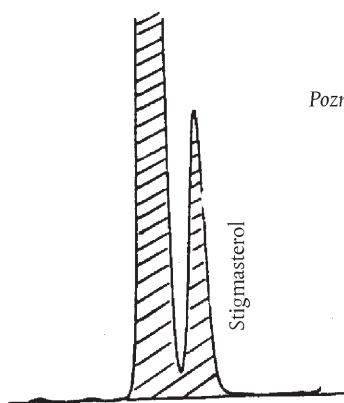
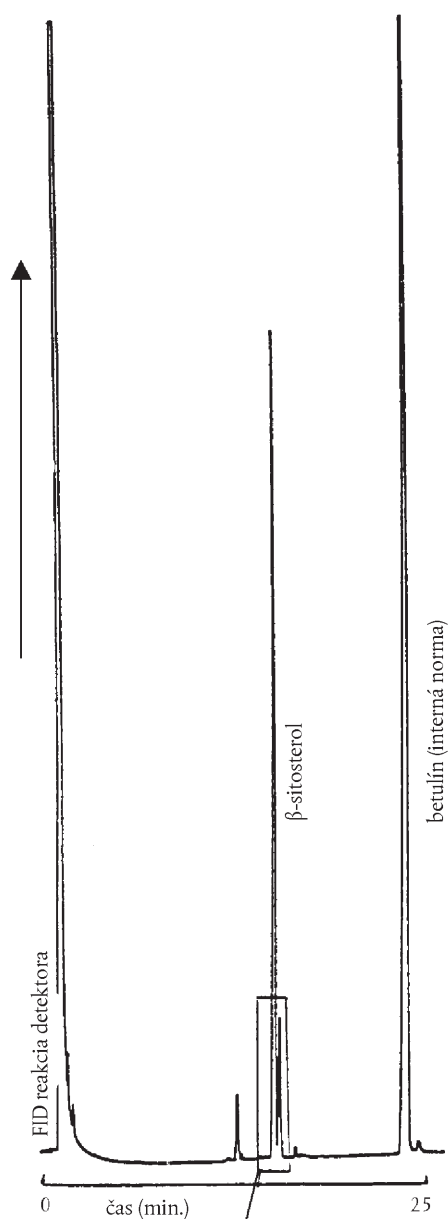
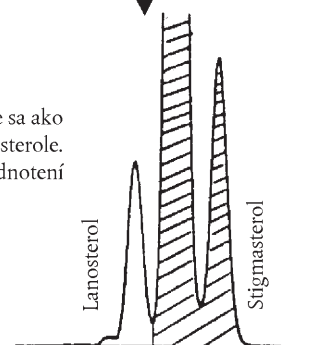
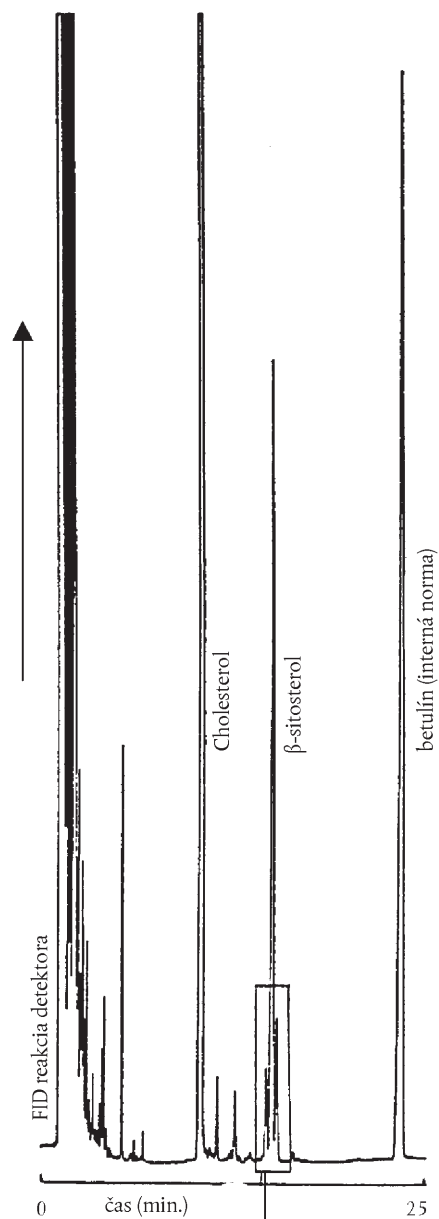


Graf 3a
Štandardný roztok sitosterolu



Poznámka: β -sitosterol často obsahuje nečistotu (označuje sa ako stigmasterol), ktorá sa ukazuje ihneď po β -sitosteroles. Plochy týchto dvoch vrcholov by sa pri hodnotení prítomnosti β -sitosterolu mali spočítať.

Graf 3b
Vzorka masla denaturovaná
beta-sitosterolom



PRÍLOHA XV

(Článok 10)

REFERENČNÁ METÓDA ZISŤOVANIA KRAVSKÉHO MlieKA A KAZEINÁTU V SYROCH VYROBENÝCH Z OVČIEHO MlieKA, KOZIEHO MlieKA ALEBO BYVOLIEHO MlieKA A ZO ZMESÍ KOZIEHO, OVČIEHO A BYVOLIEHO MlieKA**1. Rozsah**

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

2. Oblasť aplikácie

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

3. Princíp metódy

- 3.1. Izolácia kazeínov zo syra a referenčných štandardných roztokov.
- 3.2. Rozpustenie izolovaných kazeínov a vystavenie plazmínovému (EC.3.4.21.7) oddeľovaniu.
- 3.3. Izoelektrické zameranie plazmínovaných kazeínov za prítomnosti močoviny a farbenie proteínov.
- 3.4. Hodnotenie zafarbených γ_3 a γ_2 -kazeínových vzorov (dôkaz prítomnosti kravského mlieka) porovnaním vzoru získaného zo vzorky s vzormi získanými z rovnakého gélu z referenčných štandardných roztokov obsahujúcich 0 % a 1 % kravského mlieka.

4. Reagenty

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

Poznámka: Nasledovné podrobnosti platia pre laboratórne pripravené polyakrylamidové gély obsahujúce močovinu s rozmermi $265 \times 125 \times 0,25$ mm. Ak sa používajú iné rozmery gélu, podmienky separácie môže byť nutné upraviť.

Izoelektrické zameriavanie**4.1. Reagenty pre výrobu polyakrylamidových gélov obsahujúcich močovinu****4.1.1. Zásobný gélový roztok**

Rozpusťte:

4,85 g akrylamidu

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

48,05 g močoviny

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

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

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

- 4.1.2. **Gélový roztok**
Gélový roztok pripravte zmiešaním aditív a amfolytov so zásobným gélovým roztokom (pozri 4.1.1.)
9,0 ml zásobného roztoku
24 mg β -alanínu
500 μ l amfolytu pH 3,5 – 9,5 ⁽¹⁾
250 μ l amfolytu pH 5 – 7 ⁽¹⁾
250 μ l amfolytu pH 6 – 8 ⁽¹⁾
Gélový roztok zmiešajte a odstráňte plyn po dobu dvoch až troch minút v ultrazvukovom kúpeli alebo vo vákuu.
Poznámka: Pripravte gélový roztok tesne pred jeho použitím (pozri 6.2).
- 4.1.3. **Katalytické roztoky**
- 4.1.3.1. N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín (Temed)
- 4.1.3.2. 40 % w/v ammonium persulphate (PER):
Rozpusťte 800 mg PER vo vode a pridajte vodu do 2 ml
Poznámka: Vždy používajte čerstvo pripravený PER roztok.
- 4.2. **Kontaktná kvapalina**
Kerozín alebo kvapalný parafín
- 4.3. **Anódový roztok**
Vo vode rozpusťte 5,77 g kyseliny fosforečnej (85 % w/w) a pridajte vodu do 100 ml.
- 4.4. **Katódový roztok**
Vo vode rozpusťte 2 g hydroxidu sodného a pridajte vodu do 100 ml.

Príprava vzorky
- 4.5. **Reagenty na izoláciu proteínu**
- 4.5.1. Rozpusťte kyselinu octovú (25,0 ml ľadovej kyseliny octovej doplňte vodou do 100 ml.)
- 4.5.2. Dichlórometán
- 4.5.3. Acetón
- 4.6. **Ustálený roztok rozpúšťajúci proteíny**
Rozpusťte
5,75 g glycerolu (87 % w/w)
24,03 g močoviny
250 mg dithiothreitolu vo vode a doplňte do 50 ml.
Poznámka: Skladujte v chladničke, maximálna trvanlivosť je jeden týždeň.
- 4.7. **Reagenty pre plazmínové oddelenie kazeínov**
- 4.7.1. Ustálený roztok uhličitanu amónneho
Titrujte roztok 0,2 mol/l hydrogénuhličitanu amónneho (1,58 g/100 ml vody) obsahujúci 0,05 mol/l kyseliny tetraetyléndiaminoctovej (EDTA, 1,46 g/100 ml) s 0,2 mol/l roztokom uhličitanu amónneho (1,92 g/100 ml vody) obsahujúcim 0,05 mol/l EDTA na pH 8.
- 4.7.2. Hovädzí plazmín (EC.3.4.21.7), aktivita minimálne 5 U/ml.
- 4.7.3. Roztok kyseliny epsilon-aminokapronovej na inhibíciu enzýmov.
Rozpusťte 2,624 g kyseliny epsilon-aminokapronovej (kyselina 6-amino-n-hexánová) v 100 ml 40 % (v/v) etanolu.

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

4.8. Štandardné roztoky

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

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

Odstredené mlieko sa pripraví odstredením buď byvolieho, alebo kravského surového mlieka pri parametroch 37 °C, 2 500 g, 20 minút. Po rýchlom ochladení skúmavky a jej obsahu na 6 až 8 °C sa úplne odstráni horná vrstva tuku. Na prípravu 1 % štandardného roztoku pridajte do 495 ml byvolieho odstredeného mlieka 5,00 ml kravského odstredeného mlieka v 1 l vaničke, pridaním roztoku kyseliny mliečnej (10 % w/v) upravte pH na 6,4. Upravte teplotu na 35 °C a pridajte 100 µl telacieho syridla (aktivita syridla 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), miešajte 1 minútu a nádobu zakrytú hliníkovou fóliou nechajte stáť 1 hodinu pri teplote 35 °C, aby sa vytvoril cmár. Po vytvorení cmáru celé syridlom upravené mlieko vysušte mrazom bez predošlej homogenizácie alebo zliatia srvátky. Po sušení je roztok vhodný na vytvorenie homogénneho prášku. Na prípravu 0 % štandardného roztoku uskutočnite rovnaký postup s použitím pravého byvolieho odstredeného mlieka. Štandardné roztoky sa musia skladovať pri teplote – 20 °C.

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

Reagenty na farbenie proteínov**4.9. Ustalovač**

Vo vode rozpustíte 150 g kyseliny trichlórooctovej a doplňte na 1 000 ml.

4.10. Roztok na odfarbovanie

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

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

4.11. Roztoky na farbenie**4.11.1. Roztok na farbenie (zásobný roztok 1)**

Rozpusťte 3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) v 1 000 ml 90 % (v/v) metanolu použitím mechanického miešača (približne 45 minút), prefiltrujte cez dva strednorýchlostné zložené filtre.

4.11.2. Roztok na farbenie (zásobný roztok 2)

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

4.11.3. Roztok na farbenie (pracovný roztok)

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

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

5. Vybavenie

- 5.1. Sklenené doštičky (265 × 125 × 4 mm); gumený valček (šírka 15 cm); vyrovnávací tabuľka
- 5.2. Fólia na gél (265 × 125 mm)
- 5.3. Krycia fólia (280 × 125 mm). Na oba dlhé konce upevnite pás lepiacej pásky (280 × 6 × 0,25 mm) (pozri obrázok 1)
- 5.4. Elektrozameriavacia komora s chladiacou doskou (napr. 265 × 125 mm) a vhodným zdrojom energie (≥ 2,5 kV) alebo automatické elektroforézne zariadenie
- 5.5. Cirkulačný kryostat s termostatickou kontrolou na 12 ± 0,5 °C
- 5.6. Odstredivka nastaviteľná na 3 000 g
- 5.7. Elektródy (≥ 265 mm dlhé)

- 5.8. Plastické ponorné fľaše na anódový a katódový roztok
- 5.9. Aplikátory vzoriek (10 × 5 mm, viskóзовý papier alebo papier s nízkou absorpciou proteínov)
- 5.10. Nožnice, skalpely a pinzety z nerezovej ocele
- 5.11. Misky zo skla alebo nerezovej ocele na farbenie a odfarbovanie (napr. 280 × 150 mm podnosy na nástroje)
- 5.12. Nastaviteľný tyčový homogenizér (priemer hriadeľa 10 mm), rozsah rpm 8 000 až 20 000
- 5.13. Magnetický miešač
- 5.14. Ultrazvukový kúpeľ
- 5.15. Zváračka filmu
- 5.16. 25 µl mikropipety
- 5.17. Vákuový koncentrátor alebo mrazový sušič
- 5.18. Termostaticky kontrolovaný vodný kúpeľ, nastaviteľný na 35 a 40 ± 1 °C, s možnosťou pretrepiania
- 5.19. Denzitometer na hodnoty $\lambda = 634 \text{ nm}$

6. Postup

6.1. Príprava vzorky

6.1.1. Izolácia kazeínov

Odvážte 5 g suchého syra alebo referenčných roztokov do 100 ml odstredovacej skúmavky, pridajte 60 ml destilovanej vody a homogenizujte tyčovým homogenizérom (8 000 až 10 000 rpm). Hodnotu pH upravte na 4,6 rozpustenou kyselinou octovou (4.5.1.) a odstredte (5 minút, 3 000 g). Zlejte tuk a srvátku, rezíduum homogenizujte pri 20 000 rpm v 40 ml destilovanej vody s pH upraveným na 4,5 rozpustenou kyselinou octovou (4.5.1.), pridajte 20 ml dichlórometánu (4.5.2.), opäť homogenizujte a odstredte (5 minút, 3 000 g). Stierkou odstráňte vrstvu kazeínu, ktorá sa nachádza medzi vodnou a organickou vrstvou (pozri obrázok 2) a zlejte obe vrstvy. Kazeín rehomogenizujte v 40 ml destilovanej vody (pozri vyššie) a 20 ml dichlórometánu (4.5.2.) a odstredte. Tento postup opakujte, pokiaľ nebudú obe extrakčné vrstvy bezfarebné (dva až trikrát). Proteínové rezíduum homogenizujte s 50 ml acetónu (4.5.3.) a prefiltrujte cez strednorýchlostný zložený filtračný papier. Rezíduum z filtra zmyte dvoma osobitnými 25 ml dávkami acetónu a nechajte vyschnúť na vzduchu alebo prúdom dusíka a potom ho rozdrvte na jemný prášok v mažiari.

