Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

►**B**

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 273/2008

ze dne 5. března 2008,

kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 1255/1999, pokud jde o metody analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků

(Úř. věst. L 88, 29.3.2008, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
►**M1**	Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 565/2013 ze dne 18. června 2013	L 167	26	19.6.2013

▼B

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 273/2008

ze dne 5. března 2008,

kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 1255/1999, pokud jde o metody analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na nařízení Rady (ES) č. 1255/1999 ze dne 17. května 1999 o společné organizaci trhu s mlékem a mléčnými výrobky ([1]), a zejména na články 10 a 15 a čl. 26 odst. 3, čl. 29 odst. 1 a čl. 31 odst. 4 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Nařízení Komise (ES) č. 213/2001 ([2]) stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 1255/1999, pokud jde o metody analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků. V souvislosti s technickým vývojem v oblasti analytických metodik je třeba provést další výrazné změny. V zájmu jasnosti a účinnosti a s ohledem na počet a technickou povahu změn by nařízení (ES) č. 213/2001 mělo být zrušeno a nahrazeno novým nařízením.

(2) Složení a jakostní znaky mléka a mléčných výrobků stanovené v rámci režimů zavedených nařízením (ES) č. 1255/1999 musí být validovány, neboť je nutné zajistit, aby plně odpovídaly stanoveným požadavkům.

(3) Referenční metody, jež se mají pro uvedenou validaci používat, jsou metody, které zveřejňují mezinárodní organizace, jako jsou Evropský výbor pro normalizaci (CEN), Mezinárodní mlékárenská federace (IDF), Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) a vědecké sdružení zabývající se odbornou způsobilostí v oblasti analýz (AOAC International), a které tyto organizace pravidelně aktualizují. V některých případech se stanoví referenční metoda Společenství, zatímco v jiných případech právní předpisy Společenství žádnou referenční metodu nestanoví. Má-li být zajištěno jednotné používání referenčních metod, je nezbytné vypracovat seznam referenčních metod a mělo by se stanovit, že Komise může tento seznam v případě potřeby přizpůsobit.

(4) Používání rutinních metod by nemělo být vyloučeno, a proto by měly být stanoveny minimální podmínky pro jejich používání.

(5) Rovněž by měly být stanoveny společné postupy s cílem zavést jednotnou praxi při hodnocení výsledků analýz. Totéž platí pro organoleptické hodnocení dotyčných produktů a pro přezkoumávání výsledků, které byly napadeny.

([1]) Úř. věst. L 160, 26.6.1999, s. 48. Nařízení naposledy pozměněné nařízením (ES) č. 1152/2007 (Úř. věst. L 258, 4.10.2007, s. 3). Nařízení (ES) č. 1255/1999 se nahrazuje nařízením (ES) č. 1234/2007 (Úř. věst. L 299, 16.11.2007, s. 1) od 1. července 2008.

([2]) Úř. věst. L 37, 7.2.2001, s. 1.

▼B

(6) Pro některé analýzy v současnosti neexistují žádné mezinárodně uznávané referenční metody, jež byly validovány; z tohoto důvodu nejsou k dispozici žádné informace o tom, že by jednotlivé laboratoře dosahovaly při analýzách odlišných výsledků. Proto je třeba stanovit v rámci Společenství metody, které byly validovány podle pravidel stanovených na mezinárodní úrovni a které by se používaly jako metody referenční.

(7) Nařízení Komise (ES) č. 1898/2005 ([1]) stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 1255/1999, pokud jde o opatření pro odbyt smetany, másla a zahuštěného másla na trhu Společenství, a stanoví, že za určitých okolností se do smetany, másla a zahuštěného másla přidávají stopovací látky, aby bylo zajištěno správné konečné použití těchto produktů. Používání stopovacích látek je důležité pro řádné fungování režimu. V zájmu zajištění toho, aby se všem hospodářským subjektům, na které se tento režim vztahuje, dostalo rovného zacházení, měly by se zavést obecné metody pro zjišťování některých těchto stopovacích látek.

(8) Podle článku 9 nařízení (ES) č. 1255/1999 může být poskytnuta podpora pro soukromé skladování sýrů vyráběných z ovčího mléka. Podle článku 31 téhož nařízení lze pro tyto produkty poskytnout zvláštní náhradu. Sýry vyráběné z ovčího mléka, kozího mléka, buvolího mléka a ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka mohou být do Společenství dováženy z některých třetích zemí za preferenčních podmínek. Vzhledem k výše uvedenému je třeba vhodnými kontrolními postupy ověřit, zda se do dotyčných produktů nepřidává kravské mléko. Z tohoto důvodu je nezbytné stanovit referenční metodu Společenství ke zjištění kravského mléka, aniž je dotčeno použití rutinních metod, pakliže splňují určitá kritéria.

(9) Podle nařízení Komise (EHS) č. 2921/90 ze dne 10. října 1990 o podpoře výroby kaseinu a kaseinátů z odstředěného mléka ([2]) musí být stanovena nepřítomnost koliformních bakterií. Mezinárodně uznávanými referenčními metodami pro zjišťování koliformních bakterií v mléce a mléčných výrobcích je mezinárodní norma ISO 4831. Proto byla pro zjišťování koliformních bakterií stanovena referenční metoda Společenství založená na uvedené normě.

(10) Nařízení Rady (EHS) č. 2658/87 ze dne 23. července 1987 o celní a statistické nomenklatuře a o společném celním sazebníku ([3]) stanoví různé celní sazby pro krmné směsi čísla 2309 celního sazebníku podle obsahu mléčných výrobků. Má-li být zajištěno jednotné používání příslušných pravidel, měla by se stanovit metoda analýzy ke zjištění obsahu laktosy, která bude povinná pro všechny členské státy, a za tímto účelem by se měla zvolit určitá obecně uznávaná metoda.

([1]) Úř. věst. L 308, 25.11.2005, s. 1. Nařízení naposledy pozměněné nařízením (ES) č. 1546/2007 (Úř. věst. L 337, 21.12.2007, s. 68).

([2]) Úř. věst. L 279, 11.10.1990, s. 22. Nařízení naposledy pozměněné nařízením (ES) č. 1487/2006 (Úř. věst. L 278, 10.10.2006, s. 8).

([3]) Úř. věst. L 256, 7.9.1987, s. 1. Nařízení naposledy pozměněné nařízením Komise (ES) č. 1352/2007 (Úř. věst. L 303, 21.11.2007, s. 3).

▼B

(11) Nařízení (ES) č. 1255/1999 stanoví, že máslo a sušené odstředěné mléko určené k intervenci, jakož i sušené odstředěné mléko určené k použití jako krmivo, musí splňovat určité požadavky na jakost. Proto je třeba stanovit referenční metody, které umožní zjistit, zda jsou tyto požadavky plněny.

(12) Některé metody v tomto nařízení se zavádějí poprvé. Od vstupu tohoto nařízení v platnost by měla být laboratořím poskytnuta dostatečná lhůta k tomu, aby tyto nové metody mohly správně zavést a používat. Kdykoli je referenční metoda uvedená v příloze I přezkoumána a zveřejněna Organizací pro vývoj norem, měly by mít laboratoře šest měsíců na to, aby své analytické postupy zaktualizovaly způsobem, který bude nové normě odpovídat.

(13) Opatření tohoto nařízení jsou v souladu se stanoviskem Řídícího výboru pro mléko a mléčné výrobky,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

KAPITOLA I

OBECNÁ USTANOVENÍ

Článek 1

Předmět a oblast působnosti

1. Toto nařízení stanoví určité referenční metody pro chemickou, fyzikální a mikrobiologickou analýzu a organoleptické hodnocení mléka a mléčných výrobků v rámci režimů stanovených ve společné organizaci trhu s mlékem a mléčnými výrobky, kterou zavádí nařízení (ES) č. 1255/1999, a pravidla pro používání těchto metod.

2. Seznam referenčních metod použitelných pro analýzy uvedené v odstavci 1 je uveden v příloze I tohoto nařízení.

3. Komise aktualizuje uvedený seznam postupem podle článku 42 nařízení (ES) č. 1255/1999.

Článek 2

Rutinní metody

Pro analýzy stanovené právními předpisy Společenství lze používat rutinní metody za předpokladu, že jsou patřičně kalibrovány a pravidelně kontrolovány porovnáním s referenční metodou. Výsledky se srovnávají s přihlédnutím ke stálé odchylce, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

V případě sporu je rozhodující výsledek získaný referenční metodou.

Členské státy informují Komisi o použití rutinních metod při analýze uvedené v článku 1.

▼B

KAPITOLA II

METODY ANALÝZY

Článek 3

Zhodnocení splnění zákonem stanovené mezní hodnoty s ohledem na šarži

K určení toho, zda byly splněny zákonem stanovené požadavky na složení, se kromě analýzy stopovacích látek použije příloha II tohoto nařízení.

Článek 4

Organoleptické hodnocení

1. Pokud jde o mléko a mléčné výrobky jiné než máslo určené k veřejnému skladování, členské státy použijí jako referenční metodu pro organoleptické hodnocení buď normu IDF 99C:1997 nebo jiné srovnatelné metody, které sdělí Komisi.

Práce posuzovatelů a spolehlivost výsledků organoleptických analýz se ověřují pomocí postupů uvedených v příloze III.

2. Pokud jde o máslo určené pro veřejné skladování, práce posuzovatelů a spolehlivost výsledků se ověřují pomocí postupů uvedených v příloze III.

Postup stanovený v příloze IV se použije jako referenční metoda pro organoleptické hodnocení.

Článek 5

Stopovací látky

1. Ke stanovení obsahu trigliceridu kyseliny enanthové v másle, máselném oleji a smetaně se jako referenční metoda použije metoda analýzy uvedená v příloze V.

2. Ke stanovení obsahu vanilinu v zahuštěném másle, másle a smetaně se jako referenční metoda použije metoda analýzy uvedená v příloze VI.

3. Ke stanovení obsahu ethylesteru beta-apo-8'karotenové kyseliny v zahuštěném másle a másle se jako referenční metoda použije metoda analýzy uvedená v příloze VII.

4. Ke stanovení obsahu β-sitosterolu nebo stigmasterolu v zahuštěném másle a másle se jako referenční metoda použije metoda analýzy uvedená v příloze VIII.

5. Pokud získané výsledky odpovídají technickým specifikacím bodu 10 a 11 přílohy V a bodu 8 příloh VI, VII a VII, má se za to, že stopovací látky byly do zahuštěného másla, másla a smetany přidány v souladu s příslušnými právními předpisy Společenství.

Článek 6

Zjišťování kaseinu z kravského mléka

1. Je nutné zaručit, že sýry vyráběné výhradně z ovčího mléka, kozího mléka či buvolího mléka, nebo ze směsi ovčího, kozího a buvolího mléka neobsahují kasein z kravského mléka, a za tímto účelem se použije referenční metoda analýzy uvedená v příloze IX.

▼B

Přítomnost kaseinu z kravského mléka se považuje za prokázanou, pokud obsah kaseinu z kravského mléka v analyzovaném vzorku je stejný nebo vyšší v porovnání s obsahem v referenčním vzorku obsahujícím 1 % kravského mléka, který je uveden v příloze IX.

2. Rutinní metody ke zjišťování kaseinu z kravského mléka v sýrech uvedených v odstavci 1 mohou být používány za těchto podmínek:

a) jejich detekční limit musí být nejvýše 0,5 %;

b) jejich výsledky nesmí být falešně pozitivní;

c) musí umožňovat detekci kaseinu z kravského mléka s požadovanou citlivostí i po dlouhé době zrání, k čemuž může za běžných obchodních podmínek docházet.

Není-li jeden z výše uvedených požadavků splněn, použijí se referenční metody uvedené v příloze IX.

Článek 7

Zjišťování koliformních bakterií

Koliformní bakterie v másle, sušeném odstředěném mléce, kaseinu a kaseinátech se zjišťují podle referenční metody uvedené v příloze X.

Článek 8

Stanovení obsahu laktózy

Obsah laktózy ve výrobcích kódu KN 2309 se stanoví podle referenční metody uvedené v příloze XI.

Článek 9

Zjišťování syřidlové syrovátky

1. Syřidlová syrovátka v sušeném odstředěném mléce určeném pro veřejné skladování se zjišťuje podle referenční metody uvedené v příloze XII.

2. Syřidlová syrovátka v sušeném odstředěném mléce a směsích určených k použití jako krmivo se zjišťuje podle referenční metody uvedené v příloze XII. V případě zjišťování syřidlové syrovátky by se měla použít příloha XIII.

Článek 10

Zjišťování podmáslí

Podmáslí v sušeném odstředěném mléce se zjišťuje podle referenční metody uvedené v příloze XIV.

Článek 11

Zjišťování antimikrobiálních reziduí

Antimikrobiální rezidua v sušeném odstředěném mléce se zjišťují podle referenční metody uvedené v příloze XV.

▼B

Článek 12

Stanovení obsahu sušeného odstředěného mléka

Obsah sušeného odstředěného mléka v krmných směsích se stanoví podle referenční metody uvedené v příloze XVI.

Článek 13

Zjišťování škrobu

Škrob v odstředěném mléce, denaturovaném sušeném mléce a krmných směsích se zjišťuje podle referenční metody uvedené v příloze XVII.

Článek 14

Stanovení obsahu vlhkosti v sušené smetaně

Obsah vlhkosti v sušené smetaně se stanoví podle referenční metody uvedené v příloze XVIII.

Článek 15

Stanovení obsahu vlhkosti v sušeném kysaném podmáslí

Obsah vlhkosti v sušeném kysaném podmáslí určeném pro použití v krmivech se stanoví podle referenční metody uvedené v příloze XIX.

Článek 16

Stanovení čistoty mléčného tuku

Čistota mléčného tuku se stanoví podle referenční metody uvedené v příloze XX.

KAPITOLA III

OBECNÁ A ZÁVĚREČNÁ USTANOVENÍ

Článek 17

Zajištění jakosti

Analýzy provádějí laboratoře se zavedeným systémem zajištění analytické jakosti a se zavedenými postupy vnitřní kontroly jakosti. Neakreditované laboratoře se účastní programů zkoušek odborné způsobilosti alespoň jednou ročně, přičemž se jejich výsledky neodchýlí o více než $2\sigma_R$ (směrodatná odchylka reprodukovatelnosti referenční metody) od dohodnuté hodnoty. V laboratoři je k dispozici k nahlédnutí podrobný popis použitých systémů.

Laboratoře akreditované podle norem uvedených v článku 12 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních

▼B

předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat ([1]) jsou od účasti ve zkouškách odborné způsobilosti osvobozeny.

Článek 18

Odběr vzorků a námitky proti výsledkům analýzy

1. Odběr vzorků se provádí v souladu s příslušným nařízením pro posuzovaný výrobek. Neexistují-li žádná ustanovení pro odběr vzorku, použije se ustanovení uvedené v normě ISO 707 IDF 50, Mléko a mléčné výrobky – Směrnice pro odběr vzorků.

2. Laboratorní zprávy o výsledcích analýz musí obsahovat dostatečné údaje, které umožní hodnocení výsledků podle přílohy II a přílohy XXI.

3. Pro analýzy stanovené v právních předpisech Společenství se musí odebírat duplicitní vzorky.

4. V případě, že hospodářský subjekt nesouhlasí s výsledky určité analýzy, použije se postup popsaný v příloze XXI.

5. Jestliže výrobce do pěti pracovních dnů po odběru vzorků prokáže, že postup při odběru vzorků nebyl správný, odběr vzorků se musí v rámci možností zopakovat. Pokud odběr vzorků zopakovat nelze, musí být šarže přijata.

▼M1

Článek 19a

Oznamování

Oznámení uvedená v článku 2, čl. 4 odst. 1 a příloze III C se provádějí v souladu s nařízením Komise (ES) č. 792/2009 ([2]).

▼B

Článek 20

Zrušující ustanovení

Nařízení (ES) č. 213/2001 se zrušuje.

Odkazy na zrušené nařízení se považují za odkazy na toto nařízení v souladu se srovnávací tabulkou v příloze XXII.

Článek 21

Vstup v platnost

Toto nařízení vstupuje v platnost třetím dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Použije se ode dne 31. března 2008.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

([1]) Úř. věst. L 165, 30.4.2004, s. 1.
([2]) Úř. věst. L 228, 1.9.2009, s. 3.

▼B

PŘÍLOHA I

(Článek 1)

SEZNAM REFERENČNÍCH METOD

Seznam zkratek min. = minimum, max. = maximum, příloha = příloha citovaného nařízení, TPS = tukoprostá sušina, PČ = peroxidové číslo, V = vzhled, CH = chuť, K = konzistence, CPB = celkový počet bakterií, term. = počet termofilních bakterií, ČS = členský stát, IDF = Mezinárodní mlékárenská federace, ISO = Mezinárodní organizace pro normalizaci, IUPAC = Mezinárodní unie čisté a aplikované chemie, ADPI = Americký ústav mléčných výrobků, SKM = slazené kondenzované mléko, ZMS = zahuštěné mléko nebo smetana.

ČÁST A

Nařízení Komise	Produkt	Parametr	Mezní hodnota [1]	Referenční metoda	Poznámka
Nařízení (ES) č. 2771/1999 – Veřejné skladování	Nesolené máslo	Tuk	Min. 82 % hm.	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Voda	Až 16 % hm.	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		TPS	Až 2 % hm.	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Kyselost tuku	1,2 mmol/100 g tuku	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PČ (max.)	0,3 mekv. O_2/1 000 g tuku	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Poznámka 1
		Koliformní bakterie	Nezjistitelné v 1 g	Příloha X	Poznámka 3
		Nemléčný tuk	Nezjistitelný analýzou triglyceridů	Příloha XX	
		Stopovací látky: steroly	Nezjistitelné, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	Příloha VIII	
		Jiné stopovací látky			
		— vanilin	Nezjistitelný	Příloha VI	
		— ethylester kyseliny karotenové	≤ 6 mg/kg	Příloha VII	
		— triglyceridy kyseliny enanthové	Nezjistitelné	Příloha V	
		Organoleptické vlastnosti	Nejméně 4 body z 5 pro A, F a C	Příloha IV	
		Vodní disperze	Nejméně 4 body	ISO 7586:1985 – IDF 112A:1989	
Nařízení (ES) č. 2771/1999 – Soukromé skladování	Nesolené máslo	Tuk	Min. 82 % hm.	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Voda	Až 16 % hm.	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Parametr	Mezní hodnota ([1])	Referenční metoda	Poznámka
		TPS	Až 2 % hm.	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
Nařízení (ES) č. 2771/1999 – Soukromé skladování	Solené máslo	Tuk	Min. 80 % hm.	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Voda	Až 16 % hm.	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		TPS (s výjimkou soli)	Až 2 % hm.	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Sůl	Až 2 % hm.	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
Kapitola II nařízení (ES) č. 1898/2005	Nesolené máslo	Tuk	Min. 82 % hm.	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Nemléčný tuk		Příloha XX	
		Voda	Až 16 % hm.	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		TPS	Až 2 % hm.	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Stopovací látky:			
		— steroly	Viz příloha VIII	Příloha VIII	
		— vanilin	Viz příloha VI	Příloha VI	
		— ethylester kyseliny karotenové	Viz příloha VII	Příloha VII	
		— triglyceridy kyseliny enanthové	Viz příloha V	Příloha V	
Kapitola II nařízení (ES) č. 1898/2005	Solené máslo	Tuk	Min. 80 % hm.	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Nemléčný tuk		Příloha XX	
		Voda	Až 16 % hm.	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		TPS (s výjimkou soli)	Až 2 % hm.	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Sůl	Až 2 % hm.	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Stopovací látky:			
		— steroly	Viz příloha VIII	Příloha VIII	
		— vanilin	Viz příloha VI	Příloha VI	
		— ethylester kyseliny karotenové	Viz příloha VII	Příloha VII	
		— triglyceridy kyseliny enanthové	Viz příloha V	Příloha V	
Kapitola II nařízení (ES) č. 1898/2005	Zahuštěné máslo	Tuk	Min. 99,8 % hm.	IDF 24:1964	

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Parametr	Mezní hodnota ([1])	Referenční metoda	Poznámka
		Voda a TPS	Až 0,2 % hm.	ISO 5536:2002IDF 23:2002 (vlhkost) IDF 24:1964 (TPS)	
		Kyselost tuku	1,2 mmol/100 g tuku	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PČ (max.)	0,5 mekv. O_2/1 000 g tuku	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Poznámka 1
		Nemléčný tuk Chuť Vůně Jiné	Nepřítomnost Čistá Nepřítomnost cizích vůní Nepřítomnost neutralizačních činidel, antioxidantů a konzervačních činidel	Příloha XX	
		Stopovací látky: — steroly — vanilin — ethylester kyseliny karotenové — triglyceridy kyseliny enanthové	 Viz příloha VIII Viz příloha VI Viz příloha VII Viz příloha V	 Příloha VIII Příloha VI Příloha VII Příloha V	
Kapitola II nařízení (ES) č. 1898/2005	Smetana	Tuk	Minimálně 35 % hm.	ISO 2450:1999 – IDF 16 C:1987	
		Nemléčný tuk		Příloha XX	
		Stopovací látky: — steroly — vanilin — ethylester kyseliny karotenové — triglyceridy kyseliny enanthové	 Viz příloha VIII Viz příloha VI Viz příloha VII Viz příloha V	 Příloha VI Příloha V	 Poznámka 2 Poznámka 2
Kapitola III nařízení (ES) č. 1898/2005	Zahuštěné máslo	Tuk	Min. 96 % hm.		Poznámka 2
		Nemléčný tuk		Příloha XX	
		TPS	Až 2 % hm.		Poznámka 2

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Parametr	Mezní hodnota ([1])	Referenční metoda	Poznámka
		Stopovací látky:			
		— stigmasterol (95 % hm.)	15 g/100 g zahuštěného másla	Příloha VIII	
		— stigmasterol (85 % hm.)	17 g/100 g zahuštěného másla	Příloha VIII	
		— triglyceridy kyseliny enanthové	10,34 kg/t zahuštěného másla	Příloha V	
		— ethylester kyseliny máselné a stigmasterol		— ethylester kyseliny máselné — stigmasterol: Příloha VIII	Poznámka 2
		— ethylester kyseliny máselné a triglyceridy kyseliny enanthové		— ethylester kyseliny máselné — triglyceridy kyseliny enanthové: Příloha V	Poznámka 2
		lecitin (E 322)	Až 0,5 % hm.		Poznámka 2
		NaC1	Až 0,75 % hm.	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Kyselost tuku	1,2 mmol/100 g tuku	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		PČ (max.)	Až 0,5 mekv. O_2/1 000 g tuku	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Poznámka 1
		Chuť	Čistá		
		Vůně	Nepřítomnost cizích vůní		
		Jiné	Nepřítomnost neutralizačních činidel, antioxidantů a konzervačních činidel		
Kapitola IV nařízení (ES) č. 1898/2005	Nesolené máslo	Tuk	Min. 82 % hm.	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Voda	Až 16 % hm.	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		TPS	Až 2 % hm.	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
Kapitola IV nařízení (ES) č. 1898/2005	Solené máslo	Tuk	Min. 80 % hm.	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Voda	Až 16 % hm.	ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
		TPS (s výjimkou soli)	Až 2 % hm.	ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
		Sůl	Až 2 % hm.	ISO 15648:2004IDF 179:2004	

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Parametr	Mezní hodnota ([1])	Referenční metoda	Poznámka
Článek 9 a hlava II nařízení (ES) č. 1255/1999	Sýry vyráběné z ovčího a/nebo kozího mléka	Kravské mléko	< 1 % hm.	Příloha IX	
Nařízení (EHS) č. 2921/90	Příloha I – Kyselý kasein	Voda	Až 12,00 % hm.	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tuk	Až 1,75 % hm.	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Volné kyseliny	Až 0,30 ml 0,1 N roztoku NaOH/g	ISO 5547:1978 – IDF 91:1979	
Nařízení (EHS) č. 2921/90	Příloha I – Sladký kasein	Voda	Až 12,00 % hm.	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tuk	Až 1,00 % hm.	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Popeloviny	Min. 7,50 % hm.	ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
Nařízení (EHS) č. 2921/90	Příloha I – Kaseináty	Voda	Až 6,00 % hm.	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Mléčná bílkovina	Min. 88,00 % hm.	ISO 5549:1978 – IDF 92:1979	
		Tuk a popeloviny	Až 6,00 % hm.	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Vázané popeloviny		ISO 5544:1978 – IDF 89:1979	
		Popeloviny		ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
Nařízení (EHS) č. 2921/90	Příloha II – Kyselý kasein	Voda	Až 10,00 % hm.	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tuk	Až 1,50 % hm.	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Volné kyseliny	Až 0,20 ml 0,1 N roztoku NaOH/g	ISO 5547:1978 – IDF 91:1979	
		CPB (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Poznámka 3
		Koliformní bakterie	Nepřítomnost v 0,1 g	Příloha X	Poznámka 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Poznámky 3 a 4
Nařízení (EHS) č. 2921/90	Příloha II – Sladký kasein	Voda	Až 8,00 % hm.	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Tuk	Až 1,00 % hm.	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Popeloviny	Min. 7,50 % hm.	ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
		CPB (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Poznámka 3
		Koliformní bakterie	Nepřítomnost v 0,1 g	Příloha X	Poznámka 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Poznámky 3 a 4

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Parametr	Mezní hodnota ([1])	Referenční metoda	Poznámka
Nařízení (EHS) č. 2921/90	Příloha II – Kaseináty	Voda	Až 6,00 % hm.	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Mléčná bílkovina	Min. 88,00 % hm.	ISO 5549:1978 – IDF 92:1979	
		Tuk a popeloviny	Až 6,00 % hm.	ISO 5543:2004IDF 127:2004 ISO 5544:1978 – IDF 89:1979 nebo ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
		CPB (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Poznámka 3
		Koliformní bakterie	Nepřítomnost v 0,1 g	Příloha X	Poznámka 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Poznámky 3 a 4
Nařízení (EHS) č. 2921/90	Příloha III – Kaseináty	Voda	Až 6,00 % hm.	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Mléčná bílkovina	Min. 85,00 % hm.	ISO 5549:1978 – IDF 92:1979	
		Tuk	Až 1,50 % hm.	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Laktóza	Až 1,00 % hm.	ISO 5548:2004IDF 106:2004	
		Popeloviny	Až 6,50 % hm.	ISO 5544:1978 – IDF 89:1979 nebo ISO 5545:1978 – IDF 90:1979	
		CPB (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Poznámka 3
		Koliformní bakterie	Nepřítomnost v 0,1 g	Příloha X	Poznámka 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Poznámky 3 a 4
Nařízení (ES) č. 2799/1999	Krmné směsi a sušené odstředěné mléko (SOM) (pro použití v krmivech)	Voda (sušené kysané podmáslí)	Až 5 % hm.	Příloha XIX	
		Bílkoviny	31,4 % hm. (min.) v tukoprosté sušině	ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
		Voda (SOM)	Až 5 % hm.	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Tuky (SOM)	Až 11 % hm.	ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987	
		Syřidlová syrovátka (SOM)	Nepřítomnost	Příloha XIII	Poznámka 6
		Škrob (SOM)	Nepřítomnost	Příloha XVII	
		Voda (směsi)	Až 5 % v tukoprosté sušině	ISO 5537:2004IDF 26:2004	

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Parametr	Mezní hodnota (1)	Referenční metoda	Poznámka
		Tuk (směsi)		Směrnice Komise 84/4/EHS (Úř. věst. L 15, 18.1.1984, s. 29)	
		Syřidlová syrovátka (směsi)	Nepřítomnost	Příloha XIII	
		Obsah SOM (v konečném výrobku)	Min. 50 % hm.	Příloha XVI	
		Tuk (v konečném výrobku)	Min. 2,5 % hm. nebo 5 % hm.	Směrnice Komise 84/4/EHS (Úř. věst. L 15, 18.1.1984, s. 29)	Poznámka 7
		Škrob (v konečném výrobku)	Min. 2 % hm.	Příloha XVII	Poznámka 8
		Měď (v konečném výrobku)	25 ppm	Směrnice Komise 78/633/EHS (Úř. věst. L 206, 26.7.1987, s. 43)	
Nařízení (ES) č. 214/2001	SOM (sušené rozprašováním)	Tuk	Až 1,0 % hm.	ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987	
		Bílkoviny	31,4 % (2)hm. (min.) v tukoprosté sušině	ISO 8968–1/2:2001IDF 20–1/2:2001	
		Voda	Až 3,5 % hm.	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Kyselost	Až 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10 g tukoprosté sušiny	ISO 6091:1980 – IDF 86:1981	
		Mléčnany	Až 150 mg/100 g tukoprosté sušiny	ISO 8069:2005IDF 69:2005	
		Fosfatáza	Negativní	ISO 11816–1:2006IDF 155–1:2006	
		Index nerozpustnosti	Až 0,5 ml při 24 °C	ISO 8156:2005IDF 129:2005	
		Připálené částice	Filtr A nebo B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		CPB	40 000/g	ISO 4833:2003	Poznámka 3
		Koliformní bakterie	Negativní/0,1 g	Příloha X	Poznámka 3
		Podmáslí	Negativní	Příloha XIV	
		Syřidlová syrovátka	Negativní	Příloha XII	
		Kyselá syrovátka	Negativní		Poznámka 2
		Antimikrobiální látky		Příloha XV	

(1) Aniž jsou dotčeny požadavky v příslušném nařízení.
(2) Minimální obsah bílkovin bude od 1. září 2009 činit 34 %.

▼B

ČÁST B

Referenční metody uvedené v části B mohou být používány pro analýzu produktů, na které se vztahuje jakékoliv z nařízení uvedených ve sloupci 1.

Nařízení Komise	Produkt	Kód KN	Parametr	Mezní hodnota	Referenční metoda	Poznámka
Nařízení (EHS) č. 2658/87 Nařízení (ES) č. 2535/2001 Nařízení (ES) č. 1282/2006	Mléko a smetana, nezahuštěné, neobsahující přidaný cukr ani jiná sladidla	0401	Tuk (≤ 6 % hm.)	Mezní hodnoty jsou hodnoty stanovené v popisu kódu KN pro konkrétní produkt a případně blíže určené v nařízení Komise (EHS) č. 3846/87 (Úř. věst. L 366, 24.12.1987, s. 1), části 9 vývozní nomenklatury, nebo nařízení (ES) č. 2535/2001 (Úř. věst. L 341, 22.12.2001, s. 29).	ISO 1211:2001 – IDF 1D:1996	
			Tuk (> 6 % hm.)		ISO 2450:1999 – IDF 16C:1987	
	Mléko a smetana, zahuštěné nebo obsahující přidaný cukr nebo jiná sladidla	0402	Tuk (v tekuté formě)		ISO 1737:1999 – IDF 13C:1987	
			Tuk (v tuhé formě)		ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987	
			Bílkoviny		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Sacharóza (normální obsah)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacharóza (nízký obsah)			Poznámka 2
			Sušina (SKM)		ISO 6734:1989 – IDF 15B:1991	
			Sušina (ZMS)		ISO 6731:1989 – IDF 21B:1987	
			Voda (sušené mléko)		ISO 5537:2004/IDF 26:2004	
			Voda (sušená smetana)		Příloha XVIII	

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Kód KN	Parametr	Mezní hodnota	Referenční metoda	Poznámka
	Podmáslí, fermentované (kysané) nebo acidofilní mléko a smetana, zahuštěné nebo nezahuštěné, obsahující přidaný cukr nebo jiná sladidla	0403	Tuk		ISO 1211:2001 – IDF 1D:1996 ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987 ISO 2450:1999 – IDF 16C:1987 ISO 7208:1999 – IDF 22B:1987 ISO 8262–3:2005 – IDF 124–3:2005	
			Bílkoviny		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Sacharóza (normální obsah)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacharóza (nízký obsah)			Poznámka 2
			Voda (sušené kysané podmáslí)		Příloha XIX	
			Voda (sušené sladké podmáslí)		ISO 5537:2004IDF 26:2004	
			Sušina (ostatní produkty)		Metody schválené příslušným orgánem	
	Syrovátka, též zahuštěná nebo obsahující přidaný cukr nebo jiná sladidla; výrobky sestávající z přírodních složek mléka	0404	Tuk		ISO 1736:2000 – IDF 9C:1987 ISO 2450:1999 – IDF 16C:1987 ISO 7208:1999 – IDF 22B:1987	
			Bílkoviny		ISO 8968–123:2001IDF 20–123:2001	
			Sacharóza (normální obsah)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacharóza (nízký obsah)			Poznámka 2
		0404 90	Bílkoviny		ISO 8968 1/2 2001IDF 20–1/2:2001	
			Voda		IDF 21B:1987	
			Sušina		ISO 6734:1989 – IDF 15B:1991	

▼B

Nařízení Komise	Produkt	Kód KN	Parametr	Mezní hodnota	Referenční metoda	Poznámka
			(Zahuštěné výrobky)		ISO 6731:1989 – IDF 21B:1987	
	Máslo a jiné tuky získané z mléka; mléčné pomazánky	0405	Tuk (je-li ≤ 85 % hm.)		ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Máslo	Voda		ISO 3727–1:2001IDF 80–1:2001	
			TPS		ISO 3727–2:2001IDF 80–2:2001	
			NaCl		ISO 15648:2004IDF 179:2004	
			Tuk (je-li > 99 % hm.)		IDF 24:1964	
	Máselný olej		Voda (je-li tuk < 99 % hm.)		ISO 5536:2002IDF 23:2002	
	Sýry a tvaroh	0406	Tuk		ISO 1735:2004IDF 5:2004	
			Sušina		ISO 5534:2004IDF 4:2004	
			Sušina (Ricotta)		ISO 2920:2004IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006IDF 88:2006	
			Laktóza		ISO 5765–1/2:2002IDF 79–1/2:2002	
Nařízení (EHS) č. 2658/87	Krmné směsi	2309	Laktóza		Příloha XI	

Poznámky k seznamu referenčních metod Evropské unie:

Poznámka 1: Izolace mléčného tuku podle popisu v normě ISO 1740:1991 (ochrana před světlem).

Poznámka 2: Nebyla stanovena žádná referenční metoda. Metody schválené příslušným orgánem.

Poznámka 3: Vzorek je nutno připravit podle normy ISO 8261:2001IDF 122:2001.

Poznámka 4: Inkubace po dobu 48 hodin při teplotě 55 °C; je třeba zabránit vyschnutí živné půdy kultury.

Poznámka 5: % hm. TPS = % hm. sušiny – % hm. tuku.

Poznámka 6: Směrnice Komise 84/4/EHS.

Poznámka 7: Nařízení Komise (ES) č. 2799/1999 (Úř. věst. L 340, 31.12.1999, s. 3-27).

Poznámka 8: Směrnice Komise 78/633/EHS.

▼B

PŘÍLOHA II

(Článek 3)

ZHODNOCENÍ SPLNĚNÍ ZÁKONEM STANOVENÉ MEZNÍ HODNOTY S OHLEDEM NA ŠARŽI

1. PODSTATA METODY

V případech, kdy příslušné právní předpisy stanoví podrobné postupy pro odběr vzorků, dodržují se tyto postupy. Ve všech ostatních případech se používá vzorek nejméně ze 3 jednotek vzorku odebraných náhodně ze šarže odevzdané ke kontrole. Lze připravit i složený vzorek. Získaný výsledek se porovná se zákonem stanovenými mezními hodnotami na základě výpočtu 95 % intervalu spolehlivosti jakožto dvojnásobku směrodatné odchylky, kde příslušná směrodatná odchylka závisí buď na tom, 1) zda byla metoda validována na základě mezinárodní spolupráce s hodnotami pro σr a σ_R, nebo v případě vnitrolaboratorní validace na tom, 2) zda byla vypočítána vnitřní reprodukovatelnost. Tento interval spolehlivosti se potom rovná nejistotě měření výsledku.

2. METODA JE VALIDOVÁNA NA ZÁKLADĚ MEZINÁRODNÍ SPOLUPRÁCE

V tomto případě byla směrodatná odchylka opakovatelnosti σr a směrodatná odchylka reprodukovatelnosti σ_R stanovena a laboratoř může prokázat soulad s pracovními charakteristikami validované metody.

Vypočítá se aritmetický průměr $\bar{x}$ z počtu *n* opakovaných měření.

Vypočítá se rozšířená nejistota ($k = 2$) z $\bar{x}$ takto:

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

Je-li konečný výsledek měření *x* vypočítán ze vzorce ve tvaru $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ nebo $x = y_1 / y_2$, musí se v takových případech postupovat podle běžných postupů pro kombinování směrodatných odchylek.

