝZY (CHEMICKÁ ANALÝZA)

1. Ďalšia analýza sa vykonáva v inom laboratóriu schválenom príslušným orgánom s použitím príslušnej metódy na požiadanie výrobcu za predpokladu, že sú k dispozícii zapečatené duplicitné vzorky výrobku, ktoré príslušný orgán vhodne uskladnil. Žiadosť sa podáva do 7 pracovných dní po oznámení výsledkov prvej analýzy. Táto analýza sa vykoná do 21 pracovných dní od prijatia žiadosti. Príslušný orgán pošle tieto vzorky do druhého laboratória na požiadanie a náklady výrobcu. Toto druhé laboratórium musí byť autorizované na vykonávanie oficiálnych analýz a musí mať dokladovanú schopnosť na dané analýzy.

2. Rozšírené neistoty ($k = 2$) stredu $\bar{y}_1$ opakovaných meraní n_1 v laboratóriu 1 a priemeru $\bar{y}_2$ opakovaných meraní n_2 v laboratóriu 2 sú

3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ resp. $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$, kde σ_r je štandardná odchýlka opakovateľnosti a σ_R je štandardná odchýlka reprodukovateľnosti príslušnej metódy. Ak sa konečný výsledok *y* merania v laboratóriách vypočíta pomocou vzorca vo forme $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ alebo $y = x_1/x_2$, na získanie neistoty treba dodržať zvyčajné postupy kombinovania štandardných odchýlok v takýchto prípadoch.

4. Na preskúmanie súladu výsledkov z týchto dvoch laboratórií so štandardnou odchýlkou reprodukovateľnosti σ_R metódy sa vypočítava rozšírená neistota rozdielu $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$:

5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Ak absolútna hodnota rozdielu laboratórnych priemerných hodnôt $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ nie je väčšia než jeho neistota $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

   $$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

   výsledky týchto dvoch laboratórií sú v súlade so štandardnou odchýlkou reprodukovateľnosti σ_r a aritmetický stred priemerov týchto dvoch laboratórií

   $$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2},$$

   je uvedený ako konečný výsledok. Jeho rozšírená neistota je

   $$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

   Zásielka je odmietnutá ako nevyhovujúca hornému zákonnému limitu *UL*, ak

   $$\bar{y} - U_{\bar{y}} > UL;$$

   inak je prijatá ako vyhovujúca *UL*.

   Zásielka je odmietnutá ako nevyhovujúca spodnému zákonnému limitu *LL*, ak

   $$\bar{y} - U_{\bar{y}} < LL;$$

   inak je prijatá ako vyhovujúca *LL*.

   Ak je absolútna hodnota rozdielu laboratórnych stredných hodnôt $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ väčšia než jeho neistota $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

   $$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

výsledky obidvoch laboratórií sú v súlade so štandardnou odchýlkou reprodukovateľnosti.

V prípade, že druhá analýza potvrdí prvú, zásielka je odmietnutá ako nevyhovujúca. Inak je zásielka prijatá ako vyhovujúca.

Konečný výsledok musí príslušný orgán oznámiť čo najskôr výrobcovi. Náklady na druhú analýzu znáša výrobca, ak je zásielka odmietnutá.

PRÍLOHA XXII

TABUĽKA ZHODY

Nariadenie (ES) č. 213/2001	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 1
Článok 2	Článok 1
Článok 3	Článok 2
—	Článok 3
Článok 4	—
Článok 5	—
Článok 6	Článok 4
Článok 7	Článok 18
Článok 8	—
Článok 9	Článok 5
Článok 10	Článok 6
Článok 11	Článok 7
Článok 12	Článok 8
Článok 13	Článok 9
Článok 14	Článok 10
Článok 15	Článok 11
Článok 16	Článok 12
Článok 17	Článok 13
—	Článok 14
Článok 18	Článok 15
Článok 19	Článok 16
	Článok 17
	Článok 19
Článok 20	—
Článok 21	—
Článok 22	Článok 20
Článok 23	Článok 21