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

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

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

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

6.2. Príprava močoviny obsahujúcej polyakrylamidové gély

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

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

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

6.3. Izoelektrické zameriavanie

Chladiaci termostat nastavte na 12 °C. Opačnú stranu fólie na gél očistite kerozínom, potom kvapnite niekoľko kvapiek kerozínu (4.2.) do stredu chladiaceho bloku. Potom naň položte gélový sendvič, vyhnite sa pritom tvorbe bubliniek. Prebytočný kerozín odstráňte a odložte kryciu fóliu. Elektroódové pásy ponorte do elektroódových roztokov (4.3., 4.4.), odrežte na dĺžku gélu a umiestnite na dané miesta (vzdialenosť elektród – 9,5 cm).

Podmienky izoelektrického zameriavania:

6.3.1. Rozmery gélu 265 × 125 × 0,25 mm

Krok	Čas (min.)	Voltáž (V)	Prúd (mA)	Výkon (W)	Volthodiny (Vh)
1. predzameriavanie	30	maximálne 2 500	maximálne 15	konštantne 4	c. 300
2. zameriavanie vzorky ⁽¹⁾	60	maximálne 2 500	maximálne 15	konštantne 4	c. 1 000
3. konečné zameriavanie	60	maximálne 2 500	maximálne 5	maximálne 20	c. 3 000
	40	maximálne 2 500	maximálne 6	maximálne 20	c. 3 000
	30	maximálne 2 500	maximálne 7	maximálne 25	c. 3 000

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

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

6.3.2. Príklad nastavenia pre automatické elektroforézne zariadenie (2 gély, 5,0 × 4,5 cm), elektródy bez pásov sa aplikujú priamo na gél.

Krok	Voltáž	Prúd	Výkon	Teplota	Volthodiny
1. predzameriavanie	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. zameriavanie vzorky	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. zameriavenie	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. zameriavanie	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Aplikátor vzorky vložte pri kroku 2 pri 0 Vh.

Aplikátor vzorky odložte pri kroku 2 pri 30 Vh.

6.4. Farbenie proteínov

6.4.1. Ustálenie proteínov

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

6.4.2. Umývanie a farbenie gélovej doštičky

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

6.4.3. Odfarbenie gélovej doštičky

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

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

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

7. Hodnotenie

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

7.1. Vizuálny odhad

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

7.2. Denzitometrický odhad

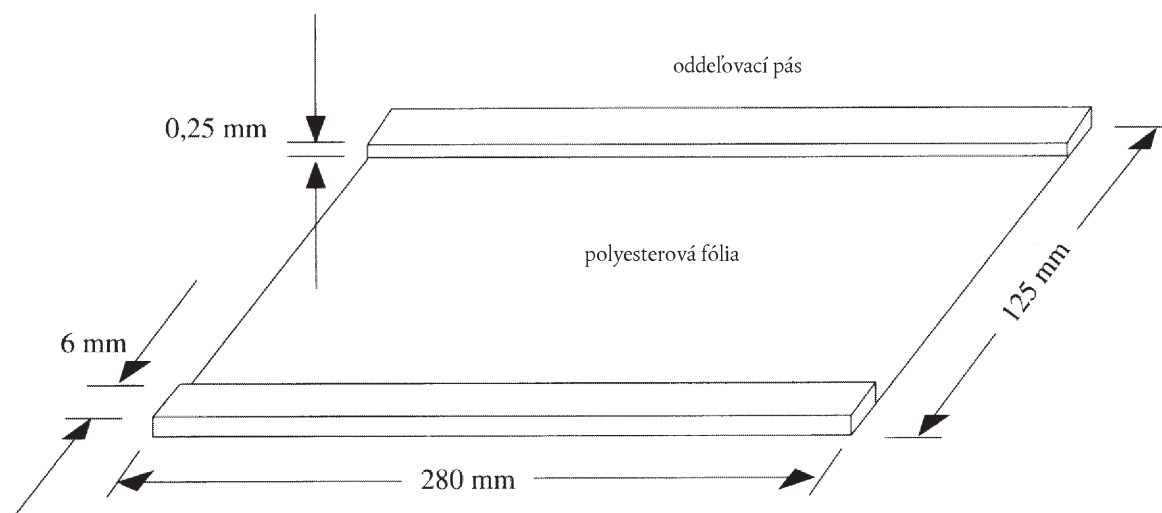
Ak je to možné, na stanovenie pomeru plochy vrcholu kravských k ovčím, kozím a/alebo byvolím γ_3 a γ_2 -kazeínom použite denzitometriu (5.19.) (pozri obrázok 5). Túto hodnotu porovnajte s pomerom plochy vrcholu γ_3 a γ_2 -kazeínov 1 % referenčného štandardného roztoku (ovčie, kozie) alebo dočasného laboratórneho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

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

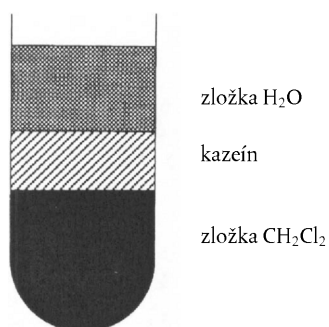
Vzorka sa hodnotí ako pozitívna, ak sa oba kravské γ_3 a γ_2 -kazeíny alebo zodpovedajúce pomery plochy vrcholu rovnajú alebo sú väčšie ako úroveň 1 % referenčného štandardného roztoku.

8. Zdroje

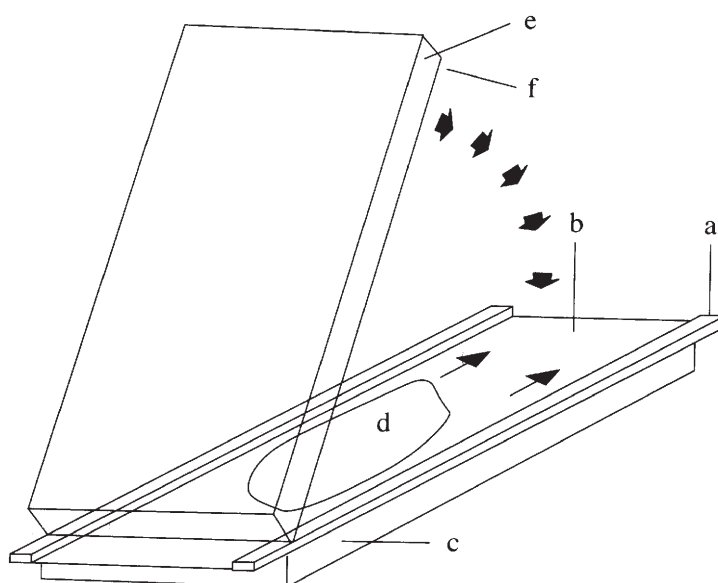
1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: *Použitie plazmínu na zvýšenie citlivosti zisťovania kravského mlieka v ovčom a/alebo kozom syre gélovým izoelektrickým zameriavaním γ_2 -kazeínov*. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: *Kontrolná metóda na zisťovanie kravského mlieka v ovčom a byvolom syre použitím imunoblotácie*. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: *Citlivé zisťovanie kravského mlieka v ovčom a kozom mlieku a syre nosičom amfolytu – a nosičom amfolytu/imobilizovaným pH spádom – izoelektrické zameriavanie γ -kazeínov použitím plazmínu ako signálneho zosilňovača*. In: *Electrophoresis-Forum* 89 (B.J. Radola, ed.) s. 389-393., Bode Verlag, Mnichov (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: *Zisťovanie kravského mlieka v ovčom a kozom mlieku alebo syre použitím izoelektrického zameriavania polyakrylamidových gélov s obsahom močoviny*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B. J.: *Izoelektrické zameriavanie na veľmi tenkých vrstvách 50-100 μ m polyakrylamidových gélov na silanizovanom skle alebo polyesterových filmoch*. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).



Obrázok 1: Schematický náčrt krycej fólie

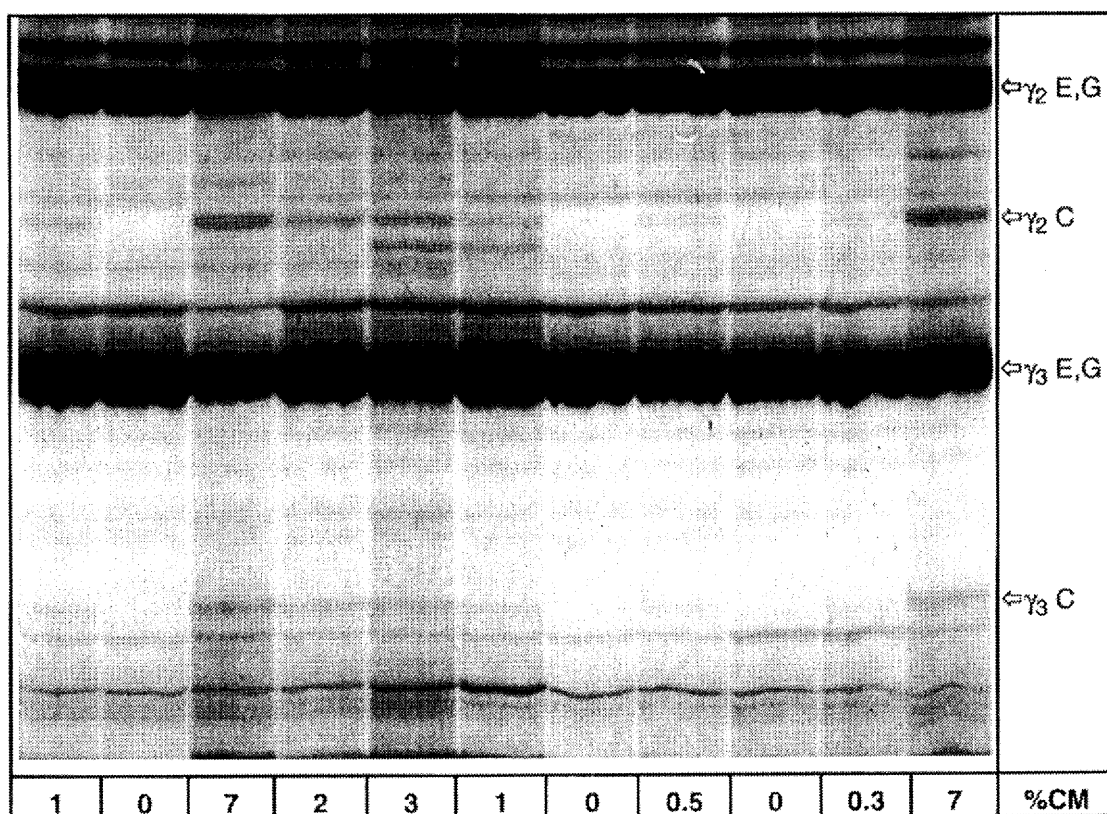


Obrázok 2: Kazeínová vrstva medzi vodnou a organickou vrstvou po odstredovaní



Obrázok 3: Postup vytvorenia veľmi tenkých polyakrilamidových gélov

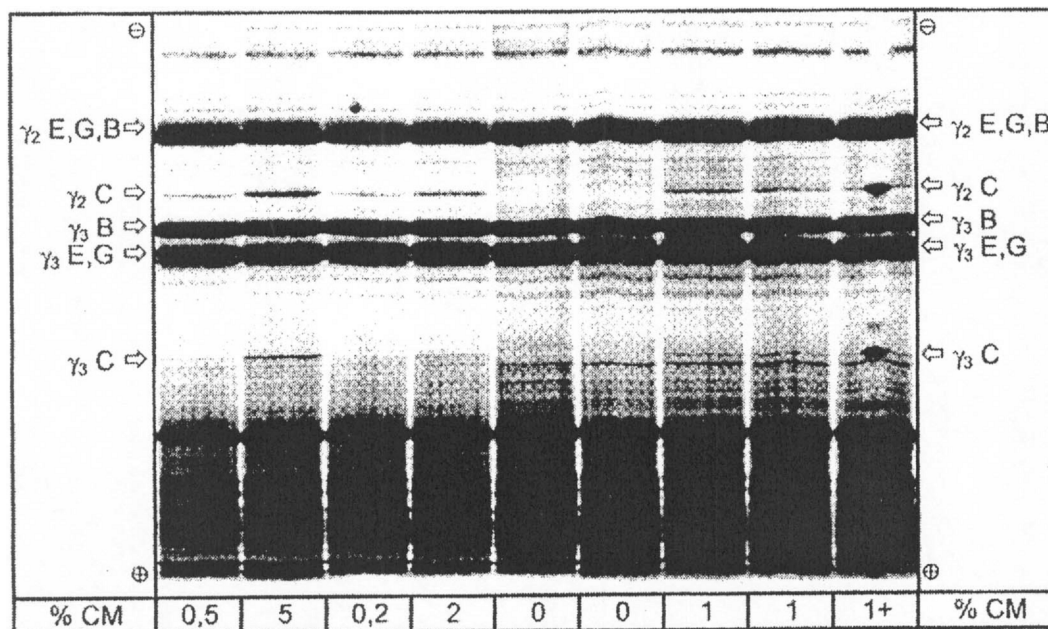
a = oddeľovací pás (0,25 mm); b = krycia fólia (5.3.); c, e = sklenené dosťičky (5.1.); d = gélový roztok (4.1.2.); f = fólia na gél (5.2.)