Šarže se považuje za nevyhovující horní zákonem stanovené mezní hodnotě *UL*, jestliže

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

jinak se má za to, že hodnotě *UL* vyhovuje.

Šarže se považuje za nevyhovující dolní zákonem stanovené mezní hodnotě *LL*, jestliže

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

jinak se má za to, že hodnotě *LL* vyhovuje.

3. VNITROLABORATORNÍ VALIDACE S VÝPOČTEM SMĚRODATNÉ ODCHYLKY VNITŘNÍ REPRODUKOVATELNOSTI

V případech, kdy jsou použity metody, které nejsou stanoveny v tomto nařízení, a kdy nebyla stanovena opatření pro zajištění shodnosti, je třeba provést vnitrolaboratorní validaci. Namísto σ_r a σ_R se musí ve vzorci pro výpočet rozšířené nejistoty *U* použít směrodatná odchylka vnitřní opakovatelnosti s_{ir} a směrodatná odchylka vnitřní reprodukovatelnosti s_{iR}.

Pravidla rozhodování jsou stejná jako v bodě 1. Považuje-li se však šarže za nesplňující zákonem stanovenou mezní hodnotu, musí se měření opakovat pomocí metody stanovené v tomto nařízení a rozhodnutí musí být dosaženo podle bodu 1.

▼B

PŘÍLOHA III

(Článek 4)

HODNOCENÍ POSUZOVATEL Ů A SPOLEHLIVOST VÝSLEDKŮ ORGANOLEPTICKÝCH ANALÝZ

V případě použití bodovacích metod (norma IDF 99C: 1997) se použijí tyto postupy:

A. STANOVENÍ „UKAZATELE OPAKOVATELNOSTI“

Jeden posuzovatel musí během 12 měsíců analyzovat nejméně deset vzorků jako slepé duplikáty. Jednotlivé analýzy obvykle provádí v odlišných termínech. Výsledky týkající se charakteristických znaků jednotlivých produktů se vyhodnotí pomocí tohoto vzorce:

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

kde:

w_1: ukazatel opakovatelnosti

x_{i1}: počet bodů pro první hodnocení vzorku x_i

x_{i2}: počet bodů pro druhé hodnocení vzorku x_i

n: počet vzorků

Hodnocené vzorky musí představovat široký rozsah jakosti. Hodnota w_1 nesmí překročit 1,5 bodu (na pětibodové stupnici).

B. STANOVENÍ „UKAZATELE ODCHYLEK“

Tento ukazatel se musí používat pro kontrolu, zda posuzovatel používá pro hodnocení jakosti stejnou stupnici jako zkušená skupina posuzovatelů. Počet bodů přidělených posuzovatelem se porovnává s průměrným počtem bodů, které přidělila skupina posuzovatelů.

Pro hodnocení výsledků se použije tento vzorec:

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

kde:

x_{i1}; x_{i2}: viz část A

$\overline{x}_{i1}$; $\overline{x}_{i2}$: průměrný počet bodů skupiny posuzovatelů pro první a druhé hodnocení vzorku x_i

n: počet vzorků (nejméně deset za 12 měsíců).

Hodnocené vzorky musí představovat široký rozsah jakosti. Hodnota D_I nesmí překročit 1,5 bodu (na pětibodové stupnici).

Členské státy musí informovat o všech potížích, s nimiž se při používání tohoto postupu setkají.

Jestliže se zjistí, že ukazatele odchylek a opakovatelnosti u jednotlivých posuzovatelů překročí hranici 1,5 bodu, musí odborník (odborníci) příslušného orgánu provést jednu nebo několik náhodných „opakovaných“ kontrol na vzorcích jakostně setříděných během několika následujících týdnů, anebo musí s těmito posuzovateli provést jednu nebo několik „doprovázených“ kontrol. Důkladné sledování je nutné k rozhodnutí, zda nadále využívat jejich služeb. Zjištění musí být zaznamenána a uchována jako důkaz pro následná opatření.

▼B

C. POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ ZÍSKANÝCH V RŮZNÝCH REGIONECH ČLENSKÉHO STÁTU A V RŮZNÝCH ČLENSKÝCH STÁTECH

V případě potřeby musí být nejméně jednou za rok zorganizována zkouška, která umožní porovnat výsledky získané posuzovateli z různých regionů. Pokud se zjistí významné rozdíly, je třeba přijmout nezbytná opatření, aby byly zjištěny důvody těchto rozdílů a dosaženy srovnatelné výsledky.

Členské státy mohou organizovat zkoušky, které umožní porovnat výsledky získané jejich vlastními posuzovateli a posuzovateli ze sousedních členských států. V případě zjištění významných rozdílů je nutné provést důkladné šetření, aby byly dosaženy srovnatelné výsledky.

Členské státy sdělí výsledky těchto porovnání Komisi.

▼B

PŘÍLOHA IV

(Článek 4)

ORGANOLEPTICKÉ HODNOCENÍ MÁSLA

1. OBLAST POUŽITÍ

Cílem tohoto postupu organoleptického hodnocení másla je stanovit jednotnou metodu použitelnou ve všech členských státech.

K bližším podrobnostem viz platná mezinárodní norma IDF pro mléko a mléčné výrobky, IDF 99 –části 1, 2, 3 o organoleptickém hodnocení.

2. DEFINICE

„Organoleptickým hodnocením“ se rozumí posuzování vlastností produktů smyslovými orgány.

„Porotou“ se rozumí skupina vybraných posuzovatelů, kteří během hodnocení pracují, aniž by mezi sebou komunikovali nebo se vzájemně ovlivňovali.

„Posuzovatel“ je osoba zvolená pro svou schopnost provést organoleptickou zkoušku. Tento posuzovatel může mít omezené zkušenosti.

„Odborný posuzovatel“ je osoba s vysokým stupněm organoleptické citlivosti a se zkušenostmi s organoleptickými metodami, jež je schopná provádět soustavná a spolehlivá organoleptická hodnocení různých produktů. Tento posuzovatel má dlouhodobou smyslovou paměť.

„Bodovým hodnocením“ se rozumí organoleptické hodnocení, které vypracuje porota za použití číselné řady. Musí být používána nomenklatura vad.

„Tříděním“ se rozumí třídění podle jakosti prováděné na základě bodového hodnocení.

„Kontrolními dokumenty“ se rozumí dokumenty používané k zaznamenávání bodového hodnocení každé vlastnosti a konečné jakostní třídy produktu (v těchto dokumentech může být rovněž zapsáno chemické složení).

3. ZKUŠEBNÍ MÍSTNOST

K bližším podrobnostem viz normy ISO 8589 a ISO/DIS 22935–2 IDF 99–2 odstavec 7.

Musí být přijata opatření, aby ve zkušební místnosti nepůsobily na posuzovatele vnější faktory.

Zkušební místnost musí být prosta cizích pachů a musí být snadné ji udržovat v čistotě. Stěny musí mít světlou a nereflexní barvu.

Zkušební místnost a její osvětlení nesmějí ovlivňovat vlastnosti bodově hodnocených produktů.

Místnost musí být vybavena vhodnou regulací teploty, aby bylo možno zachovat stálou teplotu másla. Máslo by mělo mít v době třídění teplotu 12 °C (± 2 °C).

4. VÝBĚR POSUZOVATELŮ

Posuzovatel musí být dobře obeznámen s výrobky z másla a musí být způsobilý provádět organoleptické jakostní třídění. Jeho způsobilost musí pravidelně (nejméně jednou ročně) posuzovat příslušný orgán.

4.1 Bližší informace o obecných požadavcích a screeningových zkouškách, které lze použít před oficiálním použitím nového posuzovatele, jsou uvedeny v normě ISO/DIS 22935–1 IDF 99–1 odstavec 4 (nábor) a odstavec 5.1.

Je nezbytně nutné, aby probíhalo školení a aby se pravidelně konaly valné hromady. Informace o školení poroty jsou uvedeny v normě ISO 8586–1.

▼B

4.2 Počáteční školení by mělo zahrnovat:

— obecnou teorii a praktickou důležitost organoleptického hodnocení,

— metody, stupnice a popis organoleptických dojmů,

— zjištění a rozpoznání organoleptických vlastností a zvláštní organoleptické termíny,

— základní školení o výrobě másla,

— ověřené reference a vzorky, které posuzovateli pomohou stanovit určité chutě a jejich intenzitu v produktu.

5. POŽADAVKY KLADENÉ NA POROTU

Porota se musí skládat z lichého počtu posuzovatelů, a to nejméně tří. Většinu z nich musí tvořit zaměstnanci příslušného orgánu nebo schválené osoby, které nejsou zaměstnány v mlékárenském průmyslu.

Předseda poroty odpovídá za celkový postup a může být součástí poroty.

Před hodnocením je třeba vzít v úvahu řadu faktorů, aby členové poroty podali optimální výkon:

— členové poroty nesmějí trpět žádnou chorobou, která by ovlivnila jejich výkon. Pokud taková okolnost nastane, je třeba dotčeného posuzovatele nahradit v porotě jiným,

— členové poroty se k hodnocení musí dostavit včas a vyhradit si na provedení hodnocení dostatek času,

— členové poroty nesmějí používat silně vonící látky jako parfém, vodu po holení, deodorant atd., ani jíst silně aromatizovaná (např. silně kořeněná) jídla atd.,

— členové poroty nesmějí poslední půl hodinu před hodnocením kouřit, jíst ani pít nic jiného než vodu.

6. VÝKONNOST

Všichni posuzovatelé se musí účastnit pravidelných organoleptických porot, aby si udrželi svou kvalifikaci. Častost zasedání porot závisí na objemu a množství másla; je-li to možné, měla by každý měsíc zasednout alespoň jedna porota.

Několika zasedání porot by se každý rok měli účastnit i zkušení posuzovatelé, a to alespoň jednou za čtvrt roku, je-li to možné.

7. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Je nezbytné, aby během hodnocení nebyla známa totožnost vzorků a aby se tak zabránilo případné zaujatosti. Vzorky by měly být označeny kódy.

Odběr a přípravu vzorků je nutno zorganizovat před začátkem hodnocení. Musí se stanovit požadavek na teplotu másla během přepravy do zkušební místnosti (6 °C ± 2 °C).

Pokud se organoleptické hodnocení provádí v chladírenském skladu, vzorek se odebírá pomocí máslové sondy. Pokud se organoleptické hodnocení provádí na jiném místě než v chladírenském skladu, je třeba odebrat vzorek nejméně o hmotnosti 500g. Během hodnocení by máslo mělo mít teplotu 12 °C (± 2 °C) (viz teplota pro hodnocení másla, jež je v normě ISO/DIS 22935–2 IDF 99–2 stanovená na 14 °C ± 2 °C). Větším odchylkám od této teploty je nutno za každou cenu zabránit.

8. POSOUZENÍ HODNOTY KAŽDÉ VLASTNOSTI

8.1 Organoleptické hodnocení musí být provedeno u třech následujících vlastností: vzhledu, konzistence a chuti.

„Vzhled“ se týká těchto znaků: barvy, zjevné čistoty, nepřítomnosti fyzického znečištění, nepřítomnosti tvorby plísní a stejnoměrnosti vodní disperze. Vodní disperze se testuje podle normy IDF 112A/1989.

▼B

„Konzistence“ se týká těchto znaků: struktury, textury a tuhosti. Pokud si tak členský stát přeje v zájmu uspokojení požadavků zákazníků, může pomocí fyzikálních prostředků sledovat roztíratelnost. Komise může rozhodnout, že tyto metody v budoucnu harmonizuje.

„Struktura“ je termín, kterým se označuje soudržnost produktu při konzumaci. Obvykle se spojuje s tuhostí a roztíratelností, přičemž by měla být v celém produktu stejnoměrná. Úzce souvisí s texturou a označuje schopnost produktu držet tvar pod vlastní vahou. Projevuje se odolností při krájení a lze ji měřit mechanicky a pocitem v ústech a mezi prsty.

„Chuť“ je vlastnost, kterou vnímáme v ústech, a to zejména chuťovými pohárky na jazyku.

„Vůně“ je vlastnost, kterou vnímáme nosem a čichem.

Významná odchylka od doporučené teploty brání tomu, aby konzistence a chuť byly spolehlivě ohodnoceny. Teplota má klíčový význam.

Jestliže je teplota mimo doporučené rozmezí, musí být třídění másla odloženo.

8.2 Organoleptické hodnocení každé vlastnosti musí být prováděno samostatně. Bodové hodnocení se musí provádět podle tabulky 1.

8.3 Může být žádoucí, aby v zájmu jednotnosti posuzovatelé před zahájením hodnocení společně přidělili body jednomu nebo více referenčním vzorkům za vzhled, konzistenci a chuť.

8.4 Počet bodů nutných pro přijetí je stanoven takto:

Viz část 7 – Nomenklatura a popis kritérií týkajících se bodů při bodování.

	Maximum	Požadavek
Vzhled	5	4
Konzistence	5	4
Chuť/vůně	5	4

— Pokud není dosažen požadovaný počet bodů, musí být uveden popis vady.

— Počet bodů od každého posuzovatele pro každou vlastnost musí být zapsán do kontrolního dokumentu.

— Produkt je přijat, nebo zamítnut na základě rozhodnutí většiny.

— Případy, kdy jsou rozdíly mezi jednotlivými bodovými hodnoceními každé vlastnosti větší než jeden bod, by se neměly vyskytovat často (nejvýše jednou u každých 20 vzorků). V opačném případě musí předseda poroty prověřit způsobilost poroty.

9. DOZOR

Předseda poroty, jenž musí být řádným zaměstnancem příslušného orgánu a může být členem poroty, musí nést obecnou odpovědnost za celý postup. Je povinen zapisovat bodové hodnocení každé vlastnosti do kontrolního dokumentu a potvrdit, zda je produkt přijat, nebo zamítnut.

10. NOMENKLATURA

Viz tabulka 2 uvedená v příloze.

11. NORMATIVNÍ ODKAZY

FIL-IDF 99C:1997 Senzorické hodnocení mléčných výrobků bodovým hodnocením – Referenční metoda

ISO/DIS 22935 IDF 99 Mezinárodní norma pro mléko a mléčné výrobky – Senzorická analýza – Části 1–3

▼B

ISO 8586–1 Senzorická analýza – Obecná směrnice pro výběr, výcvik a sledování činnosti posuzovatelů – Část 1

ISO 8589 Senzorická analýza – Obecná směrnice pro uspořádání senzorického pracoviště

FIL-IDF 112A:1989 Máslo – Stanovení hodnoty vodní disperze

Tabulka 1

Bodové hodnocení másla

Vzhled			Konzistence			Chuť + vůně		
Body	Č. (1)	Poznámky	Body (jakostní třída)	Č. (1)	Poznámky	Body (jakostní třída)	Č. (1)	Poznámky
5		*Velmi dobrý* ideální druh nejvyšší jakost (rovnoměrný suchý)	5		*Velmi dobrá* ideální druh nejvyšší jakost (dobře roztíratelné)	5		*Velmi dobré* ideální druh nejvyšší jakost (absolutně čisté nejjemnější aroma)
4		*Dobrý* (2) bez zjevných vad	4	 17 18	*Dobrá* (2) tvrdá měkká	4		*Dobré* (2) bez zjevných vad
3	 1 2 3 4 5 6 7 8	*Uspokojivý (drobné vady)* vodnatý, se zřetelnými kapičkami vody nejednotné barvy, dvojbarevný pruhovaný žilkovaný, mramorovaný skvrnitý oddělování oleje nadměrné vybarvení porézní textura	3	 14 15 16 17 18	*Uspokojivá (drobné vady)* drobivá, křehká, hrudky pastovitá, těstovitá, mazlavá lepivá tvrdá měkká	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Uspokojivé (drobné vady)* nevýrazné cizí chuť kyselé chuť po vaření, připálená chuť chuť krmiva trpké, hořké přesolené
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Špatný (zjevné vady)* vodnatý, se zřetelnými kapičkami vody pruhovaný žilkovaný, mramorovaný skvrnitý oddělování oleje cizí látky plesnivý nerozpuštěná sůl	2	 14 15 16 17 18	*Špatná (zjevné vady)* drobivá, křehká, hrudky pastovitá, těstovitá, mazlavá lepivá tvrdá měkká	2	 21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Špatné (zjevné vady)* nevýrazné cizí chuť zvětralé kyselé oxidovaná, kovová chuť chuť krmiva trpké, hořké přesolené zatuchlé, hnilobné po chemikáliích
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Velmi špatný (závažné vady)* vodnatý, se zřetelnými kapičkami vody pruhovaný žilkovaný, mramorovaný skvrnitý oddělování oleje nadměrné vybarvení zrnitý cizí látky plesnivý nerozpuštěná sůl	1	 14 15 16 17 18	*Velmi špatná (závažné vady)* drobivá, křehká, hrudky pastovitá, těstovitá, mazlavá lepivá tvrdá měkká	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Velmi špatné (závažné vady)* cizí chuť sýrovité, mléčně sýrové kyselé po kvasnicích po plísni žluklé olejovité, rybina lojovité oxidovaná, kovová chuť trpké, hořké přesolené zatuchlé, hnilobné po sladu po chemikáliích

(1) Tabulka 2.
(2) Vady uvedené pod hodnocením „dobrý“ představují pouze velmi malé odchylky od ideálního druhu.

▼B

Tabulka 2

Tabulka vad másla

I.	Vzhled
1.	vodnatý, se zřetelnými kapičkami vody
2.	nejednotné barvy, dvojbarevný
3.	pruhovaný
4.	žilkovaný, mramorovaný
5.	skvrnitý
6.	oddělování oleje
7.	nadměrné vybarvení
8.	porézní textura
9.	zrnitý
10.	cizí látky
11.	plesnivý
12.	nerozpuštěná sůl
II.	Konzistence
14.	drobivá, křehká, hrudky
15.	pastovitá, těstovitá, mazlavá
16.	lepivá
17.	tvrdá
18.	měkká
III.	Chuť a vůně
20.	bez chuti
21.	nevýrazné ([1])
22.	cizí chuť
23.	zvětralé
24.	sýrovité, mléčně sýrové
25.	kyselé
26.	po kvasnicích
27.	a) chuť po vaření
	b) připálená chuť
28.	po plísni
29.	žluklé
30.	olejovité, rybina
31.	lojovité
32.	a) oxidovaná chuť
	b) kovová chuť
33.	chuť krmiva
34.	trpké, hořké
35.	přesolené
36.	zatuchlé, hnilobné
37.	po sladu
38.	po chemikáliích

([1]) Toto označení je třeba používat co nejméně a jen tehdy, nelze-li vadu popsat přesněji.

▼B

PŘÍLOHA V

(Článek 5)

STANOVENÍ OBSAHU TRIGLYCERIDU KYSELINY ENANTHOVÉ V MÁSLE, MÁSELNÉM OLEJI A SMETANĚ PLYNOVOU CHROMATOGRAFICKOU ANALÝZOU TRIGLYCERIDŮ

1. OBLAST POUŽITÍ

Tento postup vymezuje metodu stanovení obsahu triglyceridu kyseliny enanthové v máselném oleji, másle a smetaně.

2. TERMÍNY A DEFINICE

Obsah kyseliny enanthové: obsah triglyceridu kyseliny enanthové stanovený postupem uvedeným v této metodě.

Poznámka: Obsah kyseliny enanthové se vyjadřuje v kilogramech na tunu výrobku v případě máselného oleje a másla a v kilogramech na tunu mléčného tuku v případě smetany.

3. PODSTATA METODY

V souladu s normou ISO 14156 IDF 172:2001 se z různých výrobků extrahuje mléčný tuk. Kvantitativní stanovení obsahu trigliceridu kyseliny enanthové v extrahovaném tuku se určí pomocí kapilární plynové chromatografie (GC). Výsledek získaný ze vzorku se vyhodnotí porovnáním s triglyceridem kyseliny kapronové jako vnitřním standardem.

Poznámka: Bylo zjištěno, že vhodným vnitřním standardem je také tributyrin.

4. CHEMIKÁLIE

Použijte pouze chemická činidla uznávané analytické čistoty.

4.1 n-hexan

4.2 Běžný triglycerid kyseliny kapronové, čistota nejméně 99 %

4.3 Běžný triglycerid kyseliny enanthové, čistota nejméně 99 %

4.4 Bezvodý síran sodný (Na_2SO_4)

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a zejména:

5.1 Analytické váhy s přesností na 1 mg

5.2 Odměrné baňky o objemu 10 ml a 20 ml

5.3 Odstředivkové zkumavky o objemu 30 ml

5.4 Rotační odparka

5.5 Pec, kterou lze udržovat na teplotě 50 °C ± 5 °C

5.6 Filtrační papír střední pórovitosti o průměru asi 15 cm

5.7 Plynové chromatografické zařízení

5.7.1 Plynový chromatograf s děleným/nedděleným (tzv. split/splitless) nebo kolonovým (tzv. on-column) nástřikovým zařízením a plamenově ionizačním detektorem (FID)

5.7.2 GC kolona se stacionární fází, která se ukázala být vhodnou při provádění separace triglyceridů (100 % dimethylpolysiloxan, nebo 5 % fenyl – 95 % methylpolysiloxan). Zvolte stacionární fázi, délku kolony (od 4 m do 15 m), vnitřní průměr (od 0,22 mm do 0,50 mm) a tloušťku filmu (0,12 μm nebo více) s přihlédnutím k laboratorním zkušenostem a použitému nástřikovému sytému. Zvolená kolona by v každém případě měla umožnit sledovat jak úplné rozdělení mezi píkem rozpouštědla a triglyceridem kyseliny kapronové, tak rozlišení základní linie mezi píky triglyceridu kyseliny kapronové a enanthové. Příklady použitelných podmínek jsou uvedeny níže.

▼B

5.7.2.1 Příklad použitelných podmínek s využitím děleného nástřikového zařízení:

— nosný plyn: helium,

— tlak na koloně: 100 kPa,

— kolona: kolona z křemenného skla o délce 12 m, vnitřním průměru 0,5 mm, tloušťce filmu 0,1 μm,

— stacionární fáze: 100 % dimethylpolysiloxan, nebo 5 % fenyl – 95 % dimethylpolysiloxan (např. HT5),

— teplota kolony: počáteční teplota 130 °C udržovaná po dobu 1 minuty, zvýšená rychlostí 20 °C/min na 260 °C a poté zvýšená rychlostí 30 °C/min na 360 °C; udržujte při teplotě 360 °C po dobu 10 min,

— teplota detektoru: 370 °C,

— teplota nástřikového zařízení: 350 °C,

— poměr rozdělení 1:30,

— množství nastříknutého vzorku: 1 μl.

5.7.2.2 Příklad použitelných podmínek s využitím kolonového nástřikového zařízení:

— nosný plyn: vodík (systém s konstantním průtokem),

— tlak na koloně: 89 kPa,

— kolona: kolona z křemenného skla o délce 4 m, vnitřním průměru 0,32 mm, tloušťce filmu 0,25 μm,

— stacionární fáze: 5 % fenyl, 95 % dimethylpolysiloxan,

— teplota kolony: počáteční teplota 60 °C udržovaná po dobu 2 minut, zvýšená rychlostí 35 °C/min na 340 °C a udržovaná při této teplotě po dobu 5 min,

— teplota detektoru: 350 °C,

— množství nastříknutého vzorku: 1 μl.

5.8 Injekční stříkačka o objemu 5 μl

6. ODBĚR VZORKŮ

Je důležité, aby laboratoř obdržela vzorek, který je skutečně reprezentativní a který nebyl během přepravy nebo skladování poškozen ani změněn.

Odběr vzorků není součástí metody uvedené v této mezinárodní normě. Doporučená metoda odběru vzorků je uvedena v normě IDF 50C:1995 nebo ISO 707–1997 – Mléko a mléčné výrobky – Směrnice pro odběr vzorků.

7. PRACOVNÍ POSTUP

7.1 **Příprava zkušebního vzorku a zkušební dávky**

Postupujte podle normy ISO 14156 IDF 172:2001.

7.1.1 *Máselný olej, máslo*

7.1.1.1 Rozpusťte 50 až 100 g zkušebního vzorku v peci (5.5).

7.1.1.2 Do složeného filtračního papíru vložte 0,5 g až 1,0 g bezvodého síranu sodného (5.4).

7.1.1.3 Přefiltrujte tuk přes filtrační papír obsahující bezvodý síran sodný a filtrát zachyťte do kádinky ponechané v peci (5.5). Při přelévání rozpuštěného másla na filtrační papír dávejte pozor na to, aby nedošlo k přenosu séra.

7.1.2 *Smetana*

7.1.2.1 Zahřejte zkušební vzorek na teplotu 20 °C ± 2 °C.

7.1.2.2 Důkladně vzorek promíchejte.

7.1.2.3 Rozpusťte vhodné množství zkušebního vzorku tak, abyste získali 10 ml zkušební dávky s hmotnostním zlomkem tuku asi 4 %.

▼B

7.1.2.4 Při extrahování tuku ze smetany postupujte jako v případě syrového a homogenizovaného mléka (viz ISO 14156 IDF 172:2001, §8.3).

7.1.2.5 V odměrné baňce na 10 ml (5.2) odměřte 1 g extrahovaného tuku s přesností na 1 mg. Přidejte 1 ml roztoku 7.2.2. Doplňte na 10 ml n-hexanem (4.1) a homogenizujte.

7.1.2.6 Přidejte 1 ml roztoku 7.1.1.2 do odměrné baňky na 10 ml (5.2) a nařeďte ho na 10 ml n-hexanem (4.1).

7.2 **Příprava kalibračních standardů**

7.2.1 Rozpusťte 10 mg triglyceridu kyseliny enanthové (4.3) v 10 ml n-hexanu (4.1).

7.2.2 Rozpusťte 10 mg triglyceridu kyseliny kapronové (4.2) v 10 ml n-hexanu (4.1).

7.2.3 Přidejte 1 ml roztoku 7.2.2 do odměrné baňky na 10 ml (5.2). Doplňte na 10 ml n-hexanem (4.1).

7.2.4 Přidejte 1 ml roztoku 7.2.1 a 1 ml roztoku 7.2.2 do odměrné baňky na 10 ml (5.2). Doplňte na 10 ml n-hexanem (4.1).

7.2.5 Přidejte 1 ml roztoku 7.2.4 do odměrné baňky na 10 ml (5.2) a doplňte na 10 ml n-hexanem (4.1).

7.3 **Chromatografické stanovení**

7.3.1 Nastříkněte dvakrát 1 µl standardního roztoku 7.2.5.

7.3.2 Nastříkněte 1 µl každého roztoku vzorku.

Poznámka: Použije-li se kolonový nástřikový systém, měly by se jak standardní roztok, tak roztoky vzorků více naředit.

7.3.3 Opakujte operaci 7.3.1 u každého třetího vzorku tak, abyste na začátku a na konci skupiny vzorků provedli vždy dva standardní nástřiky. Výsledky jsou založeny na středním průměru odezvových faktorů ze standardních chromatogramů.

8. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

U každého chromatogramu určete oblast píků souvisejících s triglyceridy kyseliny enanthové a kyseliny kapronové.

Řiďte se těmito pokyny u každé ohraničené řady, tj. u každé skupiny ohraničených vzorků je standardním roztokem nastříknutým dvakrát bezprostředně před ní STD_1 a standardním roztokem nastříknutým dvakrát bezprostředně po ní STD_2.

8.1 **Kalibrace**

8.1.1 Vypočítejte odezvový faktor $Rf_1(a)$ a $Rf_1(b)$ pro každý duplikát STD_1

Rf_1 (a) nebo (b) = (plocha píků triglyceridu kyseliny kapronové/plocha píků triglyceridu kyseliny enanthové) × 100

Vypočítejte střední průměr odezvového faktoru Rf_1:

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

8.1.2 Obdobným způsobem vypočítejte střední průměr odezvového faktoru Rf_2 pro STD_2

8.1.3 Vypočítejte střední průměr odezvového faktoru Rf

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

8.2 **Zkušební vzorky**

Pro každý chromatogram vzorků získaný mezi STD_1 a STD_2 vypočítejte obsah kyseliny enanthové C (kg/t):

C = (plocha píků triglyceridu kyseliny enanthové × Rf × 100)/(plocha píků triglyceridu kyseliny kapronové × Wt × 1 000)

kde:

— Wt = váha odebraného tuku (g),

— 100 = objem zředěného vzorku,

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

▼B

V případě vzorků másla přihlédněte k obsahu tuku v másle a vypočítejte upravenou hodnotu koncentrace $C_{máslo}$ (kg/t másla)

$$C_{máslo} = C_{tuk} \times F$$

kde F je obsah tuku v másle.

9. SHODNOST

Podrobnosti o mezilaboratorní zkoušce másla podle norem ISO 5725–1 a ISO 5725–2 týkající se přesné metody jsou uvedeny v bodě (12).

Mezní hodnoty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsou vyjádřeny pro 95 % pravděpodobnost a nemusí být použitelné na jiné než uvedené rozsahy koncentrací a matrice.

9.1 **Opakovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou jednotlivých zkoušek získaných s krátkým časovým odstupem stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem používajícím stejné zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než 0,35 kg/t.

9.2 **Reprodukovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou jednotlivých zkoušek získaných stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu v různých laboratořích a různými pracovníky používajícími odlišná zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než 0,66 kg/t.

10. MEZE TOLERANCE: DOLNÍ MEZE (PŘÍPAD NEDOSTATEČNÝCH MNOŽSTVÍ)

10.1 **Z produktu obsahujícího stopovací látku musí být odebrány tři vzorky pro ověření, zda zavedení této látky do produktu bylo provedeno správně.**

10.2 **Máslo a zahuštěné máslo**

10.2.1 Dávkování je 11 kg triglyceridu kyseliny enanthové o čistotě 95 % na jednu tunu másla, tj. 10,45 kg/t.

10.2.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 9,51 kg/t (95 % minimálního dávkování triglyceridu kyseliny enanthové o čistotě 95 %, jednotlivé stanovení),

— 6,89 kg/t (70 % minimálního dávkování triglyceridu kyseliny enanthové o čistotě 95 %, jednotlivé stanovení),

— koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem s nejnižší hodnotou se použije interpolací mezi hodnotami 9,51 kg/t a 6,89 kg/t.

10.3 **Smetana**

10.3.1 Dávkování je 10 kg triglyceridu kyseliny enanthové o čistotě 95 % na jednu tunu mléčného tuku, tj. 9,50 kg/t mléčného tuku se stopovací látkou.

10.3.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 8,60 kg/t (95 % minimálního dávkování triglyceridu kyseliny enanthové o čistotě 95 %, jednotlivé stanovení),

— 6,23 kg/t (70 % minimálního dávkování triglyceridu kyseliny enanthové o čistotě 95 %, jednotlivé stanovení),

▼B

— koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem s nejnižší hodnotou se použije interpolací mezi hodnotami 8,60 kg/t a 6,23 kg/t.

11. MEZE TOLERANCE: HORNÍ MEZE (PŘÍPAD PŘEKROČENÍ MNOžSTVÍ O VÍCE NEŽ20 %)

11.1 **Z produktu obsahujícího stopovací látku musí být odebrány tři vzorky pro ověření, zda zavedení této látky do produktu bylo provedeno správně.**

11.2 **Máslo a zahuštěné máslo**

11.2.1 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a průměrný výsledek se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— horní mez činí 12,96 kg/t.

11.3 **Smetana**

11.3.1 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a průměrný výsledek se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— horní mez činí 11,82 kg/t.

12. DALŠÍ INFORMACE: STATISTICKÁ ANALÝZA VÝSLEDKŮ STANOVENÍ TRIENANTOÁTU V MÁSELNÉM TUKU ANALÝZOU TRIGLICERIDU

Pro stanovení obsahu trienantoátu v másle se stopovacími látkami byly provedeny čtyři společné pokusy.

První kruhové zkoušky se zúčastnilo devět laboratoří, přičemž nebyly poskytnuty žádné specifikace o analytických metodách, které se měly použít.

Druhé kruhové zkoušky se zúčastnilo deset laboratoří, přičemž byly použity 4 různé metody:

— kvantifikace methylheptanoátu použitím n-nonanu nebo methylnonanoátu jako vnitřního standardu,

— kvantifikace trienantoátu použitím trikaproátu jako vnitřního standardu,

— kvantifikace methylheptanoátu použitím kalibračního vzorku/kalibrační směsi,

— kvantifikace methylheptanoátu použitím kalibrační směsi.

Prováděla-li se kromě toho analýza methylesterů mastných kyselin (FAME), byly použity dva odlišné postupy methylace (De Francesco a Christopherson & Glass).

V důsledku získaných výsledků byly pro třetí kruhovou zkoušku zvoleny dvě metody:

— kvantifikace methylheptanoátu použitím n-nonanu nebo methylnonanoátu jako vnitřního standardu,

— kvantifikace trienantoátu použitím trikaproátu jako vnitřního standardu.

Výsledky sedmi laboratoří prokázaly, že metoda FAME vede k vyšší variabilitě, v důsledku čehož bylo rozhodnuto, že se použije pouze stanovení trienantoátu jako triglyceridu na základě postupu kvantifikace trienantoátu použitím trikaproátu jako vnitřního standardu. Analýza triglyceridu musí být navíc provedena pomocí kapilární kolony.

Ve čtvrté kruhové zkoušce kolovaly čtyři vzorky (A, B, C, D) a výsledky poskytlo devět laboratoří (tabulky 1–2).

▼B

Dvě laboratoře (DE a EU) analyzovaly vzorky pomocí metody FAME.

Z důvodu nižšího počtu laboratoří byl statistický výpočet proveden jak z celkového souboru údajů (obrázky 1–2) včetně výsledků analýz FAME, tak z údajů získaných z analýzy TG.

Zkoušky pro odlehlé hodnoty:

— Vzorek A. Dixonův, Cochranův a Grubbsův test na úrovni 1 a 5 % prokázaly jednu laboratorní odlehlou hodnotu.

— Vzorek B. Grubbsův test na úrovni 5 % prokázal jednu laboratorní odlehlou hodnotu.

— Vzorek C. Dixonův a Grubbsův test na úrovni 1 a 5 % prokázaly jednu laboratorní odlehlou hodnotu.

— Vzorek D. Dixonův a Grubbsův test na úrovni 1 a 5 % prokázaly jednu laboratorní odlehlou hodnotu.

Odlehlá hodnota byla z výpočtu vyloučena.

Hodí se poznamenat, že výsledky získané metodou FAME se v použitých zkouškách nikdy nepovažovaly za odlehlé hodnoty.

Parametry shodnosti

V tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny výsledky všech laboratoří a parametry shodnosti, jež jsou vypočítané z přijatelného počtu (8) laboratoří, bohužel však nevycházejí ze stejné analytické metody.

V tabulkách 3 a 4 jsou uvedeny výsledky odvozené pouze z metody TG a odpovídající parametry shodnosti. Přijetí těchto parametrů závisí na přijetí nízkého počtu laboratoří (6).

Obrázky 2 a 3 ukazují trend hodnot Sr a SR vypočítaných ze 4 vzorků dvou souborů údajů popsaných výše.

V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty Sr a SR společně s odpovídajícími úhrnnými hodnotami a celkovými parametry r a R.

Nakonec byl vypočítán kritický rozdíl při 95 % pravděpodobnosti.

Tabulka 1:

Statistické výsledky metod TG a FAME*

Vzorek A		R_1	R_2	Střed	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	8
RENNES	FR1	11,0	11.1	11.1	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Odlehlé hodnoty	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Střední hodnota	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Skutečná hodnota	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Opakovatelnost r (95 %)	0,26
ISPRA	EU*	11,0	11,0	11,0	Relativní opakovatelnost r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,23
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	2,04
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,84
					Relativní reprodukovatelnost R %	5,71

▼B

Vzorek B		R_1	R_2	Střed	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Odlehlé hodnoty	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Střední hodnota	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Skutečná hodnota	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Opakovatelnost r (95 %)	0,40
ISPRA	EU*	13,2	13,3	13,3	Relativní opakovatelnost r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,35
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	2,61
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,99
					Relativní reprodukovatelnost R %	7,31

Tabulka 2:

Statistické výsledky metod TG a FAME*

Vzorek C		R_1	R_2	STŘED	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Odlehlé hodnoty	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Střední hodnota	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Skutečná hodnota	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Opakovatelnost r (95 %)	0,40
ISPRA	EU*	9,4	9,3	9,4	Relativní opakovatelnost r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,17
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	1,82
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,47
					Relativní reprodukovatelnost R %	5,10
Vzorek D		R_1	R_2	Střed	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Odlehlé hodnoty	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Střední hodnota	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Skutečná hodnota	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Opakovatelnost r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Relativní opakovatelnost r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,24
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	11,43
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,67
					Relativní reprodukovatelnost R %	32,00

▼B

Tabulka 3:

Statistické výsledky metod TG a FAME*

Vzorek A		R_1	R_2	Střed	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Odlehlé hodnoty	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Střední hodnota	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Skutečná hodnota	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Opakovatelnost r (95 %)	0,25
					Relativní opakovatelnost r %	2,24
					Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,13
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	1,16
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,36
					Relativní reprodukovatelnost R %	3,25
Vzorek B		R_1	R_2	Střed	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Odlehlé hodnoty	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Střední hodnota	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Skutečná hodnota	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Opakovatelnost r (95 %)	0,42
					Relativní opakovatelnost r %	3,16
					Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,33
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	2,48
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,93
					Relativní reprodukovatelnost R %	6,94

Tabulka 4:

Statistické výsledky metody TG

Vzorek C		R_1	R_2	Střed	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Odlehlé hodnoty	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Střední hodnota	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Skutečná hodnota	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Opakovatelnost r (95 %)	0,42
					Relativní opakovatelnost r %	4,51
					Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,19
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	2,04
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,53
					Relativní reprodukovatelnost R %	5.71

▼B

Vzorek D		R_1	R_2	Střed	Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Počet odlehlých hodnot	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Odlehlé hodnoty	DK
					Střední hodnota	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Skutečná hodnota	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Směrodatná odchylka opakovatelnosti (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Opakovatelnost r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Relativní opakovatelnost r %	12,01
					Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (SR)	0,25
					Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR %)	11,90
					Reprodukovatelnost R (95 %)	0,69
					Relativní reprodukovatelnost R %	33,32

Tabulka 5

Opakovatelnost a reprodukovatelnost (s analýzou FAME*)

	Počet laboratoří	Odlehlá hodnota	Opakovatelnost Sr (95 %)	Reprodukovatelnost SR (95 %)
Vzorek A	8	1	0,09	0,23
Vzorek B	8	1	0,14	0,35
Vzorek C	8	1	0,14	0,17
Vzorek D	8	1	0,08	0,24
Úhrnná hodnota			0,116	0,256
			R	**R**
Úhrnná hodnota* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Minimální čistota stanovená pro trienantoát = 95 %
Minimální mez stanovená pro trienantoát v mléčném tuku = 11 kg/t
Přihlédneme-li ke kritickému rozdílu při 95 % pravděpodobnosti, nesmí být průměr obou výsledků menší než:

10,05 kg/t v případě přidání trienantoátu o čistotě 95 %.

Opakovatelnost a reprodukovatelnost (bez analýzy FAME)

	Počet laboratoří	Odlehlá hodnota	Opakovatelnost Sr (95 %)	Reprodukovatelnost SR (95 %)
Vzorek A	6	1	0,09	0,13
Vzorek B	6	1	0,15	0,33
Vzorek C	6	1	0,15	0,19
Vzorek D	6	1	0,09	0,25
Úhrnná hodnota			0,124	0,237
			r	**R**
Úhrnná hodnota * 2,8			**0,347**	**0,663**

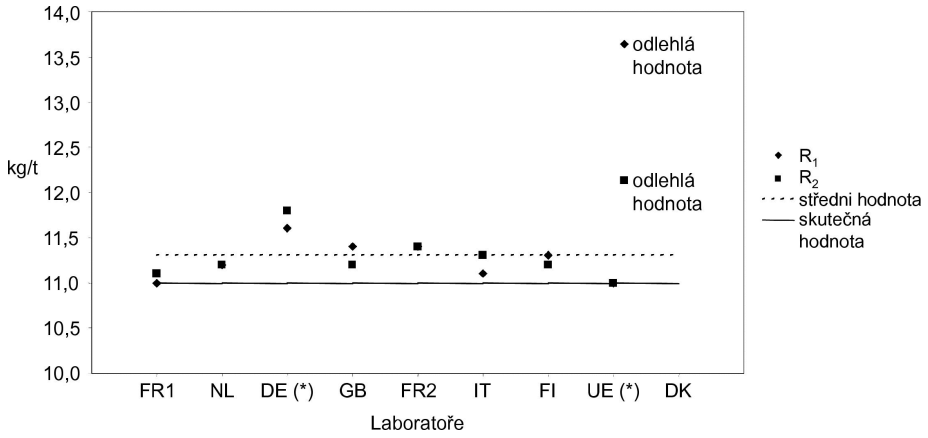
CrD95 = 0,36
Minimální čistota stanovená pro trienantoát = 95 %
Minimální mez stanovená pro trienantoát v mléčném tuku = 11 kg/t
Přihlédneme-li ke kritickému rozdílu při 95 % pravděpodobnosti, nesmí být průměr obou výsledků menší než:

10,09 kg/t v případě přidání trienantoátu o čistotě 95 %.

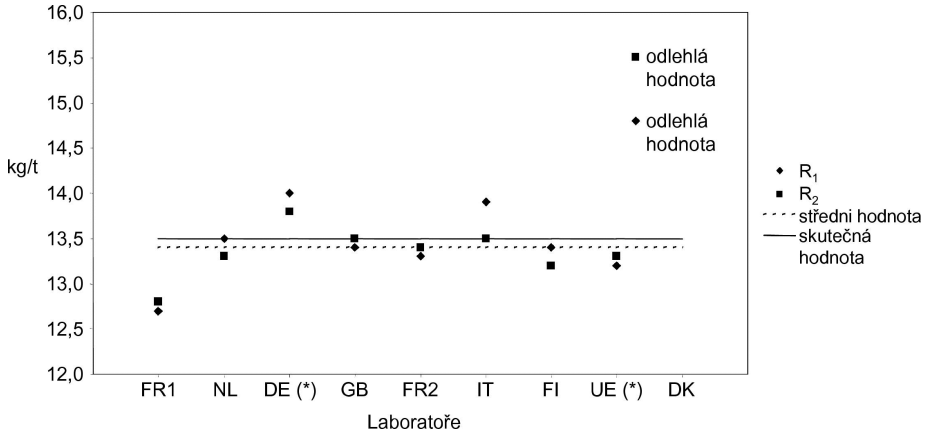
▼B

Obrázek 1 (*)

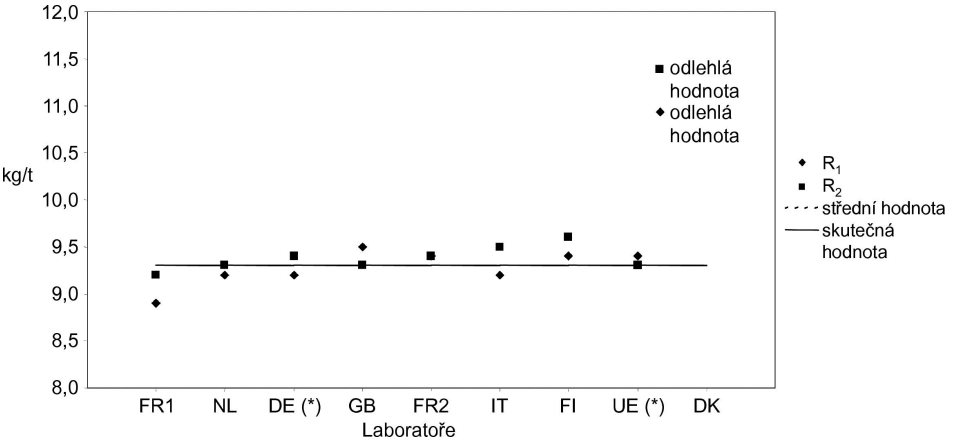
Výsledky zkoušek: vzorek A



Výsledky zkoušek: vzorek B



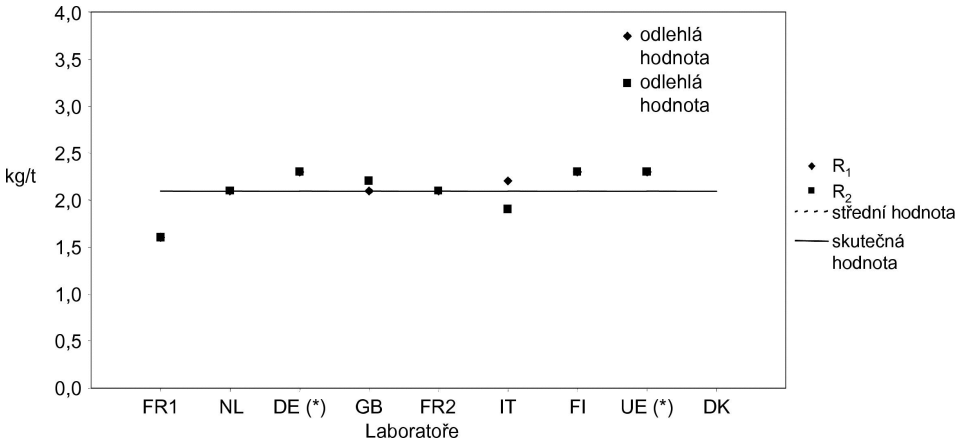
Výsledky zkoušek: vzorek C



(*) = metoda FAME.

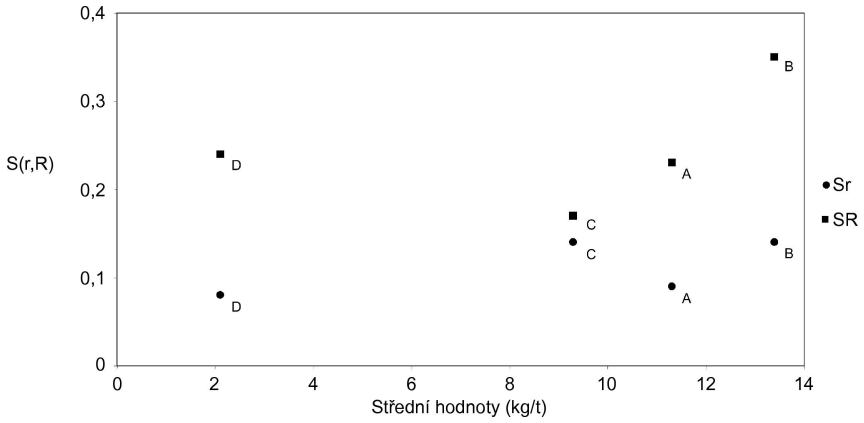
▼B

Výsledky zkoušek: vzorek D



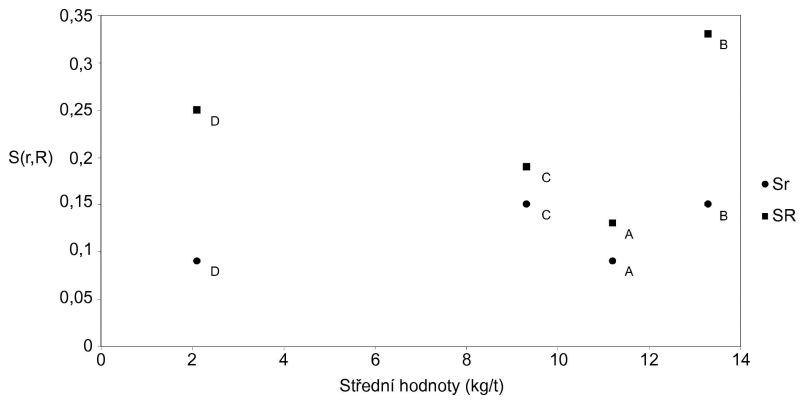
Obrázek 2

Směrodatná odchylka opakovatelnosti a reprodukovatelnosti na různých stupních (TG + FAME)



Obrázek 3

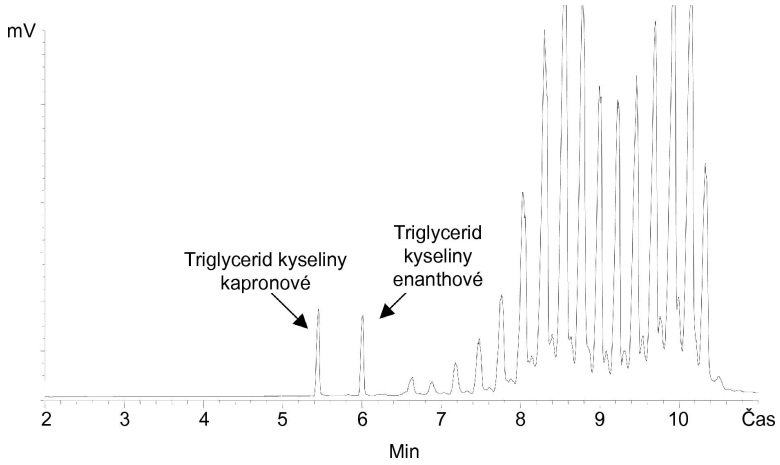
Směrodatná odchylka opakovatelnosti a reprodukovatelnosti na různých stupních (TG)



▼B

Obrázek 4

Příklad použití kolonového nástřikového zařízení



▼B

PŘÍLOHA VI

(Článek 5)

STANOVENÍ OBSAHU VANILINU V ZAHUŠTĚNÉM MÁSLE, MÁSLE NEBO SMETANĚ VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje postup pro kvantitativní stanovení vanilinu v zahuštěném másle, másle nebo smetaně.

2. PODSTATA METODY

Extrakce známého množství vzorku směsí isopropanol/ethanol/acetonitril (1:1:2). Vysrážení většiny tuku ochlazením na teplotu mezi – 15 °C a – 20 °C a následným odstředěním.

Po zředění vodou se stanoví obsah vanilinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a zejména:

3.1 Mrazicí box určený pro teploty v rozmezí od – 15 °C do – 20 °C

3.2 Injekční stříkačky na jedno použití o objemu 2 ml

3.3 Membránové mikrofiltry o velikosti pórů 0,45 μm, odolné roztoku obsahujícímu 5 % extrakčního roztoku (4.4)

3.4 Systém pro kapalinovou chromatografii sestávající z čerpadla (s průtokem 1,0 ml/min), nástřikového zařízení (automatického nebo manuálního, objem nástřiku 20 μl) a UV detektoru (fungujícího při 306 nm, 0,01 Å rozsahu stupnice), zapisovače nebo integrátoru a termostatu kolony fungujícího při 25 °C

3.5 Analytická kolona (250 mm × 4,6 mm/vnitřní průměr/), naplněná fází LiChrosper RP 18 (Merck, 5 μm) nebo jinou rovnocennou fází

3.6 Ochranná kolona (cca 20 mm × 3 mm/vnitřní průměr/), naplněná za sucha fází LiChrospher RP 18 (5 až 10 μm) nebo jinou rovnocennou fází

3.7 Odstředivka fungující při 2 000 ot/min

4. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a.

4.1 Isopropanol

4.2 Ethanol, 96 % obj.

4.3 Acetonitril

4.4 Extrakční roztok

Isopropanol (4.1), ethanol (4.2) a acetonitril (4.3) se smíchají v poměru 1:1:2 (obj.).

4.5 Vanilin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) ≥ 98 %

4.5.1 *Zásobní roztok vanilinu (500 μg/ml)*

S přesností na 0,1 mg navažte asi 50 mg (CM mg) vanilinu (4.5) do odměrné baňky na 100 ml, přidejte 25 ml extrakčního roztoku (4.4) a doplňte po značku vodou.

4.5.2 *Standardní roztok vanilinu (10 μg/ml)*

Do odměrné baňky na 250 ml pipetou přeneste 5 ml zásobního roztoku vanilinu (4.5.1) a doplňte po značku vodou.

4.5.3 *Methanol čistoty pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC)*

4.5.4 *Kyselina octová, ledová*

4.5.5 *Voda čistoty pro HPLC*

▼B

4.5.6 *Mobilní fáze HPLC*

V odměrné baňce na 1 000 ml smíchejte 300 ml methanolu (4.5.3), cca 500 ml vody (4.5.5) a 20 ml kyseliny octové (4.5.4) a doplňte po značku vodou (4.5.5). Přefiltrujte přes filtr 0,45 μm (3.3).

5. PRACOVNÍ POSTUP

5.1 **Příprava zkušebního vzorku**

5.1.1 *Máslo*

Vzorek zahřívejte, dokud nezačne tát. Je nutné zabránit místnímu přehřátí nad 30 °C. Máslo se v žádném případě nesmí oddělit ve dvou fázích. Jakmile je vzorek dostatečně plastický, homogenizujte jej protřepáním. Před odběrem vzorku máslo po dobu 15 sekund míchejte. Do odměrné baňky na 100 ml navažte s přesností na 1 mg asi 5 g (SM g) másla.

5.1.2 *Zahuštěné máslo*

Bezprostředně před odběrem vzorku vložte nádobu se zahuštěným máslem do sušárny o teplotě 40 °C až 50 °C, aby máslo zcela roztálo. Vzorek promíchejte protřepáním nebo mícháním, které však nesmí být tak silné, aby se vytvářely vzduchové bubliny. Do odměrné baňky na 100 ml navažte s přesností na 1 mg asi 4 g (SM g) zahuštěného másla.

5.1.3 *Smetana*

Vzorek zahřejte ve vodní lázni nebo termostatu na teplotu 35 °C až 40 °C. Tuk rovnoměrně rozprostřete třepáním, a je-li to nutné, také promícháním. Vzorek rychle ochlaďte na 20 ± 2 °C. Vzorek musí být na pohled homogenní, v opačném případě je třeba postup opakovat. Do odměrné baňky na 100 ml navažte s přesností na 1 mg asi 10 g (SM g) smetany.

5.2 **Příprava zkušebního roztoku**

Přidejte asi 75 ml extrakčního roztoku (4.4) ke zkušebnímu vzorku (5.1.1, 5.1.2 nebo 5.1.3), důkladně promíchávejte nebo protřepávejte po dobu asi 15 minut a doplňte po značku extrakčním roztokem (4.4). Asi 10 ml tohoto extraktu převeďte do zkumavky opatřené zátkou. Zkumavku uložte do mrazicího boxu (3.1) a nechte ji v něm stát asi 30 minut. Vychlazený extrakt odstřeďujte po dobu 5 minut asi při 2 000 otáčkách za minutu a okamžitě dekantujte. Dekantovaný roztok nechte přizpůsobit laboratorní teplotě. Do odměrné baňky na 100 ml pipetou přeneste 5 ml dekantovaného roztoku a doplňte vodou. Alikvotní díl přefiltrujte přes membránový mikrofiltr (3.3) pomocí stříkačky (3.2). Filtrát je připraven ke stanovení pomocí HPLC.

5.3 **Kalibrace**

Do odměrné baňky na 100 ml pipetou přeneste 5 ml standardního roztoku vanilinu (4.5.2). Přidejte 5 ml extrakčního roztoku (4.4) a doplňte po značku vodou. Tento roztok obsahuje 0,5 μg/ml vanilinu.

5.4 **Stanovení pomocí HPLC**

Chromatografický systém nechte asi 30 minut stabilizovat. Nastříkněte standardní roztok (5.3). Tento postup opakujte, dokud rozdíl v ploše píků nebo výšce píků mezi dvěma po sobě jdoucími nástřiky nebude menší než 2 %. Za popsaných podmínek je retenční čas vanilinu asi 9 minut. Standardní roztok (5.3) paralelně analyzujte nastříknutím 20 μl. Nastříkněte 20 μl zkušebních roztoků (5.2). Stanovte plochu nebo výšku získaného píku vanilinu. Po provedení 10 nástřiků zkušebních vzorků (5.2) opakujte duplicitní nástřik standardního roztoku (5.3).

6. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Vypočítejte průměrnou plochu (nebo výšku) (AC) píků vanilinu odpovídajících duplicitním nástřikům u každé šarže zkušebních roztoků (čtyři plochy nebo výšky).

▼B

Vypočítejte odezvový faktor (R):

$$R = AC/CM$$

kde CM je hmotnost vanilinu v mg (4.5.1).

Obsah (mg/kg) vanilinu (C) ve zkušebním vzorku je dán vzorcem:

$$C = [(AS \times 20 \times 0,96)/(SM \times R)]$$

kde:

AS = plocha nebo výška píku vanilinu zkušebního vzorku

SM = hmotnost zkušebního vzorku v g (5.1.1, 5.1.2 nebo 5.1.3).

Poznámka: Pokud se za účelem stanovení vanilinu analyzuje smetana, koncentrace stopovací látky musí být vyjádřena v miligramech stopovací látky na kilogram mléčného tuku. Tento výpočet se provede vynásobením hodnoty C výrazem 100/f, kde f je obsah tuku ve smetaně v hmotnostních procentech.

20 = koeficient, kterým se berou v úvahu zředění srovnávacího a zkušebního vzorku

0,96 = opravný faktor pro obsah tuku v prvním zředění zkušebního vzorku

Poznámka: Místo plochy píků lze použít výšku píků (viz 8.3).

7. PŘESNOST METODY

7.1 **Opakovatelnost (r)**

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedl v co nejkratším časovém odstupu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 16 mg/kg.

7.2 **Reprodukovatelnost (R)**

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedli pracovníci v různých laboratořích na různých přístrojích, by neměl překročit 27 mg/kg.

8. MEZE TOLERANCE

8.1 Pro účely posouzení homogenity musí být z produktu obsahujícího stopovací látku odebrány tři vzorky.

8.2 Stopovací látka získaná z vanilky nebo ze syntetického vanilinu

8.2.1 Dávkování 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehydu je 250 g na jednu tunu zahuštěného másla nebo másla. Jsou-li stopovací látky přidávány do smetany, pak je dávkování 250 g látky na tunu mléčného tuku.

8.2.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 220,8 mg/kg (95 % minimálního dávkování přidané látky),

— 158,3 mg/kg (70 % minimálního dávkování přidané látky).

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 220,8 mg/kg a 158,3 mg/kg.

8.3 Stopovací látka získaná výhradně z vanilkových bobů nebo z jejich komplexních extraktů

8.3.1 Dávkování 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehydu je 100 g na jednu tunu zahuštěného másla nebo másla. Jsou-li stopovací látky přidávány do smetany, pak je dávkování 100 g látky na tunu mléčného tuku.

▼B

8.3.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 78,3 mg/kg (95 % minimálního dávkování přidané látky),

— 53,3 mg/kg (70 % minimálního dávkování přidané látky).

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 78,3 mg/kg a 53,3 mg/kg.

9. POZNÁMKY

9.1 Rekuperace přidaného vanilinu na úrovni 250 mg/kg máselného oleje kolísá v rozmezí od 97,0 do 103,8. Průměrný zjištěný obsah byl 99,9 % se směrodatnou odchylkou 2,7 %.

9.2 Standardní roztok obsahuje 5 % extrakčního roztoku z důvodu kompenzace rozšiřování píků způsobeného přítomností 5 % extrakčního roztoku ve zkušebních vzorcích. To umožňuje kvantifikaci na základě výšky píků.

9.3 Analýza je založena na lineární kalibrační křivce (intercept nula).

9.4 Linearitu je třeba ověřit nejprve při prvním provedení analýzy pomocí vhodných ředění standardního roztoku (4.5.2) a poté v pravidelných intervalech a po každé změně či opravě zařízení na HPLC. Vanilin lze působením vnitřních enzymů v nepasterizované smetaně nebo ve výrobcích z nepasterizované smetany rozložit na kyselinu vanilinovou, divanilin a jiné sloučeniny.

▼B

PŘÍLOHA VII

(Článek 5)

SPEKTROMETRICKÉ KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ETHYLESTERU BETA-APO-8'-KAROTENOVÉ KYSELINY V ZAHUŠTĚNÉM MÁSLE A MÁSLE

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje postup pro kvantitativní stanovení ethylesteru beta-apo-8'-karotenové kyseliny (apokarotenového esteru) v zahuštěném másle a másle. Apokarotenový ester je souhrn všech látek přítomných v extraktu vzorků získaném za podmínek popsaných v této metodě, které absorbují světlo při 440 nm.

2. PODSTATA METODY

Máselný tuk se rozpustí v petroletheru a změří se jeho absorbance při 440 nm. Obsah apokarotenového esteru se stanoví porovnáním s vnějším standardem.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Pipety – dělené, o objemu 0,25, 0,50, 0,75 a 1,0 ml

3.2 Spektrofotometr – vhodný pro používání při 440 nm (a 447–449 nm) a vybavený kyvetami s délkou optické dráhy 1 cm

3.3 Odměrné baňky na 20 ml a 100 ml

3.4 Analytické váhy s citlivostí 0,1 mg, vážící s přesností na 1 mg a s možností odečtu po 0,1 mg

3.5 Pec, 45 °C ± 1 °C

3.6 Rychlofiltrační bezpopelné filtry

4. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a.

4.1 Suspenze apokarotenového esteru (přibližně 20 %)

4.1.1 Obsah látky v suspenzi se stanoví takto:

Suspenzi zahřejte na teplotu 45 °C až 50 °C a homogenizujte v neotevřené původní nádobě. Do odměrné baňky na 100 ml navažte 400 mg, rozpusťte ve 20 ml chloroformu (4.4) a doplňte po značku cyklohexanem (4.5). Zřeďte 5 ml tohoto roztoku cyklohexanem na 100 ml (roztok A). Zřeďte 5 ml roztoku A cyklohexanem na 100 ml. Změřte absorbanci při 447–449 nm (měří se maximum vztažené k cyklohexanu jako referenční hodnotě pomocí kyvet s délkou optické dráhy 1 cm).

Obsah apokarotenového esteru P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **nebo** se odvodí: $(Abs_{max} /2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{max} = absorbance měrného roztoku při maximu

M_{susp} = hmotnost suspenze (g)

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

P = Čistota (obsah) suspenze (%)

▼B

Poznámka: Suspenze apokarotenového esteru je citlivá na vzduch, teplo a světlo. V neotevřené původní nádobě (těsně uzavřené v dusíkové atmosféře) a v chladu ji lze skladovat po dobu asi 12 měsíců. Po otevření je třeba obsah v krátké době spotřebovat.

4.1.2 Standardní roztok apokarotenového esteru, přibližně 0,2 mg/ml

S přesností na 0,1 mg navažte asi 0,100 g suspenze apokarotenového esteru (4.1.1) (W), rozpusťte v petroletheru (4.2), kvantitativně převeďte do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplňte po značku petroletherem.

Tento roztok obsahuje (W × P) / 10 mg/ml apokarotenového esteru.

Poznámka: Roztok musí být uložen na chladném a tmavém místě. Nepoužitý roztok po měsíci vyřaďte.

4.2 Petrolether (40–60 °C)

4.3 Síran sodný bezvodý, granulovaný, předem sušený dvě hodiny při teplotě 102 °C

4.4 Chloroform

4.5 Cyklohexan

5. PRACOVNÍ POSTUP

5.1 **Příprava zkušebního vzorku**

5.1.1 *Zahuštěné máslo*

Vzorek roztavte v sušárně při teplotě asi 45 °C.

5.1.2 *Máslo*

Vzorek roztavte v sušárně při teplotě asi 45 °C a reprezentativní část přefiltrujte přes filtr obsahující asi 10 g bezvodého síranu sodného (4.3) v prostředí, které je chráněné před silným přirozeným nebo umělým světlem a udržované při teplotě 45 °C. Odeberte patřičné množství máselného tuku.

5.2 **Stanovení**

S přesností na 1 mg navažte asi 1 g zahuštěného másla (nebo extrahovaného máselného tuku (5.1.2)) (M). Kvantitativně převeďte do odměrné baňky na 20 ml (V) petroletherem (4.2), doplňte po značku a důkladně promíchejte.

Alikvotní díl této směsi převeďte do kyvety 1 cm dlouhé a změřte absorbanci při 440 nm ve vztahu k petroletheru jako referenční hodnotě. Pomocí získané standardní křivky (C μ/ml) zjistěte koncentraci apokarotenového esteru v roztoku.

5.3 **Kalibrace**

Do pěti odměrných baněk na 100 ml pipetou přeneste 0, 0,25, 0,5, 0,75 a 1,0 ml standardního roztoku apokarotenového esteru (4.1.2). Zřeďte petroletherem (4.2) doplněním ke značce a promíchejte.

Přibližné koncentrace roztoků se pohybují od 0 do 2 μg/ml a přesně se vypočítají ve vztahu ke koncentraci standardního roztoku (4.1.2) (W × P)/10 mg/ml. Změřte absorbanci při 440 nm vztaženou k petroletheru (4.2) jako referenční hodnotě.

Hodnoty absorbance vyneste do grafu na osu pořadnic („y“) a koncentrace apokarotenového esteru na osu úseček („x“). Vypočítejte rovnici standardní křivky.

▼B

6. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

6.1 Obsah apokarotenového esteru vyjádřený v mg/kg produktu je dán:

u zahuštěného másla výrazem: (C × V)/M

u másla výrazem: 0,82 (C × V)M

kde:

C = obsah apokarotenového esteru v μg/ml odečtený z kalibračního grafu (5.3)

V = objem zkušebního roztoku v ml (5.2)

M = hmotnost dílčího zkušebního vzorku v g (5.2)

0,82 = opravný koeficient pro obsah máselného tuku v másle

7. PŘESNOST METODY

7.1 **Opakovatelnost**

7.1.1 *Analýza másla*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedl v co nejkratším časovém odstupu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 1,4 mg/kg.

7.1.2 *Analýza zahuštěného másla*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedl v co nejkratším časovém odstupu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 1,6 mg/kg.

7.2 **Reprodukovatelnost**

7.2.1 *Analýza másla*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedli pracovníci v různých laboratořích na různých přístrojích, by neměl překročit 4,7 mg/kg.

7.3. **Analýza zahuštěného másla**

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedli pracovníci v různých laboratořích na různých přístrojích, by neměl překročit 5,3 mg/kg.

7.4. **Zdroj údajů o shodnosti**

Údaje o shodnosti byly získány na základě pokusu z roku 1995, kterého se zúčastnilo jedenáct laboratoří a ve kterém bylo v případě másla použito dvanáct vzorků obsahujících stopovací látku (šest slepých duplikátů) a v případě zahuštěného másla dvanáct vzorků obsahujících stopovací látku (šest slepých duplikátů).

8. MEZE TOLERANCE

8.1 Z produktu obsahujícího stopovací látku musí být odebrány tři vzorky pro ověření, zda zavedení této látky do produktu bylo provedeno správně.

8.2 **Máslo**

8.2.1 S přihlédnutím k absorbanci pozadí se stopovací látka přidává do másla v poměru 22 mg/kg.

8.2.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 17,7 mg/kg (95 % minimálního dávkování přidané látky),

— 12,2 mg/kg (70 % minimálního dávkování přidané látky).

▼B

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 17,7 mg/kg a 12,2 mg/kg.

8.3 **Zahuštěné máslo**

8.3.1 S přihlédnutím k absorbanci pozadí se stopovací látka přidává do zahuštěného másla v poměru 24 mg/kg.

Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 19,2 mg/kg (95 % minimálního dávkování přidané látky),

— 13,2 mg/kg (70 % minimálního dávkování přidané látky).

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 19,2 mg/kg a 13,2 mg/kg.

▼B

PŘÍLOHA VIII

(Článek 5)

STANOVENÍ OBSAHU SITOSTEROLU NEBO STIGMASTEROLU V MÁSLE NEBO ZAHUŠTĚNÉM MÁSLE PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ V KAPILÁRNÍ KOLONĚ

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje postup pro kvantitativní stanovení sitosterolu nebo stigmasterolu v másle nebo zahuštěném másle. Sitosterol je považován za látku složenou zejména z β-sitosterolu a 22-dihydro-β-sitosterolu, zatímco ostatní sitosteroly jsou považovány za bezvýznamné.

2. PODSTATA METODY

Máslo nebo zahuštěné máslo se zmýdelní hydroxidem draselným v ethanolovém roztoku a nezmýdelnitelný podíl se extrahuje diethyletherem.

Steroly se přemění na trimethylsilylethery a analyzují se plynovou chromatografií v kapilární koloně za použití betulinu jako vnitřního standardu.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Saponifikační baňka na 150 ml opatřená zpětným chladičem se zabroušenými spoji

3.2 Dělicí nálevky na 500 ml

3.3 Baňky na 250 ml

3.4 Nálevky o objemu přibližně 250 ml s vyrovnáváním tlaku pro zachycování odpadního diethyletheru

3.5 Skleněná kolona, 350 mm × 20 mm, opatřená zátkou se skleněným sintrem

3.6 Vodní lázeň nebo izotermní plášť

3.7 Reakční nádobky na 2 ml

3.8 Plynový chromatograf, který lze používat s kapilární kolonou, opatřený dělicím systémem, který tvoří:

3.8.1 termostatická komora pro kolony schopná udržovat požadovanou teplotu s přesností ± 1 °C

3.8.2 nástřikový systém s nastavitelnou teplotou

3.8.3 plamenově ionizační detektor a převodník/zesilovač

3.8.4 integrátor/zapisovač, který lze použít s převodníkem/zesilovačem (3.8.3)

3.9 Kapilární kolona z křemenného skla zcela potažená BP1 nebo rovnocenným materiálem (nebo jiná kolona alespoň stejného rozkladu) ve stejnoměrné tloušťce 0,25 μm; kolona musí být schopna rozložit trimethylsilylderiváty lanosterolu a sitosterolu. Vhodná je kolona o délce 12 m a vnitřním průměru 0,2 mm.

3.10 Injekční mikrostříkačka pro plynovou chromatografii o objemu 1 μl s tvrzenou jehlou

4. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Použitá voda musí být voda destilovaná nebo voda nejméně rovnocenné čistoty.

4.1 Ethanol o čistotě nejméně 95 %

4.2 Hydroxid draselný, 60 % roztok. Rozpusťte 600 g hydroxidu draselného (nejméně 85 %) ve vodě a doplňte vodou do 1 litru.

▼B

4.3 Betulin o čistotě nejméně 99 %

4.3.1 Roztoky betulinu v diethyletheru (4.4)

4.3.1.1 Koncentrace roztoku betulinu pro stanovení sitosterolu musí být 1,0 mg/ml.

4.3.1.2 Koncentrace roztoku betulinu pro stanovení stigmasterolu musí být 0,4 mg/ml.

4.4 Diethylether o čistotě p.a. (zbavený peroxidů s zbytků)

4.5 Síran sodný, bezvodý, granulovaný, předem sušený dvě hodiny při teplotě 102 °C

4.6 Silylační činidlo, např. TRI-SIL (dodávané firmou Pierce Chemical Co., katalogové číslo 49001) nebo rovnocenné. (Důležité: TRI-SIL je hořlavý, toxický, korozivní a pravděpodobně karcinogenní. Laboratorní personál musí být seznámen se zásadami bezpečnosti práce s TRI-SILem a přijmout nezbytná bezpečnostní opatření).

4.7 Lanosterol

4.8 Sitosterol o známé čistotě nejméně 90 % (P)

Poznámka 1: Čistota standardních materiálů používaných pro kalibraci musí být zjištěna standardizační metodou. Vychází se z předpokladu, že všechny steroly ve vzorku jsou znázorněny na chromatogramu, že celková plocha píků představuje 100 % sterolových složek a že steroly reagují na detektor stejně. Linearita systému musí být ověřena v celém dotčeném rozsahu koncentrací.

4.8.1 Standardní roztok sitosterolu – s přesností na 0,001 mg/ml připravte roztok obsahující přibližně 0,5 mg/ml (W_1) sitosterolu (4.8) v diethyletheru (4.4).

4.9 Stigmasterol o známé čistotě nejméně 90 % (P)

4.9.1 Standardní roztok stigmasterolu – s přesností na 0,001 mg/ml připravte roztok obsahující přibližně 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterolu (4.9) v diethyletheru (4.4).

4.10 Směs pro rozlišovací zkoušku. Připravte roztok obsahující 0,05 mg/ml lanosterolu (4.7) a 0,5 mg/ml sitosterolu (4.8) v diethyletheru (4.4).

5. PRACOVNÍ POSTUP

5.1 **Příprava standardních roztoků pro chromatografii**

Roztok vnitřního standardu (4.3.1) musí být přidán současně do odpovídajícího standardního roztoku sterolu a do zmýdelněného vzorku (viz 5.2.2).

5.1.1 Standardní chromatografický roztok sistosterolu: Převeďte 1 ml standardního roztoku sitosterolu (4.8.1) do každé ze dvou reakčních nádobek (3.7) a proudem dusíku odstraňte diethylether. Přidejte 1 ml roztoku vnitřního standardu (4.3.1.1) a proudem dusíku odstraňte diethylether.

5.1.2 Standardní chromatografický roztok stigmasterolu: Převeďte 1 ml standardního roztoku stigmasterolu (4.9.1) do každé ze dvou reakčních nádobek (3.7) a proudem dusíku odstraňte diethylether. Přidejte 1 ml roztoku vnitřního standardu (4.3.1.2) a proudem dusíku odstraňte diethylether.