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

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

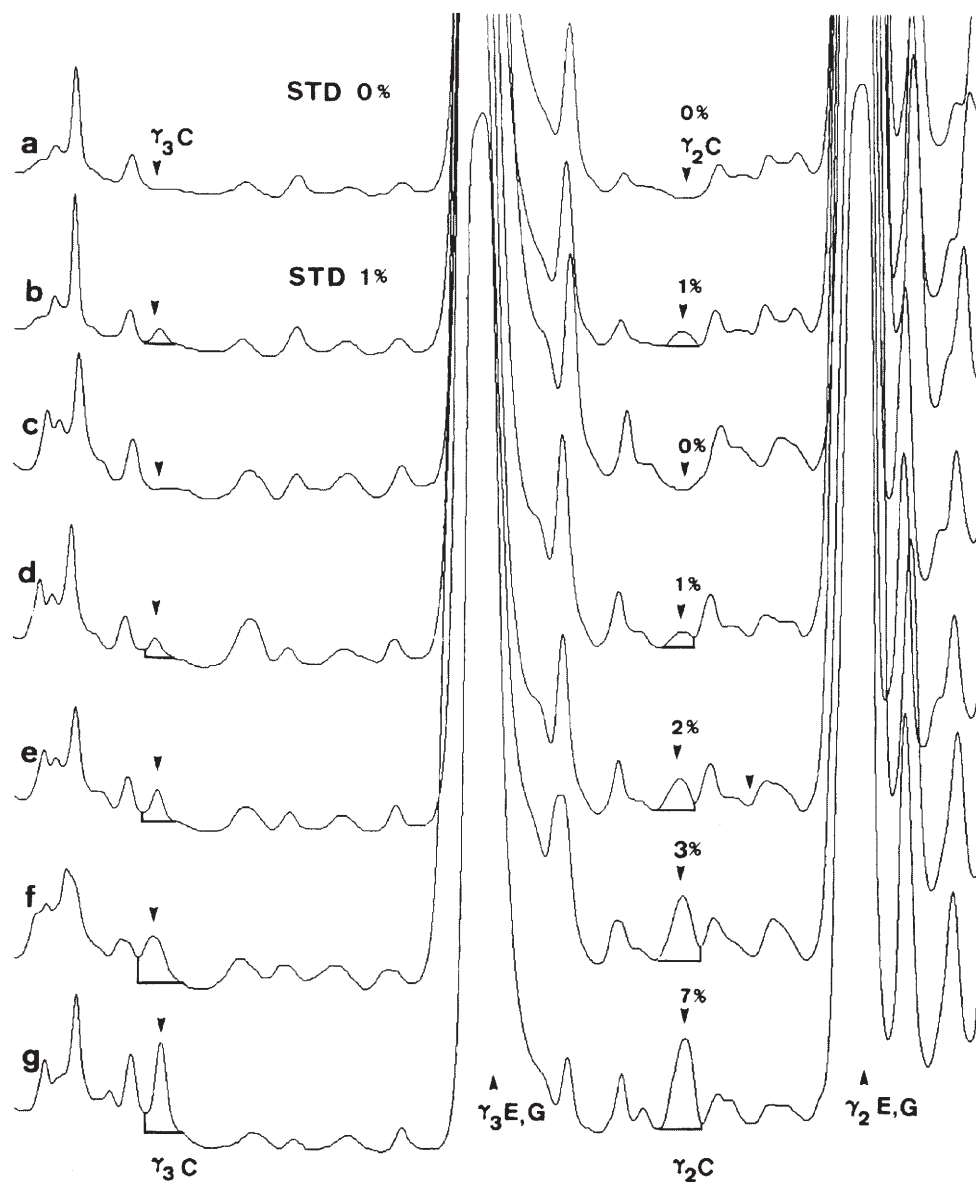
znázornená je horná časť izoelektricky zameraného gélu



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

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

Znázornená je celková separačná vzdialenosť izoelektricky zameraného gélu.



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

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

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

PRÍLOHA XVI

(Článok 11)

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

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

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

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

- 1) Príprava vzorky je podľa normy IDF 122B:1992. Pre kyslý kazeín sa môže tiež použiť postup prípravy vzorky popísaný v norme IDF 73A:1985.
- 2) Inkubujú a hodnotia sa len skúmavky so zaočkovanými vzorkami s hmotnosťou 1 g (maslo) alebo 0,1 g (odstredené mlieko v prášku, kazeín/kazeináty). Nerobia sa žiadne iné roztoky.

Hodnotenie výsledkov

Tri negatívne výsledky:	Poiadavka splnená
Dva alebo tri pozitívne výsledky:	Poiadavka nesplnená
Dva negatívne výsledky:	Analyzujú sa dve ďalšie vzorky s hmotnosťou 1 g (maslo) alebo 0,1 g (odstredené mlieko v prášku, kazeín/kazeináty).

Poznámka

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

Výsledky naznačujúce splnenie požiadavky sa získavajú s pravdepodobnosťou 93 %.

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

Výsledky naznačujúce splnenie požiadavky sa získavajú s pravdepodobnosťou 91 %.

(Predpoklad: Poissonova distribúcia)

PRÍLOHA XVII

(Článok 12)

METÓDA STANOVENIA OBSAHU LAKTÓZY VO VÝROBKOCH SPADAJÚCICH POD KÓD KN 2309 ⁽¹⁾

ČASŤ I

1. Oblasť aplikácie

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

2. Princíp

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

3. Reagenty

Tiosulfát sodný 0,1N

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

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

Roztok kyseliny sírovej 6 N

Luff-Schoorlov reagent:

- a) v 100 ml vody rozpusťte 25 g bezželezitého pentahydrátu sulfátu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- b) v 50 ml vody rozpusťte 50 g monohydrátu kyseliny citrónovej ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$);
- c) v približne 300 horúcej vody rozpusťte 143,8 g anhydrického uhličitanu sodného (Na_2CO_3) a nechajte vychladnúť.

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

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

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

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

4. Postup

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

Pridajte 5 ml kvasinkovej suspenzie ⁽²⁾ a pretrepte. Kalibrovanú banku a jej obsah nechajte vo vodnom kúpeli pri teplote 38 až 40 °C po dobu dvoch hodín.

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

Uskutočnite aj slepý test len s kvasinkami.

⁽¹⁾ Nariadenie (EHS) č. 222/88.

⁽²⁾ Pre produkty obsahujúce viac ako 40 % fermentovateľného cukru pridajte väčšie množstvo suspenzie.

ČASŤ II

1. Stanovenie obsahu laktózy Luff-Schoorlovou metódou

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

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

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

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

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

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

Tabuľka

Tabuľka pre 25 ml Luff-Schoorlovho reagentu

(pozri podmienky uvedené v texte)

1. Tiosulfát sodný 0,1 N

2. Laktóza $C_{12}H_{22}O_{11}$

1	2		1	2	
ml	mg	rozdiel	ml	mg	rozdiel
1	3,6	3,7	12	44,6	3,8
2	7,3	3,7	13	48,4	3,8
3	11,0	3,7	14	52,2	3,8
4	14,7	3,7	15	56,0	3,9
5	18,4	3,7	16	59,9	3,9
6	22,1	3,7	17	63,8	3,9
7	25,8	3,7	18	67,7	4,0
8	29,5	3,7	19	71,7	4,0
9	33,2	3,8	20	75,7	4,1
10	37,0	3,8	21	79,8	4,1
11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
			23	88,0	

PRÍLOHA XVIII

(Článok 13)

ZISŤOVANIE PRÍTOMNOSTI SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V ODSŤREDENOM MLEKU V PRÁŠKU URČENOM NA VEREJNÉ SKLADOVANIE STANOVENÍM GLYKOMAKROPEPTIDOV VYSOKOVÝKONNOU KVAPALNOU CHROMATOGRAFIU (HPLC)**1. Rozsah a oblasť aplikácie**

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

2. Zdroj

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

3. Definícia

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

4. Princíp

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

5. Reagenty

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

5.1. Roztok kyseliny trichloroctovej

Vo vode rozpustíte 240 g kyseliny trichloroctovej(Cl_3COOH) a doplníte do 1 000 ml.

5.2. Eluačný roztok, pH 6,0

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

Doplňte vodou do 1 000 ml a homogenizujte.

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

5.3. Vyplachovacie rozpúšťadlo

Jeden diel acetonitrilu (CH_3CN) zmiešajte s deviatimi dielmi vody. Zmes pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s priemerom pórov 0,45 μm .

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

5.4. Štandardné vzorky**5.4.1. Odstredené mlieko v prášku vyhovujúce požiadavkám tohto nariadenia (t. j. [0]).****5.4.2. To isté odstredené mlieko v prášku upravené 5 % (m/m) srvátkou v prášku syridlového typu štandardného zloženia (t. j. [5]).**

6. Prístroje

- 6.1. Analytická váha
- 6.2. Odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2 200 g, vybavená uzavierateľnými odstredovacími skúmavkami s objemom približne 25 ml.
- 6.3. Mechanický pretrepávač.
- 6.4. Magnetický miešač.
- 6.5. Sklenené lieviky s priemerom približne 7 cm.
- 6.6. Filtračné papiere so strednou filtráciou, s priemerom približne 12,5 cm.
- 6.7. Sklenené zariadenie na filtráciu s membránovým filtrom s priemerom pórov 0,45µm.
- 6.8. Pipety s odmerkou umožňujúca prenos 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A, alebo ISO/R 835).
- 6.9. Termostatický vodný kúpeľ nastavený na $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. Zariadenie na HPLC pozostávajúce z:
 - 6.10.1. Čerpadla
 - 6.10.2. Injektora automatického alebo manuálneho s kapacitou 15 až 30µl
 - 6.10.3. Dvoch valcov TSK 2 000-SW v sérii (dĺžka 30 cm, vnútorný priemer 0,75 cm) alebo ekvivalentných valcov a predvalca (3 cm x 0,3 cm) zabalených s I 125 alebo materiálom s ekvivalentnou efektívnosťou
 - 6.10.4. Termostatickej stĺpovej pece nastavenej na 35 ± 1 °C
 - 6.10.5. UV detektora s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou, umožňujúceho merania pri 205 nm s citlivosťou 0,008 A
 - 6.10.6. Integrátora umožňujúceho integráciu medzi spodnými krivkami

Poznámka: Práca s valcami skladovanými pri izbovej teplote je možná, avšak ich rozlišovacia schopnosť je tak nižšia. V takom prípade by sa teplota mala pohybovať o menej ako ± 5 °C v každom z rozpätí analýzy.

7. Odber vzoriek

- 7.1. Medzinárodná norma ISO 707 – Mlieko a mliečne výrobky – metódy odberu vzoriek, v súlade s pokynmi uvedenými v poslednom odseku prílohy I ods. 2 písm. c).
- 7.2. Vzorky uschovajte v podmienkach zabráňujúcich ich znehodnoteniu alebo zmene zloženia.

8. Postup**8.1. Príprava testovacej vzorky**

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

8.2. Testovacia vzorka

Odvážte $2,000 \pm 0,001$ g testovacej vzorky do odstredovacej skúmavky (6.2.).

8.3. Odstránenie tukov a proteínov

- 8.3.1. Do dávky testovacej vzorky pridajte 20 g teplej vody (50 °C). Prášok rozpustíte pretrepaním po dobu piatich minút použitím mechanického pretrepávača (6.3.). Skúmavku ochlaďte na 25 °C.
- 8.3.2. Po dvoch minútach pridajte 10,0 ml roztoku kyseliny trichloroctovej za súčasného miešania magnetickým miešačom (6.4.). Skúmavku umiestnite do vodného kúpeľa (6.9.) a ponechajte na 60 minút.
- 8.3.3. Odstredte (6.2.) po dobu 10 minút pri 2 200 g, alebo prefiltrujte cez papier (6.6.) a odstráňte prvých 5 ml filtrátu.

8.4. Chromatografické testovanie

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

Poznámky:

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

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

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

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

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

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

Kvalita valcov môže pri jednotlivých vrcholoch ovplyvniť čas viazania.

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

A_{II}: plocha vrcholu II,

A_{III}: plocha vrcholu III,

A_{IV}: plocha vrcholu IV.

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

V prípade pochybností analýzu zopakujte.

8.5. Kalibrácia

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

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

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

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

9. Výpočet výsledkov

9.1. Metóda výpočtu a vzorce

- 9.1.1. Výpočet reakčných faktorov R:

$$\text{Vrchol II:} \quad R_{II} = \frac{100}{A_{II}[0]}$$

$$\text{Vrchol IV:} \quad R_{IV} = \frac{100}{A_{IV}[0]}$$

pričom:

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

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

$$\text{Vrchol III:} \quad R_{III} = \frac{W}{A_{III}[5] - A_{III}[0]}$$

pričom

R_{III} = reakčný faktor vrcholu III

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

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

9.1.2. Výpočet relatívnej plochy vrcholov vo vzorke (E)

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

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

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

pričom:

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

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

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

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

$$RRT_{III}[E] = \frac{RT_{III}[E]}{RT_{III}[5]}$$

pričom:

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

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

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

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

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

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

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

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

9.2. Výpočet percenta syridlovej srvátky v prášku vo vzorke:

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

pričom:

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

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

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

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

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

9.3. Presnosť postupu

9.3.1. Opakovateľnosť

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

9.3.2. Reprodukovateľnosť

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

9.4. Interpretácia

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

pričom

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

$(S_{III}[0] - 0,9)$ = je korekcia, ktorú je treba urobiť, ak plocha $S_{III}[0]$ je odlišná od 0,9 (pozri bod 9.2).

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

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

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

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

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

Rovnice pre prerušovanú čiaru v grafoch 1 a 2 sú:

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

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

pričom:

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

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

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

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

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

$$T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

$$T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

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

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

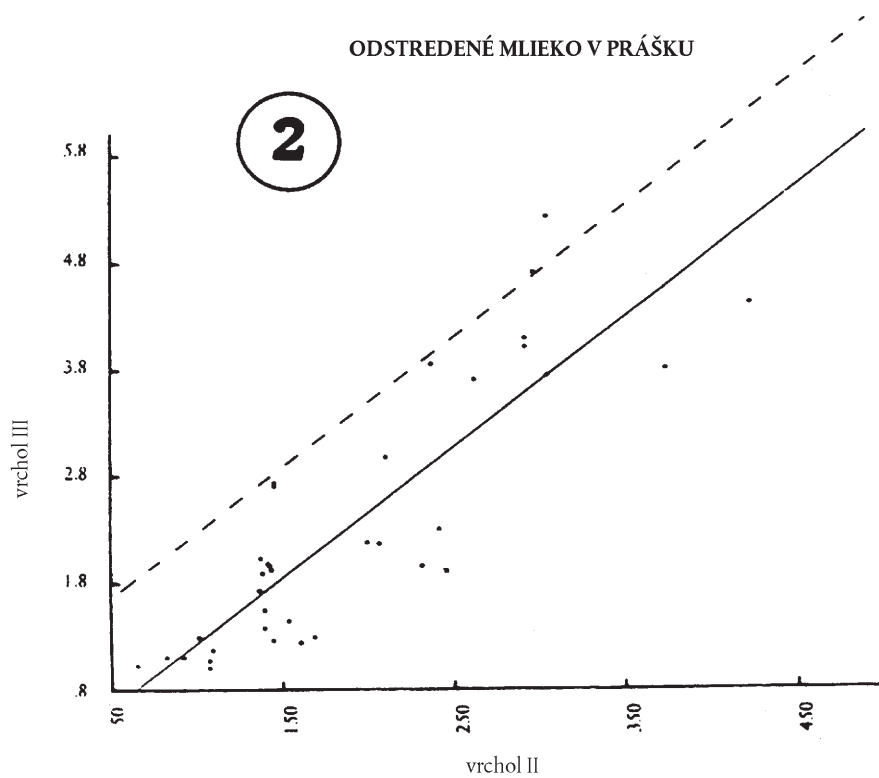
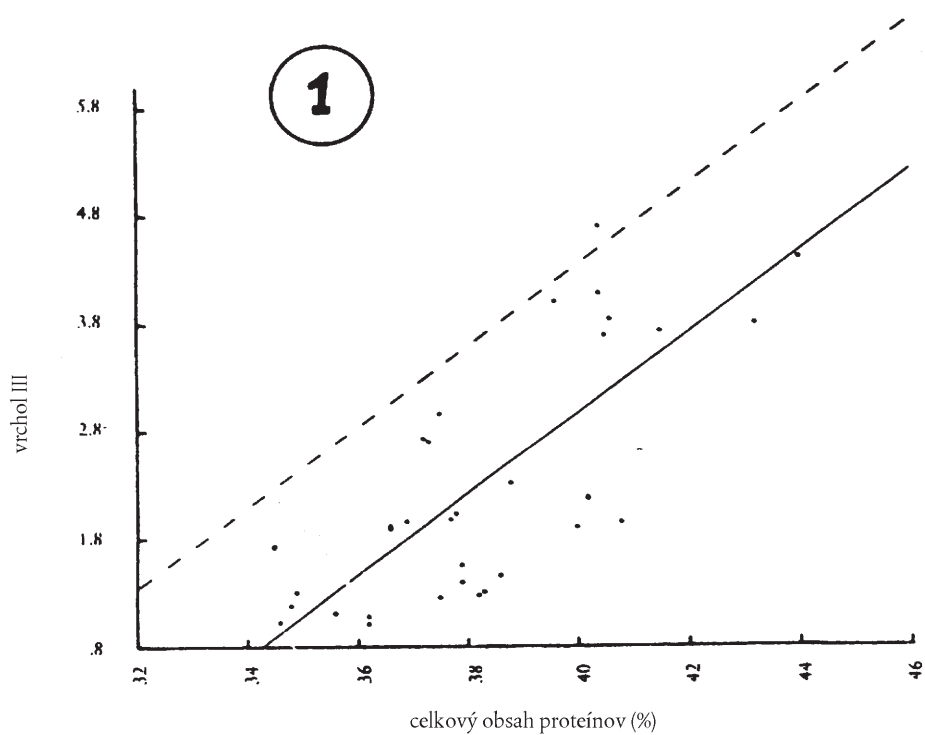
Obsah syridlovej srvátky sa počíta podľa nasledovného vzorca:

$$W = T_2 + 0,91$$

pričom

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

ODSTREDENÉ MLIEKO V PRÁŠKU



PRÍLOHA XIX

(Článok 13)

STANOVENIE OBSAHU PEVNEJ SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V ODSSTREDENOM MLIEKU V PRÁŠKU A ZMESIACH UVEDENÝCH V NARIADENÍ (ES) č. 2799/1999**1. Účel: zistenie prídania pevnej syridlovej srvátky do:**

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

2. Zdroj: Medzinárodná norma ISO 707**3. Definícia**

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

4. Princíp

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

5. Reagenty

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

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

Reagenty pre reverznú fázou HPLC.

5.1. Roztok kyseliny trichloroctovej

Vo vode rozpustíte 240 g kyseliny trichloroctovej (CCl_3COOH) a doplníte do 1 000 ml.

5.2. Eluenty A a B

Eluent A: do 1 000 ml banky dajte 150 ml acetonitrilu (CH_3CN), 20 ml izopropanolu ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) a 1,00 ml kyseliny trifluóroctovej (TFA, CF_3COOH). Doplníte vodou do 1 000 ml. Eluent B: do 1 000 ml banky dajte 550 ml acetonitrilu (CH_3CN), 20 ml izopropanolu a 1,00 ml TFA. Doplníte vodou do 1 000 ml. Roztok pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s pórmí s priemerom 0,45 μm .

5.3. Konzervácia valca

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

5.4. Štandardné vzorky

- 5.4.1. Odstredené mlieko v prášku spĺňajúce požiadavky na verejné skladovanie [t. j. (0)].
- 5.4.2. To isté odstredené mlieko v prášku upravené 5 % (m/m) srvátkou syridlového typu v prášku štandardného zloženia [t. j. (5)].
- 5.4.3. To isté odstredené mlieko v prášku upravené 50 % (m/m) srvátkou syridlového typu v prášku štandardného zloženia [t. j. (50)]⁽¹⁾.

6. Prístroje

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

6.1. 6.1.1. Analytická váha

- 6.2. Odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2 200 g, vybavená uzavierateľnými odstredovacími skúmavkami s objemom približne 50 ml

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

- 6.3. Mechanický pretrepávač fungujúci pri 50 °C
- 6.4. Magnetický miešač
- 6.5. Sklenené lieviky s priemerom približne 7 cm
- 6.6. Filtračné papiere so strednou filtráciou, s priemerom približne 12,5 cm
- 6.7. Sklenené zariadenie na filtráciu s membránovým filtrom s priemerom pórov 0,45 µm
- 6.8. Pipety s odmerkou umožňujúce prenos 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A, alebo ISO/R 835), alebo systém schopný prenosu 10 ml kvapaliny do dvoch minút
- 6.9. Termostatický vodný kúpeľ nastavený na $25 \pm 0,5$ °C
- 6.10. Zariadenie na HPLC pozostávajúce z:
 - 6.10.1. 6.10.1. Dvojitého spádového čerpaceho systému
 - 6.10.2. 6.10.2. Injektora automatického alebo manuálneho s kapacitou 100 µl
 - 6.10.3. 6.10.3. Valca Dupont Protein Plus (dĺžka 25 cm, vnútorný priemer 0,46 cm) alebo ekvivalentného valca založeného na pemze s veľkými pórmí pre reverznú fázu
 - 6.10.4. 6.10.4. Termostatickej stĺpovej pece nastavenej na 35 ± 1 °C
 - 6.10.5. 6.10.5. UV detektora s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou, umožňujúceho merania pri 210 nm (v prípade potreby sa môže použiť vyššia vlnová dĺžka do 220 nm) s citlivosťou 0,02 Å.
 - 6.10.6. 6.10.6. Integrátora umožňujúceho integráciu medzi spodnými krivkami.

Poznámka

Práca s valcom pri izbovej teplote je možná za predpokladu teplotných výkyvov menej ako ± 1 °C, v opačnom prípade dochádza k príliš veľkým variáciám času viazania GMPÅ.

7. Odber vzorky

- 7.1. Vzorky sa musia odoberať v súlade s postupom stanoveným v medzinárodnej norme ISO 707. Členské štáty však môžu použiť aj inú metódu odberu vzoriek za predpokladu, že táto je v zhode s princípmi vyššie vedenej normy.
- 7.2. Vzorka skladujte v podmienkach vylučujúcich znehodnotenie alebo zmenu zloženia.

8. Postup

8.1. Príprava vzorky

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

8.2. Testovacia vzorka

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

8.3. Odstránenie tukov a proteínov

- 8.3.1. Do dávky testovacej vzorky pridajte 20 g teplej vody (50 °C). Prášok rozpustíte pretrepaním mechanickým pretrepávačom po dobu piatich minút alebo po dobu 30 minút v prípade kyslého cmaru (6.3.). Skúmavku vložte do vodného kúpeľa (6.9.) a nechajte vyrovnať na 25 °C.
- 8.3.2. Dve minúty sústavne pridávajte 10 ml roztoku kyseliny trichloroctovej (5.1.) za súčasného intenzívneho miešania magnetickým miešačom (6.4.). Skúmavku umiestnite do vodného kúpeľa (6.9.) a odložte na 60 minút.
- 8.3.3. Odstredte (6.2.) po dobu 10 minút pri 2,200 g, alebo prefiltrujte cez papier (6.6.) a odstráňte prvých 5 ml filtrátu.

8.4. Chromatografické testovanie

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

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

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

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

Tabuľka 1

Podmienky predbežného spádu pre optimalizáciu chromatografie

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

Porovnanie dvoch chromatogramov by malo odhaliť miesto vrcholu GMPA.

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

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

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

pričom:

RT_{GMPA} : čas viazania GMP_A v predbežnom spáde

10: počiatočné % B predbežného spádu

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

13,5: stredný čas predbežného spádu

26: požadovaný čas viazania GMPA

6: pomer sklonov predbežného a normálneho spádu

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

27: čas predbežného spádu

- 8.4.3. Vezmite roztoky testovacích vzoriek

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

Zloženie eluentu na začiatku analýzy sa získa z bodu 8.4.2. Zvyčajne je okolo A:B = 76:24 (5.2.). Ihneď po injektáži sa začne lineárny spád, ktorý spôsobí o 5 % vyššie percento B po 27 minútach. Následne sa začne lineárny spád, ktorý spôsobí v zložení eluentu zmenu na 90 % B za päť minút. Toto zloženie sa udržiava po dobu piatich minút, kedy sa zloženie zmení prostredníctvom lineárneho spádu po piatich minútach na počiatočné zloženie. V závislosti od vnútorného objemu čerpaceho systému je možné ďalšiu injektáž uskutočniť po 15 minútach od dosiahnutia počiatočných podmienok.

Poznámky

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

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

Integrátor (6.40.6) automaticky vypočíta výšku vrcholu H vrcholu GMP. V každom chromatograme je potrebné skontrolovať umiestnenie základnej čiary. Ak je základná čiara umiestnená nesprávne, analýzu alebo integráciu je potrebné opakovať.

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

8.5. Kalibrácia

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

Poznámka

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

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

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

Chromatogram by nemal ukazovať vrchol v čase viazania vrcholu GMPA.

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

9. Výpočet výsledkov

9.1. Metóda výpočtu a vzorce

9.1.1. Výpočet reakčného faktora R:

vrchol GMP: $R = W/H$

pričom:

R= reakčný faktor vrcholu GMP

H= výška vrcholu GMP

W= množstvo srvátky v štandardnej vzorke (5).

9.2. Výpočet percenta syridlovej srvátky v prášku vo vzorke

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

pričom:

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

R= reakčný faktor vrcholu GMP (9.1.1.)

H(E)= výška vrcholu GMP vzorky (E)

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

9.3. Presnosť postupu

9.3.1. Opakovateľnosť

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

9.3.2. Reprodukovateľnosť

Zatiaľ nebola stanovená.