5.2 **Příprava nezmýdelnitelného podílu**

5.2.1 Vzorek másla roztavte při teplotě nepřesahující 35 °C; vzorek důkladně promíchejte mícháním.

S přesností na 1 mg navažte přibližně 1 g másla (W_2) nebo zahuštěného másla (W_2) do baňky na 150 ml (3.1). Přidejte 50 ml ethanolu (4.1) a 10 ml roztoku hydroxidu draselného (4.2). Nasaďte zpětný chladič a obsah zahřívejte asi na 75 °C po dobu 30 minut. Sejměte chladič a ochlaďte baňku přibližně na laboratorní teplotu.

▼B

5.2.2 Přidejte do baňky 1,0 ml roztoku vnitřního standardu (4.3.1.1, má-li být stanoven sitosterol, a 4.3.1.2, má-li být stanoven stigmasterol). Důkladně promíchejte. Obsah baňky kvantitativně převeďte do dělicí nálevky na 500 ml (3.2). Baňku postupně vypláchněte 50 ml vody a 250 ml diethyletheru (4.4). Obsah dělicí nálevky důkladně protřepávejte po dobu 2 minut a počkejte, dokud se neoddělí jednotlivé fáze. Spodní vodnou vrstvu vypusťte a etherovou vrstvu čtyřikrát po sobě promyjte alikvotními, 100 ml díly vody.

Poznámka 2: Má-li se zabránit tvorbě emulze, je nezbytně nutné provést první dvě promytí vodou jemně (deset převrácení nálevky). Třetí promytí lze provést důkladným protřepáváním po dobu 30 vteřin. Pokud se vytvoří emulze, je možné ji rozpustit přidáním 5–10 ml ethanolu. V případě, že se ethanol přidá, je nutné provést další dvě důkladná promytí vodou.

5.2.3 Čirou, mýdla zbavenou etherovou vrstvu nechte projít přes skleněnou kolonu (3.5) naplněnou 30 g bezvodého síranu sodného (4.5). Ether odeberte do baňky na 250 ml (3.3). Přidejte jeden varný kamínek a obsah nechte odpařit téměř do sucha ve vodní lázni nebo v izotermním plášti. Dbejte přitom na to, abyste zachytili odpadní rozpouštědla.

Poznámka 3: Jestliže se extrakty vzorků odpařují do sucha při příliš vysoké teplotě, může dojít ke ztrátám na sterolu.

5.3 **Příprava trimethylsilyletherů**

5.3.1 Převeďte etherový roztok zbývající v baňce do reakční nádobky na 2 ml (3.7) se 2 ml diethyletheru a odstraňte ether proudem dusíku. Promyjte baňku dvěma dalšími 2 ml alikvotními dávkami diethyletheru s tím, že tekutinu pokaždé převedete do reakční nádobky a ether odstraníte proudem dusíku.

5.3.2 Proveďte silylaci vzorku přidáním 1 ml TRI-SILu (4.6). Uzavřete nádobku a důkladně ji protřepejte, aby se obsah rozpustil. Nerozpustí-li se úplně, zahřejte nádobku na 65–70 °C. Nechte ji nejméně 5 minut odstát a teprve poté její obsah nastříknete do plynového chromatografu. Silylaci standardů proveďte stejným způsobem jako silylaci vzorků. Silylaci směsi pro rozlišovací zkoušku (4.10) proveďte stejným způsobem jako silylaci vzorků.

Poznámka 4: Silylace musí být provedena v bezvodém prostředí. Neúplná silylace betulinu je indikována druhým píkem v blízkosti píku betulinu.

Pokud je během silylace přítomen ethanol, pak tuto sylilaci ruší. Ethanol může být přítomen v důsledku nedostatečného promývání ve fázi extrakce. Pokud tento problém přetrvává, může být během fáze extrakce provedeno páté promytí s důkladným protřepáváním po dobu 30 vteřin.

5.4 **Analýza plynovou chromatografií**

5.4.1 *Volba provozních podmínek*

Připravte plynový chromatograf podle návodu výrobce.

Směrné provozní podmínky jsou tyto:

— teplota kolony: 265 °C

— teplota nástřikového zařízení: 265 °C

— teplota detektoru: 300 °C

— průtok nosného plynu: 0,6 ml/min

— tlak vodíku: 84 kPa

— tlak vzduchu: 155 kPa

▼B

— rozdělení nástřiku: 10:1 až 50:1; poměr rozdělení musí být optimalizován podle návodu výrobce a linearity odezvy detektoru a poté ověřen v rozmezí dotčených koncentrací.

Poznámka 5: Je nesmírně důležité pravidelně čistit vložku do nástřikového prostoru (tzv. liner).

— množství nastříknuté látky: 1 µl roztoku TMSE.

Počkejte, dokud systém nedosáhne rovnováhy, a teprve po dostatečně stabilní reakci zahajte analýzu.

Tyto podmínky je třeba měnit podle charakteristických vlastností kolony a plynového chromatografu tak, aby získané chromatogramy splňovaly tyto požadavky:

— pík sitosterolu musí být dostatečně odlišen od píku lanosterolu. Obrázek 1 znázorňuje typický chromatogram, který je třeba získat ze silylované směsi pro rozlišovací zkoušku (4.10),

— relativní retenční časy následujících sterolů se musí blížit těmto hodnotám:

cholesterol: 1,0

stigmasterol: 1,3

sitosterol: 1,5

betulin: 2,5,

— retenční čas betulinu musí být přibližně 24 minut.

5.4.2 *Analytický postup*

Nastříkněte 1 µl roztoku silylovaného standardu (stigmasterolu nebo sitosterolu) a upravte kalibrační parametry integrátoru.

Nastříkněte další 1 µl roztoku silylovaného standardu, aby bylo možné stanovit odezvové faktory ve vztahu k betulinu.

Nastříkněte 1 µl roztoku silylovaného vzorku a změřte plochy píků. Nástřik standardů musí být proveden před každým chromatografickým cyklem a po každém takovém cyklu.

Za normálních okolností by měl každý takto ohraničený cyklus zahrnovat šest nástřiků vzorku.

Poznámka 6: Do integrace píku stigmasterolu je třeba zahrnout chvosty uvedené v bodech 1, 2 a 3 na obrázku 2b.

Integrace píku sitosterolu by měla zahrnovat plochu píku 22-dihydro-β-sitosterolu (stigmastanolu), který se vymývá okamžitě po sitosterolu (viz obrázek 3b) při vyhodnocování celkového sitosterolu.

6. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

6.1 Stanoví se plocha píků sterolu a píků betulinu v obou standardech na začátku a na konci každého pokusu a vypočte se R_1:

R_1 = (průměrná plocha píku sterolu ve standardu)/(průměrná plocha píku betulinu ve standardu)

Stanoví se plocha píku sterolu (stigmasterolu a sitosterolu) a píku betulinu ve vzorku a vypočte seR_2:

R_2 = (plocha píku sterolu ve vzorku)/(plocha píku betulinu ve vzorku)

W_1 = obsah sterolu ve standardu (mg), obsažený v 1 ml standardního roztoku (4.8.1 nebo 4.9.1)

W_2 = hmotnost vzorku (g) (5.2.1)

P = čistota standardního sterolu (4.8 nebo 4.9)

▼B

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

7. PŘESNOST METODY

7.1 **Máslo**

7.1.1 *Opakovatelnost*

7.1.1.1 Stigmasterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedl v co nejkratším časovém odstupu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 19,3 mg/kg.

7.1.1.2 Sitosterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedl v co nejkratším časovém odstupu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 23,0 mg/kg.

7.1.2 *Reprodukovatelnost*

7.1.2.1 Stigmasterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedli pracovníci v různých laboratořích na různých přístrojích, by neměl překročit 31,9 mg/kg.

7.1.2.2 Sitosterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedli pracovníci v různých laboratořích na různých přístrojích, by neměl překročit 8,7 %, vztaženo ke střední hodnotě stanovení.

7.1.3 *Zdroj údajů o shodnosti*

Údaje o shodnosti byly získány na základě pokusu z roku 1992, kterého se zúčastnilo osm laboratoří a ve kterém bylo v případě stigmasterolu použito šest vzorků (tří slepých duplikátů) a v případě sitosterolu šest vzorků (tří slepých duplikátů).

7.2 **Zahuštěné máslo**

7.2.1 *Opakovatelnost*

7.2.1.1 Stigmasterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedl v co nejkratším časovém odstupu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 10,2 mg/kg.

7.2.1.2 Sitosterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedl v co nejkratším časovém odstupu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 3,6 %, vztaženo ke střední hodnotě stanovení.

7.2.2 *Reprodukovatelnost*

7.2.2.1 Stigmasterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedli pracovníci v různých laboratořích na různých přístrojích, by neměl překročit 25,3 mg/kg.

7.2.2.2 Sitosterol

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního materiálu provedli pracovníci v různých laboratořích na různých přístrojích, by neměl překročit 8,9 %, vztaženo ke střední hodnotě stanovení.

▼B

7.2.3 *Zdroj údajů o shodnosti*

Údaje o shodnosti byly získány na základě pokusu z roku 1991, kterého se zúčastnilo devět laboratoří a ve kterém bylo v případě stigmasterolu použito šest vzorků (tří slepých duplikátů) a v případě sitosterolu šest vzorků (tří slepých duplikátů).

8. MEZE TOLERANCE

8.1 Z produktu obsahujícího stopovací látku musí být odebrány tři vzorky pro ověření, zda zavedení této látky do produktu bylo provedeno správně.

8.2 **Máslo**

8.2.1 *Stigmasterol*

8.2.1.1 Dávkování stigmasterolu je 150 g stigmasterolu o čistotě nejméně 95 % na tunu másla, tj. 142,5 mg/kg, nebo 170 g stigmasterolu o čistotě nejméně 85 % na tunu másla, tj. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 115,8 mg/kg (95 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 85 %).

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 115,8 mg/kg a 80,1 mg/kg nebo 117,7 mg/kg a 81,5 mg/kg.

8.2.2 *Sitosterol*

8.2.2.1 Dávkování sitosterolu je 600 g sitosterolu o čistotě nejméně 90 % na tunu másla, tj. 540 mg/kg.

8.2.2.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 482,6 mg/kg (95 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 90 %).

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 482,6 mg/kg a 347,6 mg/kg.

8.3 **Zahuštěné máslo**

8.3.1 *Stigmasterol*

8.3.1.1 Dávkování stigmasterolu je 150 g stigmasterolu o čistotě nejméně 95 % na tunu zahuštěného másla, tj. 142,5 mg/kg, nebo 170 g stigmasterolu o čistotě nejméně 85 % na tunu zahuštěného másla, tj. 144,5 mg/kg.

▼B

8.3.1.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 118,5 mg/kg (95 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 85 %).

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 118,5 mg/kg a 82,9 mg/kg nebo 120,4 mg/kg a 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitosterol*

8.3.2.1 Dávkování sitosterolu je 600 g sitosterolu o čistotě nejméně 90 % na tunu zahuštěného másla, tj. 540 mg/kg.

8.3.2.2 Výsledky analýzy tří vzorků odebraných z daného produktu se použijí pro ověření dávkování a homogenity přidané stopovací látky a výsledek s nejnižší hodnotou se porovná s následujícími mezními hodnotami:

— 480,9 mg/kg (95 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 90 %),

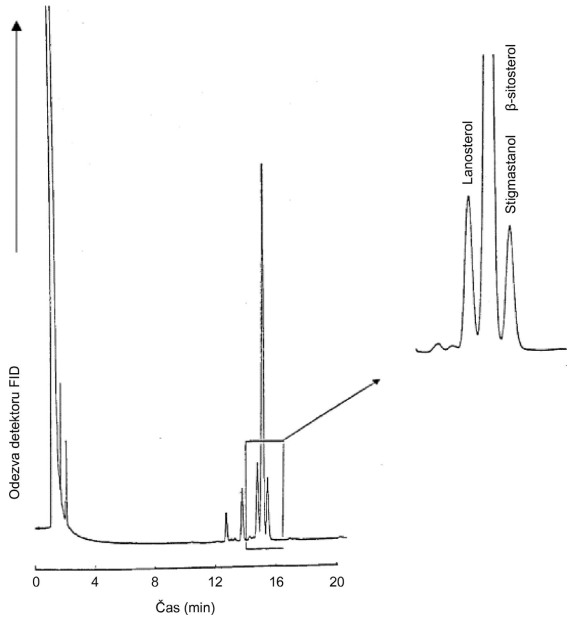
— 345,9 mg/kg (70 % minimálního dávkování stigmasterolu o čistotě 90 %).

Koncentrace stopovací látky ve vzorku s výsledkem o nejnižší hodnotě se použije interpolací mezi 480,9 mg/kg a 345,9 mg/kg.

Obrázek 1

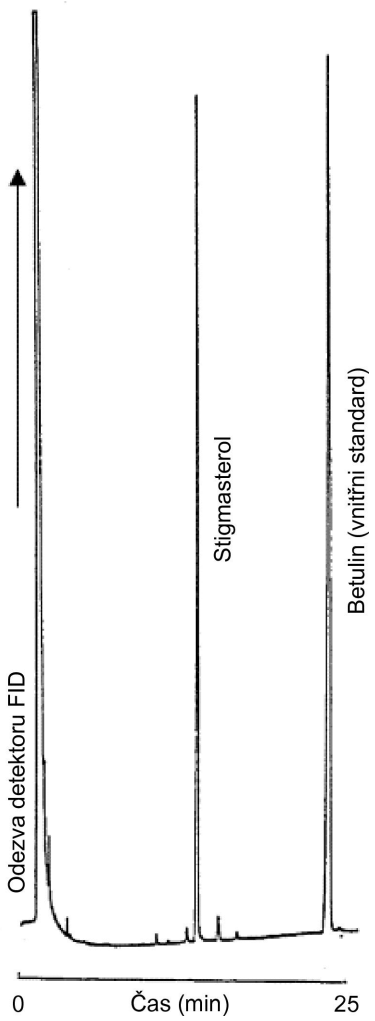
Chromatogram směsi pro rozlišovaci zkoušku

Vhodnější je úplné rozlišení, tj. zápis píku lanosterolu se musí vrátit na základní linii dříve než začne růst pík sitosrerolu. Neúplné rozlišení se však toleruje.

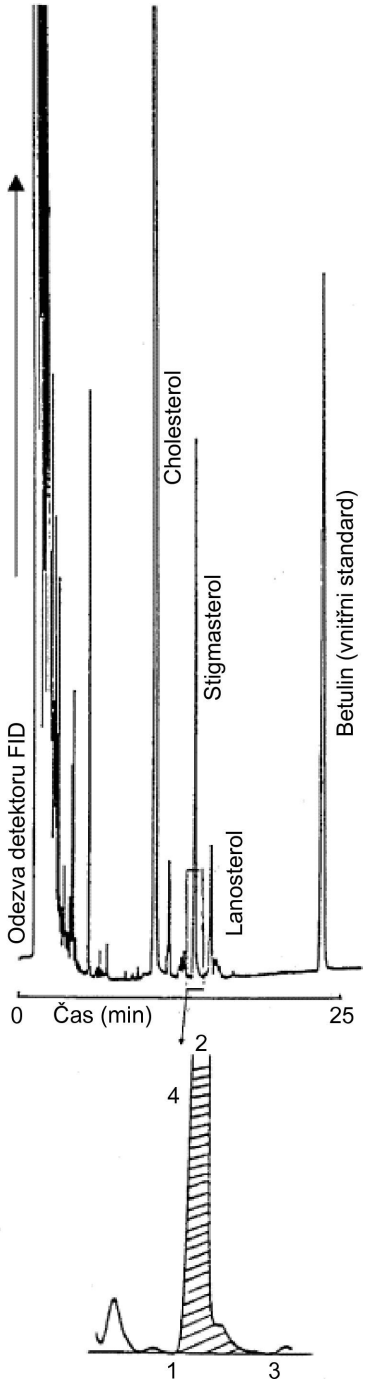


▼B

Obrázek 2a
Standard stigmasterolu



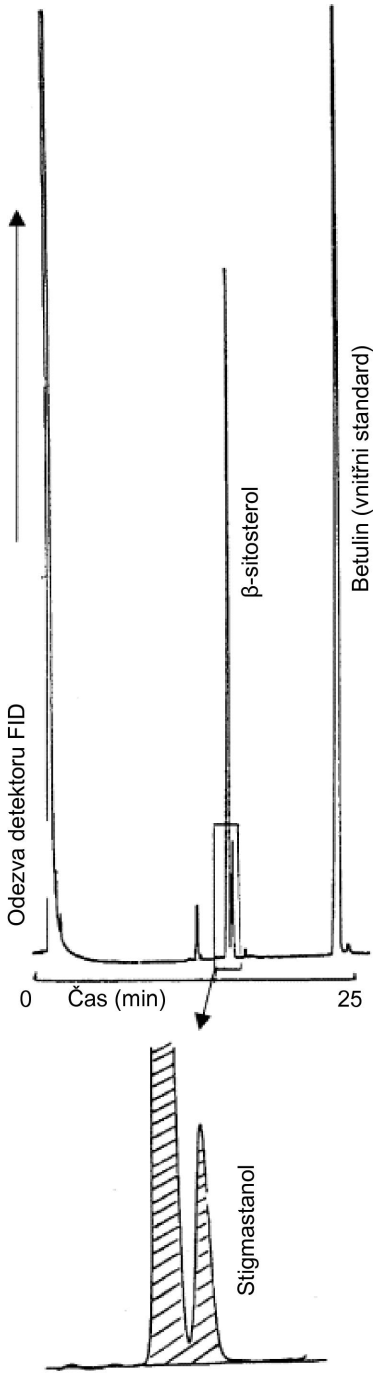
Obrázek 2b
Vzorek másla denaturovaného stigmasterolem



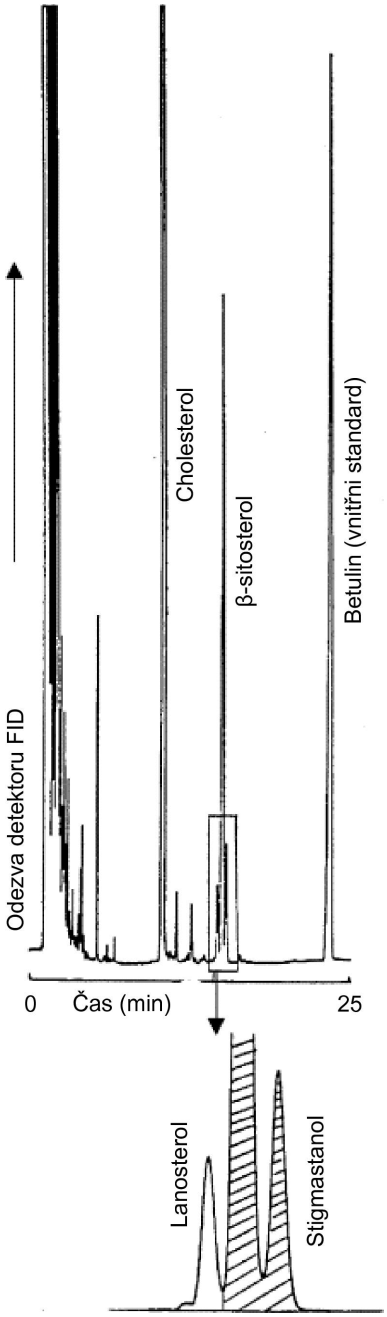
Poznámka: Integrace píku.stigmasterolu musi zahrnout všechny chvosty uvedené v bodech 1, 2 a 3.

▼B

Obrázek 3a
Standard β-sitosterolu



Obrázek 3a
Vzorek másla denaturovaného β-sitosterolem



Poznámka: β-sitosterol často obsahuje nečistotu (identifikovanou jako stigmastanol), která *se vymývá okamž*itě po β-sitosterolu. Plochy těchto dvou píků musí být při vyhodnocování celkového přítomného β-sitosterolu sečteny.

▼B

PŘÍLOHA IX

(Článek 6)

REFERENČNÍ METODA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ KRAVSKÉHO MLÉKA A KASEINÁTŮ V SÝRECH Z OVČÍHO MLÉKA, KOZÍHO MLÉKA NEBO BUVOLÍHO MLÉKA, NEBO SMĚSÍ OVČÍHO, KOZÍHO A BUVOLÍHO MLÉKA

1. PŘEDMĚT

Zjišťování kravského mléka a kaseinátů v sýrech vyrobených z ovčího mléka, kozího mléka, buvolího mléka anebo ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka izoelektrickou fokusací γ-kaseinů po plasminolýze.

2. OBLAST POUŽITÍ

Metoda je vhodná pro citlivé a specifické zjišťování mléka a kaseinátu, též tepelně ošetřených, v čerstvých a zralých sýrech vyrobených z ovčího mléka, kozího mléka, buvolího mléka nebo ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka. Není vhodná k odhalení falšování mléka a sýrů tepelně ošetřenými bílkovinnými koncentráty z hovězí syrovátky.

3. PODSTATA METODY

3.1 Izolace kaseinů ze sýra a referenčních standardů

3.2 Rozpuštění izolovaných kaseinů a proteolýza plasminem (EC.3.4.21.7)

3.3 Izoelektrická fokusace plasminem ošetřených kaseinů za přítomnosti močoviny a vybarvení bílkovin

3.4 Vyhodnocení vybarvených obrazců kaseinu γ_3 a γ_2 (důkaz přítomnosti kravského mléka) na základě porovnání obrazce získaného ze vzorku s obrazci získanými u téhož gelu z referenčních standardů obsahujících 0 % a 1 % kravského mléka

4. CHEMIKÁLIE

Není-li stanoveno jinak, používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Voda musí být redestilovaná nebo rovnocenné čistoty.

Poznámka: Následující údaje se vztahují na laboratorně připravované polyakrylamidové gely s obsahem močoviny o rozměrech 265 × 125 × 0,25 mm. Pokud se použijí jiné rozměry nebo druhy gelu, může být nutné upravit podmínky separace.

Isoelektrická fokusace

4.1 **Chemikálie pro přípravu polyakrylamidových gelů s obsahem močoviny**

4.1.1 *Zásobní roztok gelu*

Ve vodě rozpusťte:

4,85g akrylamidu

0,15g N, N'-methylen-bis-akrylamidu (BIS)

48,05g močoviny

15,00g glycerolu (87 % hm.),

doplňte na 100 ml a uložte do chladničky v hnědé skleněné lahvi.

▼B

Poznámka: Místo uvedených množství neurotoxického akrylamidu lze použít komerčně dostupný, předem namíchaný roztok akrylamidu a BIS. V případě, že koncentrace komerčního roztoku je 30 % hm./obj. akrylamidu a 0,8 % hm./obj. BIS, pak uvedená množství (4,85g akrylamidu a 0,15g BIS) musí být nahrazena komerčním roztokem o objemu 16,2 ml. Zásobní roztok lze skladovat nejdéle 10 dnů. Pokud je jeho vodivost vyšší než 5 μS, je nutné provést jeho deionizaci promícháváním s 2g Amberlitu MB-3 po dobu 30 minut a poté jej přefiltrovat přes 0,45μm membránu.

4.1.2 *Roztok gelu*

Připravte roztok gelu smícháním přísad a amfolytů se zásobním roztokem gelu (viz 4.1.1).

9,0 ml zásobního roztoku

24 mg β-alaninu

500 μl amfolytu pH 3,5–9,5 ([1])

250 μl amfolytu pH 5–7 ([1])

250 μl amfolytu pH 6–8 ([1]).

Gelový roztok promíchejte a odplyňujte po dobu dvou až tří minut v ultrazvukové lázni nebo ve vakuu.

Poznámka: Gelový roztok připravte bezprostředně před jeho naléváním (viz 6.2).

4.1.3 *Roztoky katalyzátorů*

4.1.3.1 N, N, N', N'-tetramethylendiamin (Temed)

4.1.3.2 40 % hm./obj. roztoku persíranu amonného (PER)

800 mg PER rozpusťte ve vodě a doplňte na 2 ml.

Poznámka: Vždy používejte čerstvě připravený roztok PER.

4.2 **Kontaktní tekutina**

Kerosin nebo kapalný parafin

4.3 **Anodový roztok**

Rozpusťte 5,77g kyseliny fosforečné (85 % hm.) ve vodě a zřeďte na 100 ml.

4.4 **Katodový roztok**

Rozpusťte 2,00g hydroxidu sodného ve vodě a zřeďte vodou na 100 ml.

Příprava vzorku

4.5 **Chemikálie určené k izolaci bílkovin**

4.5.1 *Zředěná kyselina octová (25,0 ml ledové kyseliny octové doplněné vodou do 100 ml)*

4.5.2 *Dichlormethan*

4.5.3 *Aceton*

4.6 **Tlumivý roztok pro rozpuštění bílkovin**

Ve vodě rozpusťte:

5,75g glycerolu (87 % hm.)

24,03g močoviny

250 mg dithiothreitolu

a doplňte na 50 ml vodou.

([1]) Jako zvláště vhodné pro dosažení žádoucího rozdělení γ-kaseinů se ukázaly výrobky Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) a Resolyte® pH 5–7 a pH 6–8 (BDH, Merck).

▼B

Poznámka: Skladujte v chladničce; maximální doba uskladnění je jeden týden.

4.7 **Chemikálie určené k plasminovému štěpení kaseinů**

4.7.1 *Tlumivý roztok uhličitanu amonnného*

Titrujte molární roztok hydrogenuhličitanu amonného 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml vody) obsahující 0,05 mol/l kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, 1,46 g/100 ml) roztokem uhličitanu amonného (1,92 g/100 ml vody) obsahujícího 0,05 mol/l EDTA na pH 8.

4.7.2 *Hovězí plasmin (EC. 3.4.21.7), s aktivitou nejméně 5 U/ml.*

4.7.3 *Roztok kyseliny ε-aminokapronové určené k inhibici enzymu*

Rozpusťte 2,624g kyseliny ε-aminokapronové (6-amino-n-hexankyseliny) ve 100 ml 40 % obj. ethanolu.

4.8 **Referenční standardy**

4.8.1 *Certifikované referenční standardy směsi ovčího a kozího odstředěného mléka vysráženého pomocí syřidla a s obsahem 0 % a 1 % kravského mléka lze získat od Ústavu pro referenční materiály a měření působícího při Komisi, B-2440, Geel, Belgie.*

4.8.2 *Příprava laboratorních prozatímních standardů buvolího mléka vysráženého pomocí syřidla a s obsahem 0 % a 1 % kravského mléka*

Odstředěné mléko se připraví odstředěním syrového buvolího nebo kravského mléka při teplotě 37 °C (2 500g, 20 minut). Po rychlém ochlazení zkumavky a jejího obsahu na 6 až 8 °C se úplně odstraní horní tuková vrstva. Pro přípravu 1 % standardu přidejte 5,00 ml odstředěného kravského mléka do 495 ml odstředěného buvolího mléka v kádince o obsahu 1 l. Hodnotu pH upravte na 6,4 přídavkem zředěné kyseliny mléčné (10 %, hm./obj.). Teplotu upravte na 35 °C, přidejte 100 µl telecího syřidla (aktivita syřidla 1:10 000, cca 3 000 U/ml) a míchejte po dobu 1 minuty. Poté kádinku zakryjte hliníkovou fólií a nechte hodinu stát při teplotě 35 °C k utvoření sýřeniny. Po utvoření sýřeniny se veškeré mléko vysrážené pomocí syřidla lyofilizuje, aniž by předtím byla provedena homogenizace nebo odebrání syrovátky. Lyofilizované mléko se jemně rozemele na homogenní prášek. K přípravě referenčního standardu 0 % použijte stejný postup u čistého odstředěného buvolího mléka. Referenční standardy musí být skladovány při teplotě – 20 °C.

Poznámka: Před přípravou referenčních standardů se doporučuje zkontrolovat čistotu buvolího mléka izoelektrickou fokusací kaseinů vystavených působení plasminu.

Chemikálie určené k barvení bílkovin

4.9 **Fixativ**

Rozpusťte 150g kyseliny trichloroctové ve vodě a doplňte na 1 000 ml.

4.10 **Odbarvovací roztok**

Zřeďte 500 ml methanolu a 200 ml ledové kyseliny octové destilovanou vodou na 2 000 ml.

Poznámka: Odbarvovací roztok připravte každý den čerstvý; lze jej připravit smícháním stejných objemů zásobního roztoku 50 % obj. methanolu a zásobního roztoku 20 % obj. ledové kyseliny octové.

4.11 **Barvicí roztoky**

4.11.1 *Barvicí roztok (zásobní roztok 1)*

V 1 000 ml 90 % obj. methanolu rozpusťte pomocí magnetické míchačky (asi 45 minut) 3,0g brilantní modři Coomassie G-250 (C. I. 42655) a roztok přefiltrujte přes dva středně husté skládané filtry.

▼B

4.11.2 *Barvicí roztok (zásobní roztok 2)*

V 1 000 ml 20 % obj. kyseliny octové rozpusťte 5,0g síranu měďnatého, pentahydrátu.

4.11.3 *Barvicí roztok (pracovní roztok)*

Bezprostředně před barvením smíchejte 125 ml obou zásobních roztoků (4.11.1 a 4.11.2).

Poznámka: Barvicí roztok je třeba použít v den přípravy.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Skleněné desky (265 × 125 × 4 mm), pryžový váleček (o šířce 15 cm), nivelační stolek

5.2 Nosná fólie gelu (265 × 125 mm)

5.3 Krycí fólie (280 × 125 mm). Na každý dlouhý okraj nalepte pruh lepicí pásky (280 × 6 × 0,25 mm) (viz obrázek 1).

5.4 Elektrofokusační komora s chladicí deskou (např. 265 × 125 mm) a vhodný napájecí zdroj (≥ 2,5 kV) nebo automatické elektroforetické zařízení

5.5 Cirkulační kryostat s regulací teploty ve výši 12 ± 0,5 °C

5.6 Odstředivka nastavitelná na 3 000g

5.7 Elektrodové proužky (o délce ≥ 265 mm)

5.8 Plastové kapací nádobky na anodový a katodový roztok

5.9 Aplikátory vzorku (10 × 5 mm, z viskózy nebo filtračního papíru s nízkou adsorpcí bílkovin)

5.10 Nůžky, skalpely a pinzety z nerezové oceli

5.11 Odbarvovací a barvicí misky (např. misky na nástroje 280 × 150 mm) z nerezové oceli nebo skleněné

5.12 Nastavitelný tyčový homogenizátor s průměrem tyče 10 mm a rychlostí 8 000 až 20 000 ot/min

5.13 Magnetická míchačka

5.14 Ultrazvuková lázeň

5.15 Svářečka fólií

5.16 Mikropipety na 25 µl

5.17 Vakuová odstředivka nebo lyofilizátor

5.18 Termostatem řízená vodní lázeň, nastavitelná na 35 a 40 ± 1 °C s třepačkou

5.19 Densitometrické zařízení umožňující měření na vlnové délce λ = 634 nm

6. PRACOVNÍ POSTUP

6.1 **Příprava vzorku**

6.1.1 *Izolace kaseinů*

Do odstředivkové kyvety na 100 ml navažte množství sýra nebo referenčního standardu odpovídající 5g sušiny, přidejte 60 ml destilované vody a obsah homogenizujte tyčovým homogenizátorem (8 000 až 10 000 ot/min). Upravte pH na 4,6 zředěnou kyselinou octovou (4.5.1) a odstřeďujte (5 minut, 3 000g). Dekantujte tuk a syrovátku a zbytek homogenizujte při 20 000 ot/min se 40 ml destilované vody s hodnotou pH upravenou na 4,5 zředěnou kyselinou octovou (4.5.1). Přidejte 20 ml dichlormethanu (4.5.2) a znovu homogenizujte a odstřeďuje (5 minut, 3 000g). Špachtlí vyjměte kaseinovou vrstvu, která se nachází

▼B

mezi vodnou a organickou fází (viz obrázek 2), a obě fáze dekantujte. Kasein znovu homogenizujte se 40 ml destilované vody (viz výše) a 20 ml dichlormethanu (4.5.2) a odstřeďte. Tento postup opakujte, dokud obě extrakční fáze nejsou bezbarvé (dvakrát až třikrát). Bílkovinný zbytek homogenizujte s 50 ml acetonu (4.5.3) a přefiltrujte přes středně hustý skládaný papírový filtr. Zbytek promyjte dvěma samostatnými 25ml dávkami acetonu a nechte vysušit na vzduchu nebo v proudu dusíku. Potom jemně rozmělněte v třecí misce.

Poznámka: Suché bílkovinné extrakty se musí uchovávat při teplotě – 20 °C.

6.1.2 *Přeměna β-kaseinů na γ-kaseiny působením plasminu*

Rozptylte 25 mg izolovaných kaseinů (6.1.1) v 0,5 ml tlumivého roztoku uhličitanu amonného (4.7.1) a směs 20 minut homogenizujte, např. ultrazvukem. Směs zahřejte na 40 °C a přidejte 10 µl plasminu (4.7.2), promíchejte a inkubujte 1 hodinu při teplotě 40 °C za stálého třepání. Pro inhibici enzymu přidejte 20 µl roztoku kyseliny ε-aminokapronové (4.7.3). Poté přidejte 200 mg pevné močoviny a 2 mg dithiothreitolu.

Poznámka: Pro získání lepší symetrie fokusovaných kaseinových pásů se doporučuje po přidání kyseliny ε-aminokapronové roztok lyofilizovat a poté zbytky rozpustit v 0,5 ml tlumivého roztoku pro rozpouštění bílkovin (4.6).

6.2 **Příprava polyakrylamidových gelů s obsahem močoviny**

Na skleněnou desku (5.1) válečkem naneste nosnou fólii gelu (5.2) s pomocí několika kapek vody a přebytečnou vodu odsajte papírovým ubrouskem nebo kapesníčkem. Stejným způsobem válečkem naneste druhou, krycí fólii (5.3) s distančními vložkami (0,25 mm) na jinou skleněnou desku. Tuto druhou desku uložte vodorovně na nivelační stolek.

K připravenému odplyněnému roztoku gelu (4.1.2) přidejte 10 µl Temedu (4.1.3.1), protřepejte a přidejte 10 µl roztoku PER (4.1.3.2); důkladně promíchejte a okamžitě nalijte rovnoměrně na střed krycí fólie. Jeden okraj nosné desky gelu (stranou s fólií směrem dolů) přiložte k desce s krycí fólií a pomalu pokládejte tak, aby se mezi fóliemi vytvořila pravidelně rozprostřená tenká vrstva gelu bez bublin (obrázek 3). Pomocí tenké špachtle nosnou desku gelu opatrně přitiskněte po celé délce a položte na ni tři další skleněné desky, aby ji zatížily. Po skončení polymerace (asi po 60 minutách) spolu s krycí fólií sejměte gel zpolymerovaný na nosné fólii gelu tak, že skleněné desky nakloníte. Zadní stranu nosné fólie pečlivě očistěte, aby se odstranily zbytky gelu a močoviny. „Gelový sendvič“ zavařte do tenké fólie a uložte do chladničky (nejdéle na šest týdnů).

Poznámka: Krycí fólii s distančními vložkami lze použít znovu. Polyakrylamidový gel může být rozřezán na menší části; je to vhodné v případě omezeného počtu vzorků nebo v případě použití automatického elektroforetického zařízení (dva gely o rozměrech 4,5 × 5 cm).

6.3 **Izoelektrická fokusace**

Nastavte kryostat na 12 °C. Zadní stranu nosné fólie gelu otřete kerosinem a poté na střed chladicího bloku kápněte několik kapek kerosinu (4.2). Opatrně přiložte „gelový sendvič“ nosnou fólií obrácený dolů, aby se vytlačily všechny vzduchové bubliny. Přebytečný kerosin otřete a sejměte krycí fólii. Elektrodové proužky napusťte elektrodovými roztoky (4.3, 4.4), seřízněte na délku gelu a uložte na místo (vzdálenost elektrod 9,5 cm).

▼B

Podmínky izoelektrické fokusace

6.3.1 *Rozměry gelu 265 × 125 × 0,25 mm*

Fáze	Doba (min)	Napětí (V)	Proud (mA)	Příkon (W)	Volty/hodiny (Vh)
1. Předběžná fokusace	30	max. 2 500	max. 15	konstantní 4	cca 300
2. Fokusace vzorku ([1])	60	max. 2 500	max. 15	konstantní 4	cca 1 000
3. Konečná fokusace	60	max. 2 500	max. 5	maximální 20	cca 3 000
	40	max. 2 500	max. 6	maximální 20	cca 3 000
	30	max. 2 500	max. 7	maximální 25	cca 3 000

([1]) Použití vzorku: Po předběžné fokusaci (krok 1) pipetou odměřte 18 µl vzorku a standardních roztoků do aplikátorů vzorku (10 × 5 mm), vložte na gel ve vzdálenosti 1 mm od sebe a 5 mm podélně od anody a jemně přitlačte. Fokusaci proveďte za výše uvedených podmínek a aplikátory vzorku opatrně vyjměte po 60 minutách fokusace vzorku.