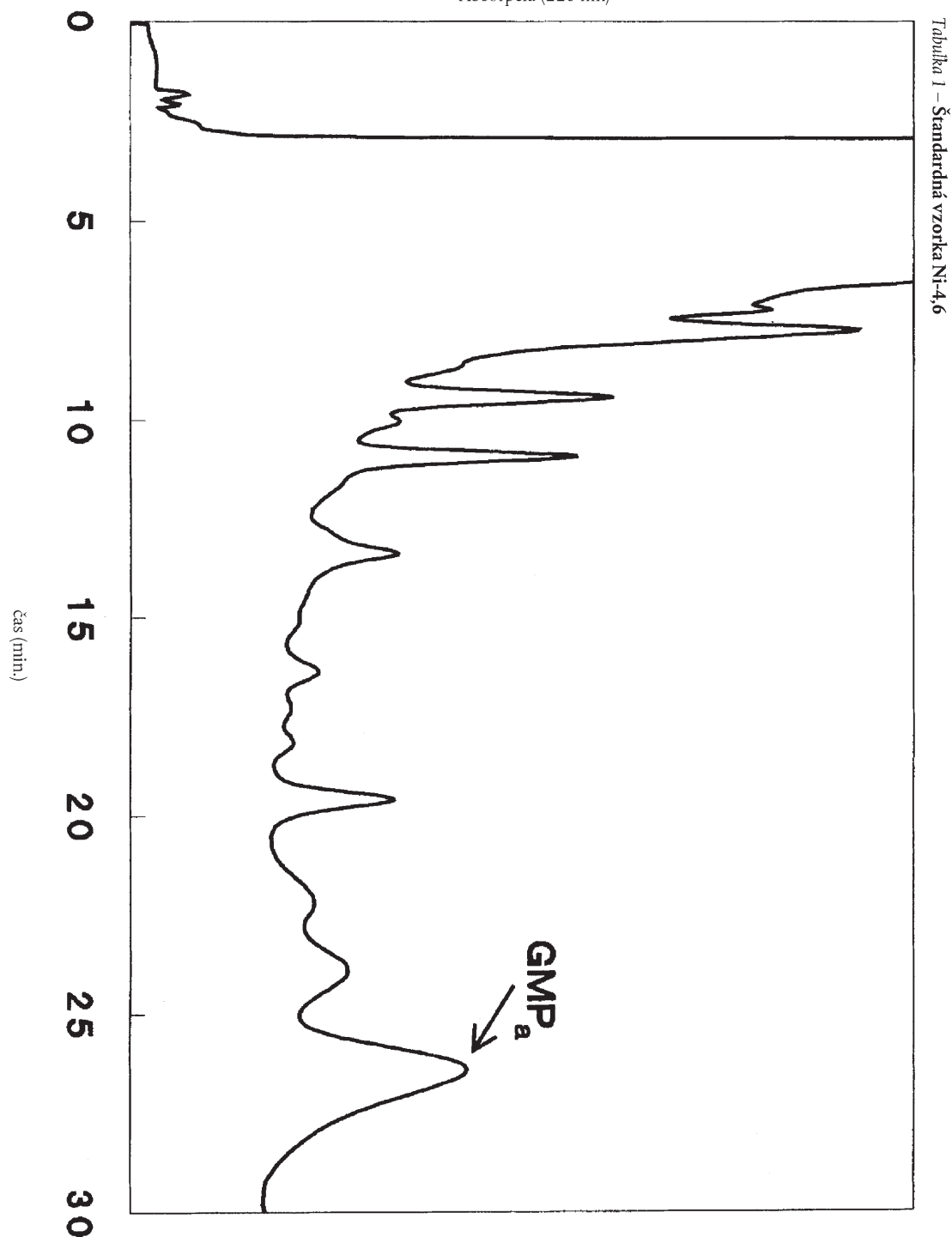
9.3.3. Linearita

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

9.4. Interpretácia

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

Absorpcia (220 nm)



PRÍLOHA XX

(Článok 14)

ODSTREDENÉ MLIEKO V PRÁŠKU: KVANTITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU FOSFATIDYLSEŘÍNU A FOSFATIDYLETANOLAMÍNU**Metóda: HPLC s reverznou fázou****1. Účel a oblasť aplikácie**

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

2. Definícia

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

3. Princíp

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

4. Reagenty

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

4.1. Štandardný materiál: PEDP, najmenej 99 % čistoty

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

4.2. Reagenty pre prípravu štandardnej a testovacej vzorky**4.2.1. Metanol triedy HPLC****4.2.2. Chloroform triedy HPLC****4.2.3. Triptamín-monohydrochlorid****4.3. Reagenty pre derivatizáciu o-ftaldialdehydu****4.3.1. Hydroxid sodný, vodný roztok 12 M****4.3.2. Kyselina bórová, vodný roztok 0,4 M upravený na pH 10 hydroxidom sodným (4.3.1)****4.3.3. 2-merkaptotetanol****4.3.4. o-ftaldialdehyd (OPA)****4.4. Rozpúšťadlá eluentu HPLC**

Eluenty musia byť pripravené použitím reagentov HPLC kvality.

4.4.1. 4.4.1. Voda HPLC kvality**4.4.2. 4.4.2. Metanol fluorometricky testovanej čistoty****4.4.3. 4.4.3. Tetrahydrofurán****4.4.4. 4.4.4. Dihydrogénfosforečnan sodný****4.4.5. 4.4.5. Octan sodný****4.4.6. 4.4.6. Kyselina octová****5. Prístroje****5.1. Analytická váha****5.2. Vaničky s objemom 25 a 100 ml****5.3. Pipety s kapacitou 1 a 10 ml****5.4. Magnetický miešač**

- 5.5. Pipety s odmerkou, s kapacitami 0,2, 0,5 a 5 ml
- 5.6. Banky so objemom 10, 50 a 100 ml
- 5.7. Striekačky, objem 20 a 100 µl
- 5.8. Ultrazvukový kúpeľ
- 5.9. Odstredivka nastaviteľná na 27 000 x g
- 5.10. Sklenené fioly s objemom približne 5 ml
- 5.11. Odmerný valec, objem 25 ml
- 5.12. pH-meter
- 5.13. Vybavenie na HPLC
- 5.13.1. 5.13.1. Spádový čerpací systém nastaviteľný na 1,0 ml/min pri 200 bar
- 5.13.2. 5.13.2. Autosampler s derivatizačnou schopnosťou
- 5.13.3. 5.13.3. Sférový ohrievač nastavený na 30 °C
- 5.13.4. 5.13.4. Detektor fluorescence nastavený na vlnovú dĺžku excitácie 330 nm a vlnovú dĺžku emisie 440 nm
- 5.13.5. 5.13.5. Integrátor alebo program na spracovanie dát umožňujúci meranie plochy vrcholu
- 5.13.6. 5.13.6. A Lichrosphere – 100 valec (250 x 4,6 mm) alebo ekvivalentný valec zabalený s oktaedecilsilánom (C18), veľkosť častí 5 µm

6. Odber vzoriek

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

7. Postup

7.1. Príprava interného štandardného roztoku

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

7.2. Príprava roztoku testovacej vzorky

Do 25 ml vamičky (5.2.) odvážte $1,000 \pm 0,001$ g vzorky SMP. Pri 40 °C pipetou (5.3.) pridajte 10 ml destilovanej vody a premiešajte magnetickým miešačom (5.4.) po dobu 30 minút s cieľom rozpustenia všetkých hrudiek. Do 10 ml banky (5.6.) pipetujte 0,2 ml (5.5.) obnoveného mlieka, použitím striekačky (5.7.) pridajte 100 µl 0,15 mM roztoku triptamínu (7.1.) a doplňte metanolom (4.2.1.). Opatrne premiešajte prevracaním a vložte do ultrazvukového kúpeľa (5.8.) na 15 minút. Odstredte (5.9.) pri 27 000 x g po dobu 10 minút a supernatant zozbierajte do sklenenej fioly (5.10.).

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

7.3. Príprava externej štandardnej vzorky.

Do 50 ml vamičky (5.2.) odvážte 55,4 mg PEDP (4.1.) a použitím odmerného valca (5.11.) pridajte približne 25 ml chloroformu (4.2.2.). Uzavretú banku zohrejte na 50 °C a opatrne premiešajte, pokiaľ sa PEDP nerozpustí. Banku ochlaďte na 20 °C, doplňte metanolom (4.2.1.) a premiešajte prevracaním. Do 100 ml banky (5.6.) pipetujte 1 ml (5.3.) tohto roztoku a doplňte metanolom (4.2.1.). Do 10 ml banky (5.6.) pipetujte 1 ml (5.3.) tohto roztoku, pridajte 100 µl (5.7.) 0,15 mM roztoku triptamínu a doplňte metanolom (4.2.1.). Premiešajte prevracaním.

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

7.4. Príprava derivatizujúceho reagentu

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

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

7.5. Analýza HPLC

7.5.1. Rozpúšťadlá eluentu (4.4)

Rozpúšťadlo A:

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

Rozpúšťadlo B:

metanol

7.5.2. Navrhované hodnoty eluenčného spádu

Čas (min.)	Rozpúšťadlo A (%)	Rozpúšťadlo B (%)	Prietok (ml/min)
počiatočný	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

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

Teplota valca: 30 °C.

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

7.5.4. Vyrovnávanie valca

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

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

7.5.5. Stanovenie obsahu PS + PE v testovacej vzorke

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

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

7.6. Stav integrácie

7.6.1. Vrchol PEDP

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

7.6.2. Vrchol tryptamínu

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

7.6.3. Skupiny vrcholov PS a PE

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

8. Výpočet a vyjadrenie výsledkov

Obsah PS a PE v testovacej vzorke sa vypočíta nasledovne

$$C = 55,36 \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{T_1}{T_2}$$

pričom:

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

A₁ = plocha vrcholu PEDP roztoku štandardnej vzorky (7.3.)

A₂ = plocha vrcholu PS alebo PE roztoku testovacej vzorky (7.2.)

T₁ = plocha vrcholu tryptamínu roztoku štandardnej vzorky (7.3.)

T₂ = plocha vrcholu tryptamínu roztoku testovacej vzorky (7.2.)

9. Presnosť

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

9.1. Opakovateľnosť

Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti, ktorá vyjadruje variabilitu nezávislých výsledkov analýz získaných rovnakým analytikom pri použití rovnakých prístrojov v rovnakých podmienkach a na rovnakom testovacom materiáli za krátky časový interval, nesmie presiahnuť 2 %. Ak sa dva výsledky získajú za týchto podmienok, relatívna odchýlka medzi týmito dvoma výsledkami nesmie byť väčšia ako 6 % aritmetického priemeru výsledkov.

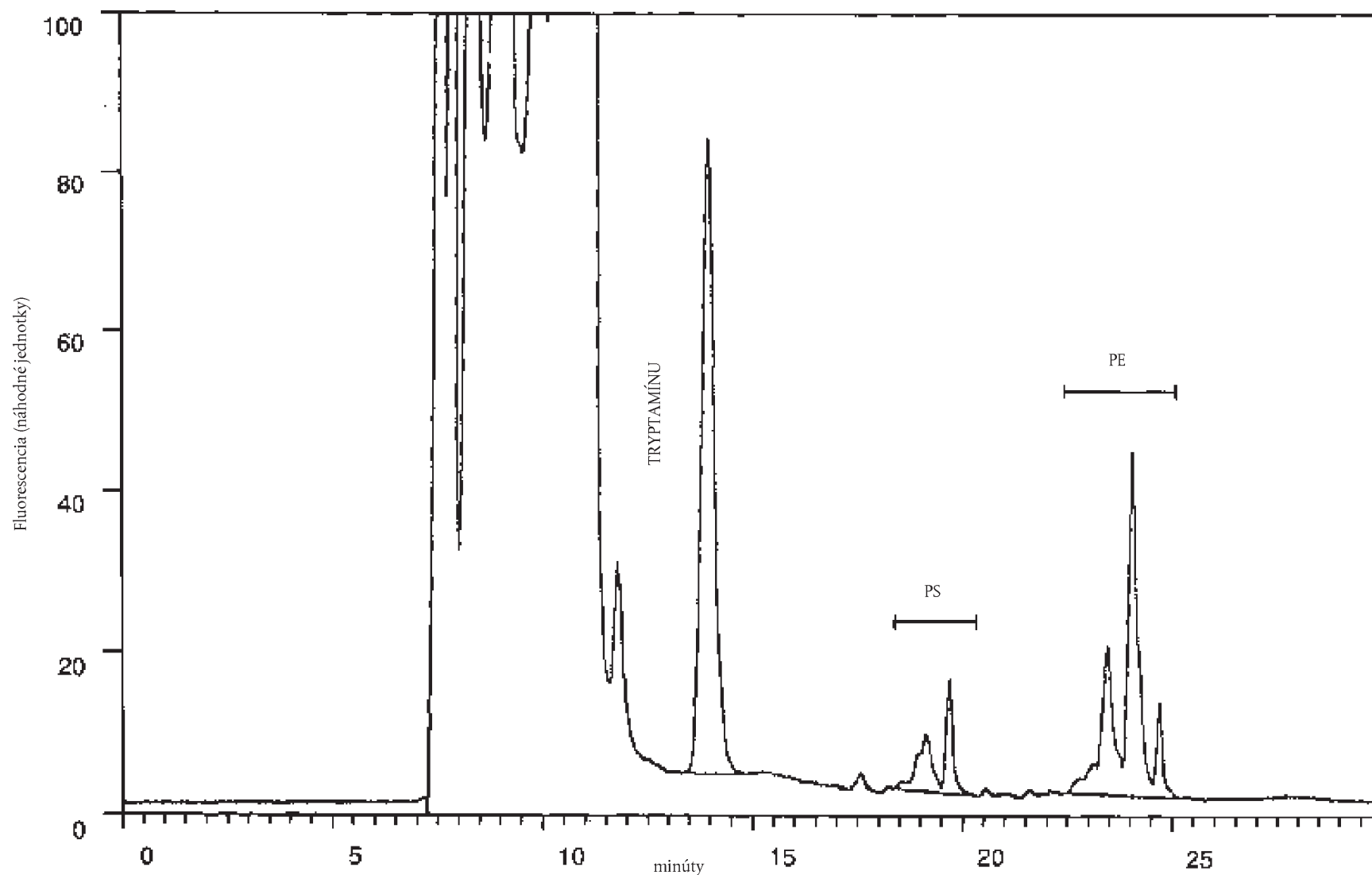
9.2. 9. 2. Reprodukovateľnosť

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

10. Zdroje

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

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



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

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

PRÍLOHA XXI

(Článok 15)

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

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

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

Pozitívne výsledky sa interpretujú nasledovne:

1. Opakujte test pridaním penicilinázy do testovacieho systému:
Pozitívny výsledok: inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť.
Negatívny výsledok: inhibičnou látkou je beta-laktámové antibiotikum.
2. Opakujte test pridaním p-aminobenzoovej kyseliny do testovacieho systému
Pozitívny výsledok: inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť.
Negatívny výsledok: inhibičnou látkou je sulfonamid/dapson.
3. Opakujte test pridaním penicilinázy + p-aminobenzoovej kyseliny do testovacieho systému
Pozitívny výsledok: inhibičná látka sa týmto postupom nedá zistiť.
Negatívny výsledok: inhibičnými látkami sú beta-laktámové antibiotikum a sulfonamid/dapson.

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

PRÍLOHA XXII

(Článok 16)

KVANTITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU ODSSTREDENÉHO MLIEKA V PRÁŠKU V KŔMNYCH ZMESIACH ENZYMATICKOU KOAGULÁCIOU PARAKAZEÍNU**1. Účel**

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

2. Rozsah

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

3. Princíp metódy

- 3.1. Rozpustenie kazeínu nachádzajúceho sa v kŕmnej zmesi extrakciou roztokom citrátu sodného.
- 3.2. Upravenie koncentrácie iónov vápnika na požadovanú hodnotu na zrazenie parakazeínu; z kazeínu sa parakazeín získa pridaním syridla.
- 3.3. Obsah dusíka v parakazeínovej zrazenine sa stanoví Kjeldahlovou metódou podľa postupu popísaného v norme IDF 20A 1986; množstvo odstredeného mlieka v prášku sa vypočíta na základe minimálneho obsahu kazeínu 27,5 % (pozri 9.1.).

4. Reagenty

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

- 4.1. Dihydrát citrátu sodného (roztok 1 % w/v)
- 4.2. Chlorid vápenatý (roztok 2M). V porcelánovej nádobe vhodnej veľkosti (150 až 200 ml) alebo vo vaničke odvážite 20,018 g CaCO_3 (analytická kvalita). Zalejte destilovanou vodou a preneste na vriaci vodný kúpeľ. Pomaly pridajte 50 až 60 ml roztoku HCl (pomer HCl: voda = 1: 1) na úplné rozpustenie uhličitanu. Ponechajte na vriacom vodnom kúpeli, pokým sa CaCl_2 nevysuší, na odstránenie HCl, ktorá nezreagovala. Preneste s destilovanou vodou do 100 ml odmernej banky a rozriedte po značku. Odmerajte hodnotu pH, ktorá nesmie byť nižšia ako 4,0. Roztok uskladnite v chladničke.
- 4.3. Hydroxid sodný 0,1 N
- 4.4. Kyselina chlorovodíková 0,1 N
- 4.5. Tekuté teľacie syridlo (štandardná sila 1: 10 000). Skladujte v chladničke pri teplote 4 až 6 °C.
- 4.6. Reagenty na kvantitatívne stanovenie obsahu dusíka podľa Kjeldahlovej metódy podľa popisu uvedeného v norme IDF 20A 1986.

5. Prístroje

Bežné laboratórne prístroje vrátane:

- 5.1. Mažiar alebo homogenizér
- 5.2. Analytická váha
- 5.3. Odstredivka (2 000 až 3 000 rpm) s 50 ml skúmavkami
- 5.4. Magnetický miešač s (10 až 15 mm) poháňaným kolesom
- 5.5. 150 až 200 ml vaničky
- 5.6. 250 a 500 ml banky
- 5.7. Sklenené lieviky s priemerom 60 až 80 mm
- 5.8. Vysokorychlostné filtre bez popola s priemerom 150 mm (S.S. 589², S.S. 595 1/2)
- 5.9. Pipety s rôznym objemom

- 5.10. Termostaticky nastaviteľný vodný kúpeľ pri teplote 37 °C
- 5.11. pH-meter
- 5.12. Kjeldahlova sada na spracovanie a destiláciu so stojanom
- 5.13. 25 ml byretová ihla s odmerkou
- 5.14. Plastická fľaša na destilovanú vodu
- 5.15. Špachtle z nerezovej ocele
- 5.16. Teplomery
- 5.17. Sušiaci pec s nastaviteľnou teplotou

6. Postup

6.1. Príprava vzorky

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

6.2. Rozpustenie mlieka v prášku a separácia nerozpustného rezídua

- 6.2.1. Priamo do 50 ml odstredovacej skúmavky odvážte $1,000 \pm 0,002$ g dobre homogenizovanej krmnej zmesi (6.1.). Pridajte 30 ml roztoku citrátu sodného (4.1.) predhriateho na 45 °C. Zmiešajte pomocou magnetického miešača po dobu minimálne 5 minút.
- 6.2.2. Pri 500 g odstreďte (2 000 až 3 000 rpm) po dobu 10 minút a do 150 až 200 ml vaničky zlejte čistý vodný supernatant tak, aby sa dnu nedostal žiadny materiál zo dna.
- 6.2.3. Na rezíduu vykonajte ďalšie dve extrakcie podľa rovnakého postupu a extrakty pridajte k prvému.
- 6.2.4. Ak sa na povrchu vytvorí vrstva oleja, uložte do chladničky, pokiaľ sa tuk nespevní, a túto vrstvu odstráňte špachtľou.

6.3. Koagulácia kazeínu enzýmami syridla

- 6.3.1. Za stáleho miešania kvapnite 3,4 ml nasýteného roztoku chloridu vápenatého (4.2.) do celkového vodného extraktu (približne 100 ml). Roztokmi NaOH (4.3.) alebo HCl (4.4.) upravte pH na 6,4 – 6,5. Vložte do termostaticky nastaviteľného vodného kúpeľa pri teplote 37 °C na 15 až 20 minút na dosiahnutie solnej rovnováhy. Táto sa prejavuje vytvorením ľahkého zákalu.
- 6.3.2. Kvapalinu prelejte do jednej (alebo dvoch) odstredovacích skúmaviek a odstreďte pri 2 000 g po dobu 10 minút s cieľom odstránenia zrazeniny. Supernatant preložte bez umytia usadeniny do jednej (alebo dvoch) odstredovacích skúmaviek.
- 6.3.3. Teplotu supernatant opäť upravte na 37 °C. Za stáleho miešania extraktu kvapnite 0,5 ml tekutého syridla (4.5.). Koagulácia sa uskutoční do jednej až dvoch minút.
- 6.3.4. Vzorku vložte späť do vodného kúpeľa a ponechajte pri teplote 37 °C po dobu 15 minút. Vzorku potom z kúpeľa vyberte a koagulát prelomte miešaním. Odstreďte pri 2 000 g po dobu 10 minút. Supernatant prefiltrujte cez vhodný filtračný papier⁽¹⁾ (Whatman č. 541 alebo ekvivalentný) a filtračný papier si odložte. Zrazeninu umyte v odstredovacej skúmavke s 50 ml vody pri teplote približne 35 °C premiešaním zrazeniny.

Opäť odstreďte pri 2 000 g po dobu 10 minút. Supernatant prefiltrujte cez odložený filtračný papier.

6.4. Stanovenie obsahu dusíka v kazeíne

- 6.4.1. Po umytí preložte zrazeninu na filtračný papier odložený v bode 6.3.4. použitím destilovanej vody. Filtračný papier preneste do Kjeldahlovej banky. Obsah dusíka stanovíte Kjeldahlovou metódou podľa popisu uvedeného v norme IDF 20A 1986.

7. Slepý test

- 7.1. Pred mineralizáciou Kjeldahlovou metódou podľa popisu uvedeného v norme IDF 20A 1986 pravidelne uskutočňujte slepý test použitím filtračného papiera bez popola (5.8.) navlhčeného zmesou 90 ml (4.1.) roztoku citrátu sodného, 1 ml nasýteného roztoku chloridu vápenatého (4.2.), 0,5 ml kvapalného syridla (4.5.) a umytého 3 x 15 ml destilovanej vody.
- 7.2. Objem kyseliny použitej v slepom teste sa musí odčítať od objemu kyseliny (4.4.) použitej na titráciu vzorky.

⁽¹⁾ Používa sa vysokorychlostný filtračný papier bez popola.

8. **Kontrolný test**

- 8.1. Na testovanie vyššie uvedeného postupu a reagentov uskutočnite analýzu na štandardnej kŕmnej zmesi so známym obsahom odstredeného mlieka v prášku podľa údajov kolaboratívnej štúdie. Priemerný výsledok duplicitnej analýzy by sa nemal od výsledku kolaboratívnej štúdie líšiť o viac ako 1 %.

9. **Výpočet výsledkov**

- 9.1. Percento obsahu odstredeného mlieka v prášku v kŕmnej zmesi sa vypočíta použitím nasledovného vzorca

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

pričom N je percento obsahu parakazeínového dusíka; 27,5 je faktor na konverziu stanoveného obsahu kazeínu na percento odstredeného mlieka v prášku; 2,81 a 0,908 sú korekčné faktory získané z regresnej analýzy.

10. **Presnosť metódy**10.1. *Opakovateľnosť*

V najmenej 95 % prípadov nesmie dvojité analýza rovnakej vzorky rovnakým operátorom v rovnakom laboratóriu dávať rozdiely vo výsledkoch rovné alebo väčšie ako 2,3 g odstredeného mlieka v prášku na 100 g kŕmnej zmesi.

10.2. *reprodukovateľnosť*

V najmenej 95 % prípadov nesmie analýza rovnakej vzorky analyzovaná v dvoch laboratóriách dávať rozdiely vo výsledkoch väčšie ako 6,5 g odstredeného mlieka v prášku na 100 g kŕmnej zmesi.

11. **Tolerančný limit**

Hodnota CrD_{95} (kritická odchýlka, 95 % limit pravdepodobnosti) sa vypočíta použitím vzorca (ISO 5725):

$$CrD_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

(R: reprodukovateľnosť, r: opakovateľnosť)

Dvojitá analýza: $CrD_{95} = 4,5$ g

Ak sa výsledok chemickej analýzy odlišuje od deklarovaného obsahu odstredeného mlieka o menej ako 4,5 g (dvojitá analýza), dodávka kŕmnej zmesi sa považuje za spĺňajúcu toto ustanovenie nariadenia.

12. **Poznámky**

- 12.1. Pridanie veľkého percenta určitých nemliečnych proteínov a najmä sójových proteínov po zohriatí s odstredeným mliekom v prášku môže viesť k príliš vysokým výsledkom kvôli spoločnému zrazeniu s mliečnym parakazeínom.
- 12.2. Pridanie cmaru môže viesť k menším hodnotám kvôli tomu, že sa stanovuje len netučná časť. Pridanie určitých kyslých cmarov môže viesť k omnoho nižším hodnotám kvôli neúplnému rozpusteniu v roztoku citrátu.
- 12.3. K nízkym výsledkom môžu viesť aj prídavky lecitínu rovné alebo väčšie ako 0,5 %.
- 12.4. Vstrebanie vysokozohriateho odstredeného mlieka v prášku môže viesť k príliš vysokým hodnotám kvôli spoločnému zrazeniu určitých srvátkových proteínov s mliečnym parakazeínom.

PRÍLOHA XXIII

(Článok 17)

KVALITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU ŠKROBU V ODSSTREDENOM MLIEKU V PRÁŠKU, DENATUROVANOM MLIEKU V PRÁŠKU A KŮRMNYCH ZMESIACH**1. Rozsah**

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

Detekčný limit metódy je približne 0,05 g škrobu na 100 g vzorky.

2. Princíp

Reakcia je založená na reakcii používanej pri jodometrii:

- fixácia koloidov voľného jódu vo vodnom roztoku,
- absorpcia škrobovými čistočkami a tvorbou farby.

3. Reagenty**3.1. Jodný roztok**

- jód: 1 g,
- jodid draselný: 2 g,
- destilovaná voda: 100 ml.

4. Prístroje

- 4.1. 4.1. Analytická váha
- 4.2. 4.2. Vodný kúpeľ
- 4.3. 4.3. Testovacie skúmavky, 25 mm x 200 mm

5. Postup

Do testovacej skúmavky (4.3.) odvážite 1 g vzorky.

Pridajte 20 ml destilovanej vody a pretrepte na rozptýlenie vzorky.

Umiestnite do vriaceho vodného kúpeľa (4.2.) a odložte na 5 minút.

Vyberte z kúpeľa a nechajte vychladnúť na izbovú teplotu.

Pridajte 0,5 ml jódného roztoku (3.1.), pretrepte a pozorujte výslednú farbu.

6. Výsledky

Modré zafarbenie naznačuje prítomnosť prírodného škrobu vo vzorke.

Ak vzorka obsahuje modifikovaný škrob, farba nemusí byť modrá.

7. Poznámky

Farba, jej intenzita a mikroskopický vzhľad škrobu sa líšia v závislosti od pôvodu prírodného škrobu (napr. kukurica alebo zemiaky) a typu modifikovaného škrobu prítomného vo vzorke.

Pri prítomnosti modifikovaných škrobov sa farba zmení na fialovú, červenú alebo hnedú podľa stupňa modifikácie kryštalickej štruktúry prírodného škrobu.

PRÍLOHA XXIV

(Článok 18)

STANOVENIE OBSAHU VODY V KYSLOM CMARE V PRÁŠKU

1. Rozsah

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

2. Princíp

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

3. Prístroje

3.1. 3.1. Analytická váha

3.2. 3.2. Nádoby na sušenie z nehrdzavejúceho kovu alebo skla s vrchnákmi zaručujúcimi vzduchotesné uzavretie; pracovný povrch musí umožniť rozmiestnenie vzorky na približne 0,3 g/cm².

3.3. 3.3. Nastaviteľná elektricky vyhrievaná vákuová pec vybavená olejovým čerpadlom a buď mechanizmom na vpúšťanie horúceho suchého vzduchu, alebo sušiacim činidlom (napr. oxid vápenatý).

3.4. 3.4. Sušička s efektívnym sušiacim činidlom.

3.5. 3.5. Sušiacia pec, ventilovaná, termostaticky nastaviteľná, pri 102 ± 2 °C.

4. Postup

V sušiacej peci (3.5.) zohrejte nádobu (3.2.) s vrchnákom po dobu minimálne jednej hodiny. Vrchnák položte na nádobu, ihneď preložte do sušičky (3.4.) a nechajte vychladnúť na izbovú teplotu a odvážte na najbližších 0,5 mg.

Na najbližších 0,5 mg odvážte nádobu (3.2.) s jej vrchnákom. Do zvaženej nádoby na najbližší 1 mg odvážte približne 5 g vzorky a rovnomerne rozmiestnite. Nádobu bez vrchnáka umiestnite do vákuovej pece (3.3.) predhriatej na 83 °C. Aby ste sa vyhli nevhodnému zníženiu teploty pece, nádobu do nej vložte čo najrýchlejšie.

Tlak zvýšte na 100 Torr (13,3 kPa) a pri tomto tlaku nechajte sušiť po dobu štyroch hodín buď v prúde horúceho suchého vzduchu, alebo použitím sušiaceho činidla (približne 300 g na 20 vzoriek). V prípade použitia činidla po dosiahnutí predpísaného tlaku odpojte vákuové čerpadlo. Čas sušenia počítajte od času, keď sa teplota v peci vráti na 83 °C. Opatrne upravte atmosférický tlak v peci na pôvodnú hodnotu. Pec otvorte, na nádobu ihneď položte vrchnák, nádobu z pece vyberte, nechajte ju vychladnúť v sušičke (3.4.) po dobu 30 až 45 minút a odvážte na najbližší 1 mg. Vo vákuovej peci (3.3.) sušte ďalších 30 minút pri teplote 83 °C a znovu odvážte. Rozdiel medzi oboma hmotnosťami nesmie presiahnuť 0,1 % vlhkosti.