Poznámka: Jestliže se změní tloušťka nebo šířka gelů, hodnoty proudu a příkonu musí být odpovídajícím způsobem upraveny (např. hodnoty proudu a příkonu se zdvojnásobí, použije-li se gel o rozměrech 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2 *Příklad programování napětí u automatického elektroforetického zařízení (2 gely 5,0 × 4,5 cm, elektrody bez proužků se přikládají přímo na gel.*

Fáze	Napětí	Proud	Příkon	Teplota	Volty/hodiny
1. Předběžná fokusace	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Fokusace vzorku	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusace	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusace	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Aplikátor vzorku ve fázi 2 vložte při 0 Vh.

Aplikátor vzorku ve fázi 2 odstraňte při 30 Vh.

6.4 **Barvení bílkovin**

6.4.1 *Fixace bílkovin*

Okamžitě po vypnutí napájení odstraňte elektrodové proužky a gel ihned vložte do barvicí/ odbarvovací misky naplněné 200 ml fixatéru (4.9). Gel v ní ponechte 15 minut za stálého třepání.

6.4.2 *Praní a barvení gelové desky*

Fixatér beze zbytku dekantujte a gelovou desku dvakrát promývejte po dobu 30 sekund vždy ve 100 ml odbarvovacího roztoku (4.10). Odbarvovací roztok dekantujte, misku naplňte 250 ml barvicího roztoku (4.11.3) a gel nechte za mírného třepání po dobu 45 minut zbarvovat.

6.4.3 *Odbarvení gelové desky*

Barvicí roztok dekantujte a gelovou desku dvakrát promývejte po dobu 30 sekund vždy ve 100 ml odbarvovacího roztoku (4.10). Poté 15 minut protřepávejte s 200 ml odbarvovacího roztoku; fázi odbarvování opakujte nejméně dvakrát až třikrát, dokud není pozadí čiré a bezbarvé. Gelovou desku potom promyjte destilovanou vodou (2 × 2 minuty) a nechte uschnout na vzduchu (2 až 3 hodiny) nebo usušte vysoušečem vlasů (10 až 15 minut).

▼B

Poznámka 1: Fixaci, promývání, barvení a odbarvování provádějte při teplotě 20 °C. Vyšší teploty nepoužívejte.

Poznámka 2: Pokud upřednostňujete citlivější obarvení stříbrem (např. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, kód č. 17–1150–01), musí být kaseinové vzorky ošetřené plasminem zředěny v poměru 5 mg/ml.

7. HODNOCENÍ

Hodnocení se provádí porovnáním proteinových obrazců zkoumaného vzorku s obrazci referenčních standardů u stejného gelu. Zjišťování kravského mléka v sýrech vyrobených z ovčího mléka, kozího mléka, buvolího mléka nebo ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka se provádí prostřednictvím γ_3- a γ_2-kaseinů, jejichž izoelektrické body se nacházejí v rozmezí mezi pH 6,5 a pH 7,5 (obrázky 4a, b, obrázek 5). Detekční mez je nižší než 0,5 %.

7.1 **Vizuální hodnocení**

Pro vizuální hodnocení množství kravského mléka se doporučuje upravit koncentraci vzorků a referenčních standardů s cílem dosáhnout u hovězích, kozích a/nebo buvolích γ_2- a γ_3-kaseinů (viz „γ_2 E, G, B“ a „γ_3 E, G, B“ na obrázcích 4a, b a obrázku 5) stejné úrovně intenzity. Pouze za těchto podmínek lze přímo posoudit množství kravského mléka (menší nebo větší než 1 % nebo ve výši 1 %) v analyzovaném vzorku porovnáním intenzity hovězích γ_3- a γ_2-kaseinů (viz „γ_3 C“ a „γ_2 C“ na obrázcích 4a, b a obrázku 5) s intenzitami kaseinů v referenčních standardech s obsahy 0 % a 1 % (ovčích, kozích), nebo prozatímních laboratorních standardech (buvolích).

7.2 **Denzitometrické hodnocení**

Pokud je to možné, použijte pro stanovení poměru mezi plochami píků hovězích γ_2- a γ_3-kaseinů a plochami píků ovčích, kozích a/nebo buvolích γ_2- a γ_3-kaseinů (viz obrázek 5) denzitometrii (5.19). Tuto hodnotu porovnejte s poměrem ploch píků γ_2- a γ_3-kaseinů v 1 % referenčním standardu (ovčím, kozím) nebo prozatímním laboratorním standardu (buvolím) analyzovaných u téhož gelu.

Poznámka: Tato metoda funguje uspokojivě, pokud existuje jasný pozitivní signál obou hovězích γ_2- a γ_3-kaseinů v 1 % referenčním standardu, avšak nikoli v 0 % referenčním standardu. V opačném případě je nutné postup optimalizovat při přesném dodržení pokynů stanovených v dané metodě.

Vzorek je považován za pozitivní, jestliže hodnoty obou hovězích γ_2- a γ_3-kaseinů nebo příslušných poměrů ploch píků jsou stejné nebo větší než hodnoty odpovídající 1 % referenčnímu standardu.

8. LITERATURA

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

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

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

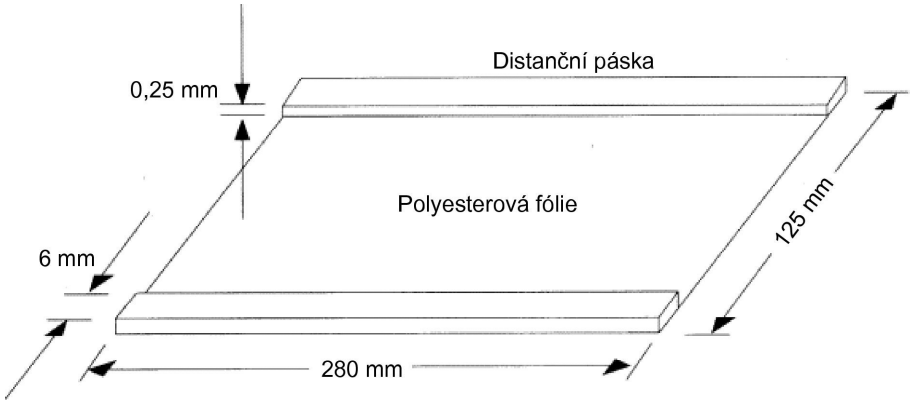
4. *Krause I., Belitz H.–D., Kaiser K.–P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf und Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195–199 (1982).*

▼B

5. *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).*

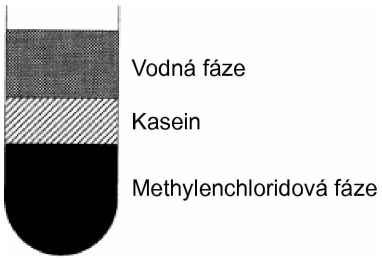
Obrázek 1

Schematický výkres krycí fólie



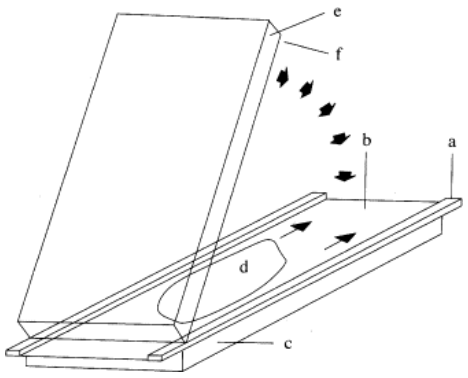
Obrázek 2

Kaseinová vrstva plovoucí mezi vodnou a organickou fází po odstředění



Obrázek 3

Sklápěcí technika pro odlévání ultratenkých polyakrylamidových gelů

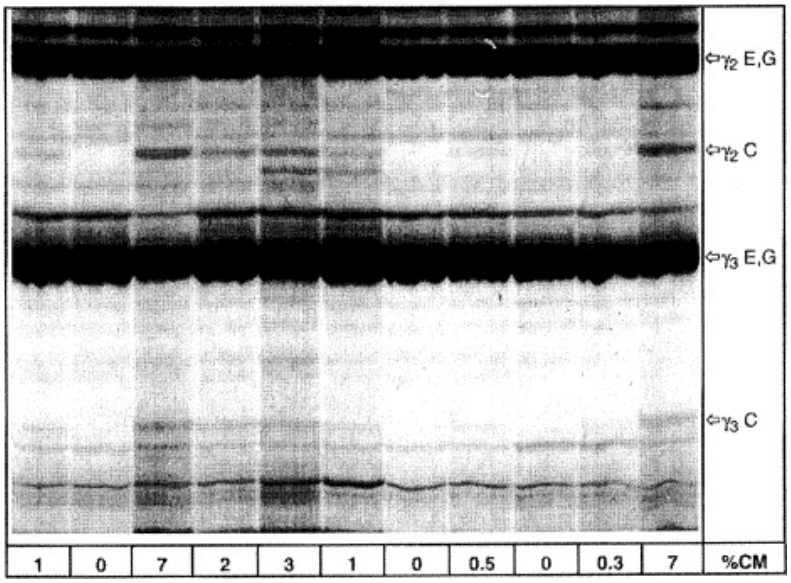


a = distanční páska (0,25 mm); b = krycí fólie (5.3); c, e = skleněné desky (5.1); d = gelový roztok (4.1.2); f = nosná fólie gelu (5.2)

▼B

Obrázek 4

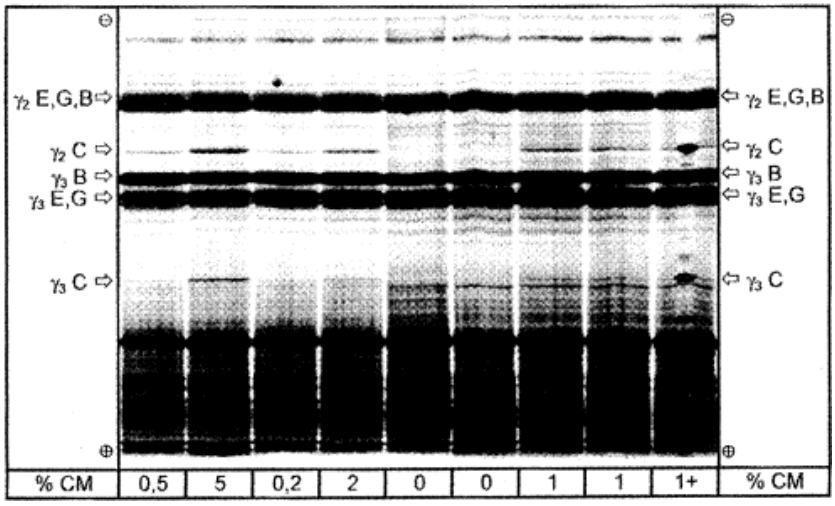
Izoelektrická fokusace kaseinů ze sýrů z ovčího a kozího mléka, ošetřených plasminem, s různým obsahem kravského mléka



% CM = procento kravského mléka, C = kravské, E = ovčí, G = kozí
Na obrázku je znázorněna horní polovina gelu IEF.

Obrázek 4b

Izoelektrická fokusace kaseinů ze sýrů vyrobených ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka, ošetřených plasminem, s různým obsahem kravského mléka

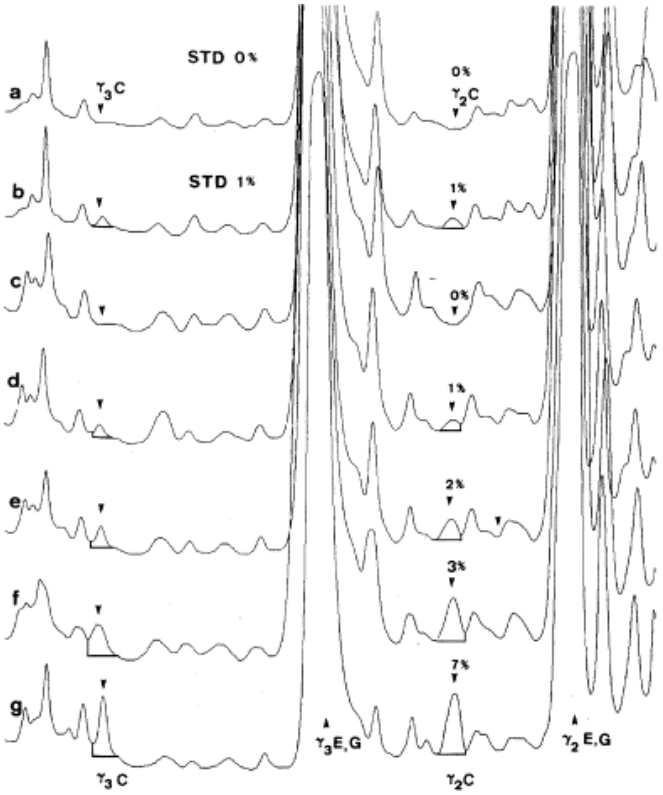


% CM = procento kravského mléka; 1+ = vzorek s obsahem 1 % kravského mléka a s přídavkem čistého hovězího kaseinu ve středu dráhy. C = kravské, E = ovčí, G = kozí, B = buvolí
Na obrázku je znázorněna celá separační vzdálenost gelu IEF.

▼B

Obrázek 5

Superpozice denzitogramů referenčních standardů (STD) a vzorků sýra vyrobeného ze směsi ovčího a kozího mléka, po izoelektrické fokusaci



a, b = referenční standardy obsahující 0 a 1 % kravského mléka; c–g = vzorky sýra obsahujícího 0, 1, 2, 3 a 7 % kravského mléka. C = kravské, E = ovčí, G = kozí.
Byla snímána horní polovina gelu IEF při λ = 634 nm.

▼B

PŘÍLOHA X

(Článek 7)

REFERENČNÍ METODA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ V MÁSLE, SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE, KASEINU A KASEINÁTECH

1. PŘÍPRAVA VZORKŮ

   Norma ISO 8261.

2. PRACOVNÍ POSTUP

   Norma ISO 4831.

   Do kultivační půdy se naočkují vzorky odpovídající 1g másla nebo 0,1g sušeného odstředěného mléka nebo kaseinu/kaseinátů.

   Pro každý vzorek se naočkují tři zkumavky.

3. VÝSLEDKY

   Jestliže 3 zkumavky dají 3 negativní výsledky, je výsledek „vyhovující“.

   Jestliže 3 zkumavky dají 2 nebo 3 pozitivní výsledky, je výsledek „nevyhovující“.

   Jestliže 3 zkumavky dají 2 negativní výsledky, provede se analýza dvakrát znovu (se dvěma zkumavkami).

   — Jestliže jsou oba výsledky negativní, je výsledek „vyhovující“.

   — Je-li alespoň jeden výsledek pozitivní, je výsledek „nevyhovující“.

▼B

PŘÍLOHA XI

(Článek 8)

STANOVENÍ LAKTÓZY V KRMNÝCH SMĚSÍCH

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Stanovení laktózy v krmných směsích.

2. NORMATIVNÍ ODKAZ

Obsah laktózy je definován jako hmotnostní procento stanovené popsaným postupem.

3. DEFINICE

Obsah bezvodé laktózy se vyjadřuje v g na 100 g.

4. PODSTATA METODY

Krmnou směs rekonstituujte s vodou. Do zředěného odváženého alikvotního dílu přidejte roztok podle Biggse, aby se z krmné směsi vysrážela tuková a bílkovinná frakce. Vzorek přefiltrujte (nebo odstřeďte) a filtrát (nebo supernatant) nastříkněte na katexovou HPLC kolonu v olovnaté formě, přičemž jako mobilní fázi použijte vodu čistoty pro HPLC. Vymytou laktózu zjistěte diferenčním refraktometrem ([i]).

5. CHEMIKÁLIE

5.1 **Obecně**

Není-li stanoveno jinak, používejte pouze chemikálie čistoty p.a. a odplyněnou vodu čistoty pro HPLC.

5.2 **Laktóza**

D-laktóza-monohydrát ($(C_{12}H_{22})O_{11}.\ H_2O$) může pohlcovat další vlhkost. Před použitím stanovte skutečný obsah vody Karl-Fisherovou metodou, nebo nadbytečnou vlhkost odstraňte umístěním laktózy do pece zahřáté na 105 °C po dobu 8 hodin (tímto postupem laktóza neztrácí krystalickou vodu).

5.3 **Koncentrovaný roztok podle Biggse/Szijarta** ([ii])

V odměrné baňce na 100 ml rozpusťte v asi 70 ml vody čistoty pro HPLC (6.8) 9,10 g dihydrátu octanu zinečnatého ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) a 5,46 g monohydrátu kyseliny fosfowolframové ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$).

Přidejte 5,81 ml ledové kyseliny octové (CH_3COOH). Zřeďte vodou čistoty pro HPLC (6.8) na 100 ml a promíchejte. Tento roztok lze skladovat při laboratorní teplotě po dobu jednoho roku.

5.4 **Zředěný roztok podle Biggse/Szijarta**

S použitím odměrné baňky zřeďte 25 ml koncentrovaného roztoku podle Biggse/Szijarta (5.3) na 500 ml vodou. Tento roztok lze skladovat při laboratorní teplotě po dobu jednoho měsíce.

5.5 **Příprava vody čistoty pro HPLC**

Pomocí systému vakuové filtrace (6.8) přefiltrujte ultračistou vodu (6.9). Pro zlepšení výkonu čerpadla a pro získání stabilní základní linie denně odplyňujte mobilní fázi volbou jedné z dostupných technik, např. probubláváním heliem, sonikací, vakuovým odplyňovacím systémem nebo odplyňovacím systémem, který je součástí chromatografu.

Poznámka: V zájmu prodloužení životnosti kolony je nezbytné, aby obsah oxidu uhličitého v eluentu byl co nejnižší a aby se zabránilo opakované absorpci.

▼B

6. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a zejména:

6.1 **Ionexová HPLC kolona**

Náplň kolony: 8 % zesítěný polystyren-divinylbenzenový kopolymer s katexovými skupinami v olovnaté formě.

Rozměry kolony: délka 300 mm, vnitřní průměr cca 8 mm.

Je možné použít i jiné průměry, avšak za předpokladu, že se odpovídajícím způsobem přizpůsobí průtok.

6.2 **Předkolona kolona**

Předkolona je kombinací odděleného kationtového měniče (H^+) a aniontového měniče (CO_3-), z nichž každý je naplněn do kolon o rozměrech asi 30 mm x 4,6 mm (d x VP) (*např*. mikropředkolony v mikropředkolonovém držáku), jež jsou zapojeny do série nebo ve formě směsi obsahující AG 50 W–X4, zrnitost 400 (H^+), a AG3–X4A, zrnitost 200–400 (OH-), v poměru 35:65 (% hm.) ručně naplněné v koloně o rozměrech asi 20 × 9 mm (d × VP).

6.3 **Termostat kolony**

Termostat schopný udržovat stálou teplotu 85 °C ± 1 °C.

6.4 **HPLC čerpadlo**

Čerpadlo schopné zajistit stálý průtok (kolísání < 0,5 %) při 0,2–1,0 m/min.

6.5 **Nástřikové zařízení pro HPLC**

Automatické zařízení na odběr vzorků schopné nastřikovat 25 µl a s opakovatelností < 0,5 %.

Alternativně se může použít ruční zařízení (požadavky jsou stejné jako na automatické zařízení pro odběr vzorků).

6.6 **HPLC detektor**

Vysoce citlivý refraktometrický detektor o šumu < $5{,}10^{-9}$ jednotek RI.

6.7 **Integrátor**

Software nebo vyhrazený integrátor pro získávání dat, zpracování a generování ploch píků a výšek píků, jež lze převést na koncentrace laktózy.

6.8 **Čistička vody**

Systém, který je schopen poskytnout ultračistou vodu (typ 1) s odporem > 14 MΩ.cm.

6.9 **Filtrační jednotka na roztoky**

Systém, který umožňuje filtrovat vodu pomocí membránového filtru s póry o velikosti 0,45 µm.

Poznámka: Mnoho čističek vody (6.8) obsahuje zabudovaný filtrační systém s póry o velikosti 0,45 nebo 0,2 µm. Další filtraci lze vynechat, jestliže je tato voda použita přímo.

6.10 **Analytické váhy**

Váhy s možností odečtu po 0,1 mg.

6.11 **Vodní lázeň**

Vodní lázeň s možností udržování teploty na 40 °C (±0,5 °C).

6.12 **Odstředivka**

Odstředivka umožňující dosáhnout síly alespoň 3 000 g u Eppendorfových zkumavek nebo u stejných nebo větších typů zkumavek.

▼B

6.13 **Odměrná baňka na 50 ml**

Objem 50 ml, třída A

Poznámka: Baňky jiných objemů lze použít, zohlední-li se objemový faktor.

6.14 **Odměrná baňka na 100 ml**

Objem 100 ml, třída A

6.15 **Dělená pipeta**

Dělená pipeta o objemu 10 ml

Poznámka: Alternativně lze použít ruční pipetor o objemu 5 ml dvojím přidáním objemu 5 ml činidla (5.).

7. ODBĚR VZORKŮ

Je důležité, aby laboratoř obdržela vzorek odebraný v souladu s normou ISO 707/IDF 50 ([iii]), který je skutečně reprezentativní a který nebyl během přepravy nebo skladování poškozen ani změněn.

8. PŘÍPRAVA STANDARDNÍHO ROZTOKU LAKTÓZY

8.1 **Referenční standard 1**

V odměrné baňce na 100 ml (5.2) rozpusťte s přesností na 0,1 mg odvážené množství asi 50 mg monohydrátu laktózy (6.14) a doplňte po značku vodou.

8.2 **Referenční standard 2**

V odměrné baňce na 100 ml (5.2) rozpusťte s přesností na 0,1 mg odvážené množství asi 100 mg monohydrátu laktózy (6.14) a doplňte po značku vodou.

Poznámka: Standardní roztoky lze skladovat nejdéle jeden týden při teplotě asi 5 °C.

9. PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍHO VZORKU

9.1 **Rekonstituce vzorku**

Do baňky na 50 ml (6.13) odměřte asi 5 g prášku a váhu zaznamenejte s přesností na 1 mg (W_1 (11)). Přidejte 50 ml vody a zaznamenejte zvýšení hmotnosti (W_2 (11)) s přesností na 0,01 g. Uzavřenou baňku umístěte na 30 minut do vodní lázně (6.11) a během této doby ji několikrát obraťte. Poté ji nechte vychladnout na laboratorní teplotu.

9.2 **Zpracování vzorku**

Asi 1 g tohoto roztoku odeberte do odměrné baňky na 50 ml (6.13), zaznamenejte hmotnost s přesností na 1 mg (W_3 (11)), přidejte 20 ml vody a poté 10 ml zředěného činidla podle Biggse/Szijarta (5.4). Následně doplňte po značku vodou. Během prvních 30 minut baňku pětkrát opatrně obraťte.

Po jedné hodině odeberte alikvotní díl a odstřeďujte (6.12) při 3 000 g po dobu 10 minut (lze použít vyšší odstředivou sílu při odpovídajícím způsobem zkrácené době). Pro analýzu HPLC použijte alikvotní díl supernatantu.

10. STANOVENÍ POMOCÍ HPLC

10.1 **Předběžná příprava HPLC**

10.1.1 *Instalace kolony a předkolony*

Instalujte předkolonu mimo termostat kolony (6.2) a kolonu (6.3) do termostatu.

Poznámka: Není-li termostat vybaven kapilárou pro předehřátí eluentu, je nutné, aby eluent před vstupem do kolony prošel v termostatu asi 15 cm dlouhou nerezovou kapilárou (je nezbytně nutné, aby se eluent před vstupem do kolony zahřál, jinak dojde k rozšíření píku).

▼B

10.1.2 *Detektor a počáteční průtok*

V zájmu získání stabilní základní linie spusťte detektor (6.6) alespoň 24 hodin před zahájením analýzy. Vnitřní teplotu detektoru nastavte na 35 °C. Průtok nastavte na 0,2 ml/min (6.4) po dobu alespoň 20 minut a zároveň nastavte termostat kolony (6.3) na laboratorní teplotu.

10.1.3 *Termostat kolony a konečný průtok*

Termostat kolony (6.3) nastavte na 85 °C. Po dosažení této teploty průtok postupně zvyšujte po dobu 30 minut z 0,2 ml/min na 0,6 ml/min (6.4). S tímto průtokem a při teplotě 85 °C nechte systém ustálit po dobu 2 hodin, nebo dokud není dosaženo stabilní základní linie.

10.1.4 *Integrace*

Pečlivě zvolte parametry pro získávání a integraci údajů (6.7), jako jsou rychlost údajů, citlivost, časová konstanta, šířka píku a práh.

Retenční čas laktózy je asi 11 minut.

Poznámka: Mnoho softwarových programů pro získávání údajů (6.7) umožňuje snadné měření teoretického počtu pater. Teoretický počet pater referenčního standardu 1 (8.1) měřte pravidelně a kolonu (6.1) vyměňte, je-li počet pater o 25 % nižší než počáteční hodnota nové kolony.

10.1.5 *Zkouška předkolony*

Pravidelně (alespoň jednou v každé sérii) kontrolujte schopnost předkolony (6.2) eliminovat soli ze vzorku nastříknutím 25 µl 0,05 % roztoku chloridu sodného. Kdykoli se objeví pík, musí se předkolona vyměnit.

10.2 **Analýza standardů**

Na začátku každé série analýz nastříkněte 25 µl (6.5) referenčního standardu 1 (8.1) a následně stejné množství referenčního standardu 2 (8.2). Tento postup opakujte u každých 10 až 20 vzorků a také na konci série.

10.3 **Analýza vzorků**

Nastříkněte 25 µl supernatantu (9.2) vzorku.

11. VÝPOČET A VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

11.1 **Kalibrace**

Obvykle se pro výpočet výsledků používá výška píků. Je-li však v signálu příliš šumu, lze použít plochu píků (číselné vyjádření pomocí výšky píku je méně ovlivněno píky složek o nízké koncentraci, které jsou částečně, avšak nedostatečně odděleny od píku laktózy).

Software (6.7) by měl vypočítat lineární kalibrační křivku procházející počátkem. Zkontrolujte možnou nelineárnost křivky (zjevná nelineárnost je nejpravděpodobněji způsobena chybou při přípravě referenčních standardů 1 (8.1) nebo 2 (8.2), špatnou integrací a méně pravděpodobně špatně fungujícím nástřikovým zařízením).

Jako vstup použijte vypočítané koncentrace laktózy v mg/ml referenčních standardů 1 (8.1) a 2 (8.2) vyjádřené jako bezvodá laktóza.

Směrnice kalibrační přímky (RF) je definována plochou/koncentrací v mg/ml.

11.2 **Vzorky**

Výsledek analýzy se vyjadřuje v g na 100 g a vypočítá se pomocí softwaru (6.7) nebo pomocí následující rovnice:

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

▼B

kde:

C: koncentrace laktózy v g/100 g prášku

H: výška píku laktózy ve vzorku

RF: odezvový faktor (či směrnice) z kalibračního grafu v mV/mg/ml

W_1: hmotnost vzorku prášku v g (9.1)

W_2: hmotnost vody přidané do vzorku prášku v g (9.1)

W_3: hmotnost vzorku rekonstituovaného roztoku prášku v g (9.2)

50: objem použité odměrné baňky (9.2)

0,1: převod výsledku na g/100 g

12. SHODNOST

Hodnoty odvozené z této mezilaboratorní zkoušky nelze použít na jiné než uvedené rozsahy koncentrace a matrice. Hodnoty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti se odvodí z výsledku mezilaboratorní zkoušky provedené v souladu s normou ISO 5725 ([iv]).

12.1 **Opakovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou jednotlivých zkoušek získanými s krátkým časovým odstupem stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem používajícím stejné zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než xxx (bude stanoveno na základě společného pokusu) ([v]).

12.2 **Reprodukovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou jednotlivých zkoušek získanými stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu v různých laboratořích a různými pracovníky používajícími odlišná zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než 0,5 g/100 g (bude stanoveno na základě společného pokusu).

13. LITERATURA

([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]) ISO 707 (IDF 50) Mléko a mléčné výrobky – Směrnice pro odběr vzorků.

([iv]) ISO 5725–1 Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření. Část 1: Obecné zásady a definice.

([v]) SO 5725–2 Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření. Část 2: Základní metoda pro stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované metody měření.

▼B

PŘÍLOHA XII

(Článek 9)

ZJIŠŤOVÁNÍ SYŘIDLOVÉ SYROVÁTKY V SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE URČENÉM PRO VEŘEJNÉ SKLADOVÁNÍ NA ZÁKLADĚ STANOVENÍ KASEINOMAKROPEPTIDŮ VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ (HPLC)

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda umožňuje zjistit přítomnost syřidlové syrovátky v sušeném odstředěném mléce určeném k veřejnému skladování na základě stanovení kaseinomakropeptidů.

2. NORMATIVNÍ ODKAZ

Mezinárodní norma ISO 707 – Mléko a mléčné výrobky – Směrnice pro odběr vzorků, podle pokynů obsažených v příloze I odst. 2 písm. c) posledním pododstavci.

3. DEFINICE

Obsah sušiny ze syřidlové syrovátky je definován jako hmotnostní procento stanovené popsaným postupem podle obsahu kaseinomakropeptidů.

4. PODSTATA METODY

— Rekonstituce sušeného odstředěného mléka, odstranění tuku a bílkovin kyselinou trichloroctovou a následným odstředěním nebo filtrací;

— Stanovení množství kaseinomakropeptidů (CMP) v supernatantu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

— Vyhodnocení výsledku získaného u vzorků porovnáním se srovnávacími vzorky, které tvoří sušené odstředěné mléko s přídavkem nebo bez přídavku známého procenta sušené syrovátky.

5. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Použitá voda musí být voda destilovaná nebo voda nejméně rovnocenné čistoty.

5.1 **Roztok kyseliny trichloroctové**

Rozpusťte 240 g kyseliny trichloroctové (CCl_3COOH) ve vodě a doplňte na 1 000 ml. Roztok by měl být čirý a bezbarvý.

5.2 **Eluční roztok, pH 6,0**

Rozpusťte 1,74 g fosforečnanu draselného sekundárního (K_2HPO_4), 12,37 g hydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a 21,41 g síranu sodného (Na_2SO_4) asi v 700 ml vody. V případě potřeby upravte pH na 6,0 roztokem kyseliny fosforečné nebo hydroxidu draselného.

Doplňte vodou do 1 000 ml a homogenizujte.

Poznámka: Složení eluentu lze obnovit tak, aby odpovídal osvědčení standardů nebo doporučením výrobce balicích materiálů na kolony.

Eluční roztok před použitím přefiltrujte přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

5.3 **Promývací roztok**

Smíchejte jeden objem acetonitrilu (CH_3CN) s devíti objemy vody. Před použitím směs přefiltrujte přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

▼B

Poznámka: Lze použít jakýkoliv jiný promývací roztok, který má baktericidní účinek a který nezhoršuje rozlišovací účinnost kolony.

5.4 **Srovnávací vzorky**

5.4.1 *Sušené odstředěné mléko splňující požadavky tohoto nařízení (tj. [0]).*

5.4.2 *Totéž sušené odstředěné mléko zfalšované přídavkem 5 % hm. sušené syřidlové syrovátky standardního složení (tj. [5]).*

6. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

6.1 Analytické váhy

6.2 Volitelná odstředivka schopná dosáhnout odstředivé síly 2 200 g a vybavená odstředivkovými zkumavkami se zátkou o objemu asi 50 ml

6.3 Mechanická třepačka

6.4 Magnetická míchačka

6.5 Skleněné nálevky o průměru asi 7 cm

6.6 Filtrační papíry střední hustoty o průměru asi 12,5 cm

6.7 Skleněné filtrační zařízení s membránovým filtrem o velikosti pórů 0,45 μm

6.8 Dělené pipety umožňující dávkovat 10 ml (ISO 648, třída A, nebo ISO/R 835) nebo dávkovací systém schopný dodávat 10,0 ml za dvě minuty

6.9 Dávkovací systém schopný dodávat 20,0 ml vody při teplotě asi 50 °C

6.10 Termostatická vodní lázeň nastavená na 25 ± 0,5 °C

6.11 Zařízení na HPLC, které tvoří:

6.11.1 Čerpadlo

6.11.2 Nástřikové zařízení – ruční nebo automatické – o objemu 15 až 30 μl

6.11.3 Dvě kolony TSK 2 000-SW za sebou (délka 30 cm, vnitřní průměr 0,75 cm), nebo kolony s rovnocennou účinností (např. jedna kolona TSK 2 000-SWxl, jedna kolona Agilent Technologies Zorbax GF 250) a jedna předkolona (3 cm × 0,3 cm) naplněná materiálem I 125 nebo jiným materiálem s rovnocennou účinností

6.11.4 Termostat kolony nastavený na teplotu 35 ± 1 °C

6.11.5 UV detektor s proměnnou vlnovou délkou umožňující měřit při 205 nm s citlivostí 0,008 Å.

6.11.6 Integrátor schopný integrovat mezi sedly

Poznámka: Lze pracovat s kolonami udržovanými při laboratorní teplotě, avšak jejich rozlišovací schopnost je o trochu nižší. V tomto případě je třeba, aby výkyvy teploty v průběhu jednoho analytického pokusu byly menší než 5 °C.

7. ODBĚR VZORKŮ

7.1 Vzorky musí být odebírány postupem stanoveným v mezinárodní normě ISO 707. Členské státy však mohou používat jinou metodu odběru vzorků za předpokladu, že tato metoda odpovídá zásadám uvedené normy.

7.2 Vzorek skladujte takovým způsobem, aby nemohlo dojít ke znehodnocení nebo změně složení.

8. PRACOVNÍ POSTUP

▼B

8.1 **PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍHO VZORKU**

Sušené mléko převeďte do nádobky, jejíž objem je asi dvakrát větší, než je objem prášku, a která je opatřena vzduchotěsným víčkem. Nádobku ihned uzavřete. Sušené mléko důkladně promíchejte opakovaným převracením nádobky.

8.2 **Zkušební dávka**

Do odstředivkové zkumavky (6.2) nebo vhodné baňky se zátkou na 50 ml navažte 2,000 ± 0,001 g zkušebního vzorku.

8.3 **Odstranění tuku a bílkovin**

8.3.1 Ke zkušební dávce přidejte 20,0 ml teplé (50 °C) vody. Prášek rozpusťte třepáním po dobu pěti minut na mechanické třepačce (6.3). Zkumavku vložte do vodní lázně (6.10), dokud se její teplota neustálí na 25 °C.

8.3.2 Během dvou minut přidejte za stálého míchání magnetickou míchačkou (6.4) 10,0 ml roztoku kyseliny trichloroctové (5.1) o teplotě asi 25 °C. Zkumavku vložte na 60 minut do vodní lázně (6.10).

8.3.3 Odstřeďujte po dobu 10 minut při odstředivé síle 2 200 g, nebo přefiltrujte přes papír (6.6) a prvních 5 ml filtrátu vyhoďte.

8.4 **Chromatografické stanovení**

8.4.1 Nastříkněte 15 až 30 µl přesně odměřeného supernatantu nebo filtrátu (8.3.3) do zařízení na HPLC (6.11) s průtokem 1,0 ml elučního roztoku (5.2) za minutu.

Poznámka 1: V závislosti na vnitřním průměru použitých kolon nebo na pokynech výrobce kolony lze použít i jiný průtok.

Poznámka 2: V průběhu chromatografické analýzy eluční roztok (5.2) uchovejte při teplotě 85 °C, aby eluent zůstal odplyněný a abyste zabránili množení bakterií. Lze použít jakékoliv jiné opatření se stejným preventivním účinkem.

Poznámka3: Při každém přerušení promyjte kolony vodou. Nikdy v nich nenechávejte eluční roztok (5.2).

Před každým přerušením na více než 24 hodin kolony propláchněte vodou a poté je promývejte roztokem (5.3) nejméně po dobu tří hodin při průtoku 0,2 ml za minutu.

8.4.2 Výsledky chromatografické analýzy zkušebního vzorku [E] se získají ve formě chromatogramu, v němž je každý pík určen svým retenčním časem RT takto:

Pík II:	Druhý pík chromatogramu s RT asi 12,5 minuty
Pík III:	Třetí pík chromatogramu odpovídající CMP s RT 15,5 minuty

Retenční časy jednotlivých píků mohou být značně ovlivněny výběrem kolony (kolon).