5. Výpočet

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

pričom

E = pôvodná hmotnosť testovacej vzorky v gramoch,

m = hmotnosť suchej testovacej vzorky v gramoch.

6. Presnosť

6.1. Limit opakovateľnosti

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom použitím rovnakých prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,4 g vody/100 g kyslého cmaru v prášku.

6.2. *Limit reprodukovateľnosti*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov na rovnakom testovacom materiáli nesmie presiahnuť 0,6 g vody/100 g kyslého cmaru v prášku.

6.3. *Zdroj údajov o presnosti*

Údaje o presnosti boli stanovené pokusom uskutočneným v roku 1995, na ktorom sa podieľalo 8 laboratórií a pri ktorom sa použilo 12 vzoriek (šesť slepých duplikátov).

PRÍLOHA XXV

(Článok 19)

REFERENČNÁ METÓDA ZISŤOVANIA PRÍTOMNOSTI CUDZÍCH TUKOV V MLIEČNOM TUKU PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU TRIGLYCERIDOV – OPRAVA 1

1. Rozsah a oblasť aplikácie

Táto norma stanovuje metódu zisťovania prítomnosti cudzích tukov, rastlinných aj živočíšnych, ako napríklad hovädzí olej alebo bravčová masť, v mliečnom tuku mliečnych výrobkov plynovou chromatografiou triglyceridov.

Použitím definovaného triglyceridového vzorca sa kvalitatívne a kvantitatívne zistí prítomnosť rastlinných a živočíšnych tukov v čistom mliečnom tuku bez ohľadu na podmienky kŕmenia alebo pridávania.

Poznámka 1: Hoci kyselina maslová (C4) nachádzajúca sa výlučne v mliečnych tukoch umožňuje kvantitatívne odhady malých až stredných množstiev mliečného tuku v rastlinných tukoch, kvalitatívne a kvantitatívne informácie sa dajú len ťažko poskytnúť v rozpätí pridania do výšky najmenej 20 % (hmotnostné %) cudzieho tuku v čistom mliečnom tuku z dôvodu veľkej variácie C4, pohybujúcej sa približne od 3,5 do 4,5 % (hmotnostné %).

Poznámka 2: Kvantitatívne výsledky je prakticky možné získať len triglyceridovou analýzou, pretože obsah sterolov v rastlinných tukoch je odlišný kvôli odlišným podmienkam výroby a ošetrovania.

2. Definícia

Cudzie tuky v mliečnom tuku: cudzie tuky podľa definície tejto normy sú všetky rastlinné a živočíšne tuky okrem mliečného tuku.

3. Princíp metódy

Po extrakcii mliečného tuku sa pripraví zásobný roztok. Z tohto roztoku sa plynovou chromatografiou na zabalených valcoch zistí prítomnosť triglyceridov (celkové karbónové čísla). Vložením hmotnostného % molekúl tuku rozličnej veľkosti (C24 – C54 – len párne čísla) do triglyceridového vzorca sa kvalitatívne alebo kvantitatívne zistí prítomnosť cudzích tukov.

Poznámka: Ak existuje záruka dosiahnutia porovnateľných výsledkov, použiť sa môže aj kapilárna plynová chromatografia za dodržania tu popísaného hodnotenia ⁽¹⁾.

4. Reagenty

Použiť sa musia chemikálie analytickej kvality.

- 4.1. 4.1. Nosný plyn: dusík so stupňom čistoty $\geq 99,996$ %
- 4.2. 4.2. Štandardné triglyceridy ⁽²⁾, saturované, ako aj cholesterol na štandardizáciu štandardného mliečného tuku podľa častí 6.5.4
- 4.3. 4.3. Metanol, bez obsahu vody
- 4.4. 4.4. n-hexán
- 4.5. 4.5. n-heptán
- 4.6. 4.6. Toluén
- 4.7. 4.7. Roztok dimetylchlorosilánu: 50 ml dimetylchlorosilánu sa rozpustí v 283 ml toluénu
- 4.8. 4.8. Spaľovací plyn: vodík a syntetický vzduch
- 4.9. 4.9. Stacionárna fáza, 3- % OV-1 na 125/150 μ m (100/120 otvor) Gas ChromQ ⁽³⁾
- 4.10. 4.10. 10 % roztok kakaového masla

5. Nástroje

Bežné laboratórne prístroje a najmä:

- 5.1. Vysokoteplotný plynový chromatograf vhodný na teploty najmenej 400 – 450 °C, vybavený detektorom ionizácie plameňa (FID) a kontrolou konštantnej prietokovej hmotnosti nosného plynu. Spaľovací plyn: 30 ml/min H₂, 270 ml/min syntetického vzduchu.

⁽¹⁾ Vhodné metódy už boli popísané. Pozri D. Precht a J. Molkenin: Kvantitatívna triglyceridová analýza použitím krátkych kapilárnych valcov, Chrompack News 4, 16-17 (1993).

⁽²⁾ Vhodné produkty sú dostupné v predaji.

⁽³⁾ Obchodné značky ako Extrelut, Gas ChromQ, Chrompack sú príkladmi vhodných produktov dostupných v špecializovanom obchode. Táto informácia slúži na jednoduché zvládnutie normy používateľom a nepredstavuje požiadavku na konkrétny výrobok. Indikácia zrna bola preložená do jednotky SI μ m podľa normy BS 410:1988 „Britská špecifikácia noriem pre testovacie sitá“.

V prípade veľkého prietoku nosného plynu by mala byť dýza plameňa veľmi veľká.

Poznámka: Sklenené vložky FID alebo injekčného systému sa kvôli vysokým teplotám pri triglyceridovej analýze musia často čistiť.

Plynový chromatograf musí byť vybavený septami odolávajúcim vysokým teplotám, ktoré sa dajú často používať a vykazujú nízky stupeň „púšťania“.

Poznámka: vhodné sú septy Chromblue (tm) (Chrompack).

Septy je potrebné v pravidelných intervaloch meniť, napr. po približne 100 injekciách, alebo ak sa zhorší rozlíšenie (pozri obrázok 4).

5.2. Chromatografický valec

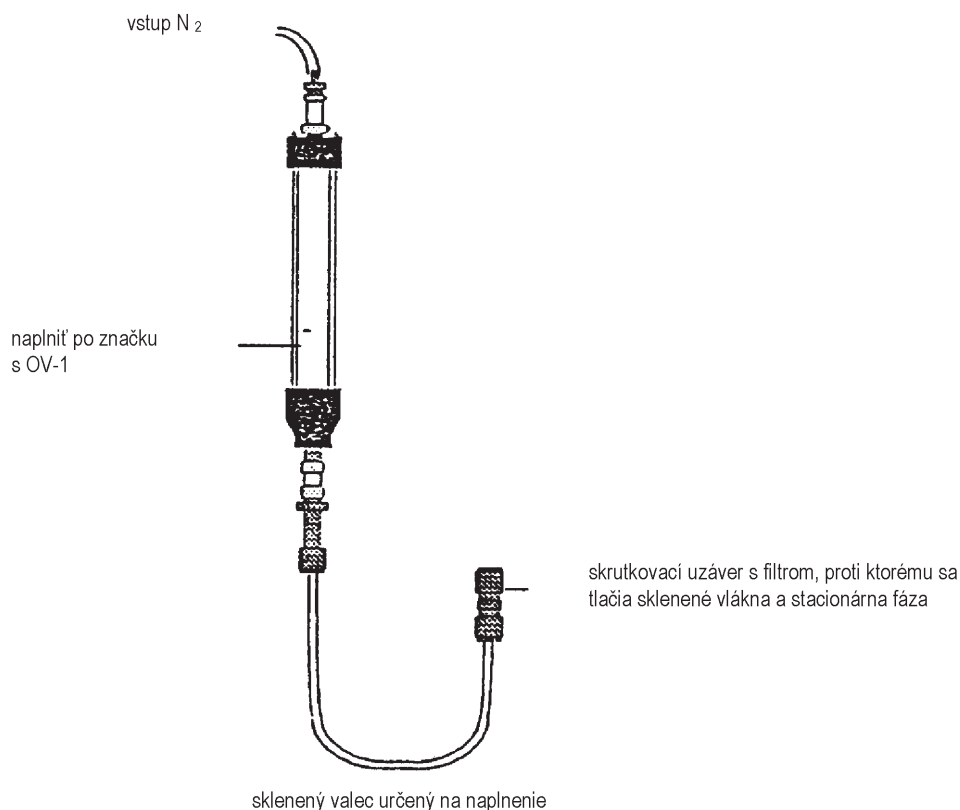
Sklenený valec v tvare U (vnútorný priemer 2 mm, 500 mm dlhý), silanizovaný podľa bodu 6.1. dimetylchlorosilánom s cieľom deaktivácie povrchu skla.

Poznámka: Vhodné sú tiež dlhšie (80 – 200 mm) zabalené valce. Dá sa nimi dosiahnuť trochu väčšia reprodukovateľnosť výsledkov. Na druhej strane stacionárna fáza vykazuje občasné zlomy po operácii, čo môže viesť na druhej strane k horším kvantitatívnym výsledkom. Ďalej, plameň FID sa ľahko zahasí ako dôsledok požadovaného extrémne vysokého prietoku nosného plynu od 75 do 85 ml/min.

5.3. Zostava pre naplnenie valca (pozri obrázok 1)

Obrázok 1

Naplnenie valca



- 5.3.1. Plastický valec s priskrutkovanými uzávermi, vybavený značkou, po ktorú sa môže naplniť požadované množstvo stacionárnej fázy
- 5.3.2. Jemné sito (oko s veľkosťou približne 100 µm) so skrútkovacím uzáverom, vhodné na uzavretie skleneného valca podľa obrázka 1
- 5.3.3. Deaktivovaná, silanizovaná sklenená vata
- 5.3.4. Vibrátor na rovnomernú distribúciu stacionárnej fázy počas plnenia
- 5.4. 1 až 3 ml valec Extrelut⁽¹⁾ so silikovým gélom. Tento valec sa dá používať na extrakciu na získanie mliečneho tuku

⁽¹⁾ Pozri poznámku pod čiarou 3 na strane 86 (Ú. v. ES L 37, 7.2.2001, s. 86).

- 5.5. Grafitová zátka 6,4 mm (1/4") so 6 mm závitom
- 5.6. Zariadenia na silanizáciu skleneného povrchu valca podľa bodu 6.1.
 - 5.6.1. 5.6.1. Woulffova fľaša
 - 5.6.2. 5.6.2. Sacie vodné čerpadlo
- 5.7. Vodný kúpeľ, nastaviteľný na 50 ± 2 °C
- 5.8. Skrinka na sušenie, nastaviteľná na (50 ± 2) °C a (100 ± 2) °C
- 5.9. Mikrolitrové pipety
- 5.10. 5 ml pipeta s odmerkou na dávkovanie 1,5 metanolu
- 5.11. 50 ml banka s oblým dnom
- 5.12. Erlenmeyerova banka, nominálny objem 50 ml
- 5.13. Lievik
- 5.14. Filter s malými pórm
- 5.15. Rotačný vyparovač
- 5.16. Ampulky s nominálnym objemom 1 ml, uzavierateľné hliníkovým uzáverom so septom vo vnútri
- 5.17. Injekčná striekačka, piest striekačky nesmie dosiahnuť na koniec ihly

Poznámka: Takéto striekačky umožňujú lepšiu reprodukovateľnosť výsledkov.

S cieľom zabránenia znehodnoteniu septa, koniec ihly je potrebné pravidelne kontrolovať (napr. stereomikroskopom).

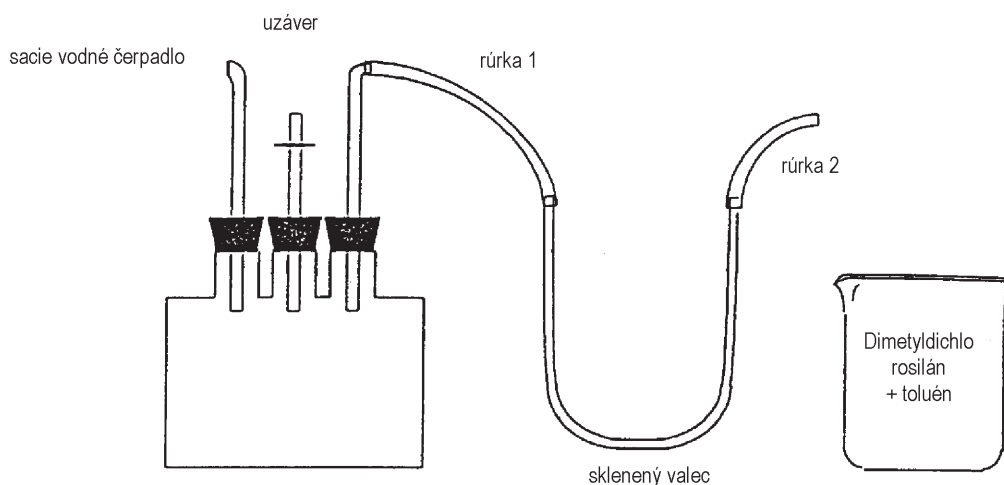
6. Postup

6.1. Príprava valca (silanizácia)

Po pripojení Woulffovej fľaše (pozri obrázok 2) k saciemu vodnému čerpadlu sa rúrka 2 ponorí do roztoku podľa bodu 4.7. Uzavretím uzávera sa valec naplní, následne sa obe rúrky odložia.