Integrátor (6.11.6) automaticky vypočítává plochu A každého píku:

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

Před kvantitativní interpretací je nezbytné prozkoumat vzhled každého chromatogramu za účelem zjištění případných anomálií způsobených buď nesprávnou funkcí zařízení, nebo kolon, nebo původem a povahou analyzovaného vzorku.

V případě pochybností analýzu zopakujte.

▼B

8.5 **Kalibrace**

8.5.1 U srovnávacích vzorků (5.4) se přesně použije postup popsaný v bodech 8.2 až 8.4.2.

Použijte čerstvě připravené roztoky, protože CMP se v prostředí 8 % kyseliny trichloroctové odbourávají. Jejich obsah se při teplotě 30 °C snižuje odhadem o 0,2 % za hodinu.

8.5.2 Před chromatografickým stanovením vzorků stabilizujte kolony opakovanými nástřiky roztoku (8.5.1) srovnávacího vzorku (5.4.2), dokud se plocha a retenční čas píku odpovídajícího CMP neustálí na konstantních hodnotách.

8.5.3 Stanovte odezvové faktory R nastříknutím stejného objemu filtrátů (8.5.1), jakého jste použili pro vzorky.

9. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

9.1 **Metoda výpočtu a vzorce**

9.1.1 *Výpočet odezvových faktorů R:*

Pík II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

kde:

R_{II} = odezvové faktory píků II

A_{II} [0] = plochy píků II srovnávacího vzorku [0] získané v 8.5.3

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

kde:

R_{III} = odezvový faktor píku III

$A_{III}[0]$ a A_{III} [5] = plochy píku III srovnávacích vzorků [0] a [5] získané v 8.5.3

W = množství syrovátky ve srovnávacím vzorku [5], tj. 5

9.1.2 *Výpočet relativní plochy píků ve vzorku [E]*

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

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

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

kde:

$S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = relativní plochy píků II, III a IV ve vzorku [E]

$A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = plochy píků II a III ve vzorku [E] získané v 8.4.2

R_{II}, R_{III} = odezvové faktory vypočtené v 9.1.1

9.1.3 *Výpočet relativního retenčního času píku III ve vzorku [E]: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

kde:

$RRT_{III}[E]$ = relativní retenční čas píku III ve vzorku [E]

$RT_{III}[E]$ = relativní retenční čas píku III ve vzorku [E] získaný v 8.4.2

▼B

$RT_{III}[5]$ = relativní retenční čas píku III v kontrolním vzorku [5] získaný v 8.5.3

9.1.4 Pokusy ukazují, že mezi relativním retenčním časem píku III, tj. $RRT_{I-II}[E]$ a procentem přidané sušené syrovátky až do přídavku 10 % existuje lineární vztah:

— při obsahu syrovátky > 5 % je $RRT_{III}[E] < 1{,}000$,

— při obsahu syrovátky ≤ 5 % je $RRT_{III}[E] \geq 1{,}000$.

Přípustná neurčitost pro hodnoty RRT_{III} je ± 0,002.

Za normálních okolností se hodnota $RRT_{III}[0]$ jen málo liší od 1,034. Podle stavu kolon se může hodnota blížit 1,000, avšak vždy musí být vyšší než 1,000.

9.2 Výpočet procenta sušené syřidlové syrovátky obsažené ve vzorku:

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

kde:

W = hmotnostní procento syřidlové syrovátky ve vzorku [E]

$S_{III}[E]$ = relativní plocha píku III zkušebního vzorku [E] získaná podle 9.1.2

1,3 = představuje relativní průměrnou plochu píku III vyjádřenou v gramech syřidlové syrovátky na 100 g stanovené v nezfalšovaném sušeném odstředěném mléce různého původu. Toto číslo bylo získáno experimentálně

$S_{III}[0]$ = představuje relativní plochu píku III, která je rovna $R_{III} \times A_{III}[0]$. Tyto hodnoty se získají v 9.1.1 a 8.5.3

$(S_{III}[0] - 0{,}9)$ = představuje opravu, kterou je nutno provést na relativní průměrné ploše, jestliže $S_{III}[0]$ není rovno 0,9. Experimentálně je relativní průměrná plocha píku III kontrolního vzorku [0] rovna 0,9

9.3 **Přesnost metody**

9.3.1 *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního vzorku provedl současně nebo v těsném sledu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 0,2 % hm.

9.3.2 *Reprodukovatelnost*

Rozdíl mezi dvěma jednotlivými a nezávislými výsledky získanými ve dvou různých laboratořích u stejného zkušebního vzorku by neměl překročit 0,4 % hm.

9.4 **Interpretace**

9.4.1 Lze předpokládat, že syrovátka není přítomna, je-li relativní plocha píku III $S_{III}[E]$ vyjádřena v gramech syřidlové syrovátky na 100 g produktu, $\leq 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$, kde

2,0 = je maximální hodnota povolená pro relativní plochu píku III s přihlédnutím k relativní ploše píku III, tj. 1,3, k nejistotě z důvodu kolísání ve složení sušeného odstředěného mléka a k reprodukovatelnosti metody (9.3.2)

$(S_{III}[0] - 0{,}9)$ = je oprava, která musí být provedena, jestliže je plocha $S_{III}[0]$ jiná než 0,9 (viz bod 9.2)

9.4.2 Je-li relativní plocha píku III $S_{III}[E] > 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$ a relativní plocha píku II $S_{II}[E] \leq 160$, stanovte obsah syřidlové syrovátky podle bodu 9.2.

▼B

9.4.3 Je-li relativní plocha píku III $S_{III}[E] > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9)$ a relativní plocha píku II $S_{II}[E] \leq 160$, stanovte celkový obsah bílkovin (P %). Potom prostudujte grafy 1 a 2.

9.4.3.1 Data získaná po analýze vzorků nezfalšovaného sušeného odstředěného mléka s vysokým celkovým obsahem bílkovin jsou zanesena do grafů 1 a 2.

Plná přímka představuje lineární regresi, jejíž koeficienty se vypočítají metodou nejmenších čtverců.

Čárkovaná přímka určuje horní mez relativní plochy píku III, a to s pravděpodobností, že nebude překročena v 90 % případů.

Rovnice čárkovaných přímek v grafech 1 a 2 jsou:

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

kde:

S_{III} = je relativní plocha píku III vypočtená buď podle celkového obsahu bílkovin, nebo podle relativní plochy píku $S_{II}[E]$

P % = je celkový obsah bílkovin vyjádřený jako procento hmotnosti

$S_{II}[E]$ = je relativní plocha vzorku vypočtená v bodu 9.1.2

Tyto rovnice jsou rovnocenné číslu 1,3 uvedenému v bodu 9.2.

Rozdíl (T_1 a T_2) mezi zjištěnou relativní plochou $S_{III}[E]$ a relativní plochou S_{III} je dán těmito vztahy: $T_1 = S_{III}[E] – [(0,376\ P\ \% – 10,7) + (S_{III}[0] – 0,9)]T_2 = S_{III}[E] – [(0,0123\ S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] – 0,9)]$.

9.4.3.2

Jsou-li T_1 a/nebo T_2 rovny nule nebo menší než nula, nelze obsah syřidlové syrovátky stanovit.

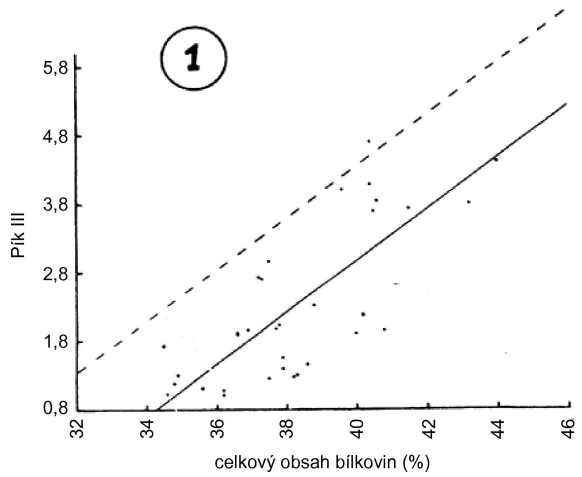
Jsou-li T_1 a T_2 větší než nula, je syřidlová syrovátka přítomna.

Obsah syřidlové syrovátky se vypočítá podle vzorce: $W = T_2 + 0,91$

kde:

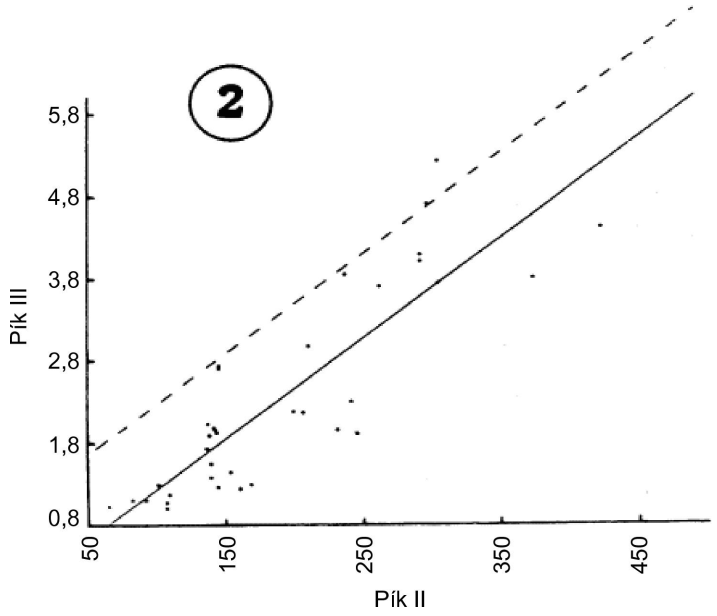
0,91 je vzdálenost na svislé ose mezi plnou a přerušovanou přímkou.

Sušené odstředěně mléko



▼B

Sušené odstředěné mléko



▼B

PŘÍLOHA XIII

(Článek 9)

STANOVENÍ SUŠINY ZE SYŘIDLOVÉ SYROVÁTKY V SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE A VE SMĚSÍCH UVEDENÝCH V NAŘÍZENÍ (ES) č. 2799/1999

1. PŘEDMĚT: STANOVENÍ PŘÍDAVKU SUŠINY ZE SYŘIDLOVÉ SYROVÁTKY DO TĚCHTO PRODUKTŮ:

a) sušeného odstředěného mléka podle definice v článku 2 nařízení (ES) č. 2799/1999 a

b) směsí podle definice v článku 4 nařízení (ES) č. 2799/1999.

2. NORMATIVNÍ ODKAZ: MEZINÁRODNÍ NORMA ISO 707

3. DEFINICE

Obsah sušiny ze syřidlové syrovátky je definován jako hmotnostní procento stanovené popsaným postupem podle obsahu kaseinomakropeptidů.

4. PODSTATA METODY

Obsah kaseinomakropeptidů se stanoví podle přílohy XII. Vzorky s pozitivními výsledky jsou analyzovány na kaseinomakropeptidy A vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi (metodou HPLC). Alternativně se vzorky metodou HPLC s obrácenými fázemi analyzují přímo. Vyhodnocení výsledků se provádí porovnáním se srovnávacími vzorky, které tvoří sušené odstředěné mléko bez přídavku nebo s přídavkem známého procenta sušené syrovátky. Pokud je výsledek vyšší než 1 % hm., je přítomnost sušiny ze syřidlové syrovátky prokázána.

5. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Použitá voda musí být voda destilovaná nebo voda nejméně rovnocenné čistoty. Acetonitril musí mít spektroskopickou jakost nebo jakost vhodnou pro HPLC.

Chemikálie potřebné pro tuto metodu jsou chemikálie uvedené v příloze XII tohoto nařízení.

Chemikálie pro HPLC s obrácenými fázemi

5.1 **Roztok kyseliny trichloroctové**

Rozpusťte 240 g kyseliny trichloroctové (CCl_3COOH) ve vodě a doplňte na 1 000 ml. Roztok by měl být čirý a bezbarvý.

5.2 **Eluenty A a B**

Eluent A: Vneste 150 ml acetonitrilu (CH_3CN), 20 ml isopropanolu ($CH_3CHOHCH_3$) a 1,00 ml kyseliny trifluoroctové (TFA, CF_3COOH) do odměrné baňky na 1 000 ml a doplňte na 1 000 ml vodou.

Eluent B: Vneste 550 ml acetonitrilu, 20 ml isopropanolu a 1,00 ml TFA do odměrné baňky na 1 000 ml a doplňte na 1 000 ml vodou. Eluční roztok před použitím přefiltrujte přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

5.3 **Uchování kolony**

Po analýzách se kolona promyje eluentem B (spádem) a poté se propláchne acetonitrilem (spádem po dobu 30 minut). Kolona se uchovává v acetonitrilu.

5.4 **Srovnávací vzorky**

5.4.1 Sušené odstředěné mléko splňující požadavky stanovené pro veřejné skladování (tj. [0]).

▼B

5.4.2 Totéž sušené odstředěné mléko zfalšované přídavkem 5 % hm. sušené syřidlové syrovátky standardního složení (tj. [5]).

5.4.3 Totéž sušené odstředěné mléko zfalšované přídavkem 50 % hm. sušené syřidlové syrovátky standardního složení (tj. [50]) ([1]).

6. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Přístroje a pomůcky potřebné pro popsaný postup jsou uvedeny v příloze XII tohoto nařízení.

6.1 Analytické váhy

6.2 Volitelná odstředivka schopná dosáhnout odstředivé síly 2 200 g a vybavená odstředivkovými zkumavkami se zátkou o objemu asi 50 ml

6.3 Mechanická třepačka

6.4 Magnetická míchačka

6.5 Skleněné nálevky o průměru asi 7 cm

6.6 Filtrační papíry střední hustoty o průměru asi 12,5 cm

6.7 Skleněné filtrační zařízení s membránovým filtrem o velikosti pórů 0,45 μm

6.8 Dělené pipety umožňující dávkovat 10 ml (ISO 648, třída A, nebo ISO/R 835), nebo dávkovací systém schopný dodávat 10,0 ml za dvě minuty

6.9 Dávkovací systém schopný dodávat 20,0 ml vody při teplotě asi 50 °C

6.10 Termostatická vodní lázeň nastavená na 25 ±0,5 °C

6.11 Zařízení na HPLC, které tvoří:

6.11.1 Čerpadlo s binárním gradientem

6.11.2 Nástřikové zařízení – ruční nebo automatické, o objemu 100 μl

6.11.3 Kolona Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (délka 25 cm, vnitřní průměr 0,46 cm), nebo jiná rovnocenná kolona pro obrácené fáze s velkými póry na bázi křemene

6.11.4 Termostat kolony nastavený na 35 ± 1 °C

6.11.5 UV detektor s proměnnou vlnovou délkou, který umožňuje provádět měření při 210 nm (v nutných případech je možné použít větší vlnové délky až do 220 nm) s citlivostí 0,02 Å.

6.11.6 Integrátor s možností nastavení integrace na obecnou základní linii nebo mezi sedly

Poznámka: Práce s kolonami udržovanými při laboratorní teplotě je možná za předpokladu, že tato teplota nekolísá více než o 1 °C; v opačném případě dochází k příliš velkým změnám retenčního času CMP_A.

7. ODBĚR VZORKŮ

7.1 Vzorky musí být odebírány postupem stanoveným v mezinárodní normě ISO 707. Členské státy však mohou používat jinou metodu odběru vzorků za předpokladu, že tato metoda odpovídá zásadám uvedené normy.

7.2 Vzorek skladujte takovým způsobem, aby nemohlo dojít ke znehodnocení nebo změně složení.

8. PRACOVNÍ POSTUP

([1]) Sušená syřidlová syrovátka standardního složení a rovněž zfalšované sušené odstředěné mléko lze získat od firmy NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL-6710 BA Ede. Lze však také používat sušené výrobky, u nichž se dosahuje rovnocenných výsledků jako v případě sušených výrobků NIZO.

▼B

8.1 **Příprava zkušebního vzorku**

Sušené mléko převeďte do nádobky, jejíž objem je asi dvakrát větší než objem prášku a která je opatřena vzduchotěsným víčkem. Nádobku ihned uzavřete. Sušené mléko důkladně promíchejte opakovaným převracením nádobky.

8.2 **Zkušební dávka**

Do odstředivkové zkumavky (6.2) nebo vhodné baňky se zátkou na 50 ml navažte 2,00 ± 0,001 g zkušebního vzorku.

Poznámka: V případě směsí navažte takové množství zkušebního vzorku, aby tuku zbavená zkušební dávka odpovídala 2,00 g.

8.3 **Odstranění tuku a bílkovin**

8.3.1 Ke zkušební dávce přidejte 20,0 ml teplé (50 °C) vody. Prášek rozpusťte pětiminutovým třepáním nebo v případě kysaného podmáslí třicetiminutovým třepáním na mechanické třepačce (6.3). Zkumavku vložte do vodní lázně (6.10), dokud se její teplota neustálí na 25 °C.

8.3.2 Během dvou minut za stálého míchání magnetickou míchačkou (6.4) přidejte 10,0 ml roztoku kyseliny trichloroctové o teplotě asi 25 °C (5.1). Zkumavku vložte na 60 minut do vodní lázně (6.10).

8.3.3 Odstřeďujte po dobu 10 minut při odstředivé síle 2 200 g, nebo přefiltrujte přes papír (6.6) a prvních 5 ml filtrátu vyhoďte.

8.4 **Chromatografické stanovení**

8.4.1 Proveďte analýzu HPLC podle popisu v příloze XII. Je-li výsledek negativní, analyzovaný vzorek neobsahuje sušinu ze syřidlové syrovátky ve zjistitelném množství. Je-li výsledek pozitivní, musí být použit níže popsaný postup HPLC s obrácenými fázemi. Alternativně lze metodu HPLC s obrácenými fázemi použít přímo. Přítomnost sušeného kysaného podmáslí může při použití metody popsané v příloze XII vyvolat falešné pozitivní výsledky. Metoda HPLC s obrácenými fázemi však tuto možnost vylučuje.

8.4.2 Před provedením analýzy HPLC s obrácenými fázemi je třeba optimalizovat podmínky gradientu. Pro gradientové systémy s mrtvým objemem asi 6 ml (objem od bodu, kde se stékají rozpouštědla k objemu nástřikové smyčky včetně) je optimální retenční čas v délce 26 minut ±2 minuty pro CMP_A. Pro gradientové systémy s menším mrtvým objemem (např. 2 ml) je optimální retenční čas 22 minut.

Vezměte roztoky srovnávacích vzorků (5.4) s obsahem 50 % syřidlové syrovátky a bez obsahu této syrovátky.

Nastříkněte 100 µl supernatantu nebo filtrátu (8.3.3) do zařízení na HPLC, které musí fungovat za podmínek referenčního gradientu uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1

Podmínky referenčního gradientu pro optimalizaci chromatografie

Čas (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B	Křivka
Počátek	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	přímka
32	1,0	10	90	přímka
37	1,0	10	90	přímka
42	1,0	90	10	přímka

Porovnání obou chromatogramů by mělo ukázat polohu píku CMP_A.

▼B

Počáteční složení rozpouštědla, které je nutno použít pro normální gradient (viz 8.4.3), lze vypočítat podle tohoto vzorce: % B = 10 – 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 1,11

kde:

RT_{cmpA}: retenční čas CMP_A v referenčním gradientu

10: počáteční % B v referenčním gradientu

2,5: % B ve středním bodu minus počáteční % B v normálním gradientu

13,5: čas odpovídající střednímu bodu referenčního gradientu

26: požadovaný retenční čas CMP_A

6: poměr směrnic referenčního a normálního gradientu

30: % B v počátečním bodu minus % B po 27 minutách v referenčním gradientu

27: doba běhu referenčního gradientu

8.4.3 Nástřik roztoků zkušebních vzorků

Nastříkněte 100 µl přesně odměřeného supernatantu nebo filtrátu (8.3.3) do zařízení na HPLC s průtokem 1,0 ml elučního roztoku (5.2) za minutu.

Složení eluentu na začátku analýzy se získá z 8.4.2. Za normálních okolností se blíží poměru A:B = 76:24 (5.2). Okamžitě po nástřiku se spustí lineární gradient, což způsobí, že procento B se za 27 minut zvětší o 5 %. Poté se spustí lineární gradient, kterým složení eluentu dosáhne v pěti minutách 90 % B. Toto složení se udržuje po dobu pěti minut a po jejím uplynutí se pomocí lineárního gradientu složení opět změní během pěti minut na složení počáteční. V závislosti na vnitřním objemu čerpacího systému může být další nástřik proveden 15 minut po dosažení původních podmínek.

Poznámka 1: Retenční čas CMP_A by měl být 26 ±2 minuty. Toho lze dosáhnout změnou počátečních a konečných podmínek prvního gradientu. Rozdíl v % B mezi počátečními a konečnými podmínkami prvního gradientu však musí zůstat ve výši 5 % B.

Poznámka 2: Eluenty je třeba dostatečně odplynit a uchovávat je odplyněné. Je to nezbytně nutné pro to, aby gradientový čerpací systém správně fungoval. Směrodatná odchylka retenčního času píku CMP_A musí být menší než 0,1 minuty (n = 10).

Poznámka 3: Na každých pět vzorků je třeba nastříknout referenční vzorek (5) a použít jej pro výpočet nového odezvového faktoru R (9.1.1).

8.4.4 Výsledky chromatografických analýz zkušebního vzorku (E) se získávají ve formě chromatogramu, na němž je pík CMP_A určen svým retenčním časem přibližně v délce 26 minut.

Výšku H píku CMP_A automaticky vypočítává integrátor (6.11.6). Polohu základní linie je třeba kontrolovat na každém chromatogramu. Jestliže je základní linie nesprávně umístěna, analýzu nebo integraci je třeba zopakovat.

▼B

Poznámka: Je-li pík CMP_A dostatečně oddělen od ostatních píků, mělo by se použít přiřazení základní linie mezi sedly. V opačném případě použijte svislé kolmice ke společné základní linii, jejichž počáteční bod by měl být v blízkosti píku CMP_A (tedy ne v čase t = 0 min!). Pro referenční standard a vzorky použijte stejný typ integrace a u společné základní linie zkontrolujte, zda je se vzorky a referenčním standardem konzistentní.

Před kvantitativní interpretací je nezbytné prozkoumat vzhled každého chromatogramu za účelem zjištění případných anomálií způsobených buď nesprávnou funkcí zařízení, nebo kolony, nebo původem a povahou analyzovaného vzorku. V případě pochybností analýzu zopakujte.

8.5 **Kalibrace**

8.5.1 U srovnávacích vzorků (5.4.1 až 5.4.2) přesně použijte postup popsaný v bodech 8.2 až 8.4.4. Použijte čerstvě připravené roztoky, protože CMP se v prostředí 8 % kyseliny trichloroctové odbourává. Při teplotě 4 °C zůstává roztok stálý po dobu 24 hodin. V případě dlouhých analytických pokusů je žádoucí používat v automatickém nástřikovém zařízení chlazenou misku na vzorek.

Poznámka: Fáze 8.4.2 může být vynechána, jestliže je % B v počátečních podmínkách známo z předchozích analýz.

Chromatogram referenčního vzorku [5] má být obdobný chromatogramu znázorněnému na obrázku 1. Na tomto obrázku jsou před píkem CMP_A dva malé píky. Je nezbytně nutné dosáhnout podobné separace.

8.5.2 Před chromatografickým stanovením vzorků nastříkněte 100 µl srovnávacího vzorku bez syřidlové syrovátky [0] (5.4.1).

Chromatogram nesmí vykazovat pík v retenčním čase CMP_A píku.

8.5.3 Odezvové faktory R stanovte nastříknutím stejného objemu filtrátu (8.5.1), jakého bylo použito pro vzorky.

9. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

9.1 **Metoda výpočtu a vzorce**

9.1.1 *Výpočet odezvového faktoru R:*

Pík CMP_A: $R = W/H$

kde:

R = odezvový faktor píku CMP_A

H = výška píku CMP_A

W = množství syrovátky ve srovnávacím vzorku [5]

9.2 **Výpočet procenta sušené syřidlové syrovátky obsažené ve vzorku**

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

kde:

W(E) = hmotnostní procento syřidlové syrovátky ve vzorku (E)

R = odezvový faktor píku CMP_A (9.1.1)

H(E) = výška píku CMP_A vzorku (E)

Pokud je W(E) vyšší než 1 % a rozdíl mezi retenčním časem a časem srovnávacího vzorku [5] menší než 0,2 minuty, pak je přítomnost sušiny ze syřidlové syrovátky prokázána.

9.3 **Přesnost metody**

9.3.1 *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního vzorku provedl současně nebo v těsném sledu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 0,2 % hm.

▼B

9.3.2 *Reprodukovatelnost*

Nestanovena.

9.3.3 *Linearita*

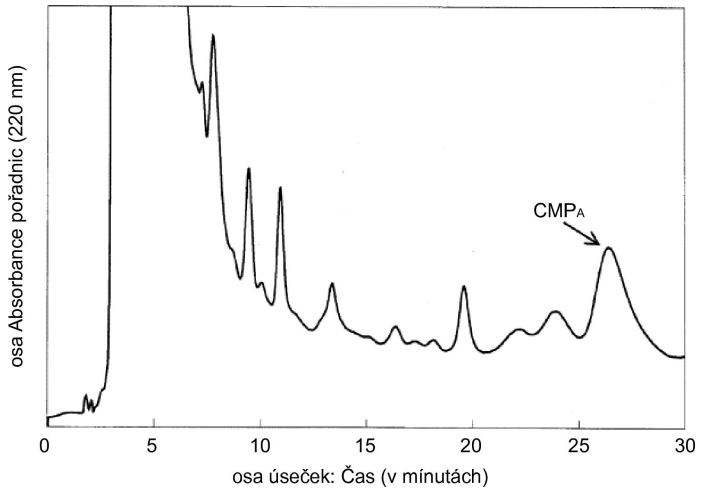
Pro hodnoty od 0 % do 16 % syřidlové syrovátky je třeba získat lineární vztah s korelačním koeficientem > 0,99.

9.4 **Interpretace**

Mezní hodnota 1 % je stanovena v souladu s ustanoveními bodů 9.2 a 9.4.1 přílohy XIX nařízení (ES) č. 214/2001, které obsahují nejistotu z důvodu reprodukovatelnosti.

Tabulka 1

Ni –4,6 standard



▼B

PŘÍLOHA XIV

(Článek 10)

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ FOSFATIDYLSERINU A FOSFATIDYLETHANOLAMINU V SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE

Metoda: HPLC s obrácenými fázemi

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje postup kvantitativního stanovení fosfatidylserinu (PS) a fosfatidylethanolaminu (PE) v sušeném odstředěném mléce (SOM) a je vhodná pro zjišťování sušiny podmáslí v SOM.

2. DEFINICE

Obsah PS + PE: hmotnostní zlomek látky stanovené popisovaným postupem. Výsledek se vyjadřuje v miligramech dipalmitoyl-fosfatidylethanolaminu (PEDP) na 100 g prášku.

3. PODSTATA METODY

Extrakce aminofosfolipidů methanolem z rekonstituovaného sušeného mléka. Stanovení obsahu PS a PE jako derivátů o-ftaldialdehydu (OPA) metodou HPLC s obrácenými fázemi (RP) a fluorescenční detekcí. Kvantitativní stanovení obsahu PS a PE ve zkušebním vzorku porovnáním se srovnávacím vzorkem, který obsahuje známé množství PEDP.

4. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Pokud není uvedeno jinak, používá se pouze destilovaná voda nebo voda nejméně rovnocenné čistoty.

4.1 **Referenční materiál: PEDP o čistotě nejméně 99 %**

Poznámka: Referenční materiál musí být skladován při teplotě –18 °C.

4.2 **Chemikálie pro přípravu srovnávacích a zkušebních vzorků**

4.2.1 Methanol čistoty pro HPLC

4.2.2 Chloroform čistoty pro HPLC

4.2.3 Monohydrochlorid tryptaminu

4.3 **Chemikálie pro přípravu o-ftaldialdehydových derivátů**

4.3.1 Hydroxid sodný, 12M vodný roztok

4.3.2 Kyselina boritá, 0,4M vodný roztok s hodnotu pH upravenou hydroxidem sodným (4.3.1) na 10,0

4.3.3 2-merkaptoethanol

4.3.4 o-ftaldialdehyd (OPA)

4.4 **Eluční rozpouštědla pro HPLC**

4.4.1 Eluční rozpouštědla musí být připravena pomocí chemikálií čistoty pro HPLC.

4.4.2 Voda čistoty pro HPLC

4.4.3 Methanol fluorometricky zjištěné čistoty

4.4.4 Tetrahydrofuran

4.4.5 Natrium dihydrogenfosforečnan

4.4.6 Octan sodný

4.4.7 Kyselina octová

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Analytické váhy s přesností měření na 1 mg a s možností odečtu po 1 mg

▼B

5.2 Kádinky o objemu 25 a 100 ml

5.3 Pipety schopné dávkovat od 1 do 10 ml

5.4 Magnetická míchačka

5.5 Dělené pipety schopné dávkovat 0,2, 0,5 a 5 ml

5.6 Odměrné baňky o objemu 10, 50 a 100 ml

5.7 Injekční stříkačky o objemu 20 a 100 µl

5.8 Ultrazvuková lázeň

5.9 Odstředivka fungující při 27 000 × g

5.10 Skleněné nádobky o objemu asi 5 ml

5.11 Odměrný válec o objemu 25 ml

5.12 pH metr s přesností na 0,1 jednotky pH

5.13 Zařízení na HPLC

5.13.1 Gradientový čerpací systém schopný fungovat při průtoku 1,0 ml/min při 200 barech

5.13.2 Automatický dávkovač vzorků s možností derivatizace

5.13.3 Termostat kolony schopný kolonu udržovat na teplotě 30 °C ±1 °C

5.13.4 Fluorescenční detektor schopný fungovat při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 440 nm

5.13.5 Integrátor nebo programové vybavení pro zpracování dat schopné měřit plochy píků

5.13.6 Kolona Lichrosphere – 100 (250 × 4,6 mm) nebo rovnocenná kolona naplněná oktadecylsilanem (C 18), velikost částic 5 µm

6. ODBĚR VZORKŮ

Vzorky musí být odebírány v souladu s normou ISO 707.

7. PRACOVNÍ POSTUP

7.1 **Příprava roztoku vnitřního standardu**

7.1.1 Navažte 30,0 ±0,1 mg tryptaminhydrochloridu (4.2.3) do odměrné baňky na 100 ml (5.6) a doplňte po značku methanolem (4.2.1).

7.1.2 Pipetou (5.3) přeneste 1 ml tohoto roztoku do odměrné baňky na 10 ml (5.6) a doplňte po značku methanolem (4.2.1) s cílem získat koncentraci tryptaminu 0,15 mM.

7.2 **Příprava roztoku zkušebního vzorku**

7.2.1 Navažte 1,000 ±0,001 g vzorku SOM do kádinky na 25 ml (5.2). Pipetou (5.3) přidejte 10 ml destilované vody o teplotě 40 °C ±1 °C a po dobu 30 minut míchejte magnetickou míchačkou (5.4), aby se rozpustily všechny kousky.

7.2.2 Pipetou (5.5) přeneste 0,2 ml rekonstituovaného mléka do odměrné baňky na 10 ml (5.6), pomocí injekční stříkačky přidejte 100 µl 0,15 mM roztoku tryptaminu (7.1) a doplňte po značku methanolem (4.2.1). Převracením opatrně promíchejte a vložte na 15 minut do ultrazvukové lázně (5.8).

7.2.3 Odstřeďujte (5.9) při 27 000 × g po dobu 10 minut a supernatant odeberte do skleněné nádobky (5.10).

Poznámka: Do provedení analýzy HPLC musí být roztok zkušebního vzorku skladován při teplotě 4 °C.

7.3 **Příprava roztoku vnějšího standardu**

▼B

7.3.1 Navažte 55,4 mg PEDP (4.1) do odměrné baňky na 50 ml (5.6) a odměrným válcem (5.11) přidejte asi 25 ml chloroformu (4.2.2). Zazátkovanou baňku zahřejte na 50 °C ±1 °C a opatrně promíchávejte, dokud se PEDP nerozpustí. Baňku ochlaďte na 20 °C, doplňte po značku methanolem (4.2.1) a promíchejte převracením.

7.3.2 Pipetou (5.3) přeneste 1 ml tohoto roztoku do odměrné baňky na 100 ml (5.6) a doplňte po značku methanolem (4.2.1). Pipetou (5.3) přeneste 1 ml tohoto roztoku do odměrné baňky na 10 ml (5.6), přidejte 100 µl (5.7) 0,15mM roztoku tryptaminu (7.1) a doplňte po značku methanolem (4.2.1). Promíchejte převracením.

Poznámka: Do provedení analýzy HPLC musí být roztok referenčního vzorku skladován při teplotě 4 °C.

7.4 **Příprava derivatizačního činidla**

Do odměrné baňky na 10 ml (5.6) navažte 25,0 ±0,1 mg OPA (4.3.4), přidejte 0,5 ml (5.5) methanolu (4.2.1) a pečlivě promíchejte, aby se OPA rozpustil. Doplňte po značku roztokem kyseliny borité (4.3.2) a injekční stříkačkou (5.7) přidejte 20 µl 2-merkaptoethanolu (4.3.3).

Poznámka: Derivatizační činidlo musí být skladováno v hnědé nádobě při teplotě 4 °C; činidlo zůstává stálé po dobu jednoho týdne.

7.5 **Stanovení pomocí HPLC**

7.5.1 *Eluční rozpouštědla (4.4)*

Rozpouštědlo A: Roztok 0,3 mM natria dihydrogenfosforečnanu a roztok 3 mM octanu sodného (s hodnotou pH upravenou na 6,5 ±0,1 kyselinou octovou): methanol: tetrahydrofuran = 558:440:2 (obj.).

Rozpouštědlo B: Methanol

7.5.2 *Doporučený eluční gradient:*

Čas (min)	Rozpouštědlo A (%)	Rozpouštědlo B (%)	Průtok (ml/min)
Počáteční	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: Může se stát, že eluční gradient bude muset být mírně upraven, aby bylo dosaženo rozlišení znázorněné na obrázku 1.

Teplota kolony: 30 °C.

7.5.3 *Objem nástřiku: 50 µl derivatizačního činidla a 50 µl roztoku vzorku*

▼B

7.5.4 *Ekvilibrace kolony*

Při každodenním provádění pokusů kolonu promývejte 100 % rozpouštědlem B po dobu 15 minut, potom připravte poměr A:B = 40:60 a provádějte ekvilibraci po dobu 15 minut při průtoku 1 ml/min. Proveďte slepý pokus nástřikem methanolu (4.2.1).

Poznámka: Před uskladněním kolony na delší dobu kolonu promývejte po dobu 30 minut směsí methanolu s chloroformem v poměru 80:20 (obj.).

7.5.5 *Stanovení obsahu PS + PE ve zkušebním vzorku*

7.5.6 *Proveďte sérii chromatografických analýz při zachování stejných časových odstupů mezi jednotlivými pokusy, abyste získali konstantní retenční časy. Pro výpočet odezvového faktoru nastříkněte roztok vnějšího standardu (7.3) na každých 5–10 roztoků zkušebních vzorků.*

Poznámka: Kolonu je nutné po každých 20–25 pokusech vyčistit nejméně třicetiminutovým promýváním 100 % rozpouštědlem B (7.5.1).

7.6 **Integrační režim**

7.6.1 *Pík PEDP*

PEDP se vymývá v podobě jediného píku. Plochu píku stanovte integrací mezi sedly.

7.6.2 *Pík tryptaminu*

Tryptamin se vymývá v podobě jediného píku (obrázek 1). Plochu píku stanovte integrací mezi sedly.

7.6.3 *Skupiny píků PS a PE*

Za takto popsaných podmínek (obrázek 1) se PS vymývá v podobě dvou hlavních, částečně nerozlišených píků, před nimiž se nachází jeden menší pík. PE se vymývá v podobě tří hlavních, částečně nerozlišených píků. Celou plochu každé skupiny píků stanovte nastavením základní linie tak, jak je znázorněno na obrázku 1.

8. VÝPOČET A VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Obsah PS + PE ve zkušebním vzorku se vypočte takto: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

kde:

C = obsah PS nebo PE (v mg/100 g prášku) ve zkušebním vzorku

A_1 = plocha píku PEDP roztoku srovnávacího vzorku (7.3)

A_2 = plocha píku PS nebo PE roztoku zkušebního vzorku (7.2)

T_1 = plocha píku tryptaminu roztoku srovnávacího vzorku (7.3)

T_2 = plocha píku tryptaminu roztoku zkušebního vzorku (7.2)

9. PŘESNOST METODY

Poznámka: Hodnoty pro opakovatelnost byly vypočteny podle Mezinárodní normy IDF ([1]). Prozatímní mezní hodnota reprodukovatelnosti byla vypočtena postupem stanoveným v příloze III písm. b) tohoto nařízení.

([1]) Mezinárodní norma IDF 135B/1991. Mléko a mléčné výrobky. Přesnostní charakteristiky analytických metod. Stručný popis práce na společné studii.

▼B

9.1 **Opakovatelnost**

Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, která vyjadřuje proměnlivost nezávislých analytických výsledků, které u stejného zkušebního vzorku získá stejný pracovník na stejném přístroji v krátkém časovém odstupu, by neměla překročit relativní 2 %. Jestliže se za těchto podmínek získají dvě stanovení, relativní rozdíl mezi jejich výsledky by neměl být větší než 6 % aritmetického průměru výsledků.

9.2 **Reprodukovatelnost**

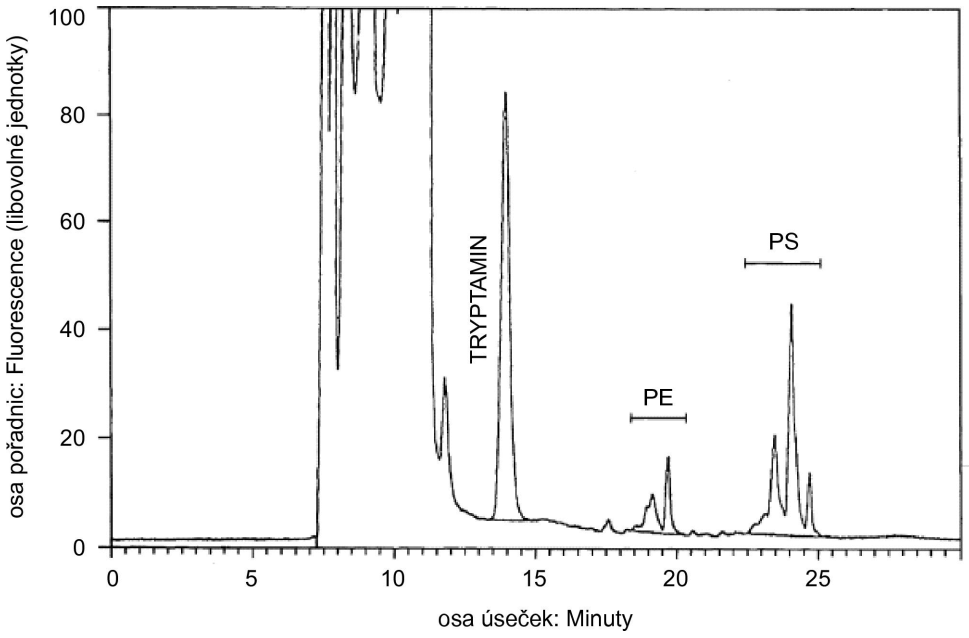
Jestliže dva pracovníci provedou v různých laboratořích na různých přístrojích a za různých podmínek analýzu téhož zkušebního vzorku a dospějí k různým stanovením, relativní rozdíl mezi oběma výsledky by neměl být větší než 11 % aritmetického průměru výsledků.

10. LITERATURA

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).*

Obrázek 1

HPLC chromatogram OPA-derivátů fosfatidylserinu (PS) a fosfatidylethanolaminu (PE) v methanolovém extraktu z rekonstituovaného sušeného odstředěného mléka. Je znázorněn integrační režim pro píky PS, PE a tryptamin (vnitřní standard).



▼B

PŘÍLOHA XV

(Článek 11)

ZJIŠTĚNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH REZIDUÍ V SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE

Provede se screeningová zkouška na mikrobiální inhibitory, při které se jako zkušební mikroorganismus použije *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (totožný s kmenem C953) a která je dostatečně citlivá, aby detekovala 4 μg benzylpenicilinu v 1 kg mléka a 100 μg sulfadimidinu v 1 kg mléka. K dispozici jsou komerční zkušební soupravy, které lze používat, mají-li požadovanou citlivost na benzylpenicilin a sulfadimidin.

Ke zkoušce se použije rekonstituované sušené odstředěné mléko (1 g prášku +9 ml destilované vody). Zkouška se provádí podle popisu v normě ISO/TS 26844:2006 Mléko a mléčné výrobky – Stanovení reziduí antimikrobních látek – Zkumavková difúzní zkouška – ve věstníku IDF č. 258/1991, oddíl 1, kapitola 2, nebo podle návodu výrobce zkušební soupravy ([1]).

Pozitivní výsledky se interpretují takto:

1. Přítomnost β-laktamů lze potvrdit opakováním zkoušky přidáním penicilinázy do zkušebního systému ([2]):

   Negativní výsledek: Inhibující látkou je antibiotikum β-laktam.

   Pozitivní výsledek: Inhibující látku nelze tímto postupem identifikovat; pokračujte podle bodu 2.

2. Přítomnost sulfonamidů lze potvrdit opakováním zkoušky přidáním kyseliny p-aminobenzoové do zkušebního systému:

   Negativní výsledek: Inhibující látkou je sulfonamid.

   Pozitivní výsledek: Inhibující látku nelze tímto postupem identifikovat; pokračujte podle bodu 3.

3. Přítomnost kombinace β-laktamu a sulfonamidu lze potvrdit opakováním zkoušky přidáním penicilinázy a kyseliny p-aminobenzoové do zkušebního systému:

   Negativní výsledek: Inhibujícími látkami jsou antibiotikum β-laktam a sulfonamid.

   Pozitivní výsledek: Inhibující látku nelze tímto postupem identifikovat.

([1]) Důležité upozornění: Při analýze sušeného odstředěného mléka mohou být získány falešně pozitivní výsledky. Proto je důležité ověřit, zda použitý zkušební systém falešně pozitivní výsledky neposkytuje.

([2]) Některé β-laktamy jsou méně citlivé na β-laktamázu. V takových případech se doporučuje vzorek předem upravit (1 ml zkušebního vzorku s 0,3 ml penicilinázového koncentrátu při 37 °C po dobu 2 hodin).

▼B

PŘÍLOHA XVI

(Článek 12)

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ SUŠENÉHO ODSTŘEDĚNÉHO MLÉKA V KRMNÝCH SMĚSÍCH ENZYMATICKOU KOAGULACÍ PARAKASEINU

1. PŘEDMĚT

Kvantitativní stanovení sušeného odstředěného mléka v krmných směsích enzymatickou koagulací parakaseinu.

2. OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda se používá pro krmné směsi obsahující nejméně 10 % sušeného odstředěného mléka. Analýzu mohou rušit velká množství podmáslí a/nebo některých jiných než mléčných bílkovin.

3. PODSTATA METODY

3.1 Rozpuštění kaseinu obsaženého v krmných směsích extrakcí roztokem citranu sodného

3.2 Úprava koncentrace vápenatých iontů na úroveň potřebnou pro vysrážení parakaseinu provedená přidáním syřidla

3.3 Obsah dusíku ve sraženině parakaseinu se stanoví Kjeldahlovou metodou uvedenou v normě ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001; množství sušeného odstředěného mléka se vypočítá na základě minimálního obsahu kaseinu 27,5 % (viz 8.1).

4. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Použitá voda musí být voda destilovaná nebo voda rovnocenné čistoty. S výjimkou syřidla (4.5) musí být všechny chemikálie a roztoky prosté dusíkatých látek.

4.1 Citran trojsodný, dihydrát (roztok 1 % hm./obj.)

4.2 Chlorid vápenatý (roztok 5 M).

Ve 100 ml destilované vody třepáním rozpusťte 75 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (pozor na exotermickou reakci). Roztok nechte přes noc ustát a poté jej přefiltrujte. Roztok uchovávejte v chladničce.

4.3 Hydroxid sodný 0,1 N

4.4 Kyselina chlorovodíková 0,1 N

4.5 Kapalné telecí syřidlo (síly asi 100 IMCU/ml podle normy ISO 11815IDF 157). Skladujte v chladničce při teplotě 4 až 6 °C.

4.6 Chemikálie pro kvantitativní stanovení dusíku Kjeldahlovou metodou podle popisu v normě ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a zejména:

5.1 Třecí miska nebo homogenizátor

5.2 Analytické váhy s přesností měření na 1 mg a s možností odečtu po 1 mg

5.3 Stolní odstředivka (500 g nebo 2 000 až 3 000 ot/min) s 50ml kyvetami a 2 000 g

5.4 Magnetická míchačka s míchacími tyčinkami (délky 10–15 mm)

5.5 Kádinky na 150 až 200 ml

5.6 Baňky na 250 až 500 ml

▼B

5.7 Skleněné nálevky o průměru 60 až 80 mm

5.8 Rychlofiltrační bezpopelné filtry o průměru 150 mm (Whatman č. 41 nebo rovnocenné)

5.9 Pipety o různém jmenovitém objemu

5.10 Vodní lázeň s termostatickou regulací na 37 °C ± 1 °C

5.11 pH metr s přesností na 0,1 jednotek pH

5.12 Teploměry s přesností na 1 °C

6. PRACOVNÍ POSTUP

6.1 **Příprava vzorku**

Rozetřete 10 až 20 g vzorku v třecí misce nebo homogenizujte v mlýnku, aby se vytvořila homogenní směs.

6.2 **Rozpuštění sušeného mléka a oddělení nerozpustného zbytku**

6.2.1 Navažte 1,000 ± 0,002 g dobře homogenizované krmné směsi (6.1) přímo do odstředivkové kyvety na 50 ml. Přidejte 30 ml roztoku citranu sodného (4.1) předem zahřátého na 45 °C ± 2 °C. Pomocí magnetické míchačky nebo energického ručního třepání obsah promíchávejte nejméně 5 minut.

6.2.2 Po dobu 10 minut odstřeďujte při 500 g (2 000 až 3 000 ot/min) a čirý vodný supernatant dekantujte do kádinky na 150 ml až 200 ml. Dbejte přitom na to, abyste spolu se supernatantem nepřevedli nerozpustitelné částice.

6.2.3 Stejným způsobem proveďte další dvě extrakce zbytku. Všechny tři vodné extrakty smíchejte.

6.2.4 Jestliže se na povrchu utvoří olejová vrstva, ochlazujte obsah v chladničce, dokud tuk neztuhne, a tukovou vrstvu odstraňte špachtlí.

6.3 **Koagulace kaseinu enzymy syřidla**

6.3.1 Za stálého míchání přidejte po kapkách k celkovému vodnému extraktu (asi100 ml) 2 ml chloridu vápenatého (4.2). Roztokem NaOH (4.3) nebo HCl (4.4) upravte pH na 6,4 až 6,5. Nádobu uložte na 15 až 20 minut do termostatem regulované vodní lázně o teplotě 37 °C ± 1 °C k dosažení solné rovnováhy. Projeví se tvorbou lehkého zákalu.

6.3.2 Kapalinu převeďte do jedné či dvou odstředivkových kyvet a odstřeďujte 10 minut při 2 000 g, aby se odstranil vysrážený materiál. Supernatant převeďte do jedné další odstředivkové kyvety, aniž by se promývala usazenina.

6.3.3 Teplotu supernatantu dostaňte opět na úroveň 37 °C ± 1 °C. Za míchání do extraktu přidejte po kapkách 0,5 ml kapalného syřidla (4.5). Koagulace proběhne do dvou minut.

6.3.4 Vraťte vzorek do vodní lázně a ponechte jej v ní 15 minut při teplotě 37 °C ± 1 °C. Vzorek vyjměte z vodní lázně a koagulát rozrušte mícháním. Obsah znovu odstřeďujte po dobu 10 minut při 2 000 g. Supernatant přefiltrujte přes vhodný filtrační papír (5.8) a filtrační papír uchovejte. Mícháním sraženinu v odstředivkové kyvetě promyjte 50 ml vody při teplotě asi 35 °C.

Obsah znovu odstřeďujte po dobu 10 minut při 2 000 g. Supernatant přefiltruje přes filtr z předchozí filtrace.

6.4 **Stanovení kaseinového dusíku**

6.4.1 Po promytí sraženinu kvantitativně převeďte pomocí destilované vody na filtrační papír uchovaný z 6.3.4. Suchý filtrační papír přeneste do Kjeldahlovy baňky. Stanovte obsah dusíku Kjeldahlovou metodou popsanou v normě ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001.

▼B

7. SLEPÝ POKUS

7.1 Pravidelně se provádí slepý pokus mineralizací podle Kjeldahlovy metody popsané v normě ISO 8968–2:2001IDF 20–2:2001. Bezpopelný filtrační papír (5.8) se navlhčí směsí 90 ml roztoku citranu sodného (4.1), 2 ml roztoku chloridu vápenatého (4.2) a 0,5 ml kapalného syřidla (4.5) a promyje 3 × 15 ml destilované vody.

7.2 Objem kyseliny použité na slepý pokus musí být odečten od objemu kyseliny (4.4) použité na titraci vzorku.

8. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

8.1 Procento sušeného odstředěného mléka v krmné směsi se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

N je procento parakaseinového dusíku,

27,5 je koeficient pro převod stanoveného kaseinu na procento sušeného odstředěného mléka,

2,81 a 0,908 jsou opravné faktory získané regresní analýzou.

9. PŘESNOST METODY

9.1 **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky paralelní analýzy stejného vzorku provedené stejným pracovníkem ve stejné laboratoři by nejméně v 95 % posuzovaných případů neměl být větší než 2,3 g sušeného odstředěného mléka na 100 g krmné směsi.

9.2 **Reprodukovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky analýzy stejného vzorku provedené dvěma laboratořemi by nejméně v 95 % posuzovaných případů neměl být větší než 6,5 g sušeného odstředěného mléka na 100 g krmné směsi.

10. POZNÁMKY

10.1 Přídavek velkých množství některých nemléčných bílkovin, zejména sojových bílkovin, může při zahřívání spolu se sušeným odstředěným mlékem vést k příliš vysokým výsledkům v důsledku společného srážení s mléčným parakaseinem.

10.2 Přídavek podmáslí může vést k poněkud nižším hodnotám, protože se stanoví pouze tukuprostá složka. Přídavkem určitého kysaného podmáslí může být docíleno výrazně nižších hodnot v důsledku neúplného rozpuštění v citrátovém roztoku.

10.3 Přídavky lecithinu v množství 0,5 % a větším mohou být rovněž příčinou nižších výsledných hodnot.

10.4 Přídavek sušeného odstředěného mléka zahřívaného na vyšší teploty může vést k příliš vysokým výsledným hodnotám, což je způsobeno společným vysrážením některých bílkovin ze syrovátky s mléčným parakaseinem.

▼B

PŘÍLOHA XVII

(Článek 13)

ZJIŠTĚNÍ ŠKROBU V SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE, DENATUROVANÉM SUŠENÉM MLÉCE A KRMNÝCH SMĚSÍCH

1. OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je určena pro zjištění škrobu, který se používá jako stopovací látka v denaturovaném sušeném mléce.

Detekční mez metody je přibližně 0,05 g škrobu na 100 g vzorku.

2. PODSTATA METODY

Reakce je založena na reakci používané v jodometrii:

— vazbě volného jodu koloidy ve vodném roztoku,

— absorpci micelami škrobu a barevnou formací.

3. CHEMIKÁLIE

3.1 Roztok jodu

— jod: 1,0 g,

— jodid draselný: 2,0 g,

— destilovaná voda: 100 ml,

— v odměrné baňce na 100 ml s jednou značkou rozpusťte 1,0 g jodu a 2,0 g jodidu draselného s vodou. Nařeďte vodou až ke značce 100 ml a zamíchejte.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Analytické váhy

4.2 Vroucí vodní lázeň

4.3 Zkumavky 25 mm × 200 mm

5. PRACOVNÍ POSTUP

S přesností na 0,1g navažte 1,0g vzorku a převeďte do zkumavky (4.3).

Přidejte 20 ml destilované vody a promíchejte, aby se vzorek rozptýlil.

Vložte na 5 minut do vroucí vodní lázně (4.2).

Vyjměte z lázně a ochlaďte na laboratorní teplotu.

Přidejte 0,5 ml roztoku jodu (3.1), protřepejte a pozorujte výsledné zbarvení.

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Modré zabarvení ukazuje na přítomnost přírodního škrobu ve vzorku.

Jestliže vzorek obsahuje modifikovaný škrob, zbarvení nemusí být nutně modré.

7. POZNÁMKY

Barva, intenzita zbarvení a mikroskopický vzhled škrobu se liší podle původu přírodního škrobu (např. z kukuřice nebo z brambor) a podle druhu modifikovaného škrobu přítomného ve vzorku.

Pokud jsou přítomny modifikované škroby, vyvolané zbarvení se mění na fialové, červené nebo hnědé podle míry modifikace krystalické struktury přírodního škrobu.

▼B

PŘÍLOHA XVIII

(Článek 14)

STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI V SUŠENÉ SMETANĚ

1. OBLAST POUŽITÍ

Tato příloha uvádí metodu pro stanovení obsahu vlhkosti v sušené smetaně.

2. TERMÍNY A DEFINICE

Pro účely této přílohy platí následující definice.

Obsah vlhkosti: ztráta hmotnosti stanovená postupem popsaným v této příloze.

Vyjadřuje se v hmotnostních procentech.

3. PODSTATA METODY

Stanovení úbytku hmotnosti vysušením zkušební dávky při teplotě 102 ± 2 °C do konstantní hmotnosti a zvážením.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a zejména:

4.1 Analytické váhy s přesností měření na 1 mg a s možností odečtu po 0,1 mg

4.2 Sušárna s dobrou ventilací a schopností termostatického udržování při teplotě 102 ± 2 °C v celém pracovním prostoru

4.3 Exsikátor s čerstvě vysušeným silikagelem s indikátorem vlhkosti nebo s jiným účinným vysoušedlem

4.4 Misky s plochým dnem o hloubce asi 25 mm a průměru asi 50 mm vyrobené z vhodného materiálu (např. skla, korozivzdorné oceli, niklu nebo hliníku) a vybavené dobře těsnicími a snadno snímatelnými víčky

4.5 Lahve s těsnicími zátkami pro míchání laboratorních vzorků

5. ODBĚR VZORKŮ

Je důležité, aby laboratoř obdržela vzorek, který je skutečně reprezentativní a který nebyl během přepravy nebo skladování poškozen ani změněn.

Odběr vzorků není součástí metody uvedené v této příloze. Doporučená metoda odběru vzorků je uvedena v normě ISO 707IDF 50.

Vzorek skladujte tak, aby bylo zabráněno jakémukoli zhoršení a změně jeho složení.

6. PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍHO VZORKU

Zkušební vzorek důkladně promíchejte opakovaným třepáním a převracením nádoby (je-li to nutné, až po převedení všech zkušebních vzorků do vzduchotěsné nádoby dostatečného objemu, která provedení tohoto postupu umožňuje).

Pokud se tímto postupem nedosáhne úplné homogenity, odejměte z připraveného zkušebního vzorku zkušební dávky ze dvou co nejvzdálenějších míst (pro dvě jednotlivá stanovení).

7. PRACOVNÍ POSTUP

7.1 **Příprava misky**

7.1.1 Nepřikrytou misku a její víčko (4.4) alespoň 1 hodinu zahřívejte v sušárně (4.2) nastavené na teplotu 102 ± 2 °C.

7.1.2 Víčko položte na misku, přikrytou misku převeďte do exsikátoru (4.3), nechte vychladnout na teplotu váhovny, zvažte s přesností na 1 mg a hmotnost zaznamenejte s přesností na 0,1 mg.

▼B

7.2 **Zkušební dávka**

Asi 1 až 3g připraveného zkušebního vzorku (6) převeďte do misky, přikryjte víčkem a zvažte s přesností na 1 mg. Hmotnost zaznamenejte s přesností na 0,1 mg.

7.3 **Stanovení**

7.3.1 Odkryjte misku a vložte ji i s víčkem na 2 hodiny do sušárny (4.2) nastavené na teplotu 102 ± 2 °C.

7.3.2 Víčko znovu položte na misku, přikrytou misku převeďte do exsikátoru, nechte vychladnout na teplotu váhovny, zvažte s přesností na 1 mg a hmotnost zaznamenejte s přesností na 0,1 mg.

7.3.3 Misku odkryjte a spolu s víčkem ji znovu zahřívejte v sušárně po dobu 1 hodiny. Poté opakujte postup podle bodu 7.3.2.

7.3.4 Postup zahřívání a vážení opakujte, dokud hmotnost neklesne o 1 mg nebo méně, nebo dokud mezi dvěma následujícími váženími nestoupne.

Pro výpočet použijte nejnižší zjištěnou hmotnost.

8. VÝPOČET A VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

8.1 **Výpočet výsledků**

Obsah vlhkosti vyjádřený v g/100 g je roven:

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

kde:

m_0 je hmotnost misky s víčkem vyjádřená v g (7.1.2),

m_1 je hmotnost misky s víčkem a zkušební dávkou před sušením vyjádřená v g (7.2),

m_2 je hmotnost misky s víčkem a zkušební dávkou po sušení vyjádřená v g (7.3.4).

Výsledek uveďte s přesností na dvě desetinná místa.

9. SHODNOST

Poznámka: Hodnoty pro opakovatelnost a reprodukovatelnost byly odvozeny z výsledků mezilaboratorní zkoušky (viz Steiger, G. Věstník IDF č. 285/1993, s. 21–28) provedené podle normy IDF 135B:1991. Mléko a mléčné výrobky – Přesnostní charakteristiky analytických metod – Stručný popis práce na společné studii.

9.1 **Opakovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou nezávislých jednotlivých zkoušek získanými s krátkým časovým odstupem stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem používajícím stejné zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než 0,20g vlhkosti na 100g výrobku.

9.2 **Reprodukovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou nezávislých jednotlivých zkoušek získanými stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu v různých laboratořích a různými pracovníky používajícími odlišná zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než 0,40g vlhkosti na 100g výrobku.

10. PROTOKOL O ZKOUŠCE

V protokolu o zkoušce musí být uvedeny:

— veškeré informace nutné pro úplnou identifikaci vzorku,

— použitá metoda odběru vzorku, je-li známa,

— použitá zkušební metoda s odkazem na tuto přílohu,

▼B

— všechny údaje o pracovním postupu, které tato příloha neobsahuje nebo které jsou považovány za volitelné, spolu s údaji o všech skutečnostech, jež mohly výsledek (výsledky) zkoušky ovlivnit,

získaný výsledek (výsledky) zkoušky, a byla-li ověřena opakovatelnost, konečný získaný výsledek.

▼B

PŘÍLOHA XIX

(Článek 15)

STANOVENÍ VLHKOSTI V SUŠENÉM KYSANÉM PODMÁSLÍ

1. OBLAST POUŽITÍ

Stanovení obsahu vlhkosti v sušeném kysaném podmáslí původně určeném k použití jako krmivo.

2. PODSTATA METODY

Vzorek se vysuší ve vakuu. Ztráta hmotnosti se stanoví vážením.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Analytické váhy s přesností měření na 1 mg a s možností odečtu po 1 mg

3.2 Misky z nerezového kovu nebo skla s víčky zajišťujícími vzduchotěsnost; pracovní povrch umožňující rozprostření vzorku asi na hustotu 0,3 g/cm^2

3.3 Nastavitelná, elektricky vyhřívaná vakuová sušárna opatřená olejovou vývěvou a mechanismem na vhánění horkého suchého vzduchu sloupem obsahujícím např. oxid vápenatý nebo síran vápenatý (a vybaveným indikátorem vlhkosti)

3.4 Exsikátor s účinným vysoušedlem

3.5 Sušárna s větráním regulovaná termostatem na teplotu 102 ± 2 °C.

4. PRACOVNÍ POSTUP

Misku (3.2) i s víčkem zahřívejte v sušárně (3.5) nejméně po dobu jedné hodiny. Nádobku přikryjte víčkem a okamžitě přeneste do exsikátoru (3.4). Nechte vychladnout na laboratorní teplotu a zvažte s přesností na 1 mg. Hmotnost zaznamenejte s přesností na 0,1 mg.

Misku odkryjte, převeďte do ní asi 5 g vzorku a zvažte s přesností na 1 mg. Hmotnost zaznamenejte s přesností na 0,1 mg. Misku bez víčka vložte do vakuové sušárny (3.3) předehřáté na 83 °C. Misku do sušárny vložte co nejrychleji, aby nedošlo k nežádoucímu poklesu teploty sušárny.

Zvyšte tlak na 100 torrů (13,3 kPa) a za tohoto tlaku nechte vysušit na konstantní hmotnost (asi po dobu čtyř hodin) v proudu suchého horkého vzduchu.

Dobu sušení počítejte od okamžiku, kdy se teplota sušárny vrátí na 83 °C. Poté tlak v sušárně opatrně upravte zpět na atmosférický tlak. Sušárnu otevřete, misku okamžitě uzavřete víčkem, vyjměte ze sušárny, nechte na 30 až 45 minut vychladnout v exsikátoru (3.4) a poté zvažte s přesností na 1 mg. Hmotnost zaznamenejte s přesností na 0,1 mg. Následně sušte dalších 30 minut ve vakuové sušárně (3.3) při teplotě 83 °C a znovu zvažte. Postup zahřívání a vážení opakujte, dokud hmotnost misky s víčkem neklesne o 1 mg nebo méně, nebo dokud mezi dvěma následujícími váženími nestoupne. Pro výpočet použijte nejnižší zjištěnou hmotnost.

5. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

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

Kde

m_0 je hmotnost misky s víčkem,

m_1 je hmotnost misky s víčkem a zkušební dávkou před sušením,

m_2 je hmotnost misky s víčkem a zkušební dávkou po sušení.

Výsledek zaznamenejte s přesností na 0,1 g/100 g.

▼B

6. SHODNOST

6.1 **Mezní hodnota opakovatelnosti**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou nezávislých jednotlivých zkoušek získanými s krátkým časovým odstupem stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem používajícím stejné zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než 0,4 g vody/100 g sušeného podmáslí.

6.2 **Mezní hodnota reprodukovatelnosti**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou nezávislých jednotlivých zkoušek získanými stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu v různých laboratořích a různými pracovníky používajícími odlišná zařízení by ve více než 5 % případů neměl být větší než 0,6 g vody/100 g sušeného kysaného podmáslí.

6.3 **Zdroj údajů o shodnosti**

Tyto údaje o shodnosti byly získány na základě pokusu z roku 1995, kterého se zúčastnilo osm laboratoří a ve kterém bylo použito dvanáct vzorků (6 slepých duplikátů).

▼B

PŘÍLOHA XX

(Článek 16)

REFERENČNÍ METODA PRO STANOVENÍ ČISTOTY MLÉČNÉHO TUKU PLYNOVOU CHROMATOGRAFICKOU ANALÝZOU TRIGLYCERIDŮ – 2. REVIZE

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato příloha uvádí referenční metodu pro stanovení čistoty mléčného tuku pomocí plynové chromatografické analýzy triglyceridů. Touto metodou lze zjistit jak přítomnost rostlinného, tak živočišného tuku, jako je hovězí lůj a vepřové sádlo.

Neporušenost mléčného tuku se zjistí pomocí stanovených triglyceridových rovnic. Tato metoda se v zásadě používá na syrové kravské mléko nebo výrobky z tohoto mléka, a to bez ohledu na podmínky krmení, chovu nebo laktace. Pouze výjimečně může krmení s vysokým podílem čistých rostlinných olejů, např. řepkového oleje, způsobit falešně pozitivní výsledek. Falešně pozitivní výsledek mohou způsobit také výrobky získané z mléka jednotlivých krav.

Tato metoda se používá zejména na tuk extrahovaný z mléčných výrobků, jež mají obsahovat čistý mléčný tuk s nezměněným složením, např. z másla, smetany, mléka a sušeného mléka. Technologické zpracování mléčného tuku, jako odstranění cholesterolu nebo frakcionace, může způsobit falešně pozitivní výsledek. Totéž platí pro mléčný tuk získaný z odstředěného mléka nebo podmáslí. Tato metoda se nedá vždy použít na tuk extrahovaný ze sýra, jelikož proces zrání může ovlivnit složení tuku natolik, že se získá falešně pozitivní výsledek.

Poznámka 1: Kyselina máselná (n-butanová) (C_4) se vyskytuje výhradně v mléčném tuku a umožňuje provedení kvantitativních odhadů nízkého až středního množství mléčného tuku v rostlinných a živočišných tucích. Z důvodu velkých rozdílů v obsahu C_4 v přibližném rozsahu hmotnostního zlomku 3,1 % až 3,8 % je však obtížné poskytnout kvalitativní a kvantitativní informace u hmotnostních zlomků cizího tuku v čistém mléčném tuku do 20 %[1].

Poznámka 2: Kvantitativní výsledky nelze prakticky odvodit z obsahu sterolů v rostlinných tucích, protože závisí na podmínkách výroby a zpracování. Kvalitativní stanovení cizích tuků za pomoci sterolů je ještě nejednoznačnější.

2. DEFINICE

Čistota mléčného tuku: nepřítomnost rostlinných a živočišných tuků stanovená postupem uvedeným v této příloze.

Poznámka: Čistota je stanovena pomocí hodnot *S*, které se vypočítají ze složení triglyceridů. Hmotnostní zlomky triglyceridů jsou vyjádřeny v procentech.

3. PODSTATA METODY

Tuk extrahovaný z mléka nebo mléčných výrobků se analyzuje pomocí plynové chromatografie s využitím náplňové nebo krátké kapilární kolony s cílem stanovit triglyceridy (TG) rozdělené podle celkového počtu uhlíků. Dosazením procentuálně vyjádřeného hmotnostního zlomku molekul tuku s různou velikostí (C_{24} až C_{54}, pouze s využitím molekul se sudým počtem uhlíků) do vhodných TG rovnic se vypočítají hodnoty *S*. Překročí-li hodnoty *S* meze stanovené pro čistý mléčný tuk, je zjištěna přítomnost cizího tuku.

▼B

Poznámka 1: Vhodnost a rovnocennost náplňových a kapilárních kolon již byla prokázána dříve[2–4].

Poznámka 2: Hodnota *S* je součet hmotnostních zlomků TG vynásobených stanovenými koeficienty.

4. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a.

4.1 Nosný plyn: dusík, alternativně helium nebo vodík, každý z nich o čistotě alespoň 99,995 %

4.2 Referenční standardy tuku pro standardizaci referenčního standardu mléčného tuku podle bodu 7.3.3

4.2.1 Referenční standardy triglyceridů, nasycené; vhodné výrobky jsou komerčně dostupné.

4.2.2 Referenční standard cholesterolu

4.3 Methanol (CH_3OH), bezvodý

4.4 n-hexan ($CH_3(CH_2)4CH_3$)

4.5 n-heptan ($CH_3(CH_2)5CH_3$)

4.6 Další plyny: vodík, čistota alespoň 99,995 %, bez organických nečistot (CnHm < 1 µl/l); syntetický vzduch bez organických nečistot (C_nH_m < 1 µl/l)

4.7 Bezvodý síran sodný (Na_2SO_4)

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a zejména:

5.1 **Vysokoteplotní plynový chromatograf**

Vysokoteplotní plynový chromatograf musí být vhodný pro teploty nejméně 400 °C a musí být vybaven plamenově ionizačním detektorem (FID). Septa používaná v nástřiku musí být odolná proti vysokým teplotám a vykazovat velmi nízký stupeň uvolňování nežádoucích složek (tzv. bleeding). V případě kapilární GC se použije kolonové (tzv. on-column) nástřikové zařízení. K připojení kolony a vložek nástřikového zařízení a/nebo detektoru, používejte vždy grafitová těsnění (je-li to nutné).

5.2 **Chromatografická kolona**

5.2.1 *Náplňová kolona*

Použijte skleněnou kolonu s vnitřním průměrem 2 mm a délkou 500 mm naplněnou stacionární fází Gas ChromQ ([1]) 3 % OV-1 na 125 µm až 150 µm (zrnitost 100 až 120). Příprava, silanizace, plnění a kondicionování náplňové kolony je popsáno v příloze A.

Alternativně lze použít kapilární kolonu (5.2.2).

5.2.2 *Kapilární kolona*

Použijte krátkou kapilární kolonu, např. délky 5 m s nepolární stacionární fází, která odolá teplotám do 400 °C a více ([2]). Kolonu kondicionujte provedením 20 analýz roztoku mléčného tuku (7.2) v rozmezí 2 až 3 dnů s použitím nastavení uvedeného v bodě 7.3.4.2. Poté by se odezvové faktory (7.3.3) měly blížit hodnotě 1 a měly by být nižší než 1,20.

Poznámka: Kolon s rozdílnými rozměry a rozdílnou nepolární, vysoce tepelně odolnou fází lze použít, pokud jejich výkonnost odpovídá této příloze. Viz také 7.3.4.2.

([1]) Příklad vhodného komerčně dostupného produktu. Tyto informace se uvádějí pouze pro orientaci uživatelů této přílohy a neznamenají povinné předepsání tohoto produktu.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) je příkladem vhodného komerčně dostupného produktu. Tyto informace se uvádějí pouze pro orientaci uživatelů této přílohy a neznamenají povinné předepsání tohoto produktu.

▼B

5.3 Kolona Extrelut o objemu 1 ml až 3 ml naplněná silikagelem potřebná pouze pro extrakci mléčného tuku podle bodu 7.1.3.

5.4 Grafitová těsnění odolná vůči teplotě alespoň 400 °C; použijí se k připojení GC kolony a vložek nástřikového zařízení a/nebo detektoru.

5.5 Vodní lázeň s možností udržování teploty na 50 °C ± 2 °C.

5.6 Pec fungující při teplotách 50 °C ± 2 °C a 100 °C ± 2 °C.

5.7 Mikrolitrová pipeta

5.8 Dělená pipeta o objemu 5 ml

5.9 Baňka s kulatým dnem o objemu 50 ml

5.10 Erlenmeyerova baňka s jmenovitým objemem 250 ml

5.11 Nálevka

5.12 Papírový filtr s mikropóry

5.13 Rotační odparka

5.14 Ampulky o jmenovitém objemu 1 ml opatřené hliníkovým uzávěrem tvarovaným přes hranu nebo šroubovacím uzávěrem s polytetrafluorethylenovým vyložením

5.15 Injekční stříkačka s pístem nesahajícím až k hrotu jehly (náplňová kolona pro GC)

Poznámka: S těmito injekčními stříkačkami lze dosáhnout lepší opakovatelnosti výsledků.

5.16 Analytické váhy s přesností měření na 1 mg a s možností odečtu po 0,1 mg

6. ODBĚR VZORKŮ

Laboratoři musí být zaslán reprezentativní vzorek, který během přepravy nebo skladování nesmí být poškozen ani změněn.

Odběr vzorků není součástí metody uvedené v této příloze. Doporučená metoda odběru vzorků je uvedena v normě ISO 707IDF 50[5].

7. PRACOVNÍ POSTUP

7.1 **Příprava zkušebních vzorků**

Pro přípravu vzorků použijte jednu z následujících tří metod extrakce mléčného tuku.

7.1.1 *Izolace z másla nebo máselného oleje*

Pomocí vodní lázně (5.5) nebo pece (5.6) rozpusťte 50 až 100 g zkušebního vzorku při teplotě 50 °C. Do složeného filtračního papíru (5.12) vložte 0,5 g až 1,0 g bezvodého síranu sodného (4.7). V peci (5.6) nastavené na 50 °C předehřejte 250 ml Erlenmeyerovu baňku (5.10) a nálevku (5.11) s vloženým filtračním papírem. Vrstvu tuku rozpuštěného vzorku filtrujte s tím, že předehřátou baňku, nálevku a do ní vložený filtr ponecháte v peci. Dbejte na to, aby nedošlo k přenosu séra.

Pouze v případech, kdy je k dispozici omezené množství zkušebního vzorku, lze použít menší zkušební vzorek, čemuž je nutno přizpůsobit i tento postup. Manipulace s menší zkušební dávkou však představuje větší riziko toho, že bude získán nereprezentativní vzorek.

Poznámka 1: Máslo lze získat ze smetany stlučením a důkladným omytím výsledného máselného zrna.

Poznámka 2: Mléčný tuk získaný postupem v bodě 7.1.1 bude téměř prostý fosfolipidů.

▼B

7.1.2 *Extrakce podle Röse-Gottliebovy vážkové metody*

Tukovou frakci ze zkušebního vzorku extrahujte vážkovou metodou popsanou v jedné z norem ISO 1211 IDF 001D, ISO 2450IDF 016C nebo ISO 7328IDF 116A.

Poznámka: Jsou-li v získaném mléčném tuku přítomny fosfolipidy, získá se pík cholesterolu zvýšený asi o 0,1 %. Vliv na složení TG standardizované na 100 % včetně cholesterolu je tudíž zanedbatelný.

7.1.3 *Extrakce z mléka pomocí silikagelových kolon*

Pomocí mikrolitrové pipety (5.7) přidejte do 1ml až 3ml kolony Extrelut (5.3) 0,7 ml zkušebního vzorku temperovaného na 20 °C. Po dobu asi 5 minut jej nechte rovnoměrně rozprostřít na silikagelu.

Pro denaturalizaci protein-lipidových komplexů přidejte pomocí dělené pipety (5.8) do kolony Extrelut 1,5 ml methanolu (4.3). Následně ze zkušebního vzorku extrahujte tukovou frakci 20 ml *n*-hexanu (4.4). V malých dávkách pomalu přidávejte *n*-hexan. Vytékající rozpouštědlo jímejte do 50ml baňky s kulatým dnem (5.9), již jste předem vysušili na známou konstantní hmotnost zváženou s přesností na 1 mg a zaznamenanou s přesností na 0,1 mg.

Po extrakci nechte kolonu vytékat, dokud se zcela nevyprázdní. Z eluátu nechte odpařit rozpouštědla na rotační odparce (5.13) s vodní lázní nastavenou na teplotu mezi 40 °C a 50 °C. Po odpaření rozpouštědel vysušte a následně zvažte baňku s kulatým dnem a její obsah s přesností na 1 mg a hmotnost zaznamenejte s přesností na 0,1 mg. Získanou hmotnost tuku stanovte odečtením hmotnosti suché prázdné baňky s kulatým dnem od získané hmotnosti.

Poznámka: Extrakce tuku podle metod Gerbera, Weibulla a Berntropa nebo Schmida, Bondzynského a Ratzlaffa či izolace mléčného tuku detergenty (metodou BDI) nejsou pro analýzu triglyceridů vhodné, protože při těchto metodách může do tukové fáze přecházet značné množství parciálních glyceridů nebo fosfolipidů. Použití této přílohy je tudíž omezeno s ohledem na určité výrobky, zejména sýr.

7.2 **Příprava roztoku vzorku**

Pro plynovou chromatografii s náplňovou kolonou připravte 5 % (hmotnostní zlomek) roztoku tuku (získaného podle bodu 7.1) v *n*-hexanu (4.4) nebo *n*-heptanu (4.5). V závislosti na rozměrech kolony použijte 1 % nebo nižší koncentraci (0,53 mm, VP široké kapiláry) pro nástřik na kolonu prováděný s kapilární kolonou.

Podle použité kolony a množství tuku získaného v 7.1.3 stanovte množství rozpouštědla (4.4 nebo 4.5), které je třeba přidat ke zkušebnímu vzorku v baňce na základě jeho hmotnosti získané s přesností na 1 mg a zaznamenané s přesností na 0,1 mg. Zbytek zcela rozpusťte.

Do ampulky (5.14) převeďte asi 1 ml roztoku vzorku.

7.3 **Chromatografické stanovení triglyceridů**

7.3.1 *Posun základní linie*

Pro minimalizaci nárůstu základní linie se musí kolona kondicionovat podle bodu 5.2.2 (kapilární kolona) nebo podle přílohy A.4 (náplňová kolona).

Poznámka: Z důvodu vysoké teploty kolony je analýza triglyceridů zvláště náchylná na nárůst základní linie v oblasti vysokého počtu uhlíků.

7.3.2 *Technika nástřiku*

▼B

7.3.2.1 Náplňová kolona

Diskriminačním účinkům lze předejít použitím techniky horké jehly (tzv. hot-needle) pro zlepšení kvantifikace vysokovroucích složek TG. Jehlu naplňte vzduchem nasáním roztoku tuku do stříkačky a vložte ji do nástřikového zařízení. Před nástřikem jehlu zahřívejte po dobu asi 3 s a poté obsah stříkačky rychle nastříkněte.

7.3.2.2 Kapilární kolona

Při použití studeného nástřiku na kolonu (7.3.4.2) jehlu stříkačky vložte do prostoru nástřiku a obsah nastříkněte okamžitě. Doba prodlevy jehly v injekčním vstupu by měla být taková, aby nedošlo k rozmytí píku rozpouštědla.

Poznámka: Optimální doba prodlevy je obvykle asi 3 s.

7.3.3 *Kalibrace*

7.3.3.1 Obecně

Pro kalibraci zkušebních vzorků proveďte na začátku každého dne dvě až tři analýzy standardizovaného mléčného tuku. Pro stanovení odezvových faktorů RF_{Si} (hmotnostní zlomek/plošný zlomek) TG a cholesterolu použijte poslední analýzu standardizovaného mléčného tuku. Tyto odezvové faktory následně použijte na zkušební vzorky (viz 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

kde:

w_{si} je hmotnostní zlomek každého TG nebo cholesterolu ve standardizovaném mléčném tuku vyjádřený v procentech,

A_{si} je číselná hodnota plochy píku každého TG nebo cholesterolu ve standardizovaném mléčném tuku.

Pro získání standardizovaného mléčného tuku se známým složením TG použijte buď 7.3.3.2, nebo 7.3.3.3.

7.3.3.2 Komerční referenční standard mléčného tuku

Nejlepším způsobem, jak stanovit odezvový faktor jednotlivých složek zkušebního vzorku, je použít standardizovaný mléčný tuk s ověřeným složením TG.

Poznámka: Vhodným referenčním standardem je CRM 519 (bezvodý mléčný tuk), který lze získat v Ústavu referenčních materiálů a měr (IRMM) v belgickém Geelu ([1]).

7.3.3.3 Laboratorní referenční standard mléčného tuku

Připravte asi 1 g směsi referenčních standardů tuků (viz 4.2, obsahující alespoň nasycené TG, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} a C_{54} i cholesterol, a nejlépe i C_{50} a C_{52}) navážením s přesností na 1 mg a zaznamenáním hmotnosti s přesností na 0,1 mg tak, abyste získali relativní složení TG podobné mléčnému tuku.

Roztok směsi referenčních standardů tuku opakovaně analyzujte v *n*-hexanu (4.4) nebo *n*-heptanu (4.5) podle bodu 7.3.4. Zároveň opakovaně analyzujte mléčný tuk s průměrným složením.

Odezvové faktory TG stanovte ze směsi referenčních standardů tuků. Přechodné odezvové faktory TG, které nejsou ve směsi přítomny, lze vypočítat matematickou interpolací. Získané odezvové faktory použijte

([1]) Příklad vhodného komerčně dostupného produktu. Tyto informace se uvádějí pouze pro orientaci uživatelů této přílohy a neznamenají povinné předepsání tohoto produktu.

▼B

na mléčný tuk, abyste získali standardizované složení. Takto získaný standardizovaný mléčný tuk má životnost několik let, pokud se skladuje pod dusíkem a při maximální teplotě –18 °C.

7.3.4 *Chromatografické podmínky*

Poznámka: Použití náplňové, nebo kapilární kolony obvykle vede k podobnému rozlišení jako na obrázku 1. Oddělení TG se sudým číslem se běžně nepozoruje a je třeba mu předejít.

7.3.4.1 Náplňová kolona

a) Teplotní program: Počáteční teplotu pece nastavte na 210 °C. Pec na této teplotě udržujte po dobu 1 min. Poté teplotu zvyšte rychlostí 6 °C/min až na 350 °C. Na této (konečné) teplotě pec udržujte po dobu 5 min.

b) Teplota detektoru a nástřikového zařízení: obě teploty nastavte na 370 °C.

c) Nosný plyn: použijte dusík s konstantním průtokem asi 40 ml/min. Přesný průtok nosného plynu nastavte tak, aby se C_{54} eluoval při 341 °C.

d) Doba analýzy: 29,3 min.

e) Objem nástřiku: nastříkněte 0,5 µl 5 % (objemový zlomek) roztoku vzorku.

V době, kdy se neprovádí žádné analýzy TG, udržujte počáteční teplotu v peci uvedenou v písmenu a), teplotu detektoru a nástřikového zařízení uvedenou v písmenu b) a průtok nosného plynu uvedený v písmenu c) konstantní, a to i přes noc a během víkendů a svátků. Tím se zajistí nejlepší fungování kolony.

7.3.4.2 Kapilární kolona

a) Teplotní program: Počáteční teplotu pece nastavte na 80 °C. Pec na této teplotě udržujte po dobu 0,5 min. Poté teplotu zvyšte rychlostí 50 °C/min až na 190 °C a následně rychlostí 6 °C/min až na 350 °C. Na této (konečné) teplotě pec udržujte po dobu 5 min.

b) Teplota detektoru: nastavte na 370 °C.

c) Nosný plyn: použijte dusík s konstantním průtokem asi 3 ml/min.

d) Doba analýzy: 34,4 min.

e) Objem nástřiku: nastříkněte 0,5 µl 1 % (objemový zlomek) roztoku vzorku.

V zájmu zajištění optimálního provozu toto nastavení udržujte i během nouzových přestávek (viz 7.3.4.1).

Analytická nastavení uvedená v bodě 7.3.4.2 jsou vhodná pro použití kolony se širokým průměrem (VP 0,53 mm), jak je uvedeno v bodě 5.2.2. Při použití kolony s jinými rozměry nebo s jinou fází lze použít jiné podmínky.

8. INTEGRACE, VYHODNOCENÍ A KONTROLA ANALYTICKÉHO VÝKONU

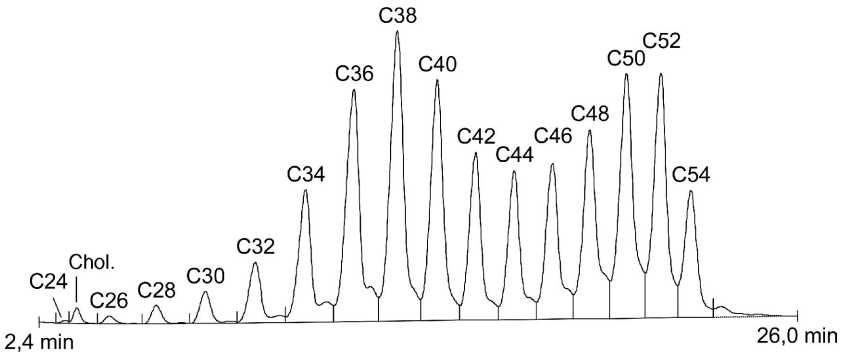
Píky chromatogramu vyhodnoťte pomocí integračního systému schopného zakreslit základní linii a reintegrovat. Obrázek 1 zobrazuje správně integrovaný chromatogram, zatímco na obrázku 2 je znázorněna sporadická chyba v základní linii končící po C_{54}, která má vliv na procentické zastoupení všech TG. Nicméně píky po C_{54} z hodnocení vylučte.

TG s lichým počtem uhlíků v acylech ($2n + 1$) slučte s předcházejícím TG se sudým počtem ($2n$). Nízký obsah C_{56} neberte v úvahu. Plošná procenta zbývajících TG včetně cholesterolu vynásobte odpovídajícími odezvovými faktory standardizovaného mléčného tuku (poslední kalibrace) a společně normalizujte na 100 % podle bodu 9.1.

▼B

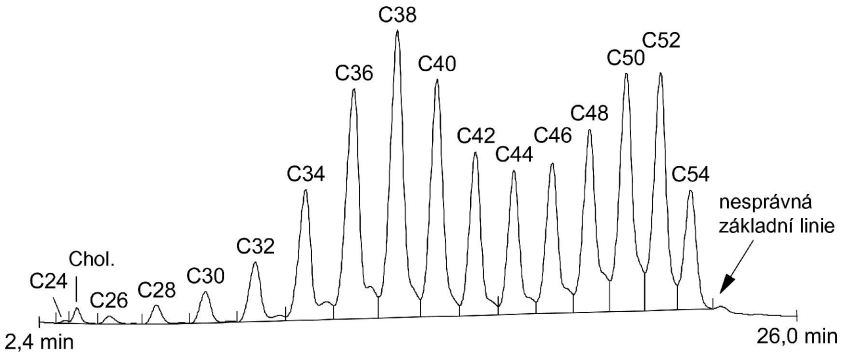
Obrázek 1

Příklad chromatogramu triglyceridů mléčného tuku se správně stanovenou základní linií



Obrázek 2

Příklad chromatogramu triglyceridů mléčného tuku s nesprávně stanovenou základní linií



Pro kontrolu podmínek měření porovnejte koeficienty odchylky (KO vyjádřené v procentech) různých TG uvedených v tabulce 1, které vycházejí z devatenácti po sobě jdoucích analýz téhož vzorku mléčného tuku.

Jsou-li hodnoty KO výrazně vyšší než hodnoty v tabulce 1, nejsou chromatografické podmínky vhodné.

Poznámka: Hodnoty uvedené v tabulce 1 nejsou závazné, jsou pouze orientační pro účely kontroly jakosti.

Jsou-li však přijatelné vyšší hodnoty KO, musí být splněny mezní hodnoty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti uvedené v bodu 10.

Tabulka 1

Koeficienty odchylky obsahu triglyceridů (devatenáct po sobě jdoucích analýz)

Triglycerid	KO %
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

▼B

Triglycerid	KO %
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 vyjádření výsledků

9.1 **Složení triglyceridů**

9.1.1 *Výpočet výsledků*

Pomocí následující rovnice vypočítejte hmotnostní zlomek každého TG (pro $i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52}$ a C_{54}) a cholesterolu z celkového obsahu TG ve zkušebním vzorku, w_i, vyjádřený v procentech:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

kde

A_i je číselná hodnota plochy píku každého TG ve zkušebním vzorku

RF_{si} je odezvový faktor každého TG stanovený kalibrací (7.3.3).

9.1.2 *Vyjádření výsledků zkoušky*

Výsledky uveďte s přesností na dvě desetinná místa.

9.2 **Hodnoty S**

9.2.1 *Výpočet výsledků*

9.2.1.1 Hodnoty S vyjádřené v procentech vypočítejte zadáním vypočítaného w_i (9.1.1) odpovídajících procentních hodnot TG do rovnic (3) až (7). Všechny rovnice použijte bez ohledu na druh cizího tuku, na jehož přítomnost je podezření.

9.2.1.2 Sojový, slunečnicový, olivový, řepkový a lněný olej, olej z pšeničných klíčků, olej z kukuřičných klíčků, bavlníkový olej a rybí tuk

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3 Kokosový a palmojádrový 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 hovězí lůj

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}2010 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5 Vepřové sádlo

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6 Celkem

$$S = -2{,}757\,5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\,7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\,7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\,7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\,0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\,8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\,6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\,6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\,1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2 *Vyjádření výsledků zkoušky*

Výsledky uveďte s přesností na dvě desetinná místa.

9.3 **Zjišťování přítomnosti cizích tuků**

Pět hodnot S získaných podle bodu 9.2.1 porovnejte s odpovídajícími mezemi S uvedenými v tabulce 2.

Zkušební vzorek považujte za čistý mléčný tuk, když všech pět hodnot S spadá do mezí uvedených v tabulce 2. Spadá-li však některá hodnota S mimo odpovídající mez, má se za to, že vzorek obsahuje cizí tuk.

Ačkoli jsou jednotlivé rovnice (3) až (6) citlivější na určité cizí tuky než celková rovnice (7) (viz tabulka B.1), pozitivní výsledek získaný pouze prostřednictvím jedné z rovnic (3) až (6) neumožňuje vyvozovat závěry o druhu cizího tuku.

Příloha B popisuje postup výpočtu obsahu rostlinného nebo živočišného tuku ve zfalšovaném mléčném tuku. Tento postup není ověřen a je uveden pouze pro informaci.

Tabulka 2

Mezní hodnoty S pro čisté mléčné tuky

Cizí tuk	Rovnice	Mezní hodnoty S [a]
Sojový, slunečnicový, olivový, řepkový a lněný olej, olej z pšeničných klíčků, olej z kukuřičných klíčků, bavlníkový olej a rybí tuk	(3)	98,05 až 101,95
Kokosový a palmojádrový tuk	(4)	99,42 až 100,58
Palmový olej a hovězí lůj	(5)	95,90 až 104,10
Vepřové sádlo	(6)	97,96 až 102,04
Celkem	(7)	95,68 až 104,32

[a] Vypočteno na základě úrovně spolehlivosti 99 % tak, aby byl přídavek cizího tuku uveden pouze při překročení detekčních limitů příslušné rovnice (viz tabulka B.1).

10. SHODNOST

10.1 **Mezilaboratorní zkouška**

Hodnoty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti byly stanoveny na základě rovnic (3) až (7) s použitím čistého mléčného tuku a nesmí se použít na jiné než uvedené matrice.

10.2 **Opakovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou jednotlivých zkoušek získanými s krátkým časovým odstupem stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem používajícím stejné zařízení by ve více než 5 % případů neměl překročit limity uvedené v tabulce 3.

▼B

Tabulka 3

Mezní hodnoty opakovatelnosti, r, pro rovnice (3) až (7)

Cizí tuk	Rovnice	r %
Sojový, slunečnicový, olivový, řepkový a lněný olej, olej z pšeničných klíčků, olej z kukuřičných klíčků, bavlníkový olej a rybí tuk	(3)	0,67
Kokosový a palmojádrový tuk	(4)	0,12
Palmový olej a hovězí lůj	(5)	1,20
Vepřové sádlo	(6)	0,58
Celkem	(7)	1,49

10.3 **Reprodukovatelnost**

Absolutní rozdíl mezi výsledky dvou jednotlivých zkoušek získanými stejnou metodou na stejném zkušebním materiálu v různých laboratořích a různými pracovníky používajícími odlišná zařízení by ve více než 5 % případů neměl překročit limity uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4

Mezní hodnoty reprodukovatelnosti, R, pro rovnice (3) až (7)

Cizí tuk	Rovnice	R %
Sojový, slunečnicový, olivový, řepkový a lněný olej, olej z pšeničných klíčků, olej z kukuřičných klíčků, bavlníkový olej a rybí tuk	(3)	1,08
Kokosový a palmojádrový tuk	(4)	0,40
Palmový olej a hovězí lůj	(5)	1,81
Vepřové sádlo	(6)	0,60
Celkem	(7)	2,07

11. NEJISTOTA MĚŘENÍ

Na základě opakovatelnosti *r* a reprodukovatelnosti *R* lze vypočítat rozšířenou nejistotu pro hodnoty *S*.

Zahrnutím rozšířené nejistoty (vycházející z paralelní analýzy) do mezních hodnot *S* v tabulce 2 se získají rozšířené mezní hodnoty *S*, které jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5

Rozšířené mezní hodnoty S pro čistý mléčný tuk a rozšířená nejistota

Cizí tuk	Rovnice	Rozšířené mezní hodnoty S
Sojový, slunečnicový, olivový, řepkový a lněný olej, olej z pšeničných klíčků, olej z kukuřičných klíčků, bavlníkový olej a rybí tuk	(3)	97,36 až 102,64
Kokosový a palmojádrový tuk	(4)	99,14 až 100,86
Palmový olej a hovězí lůj	(5)	94,77 až 105,23
Vepřové sádlo	(6)	97,65 až 102,35
Celkem	(7)	94,42 až 105,58

▼B

12. PROTOKOL O ZKOUŠCE

V protokolu o zkoušce musí být uvedeny:

— veškeré informace nutné pro úplnou identifikaci vzorku,

— použitá metoda odběru vzorku, je-li známa,

— použitá zkušební metoda s odkazem na tuto přílohu,

— všechny provozní údaje týkající se pracovního postupu, které tato příloha neobsahuje nebo které jsou považovány za volitelné, jakož i údaje o všech skutečnostech, jež mohly výsledek (výsledky) zkoušky ovlivnit,

— získaný výsledek (výsledky) zkoušky, a byla-li ověřena opakovatelnost, konečný získaný výsledek.

▼B

PŘÍLOHA A

(normativní)

PŘÍPRAVA NÁPLŇOVÉ KOLONY

A.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE A POMŮCKY

A.1.1 **Toluen** ($C_6H_5CH_3$)

A.1.2 Roztok **dimethyldichlorosilanu** [$Si(CH_3)2Cl_2$]

Ve 283 ml toluenu (A.1.1) rozpusťte 50ml dimethyldichlorosilanu.

A.1.3 Roztok **kakaového másla** s hmotnostním zlomkem 5 % kakaového másla v *n*-hexanu (4.4) nebo n-heptanu (4.5)

A.1.4 **Stacionární fáze**, 3 % OV-1 na 125 μm až 150 μm (zrnitost 100 až 120) Gas ChromQ ([1])

Poznámka: Uvedení zrna bylo převedeno na mikrometry v souladu s BS 410 (všechny části)[6].

A.1.5 **Skleněná kolona**, vnitřní průměr 2 mm a délka 500 mm, tvar U

A.1.6 **Zařízení** pro plnění náplňové kolony

A.1.6.1 **Plnicí kolona** s našroubovanými koncovými uzávěry opatřená značkou, k níž lze doplnit požadované množství stacionární fáze.

A.1.6.2 **Jemné síto** se zrnitostí přibližně 100 μm se šroubovým uzávěrem umožňujícím utěsnit skleněnou kolonu podle obrázku A.3

A.1.6.3 **Silanizovaná skleněná vata**, deaktivovaná

A.1.6.4 **Vibrátor** pro stejnoměrné rozložení stacionární fáze během plnění

A.1.6.5 **Zařízení pro silanizaci** skleněného povrchu kolony

A.1.6.6 *Woulffova láhev*

A.1.6.7 *Vodní vývěva*

A.2 SILANIZACE (DEAKTIVACE SKLENĚNÉHO POVRCHU)

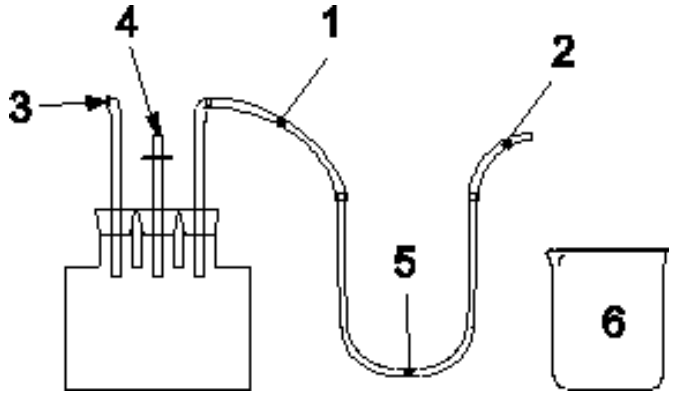
Po připojení Woulffovy láhve (A.1.6.6) k vodní vývěvě (A.1.6.7) ponořte trubičku 2 (viz obrázek A.1) do dimethyldichlorosilanového roztoku (A.1.2). Tímto roztokem naplňte kolonu (A.1.5) uzavřením kohoutu. Kohout znovu otevřete a poté obě trubičky odstraňte. Kolonu připevněte ke stojanu. Pipetou ji zcela doplňte roztokem dimethyldichlorosilanu (A.1.2).

([1]) Příklad vhodného komerčně dostupného produktu. Tyto informace se uvádějí pouze pro orientaci uživatelů této přílohy a neznamenají povinné předepsání tohoto produktu normou ISO ani IDF.

▼B

Obrázek A.1

Silanizační zařízení



Legenda

1 trubička 1

2 trubička 2

3 vodní vývěva

4 kohout

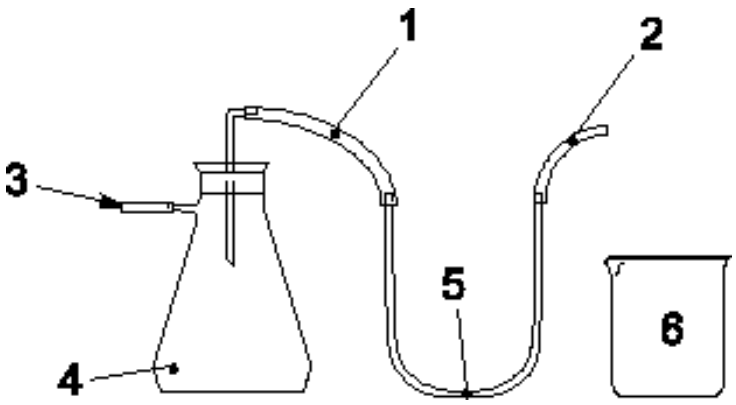
5 skleněná kolona

6 dimethyldichlorosilan a toluen

Kolonu nechte stát po dobu 20 až 30 minut. Poté Woulffovu láhev vyměňte za filtrační baňku. Připojením kolony k vodní vývěvě (A.1.6.7) kolonu vyprázdněte (viz obrázek A.2). Vyprázdněnou kolonu propláchněte 75 ml toluenu (A.1.1) a následně 50 ml methanolu (4.3) ponořením trubičky 2 do rozpouštědla. Propláchnutou kolonu nechte vysoušet v peci (5.6) nastavené na 100 °C po dobu asi 30 minut.

Obrázek A.2

Proplachovací zařízení



Legenda

1 trubička 1

2 trubička 2

3 vodní vývěva

4 filtrační baňka

5 skleněná kolona

6 proplachovací činidlo

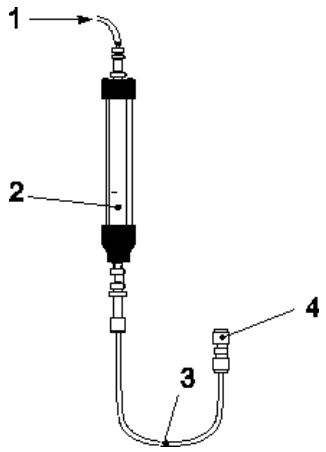
▼B

A.3 PLNĚNÍ

Naplňte kolonu pomocí zařízení znázorněného na obrázku A.3. Plnicí kolonu (A.1.6.1) naplňte stacionární fází (A.1.4) až po značku. Dolní konec skleněné kolony, která má být naplněna, utěsněte asi 1 cm dlouhou zátkou ze silanizované, stlačené skleněné vaty (A.1.6.3). Konec kolony uzavřete jemným sítem (A.1.6.2).

Obrázek A.3

Plnění skleněné kolony



Legenda

1 přívod dusíku

2 plnicí kolona, která má být naplněna OV-1 až po značku

3 skleněná kolona, která má být naplněna

4 šroubovací uzávěr s filtrem, na který se přitlačí skleněné vlákno a stacionární fáze

Kolonu naplňte pod tlakem (300 kPa a průtok dusíku) stacionární fází. Pro dosažení stejnoměrné, souvislé a pevné náplně pohybujte během plnění po skleněné koloně nahoru a dolů vibrátorem. Po naplnění zatlačte do druhého konce náplňové kolony pevnou zátku ze silanizované skleněné vaty (A.1.6.3). Vyčnívající konce odřízněte. Zátku zatlačte o několik milimetrů dovnitř kolony špachtlí.

A.4 KONDICIONOVÁNÍ

Během fází a) až c) nepřipojujte zadní část kolony k detektoru, aby nedošlo ke znečištění. Naplněnou kolonu (A.3) kondicionujte takto:

a) Kolonu proplachujte 15 minut dusíkem s průtokem nastaveným na 40 ml/min a GC pecí nastavenou na 50 °C.

b) Kolonu zahřejte rychlostí 1 °C/min na teplotu 355 °C s průtokem dusíku nastaveným na 10 ml/min.

c) Kolonu udržujte po dobu 12 až 15 hodin při teplotě 355 °C.

d) Pomocí teplotního programu pro náplňovou kolonu uvedeného v bodě 7.3.4.1 dvakrát nastříkněte 1 µl roztoku kakaového másla (A.1.3).

Poznámka: Kakaové máslo obsahuje téměř výhradně vysokovroucí C_{50} až C_{54} TG, a proto snižuje nároky na kondicionování kolony s ohledem na příslušné odezvové faktory.

▼B

e) V průběhu dvou až tří dnů nastříkněte dvacetkrát 0,5 µl roztoku mléčného tuku podle bodu 7.2 pomocí nastavení pro náplňovou kolonu uvedených v bodě 7.3.4.1.

— Pro analýzu zkušebních vzorků používejte pouze kolony s odezvovým faktorem blízkým hodnotě 1. Odezvové faktory nesmí být vyšší než 1,20.

▼B

PŘÍLOHA B

(informativní)

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ OBSAHU CIZÍHO TUKU

B.1 OBECNĚ

Tabulka B.1 uvádí detekční limity pro různé cizí tuky vypočítané s 99 % úrovní spolehlivosti. Prostřední sloupec uvádí detekční limity nejúčinnější jednotlivé rovnice (3) až (6).

Detekční limity celkové rovnice (7) uvedené v krajním pravém sloupci jsou o něco vyšší. V zásadě je rovnice (7) nutná pouze pro kvantitativní stanovení cizího tuku.

Prostřednictvím všech rovnic lze také zjistit kombinace různých cizích tuků. Odchylka složení TG mezi jednotlivými vzorky jednoho druhu cizího tuku nemá na detekční limity žádný výrazný vliv.

Při použití jak jednotlivých rovnic, tak rovnice celkové, se uplatní detekční limity jednotlivých rovnic. V určitých případech (B.2) je však pro kvantitativní stanovení potřebná hodnota *S* z celkové rovnice.

Tabulka B.1

99 % limity detekce cizího tuku přidaného do mléčného tuku vyjádřené v procentech

Cizí tuk	Jednotlivá rovnice %	Celková rovnice %
Sojový olej	2,1	4,4
Slunečnicový olej	2,3	4,8
Olivový olej	2,4	4,7
Kokosový tuk	3,5	4,3
Palmový olej	4,4	4,7
Palmojádrový tuk	4,6	5,9
Řepkový olej	2,0	4,4
Lněný olej	2,0	4,0
Olej z pšeničných klíčků	2,7	6,4
Olej z kukuřičných klíčků	2,2	4,5
Bavlníkový olej	3,3	4,4
Vepřové sádlo	2,7	4,7
Hovězí lůj	5,2	5,4
Hydrogenovaný rybí tuk	5,4	6,1

B.2 VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Kvantitativní stanovení cizího tuku proveďte pouze v případě, že je překročena jedna z mezních hodnot *S* (tabulka 2 nebo tabulka 5). Pro získání kvantitativní informace vypočítejte hmotnostní zlomek cizího tuku nebo hmotnostní zlomek směsi cizího tuku w_f ve zkušebním vzorku vyjádřený v procentech podle následující rovnice:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(B. 1)}$$

▼B

kde

S je výsledek získaný doplněním údajů o TG z mléčného tuku, do kterého byl přidán cizí tuk nebo směs cizích tuků, do jedné z rovnic (3) až (7),

S_f je konstanta závisející na druhu přidaného cizího tuku.

Není-li druh cizího tuku přidaného do mléčného tuku znám, použijte obecnou hodnotu S_f 7,46 (tabulka B.2). Vždy použijte hodnotu S získanou z rovnice (7), a to i tehdy, jestliže její mezní hodnoty S nejsou překročeny, avšak mezní hodnoty S jiné rovnice ano.

V případě známých cizích tuků doplňte do rovnice (B.1) jejich jednotlivé hodnoty S_f (tabulka B.2). Pro výpočet S zvolte z rovnic (3) až (6) rovnici pro odpovídající cizí tuk.

Tabulka B.2

Hodnoty S_f různých cizích tuků

Cizí tuk	S_f
Neznámý	7,46
Sojový olej	8,18
Slunečnicový olej	9,43
Olivový olej	12,75
Kokosový tuk	118,13
Palmový olej	7,55
Palmojádrový tuk	112,32
Řepkový olej	3,30
Lněný olej	4,44
Olej z pšeničných klíčků	27,45
Olej z kukuřičných klíčků	9,29
Bavlníkový olej	41,18
Vepřové sádlo	177,55
Hovězí lůj	17,56
Rybí tuk	64,12

B.3 VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ ZKOUŠKY

Výsledky zkoušky uveďte s přesností na dvě desetinná místa.

Literatura

1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82–85.

2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16–17.

3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 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, pp. 791–797.

5) ISO 707IDF 50, *Mléko a mléčné výrobky – Směrnice pro odběr vzorků*

▼B

6) BS 410:1988, *Zkušební síta – Technické požadavky a zkoušky*

7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber*., 43, 1991, pp. 219–242.

8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol*., 93, 1991, pp. 538–544.

9) DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Zjištění a stanovení cizích tuků v mléčném tuku pomocí plynové chromatografické analýzy triglyceridů]

10) Komise evropských společenství: Posouzení výsledků prvního, druhého, třetího, čtvrtého, pátého a šestého kolektivního pokusu EHS: Stanovení triglyceridů v mléčném tuku; dok. č. 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, pp. 505–510.

▼B

PŘÍLOHA XXI

(Článek 18)

POSTUP POUŽITELNÝ V PŘÍPADĚ ZPOCHYBNĚNÍ VÝSLEDKŮ ANALÝZY (CHEMICKÁ ANALÝZA)

1. Na žádost výrobce se provede v jiné laboratoři schválené příslušným orgánem nová analýza pomocí příslušné metody za předpokladu, že jsou k dispozici zapečetěné duplicitní vzorky produktu, které byly řádně uloženy u příslušného orgánu. Tato žádost se podává do 7 pracovních dnů od sdělení výsledků první analýzy. Analýza se provede do 21 dnů od obdržení žádosti. Na žádost výrobce a na jeho náklady zašle příslušný orgán tyto vzorky druhé laboratoři. Tato laboratoř musí být oprávněna provádět úřední analýzy a musí mít prokázanou kvalifikaci pro dotčenou analýzu.

2. Rozšířené nejistoty ($k = 2$) střední hodnoty $\overline{y}_1$ počtu n_1 opakovaných měření v laboratoři 1 a střední hodnoty $\overline{y}_2$ počtu n_2 opakovaných měření v laboratoři 2 jsou

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ a $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ kde σ_r je směrodatná odchylka opakovatelnosti a σ_R je směrodatná odchylka reprodukovatelnosti příslušné metody. Je-li konečný výsledek měření v laboratořích *y* vypočítán ze vzorce ve tvaru $y = x_1 + x_2$ $y = x_1 - x_2$ nebo $y = x_1 \cdot x_2 y = x_1/x_2$, musí se pro získání nejistoty v těchto případech postupovat podle běžných postupů pro kombinování směrodatných odchylek.

4. Pro ověření, zda výsledky obou laboratoří vyhovují směrodatné odchylce reprodukovatelnosti metody σ_R, vypočítá se rozšířená nejistota rozdílu $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$ takto:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Není-li absolutní hodnota rozdílu středních hodnot laboratoří $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ větší než její nejistota $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

odpovídají výsledky obou laboratoří směrodatné odchylce reprodukovatelnosti σ_r a aritmetický průměr středních hodnot obou laboratoří

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2},$$

se uvede jako konečný výsledek. Jeho rozšířená nejistota je

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Šarže se odmítne jako nevyhovující horní zákonem stanovené mezní hodnotě *UL*, jestliže

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL;$$

v opačném případě se přijme jako šarže, která hodnotě *UL* vyhovuje.

Šarže se odmítne jako nevyhovující dolní zákonem stanovené mezní hodnotě *LL*, jestliže

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL;$$

v opačném případě se přijme jako šarže, která hodnotě *LL* vyhovuje.

Je-li absolutní hodnota rozdílu středních hodnot laboratoří $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$ větší než její nejistota $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

výsledky obou laboratoří nevyhovují směrodatné odchylce reprodukovatelnosti.

V tomto případě je šarže zamítnuta jako nevyhovující, jestliže druhá analýza potvrdí analýzu první. V opačném případě se šarže přijme jako vyhovující.

Příslušný orgán musí konečný výsledek sdělit výrobci co nejdříve. Pokud je šarže zamítnuta, nese náklady na druhou analýzu výrobce.

▼B

PŘÍLOHA XXII

SROVNÁVACÍ TABULKA

Nařízení (ES) č. 213/2001	Toto nařízení
Článek 1	Článek 1
Článek 2	Článek 1
Článek 3	Článek 2
—	Článek 3
Článek 4	—
Článek 5	—
Článek 6	Článek 4
Článek 7	Článek 18
Článek 8	—
Článek 9	Článek 5
Článek 10	Článek 6
Článek 11	Článek 7
Článek 12	Článek 8
Článek 13	Článek 9
Článek 14	Článek 10
Článek 15	Článek 11
Článek 16	Článek 12
Článek 17	Článek 13
—	Článek 14
Článek 18	Článek 15
Článek 19	Článek 16
	Článek 17
	Článek 19
Článek 20	—
Článek 21	—
Článek 22	Článek 20
Článek 23	Článek 21