Obrázok 2

Zostava na silanizáciu



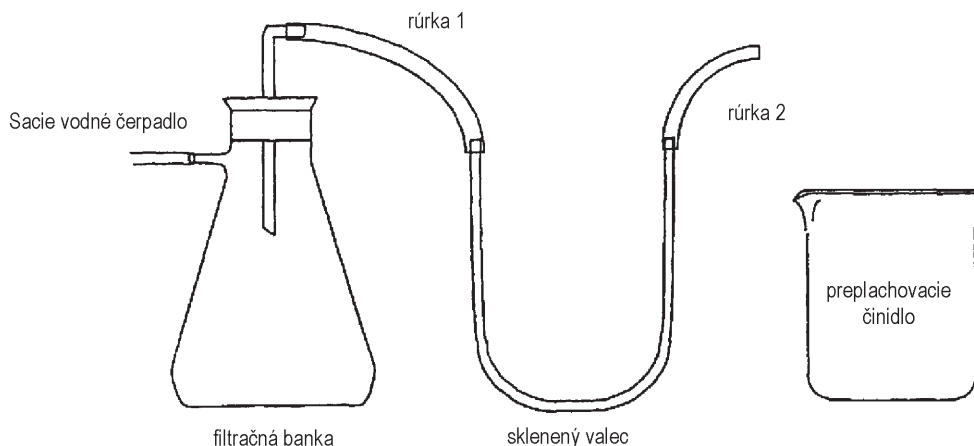
Valec sa pripevní na stojan a pipetou sa doplní roztokom dimetylchlorosilánu.

Po 20 – 30 minútach sa Woulffova fľaša vymení filtračnou bankou a valec sa vyprázdni pripojením k saciemu vodnému čerpadlu (pozri obrázok 3).

6.2. *Naplnenie valca*

Potom nasleduje prepláchnutie za pomoci 75 ml toluénu a 50 ml metanolu; prázdny valec sa potom nechá vysušiť v skrinke na sušenie pri teplote 100 °C po dobu približne 30 minút.

Obrázok 3

Zostava na prepláchnutie

Na naplnenie valca sa použije zostava znázornená na obrázku 1. Stacionárna fáza (4.9.) sa napustí do plastického valca až po značku. Spodná časť skleneného valca určeného na naplnenie sa uzavrie približne 1 cm dlhou zátkou zo sklenenej vaty, ktorá bola pred tým silanizovaná a ktorá sa dnu vtlačí oceľovou tyčkou. Potom sa koniec valca nasunie na sitko podľa bodu 5.3.2.

Valec sa pod tlakom (3 bar, s N₂) plní stacionárnou fázou. Na dosiahnutie rovnomerného, stáleho a pevného naplnenia sa počas plnenia valcom pohybuje vibrátor.

Po naplnení sa do druhého konca naplneného valca vtlačí pevná zátka zo silanizovanej sklenenej vaty, vytrčajúce konce sa odstrihnú a zátka sa špachtľou vtlačí niekoľko milimetrov dovnútra.

6.3. *Príprava vzoriek*

Na prípravu vzoriek sa používa jedna z troch nasledovných metód:

6.3.1. *Izolácia mliečneho tuku z masla*

5 až 10 g masla sa roztopí vo vhodnej nádobe vo vodnom kúpeli podľa bodu 5.7. pri teplote 50 °C.

50 ml Erlenmeyerova banka a lievik s vloženým filtrom podľa bodu 5.14. sa v skrinke na sušenie zohrejú na teplotu 50 °C. Vrstva tuku vzorky roztopeného masla sa prefiltruje použitím predhriateho zariadenia.

Takýto mliečny tuk je takmer bez fosfolipidov.

6.3.2. *Extrakcia tukovej frakcie podľa Röse-Gottliebovej metódy*

Extrakcia sa robí buď podľa normy IDF 1C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 alebo 22B: 1987.

S takýmito fosfolipidmi mliečneho tuku umožníte dosiahnutie vrcholu cholesterolu, ktorý je zvýšený o približne 0,1 %.

Triglyceridové spektrum, cholesterolom štandardizované na 100 je týmto ovplyvnené len do zanedbateľnej miery.

6.3.3. *Extrakcia z mlieka použitím valcov silikových gélov*

Do 1 až 3 ml Extrelutového valca sa mikrolitrovou pipetou podľa bodu 5.4. aplikuje 0,7 ml vzorky mlieka s teplotou 20 °C a umožní sa rovnomerné rozloženie na silikovom géli po dobu približne 5 minút.

Na denaturáciu proteín-lipidových komplexov sa pipetou pridá 1,5 ml metanolu. Následne sa vzorka extrahuje s 20 ml n-hexánu. n-hexán sa pridáva pomaly a v malých množstvách a rozpúšťadlo je zliate a zhromaždené v 50 ml banke s oblým dnom, ktorá bola vysušená na konštantnú známu hmotnosť.

Po extrakcii valec vyprázdniť.

Z eluátu sa vydestilujú rozpúšťadlá rotačným vyparovačom pri teplote vodného kúpeľa 40 až 50 °C.

Banka sa vysuší a získaný tuk sa odváži.

Poznámka: Tuková extrakcia pomocou Gerberovej, Weibull-Berntropovej, Schmid-Bondzynski-Ratzlaf-fovej metódy alebo izoláciou mliečneho tuku použitím detergentu (metóda BDI) nie sú vhodné na triglyceridovú analýzu, pretože týmito metódami môžu do tukovej vrstvy prejsť veľké množstvá parciálnych glyceridov alebo fosfolipidov.

6.4. Príprava roztoku vzorky

Na plynovú chromatografiu sa používa 5 % roztok tuku v n-heptáne získaný podľa bodu 6.3. Na prípravu tohto roztoku vzorky sa odvážia zodpovedajúce množstvá vzorky získané podľa bodov 6.3.1. a 6.3.2. a rozpustené v zodpovedajúcich množstvách n-heptánu.

Pri príprave vzorky podľa bodu 6.3.3. sa množstvo n-heptánu určeného na pridanie do vzorky v banke vypočíta na základe odváženia a zvyšku v ňom rozpusteného.

Do ampulky (5.16.) sa vloží približne 1 ml roztoku vzorky.

6.5. Analýza triglyceridovou chromatografiou

Pri vysokých teplotách až do 350 °C na eluovanie triglyceridov s dlhým reťazcom C52 – C56 sa ľahko vyskytne nárast základnej čiary, najmä ak valce na začiatku neboli vhodne pripravené. Tomuto nárastu základnej čiary pri vysokých teplotách sa dá úplne vyhnúť skombinovaním dvoch valcov alebo odpočítaním základnej čiary.

V takej situácii alebo pri práci s jedným valcom, ako aj na sklenené vložky injektora a detektora sa musia použiť grafitové zátky (5.5.).

6.5.1. Korekcia základnej čiary

Na zabránenie nárastu základnej čiary sa používa jedna z nasledovných štyroch metód:

6.5.1.1. Kombinácia valcov

Použijú sa dva balené valce.

6.5.1.2. Korekcia základnej čiary plynovým chromatografom

Nárastu základnej čiary sa dá zabrániť uskutočnením jedného kola chromatografie bez iniektáže roztoku tuku a následným odpočítaním uloženej základnej čiary.

6.5.1.3. Korekcia základnej čiary integračným softvérom

Nárastu základnej čiary sa dá zabrániť uskutočnením jedného kola chromatografie bez iniektáže roztoku tuku a následným odpočítaním uloženej základnej čiary.

6.5.1.4. Korekcia základnej čiary vhodnou úpravou

Pri adekvátnej počiatočnej úprave valca a približne 20 iniektáciách s roztoku mliečného tuku je nárast základnej čiary pri vysokých teplotách zvyčajne taký malý, že korekcie základnej čiary nie sú potrebné.

6.5.2. Technika iniektáže

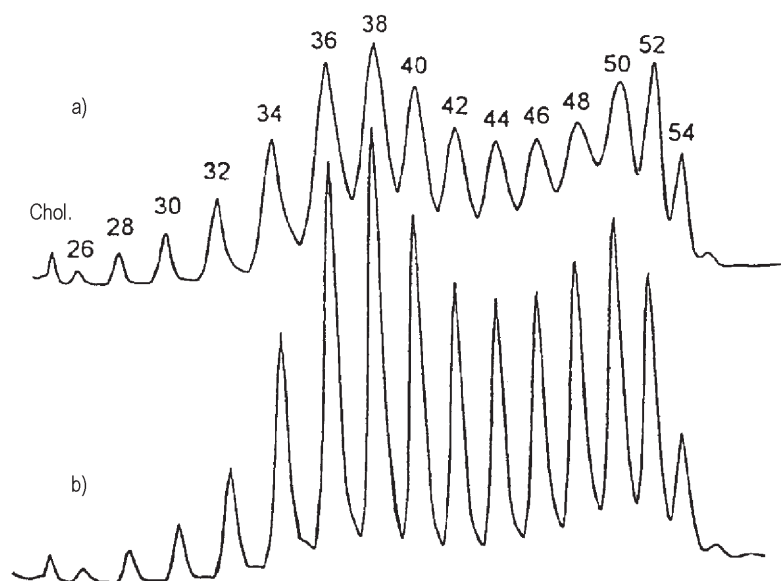
Na vyhnutie sa skresľujúcim efektom sa používa technika „horúcej iniektáže“ na dosiahnutie lepších kvantitatívnych výsledkov s triglyceridovými zložkami s vysokým bodom varu. Roztok tuku sa vtiahne do striekačky a studená ihla striekačky sa pred iniektážou zahreje po dobu približne troch sekúnd v hlave injektora. Potom sa obsah striekačky rýchlo iniektuje.

Poznámka: Touto technikou iniektáže sa znižuje riziko frakčionálneho javu vnútri striekačky alebo iniektčného bloku. Priama iniektáž do valca v jeho hornej predĺženej zahriatej časti sa nepoužíva, pretože fragmenty septa, ako aj znečisťujúce látky, ktoré sa tu akumulujú, sa dajú jednoducho odstrániť použitou technikou pravidelnou výmenou vložky injektora bez odpájania valca.

S cieľom nepoškodenia septa je veľmi dôležité zabrániť ohnutiť konca ihly dotknutím sa dna vaničky so vzorkou (aj keď nie je dobre viditeľné).

Obrázok 4

Triglyceridový chromatogram vzorky mliečneho tuku



- a) zlé rozlíšenie ako následok poškodeného septa
b) dobré rozlíšenie

6.5.3. Príprava baleného valca

Počas krokov a) až c) sa na zabránenie kontaminácii vrchol valca nepripojí na detektor.

Valce naplnené podľa bodu 6.2. sa upravujú nasledovne:

- 15 minút prúd N₂ 40 ml/min pri teplote 50 °C;
- zohrievanie pri 1 K/min až na 355 °C pri 10 ml N₂/min.;
- ponechanie pri 355 °C na 12 až 15 hodín;
- dve injekcie 1 µl roztoku kakaového masla (4.10.) a príslušný teplotný program;
- 20 injekcií 0,5 µm roztoku mliečneho tuku počas dvoch až troch dní podľa bodu 6.4.

Poznámka: Kakaové maslo pozostáva takmer výlučne s triglyceridov s vysokým bodom varu C50 až C56. Injektáž kakaovým maslom slúži na osobitnú úpravu tohto rozpätia s dlhým reťazcom. Pri triglyceridoch s vysokým bodom varu C50 až C54 sa môžu vyskytnúť čiastočné reakčné faktory vo výške približne 1,20. Pri opakovanej injektáži roztoku mliečneho tuku sa zvyčajne musí očakávať zníženie počiatočných vysokých reakčných faktorov pre C50 až C54. Pri Triglyceridoch s nízkym acyl-c číslom sa faktory blížia k 1. Pripraví sa tri páry valcov naplnených podľa bodu 6.2. Upravené valce sa na rutinné testovanie skontrolujú analýzou mliečneho tuku.

Následne sa používa pár s najlepšimi kvantitatívnymi výsledkami (reakčný faktor takmer 1). Valce s reakčným faktorom > 1,20 sa nepoužívajú.

6.5.4. Kalibrácia

Na kalibráciu sa stanoví reakčné faktory zodpovedajúcich triglyceridov, ako aj cholesterolu v mliečnom tuku (štandardizovaný tuk) použitím štandardizovaných triglyceridov (aspoň saturované triglyceridy C24, C30, C36, C42, C48 a C54, ako aj cholesterol; radšej aj C50 a C52). Stredné reakčné faktory sa dajú stanoviť matematickou interpoláciou.

Každý deň sa musia uskutočniť dve až tri kalibrácie použitím štandardizovaného tuku. Ak sa získajú takmer identické výsledky, dobre reprodukovateľné kvantitatívne výsledky sa dosiahnu triglyceridovou analýzou vzoriek.

Štandardizovaný tuk má trvanlivosť niekoľko mesiacov pri teplote maximálne – 18 °C a dá sa preto používať ako štandardná vzorka.

Poznámka: Reakčný faktor každej zložky sa tiež dá stanoviť použitím štandardizovaného tuku s certifikovaným zložením triglyceridov, ako napríklad CRM 519 (anhydričný mliečny tuk), ktorý sa dá získať z Inštitútu pre referenčné materiály a merania v Geeli v Belgicku.

6.5.5. Teplotný program, nosný plyn a iné podmienky triglyceridovej analýzy

Teplotný program: počiatočná teplota valca 210 °C, udržať jednu minútu, potom naprogramovať na nárast 6 °C/min až po 350 °C a konečnú teplotu udržať päť minút.

Teplota detektora a injektora: 370 °C.

Poznámka: Teplota detektora, injektora a pece (počiatočná teplota) sa musí udržiavať na konštantnej úrovni (aj cez noc, počas víkendov a sviatkov).

Nosný plyn: dusík, prietok 40 ml/min.

Poznámka: Ak sa používajú 80 cm valce, prietok musí byť minimálne 75 ml/min N₂. Prietok nosného plynu sa musí stále udržiavať (aj cez noc, počas víkendov a sviatkov). Presný prietok nosného plynu sa upravuje tak, aby sa C54 eluoval pri 341 °C nezávisle od dĺžky valca.

Doba analýzy: 29,3 minút.

Injekčný objem: 0,5 µl.

Poznámka: Striekačka musí byť po každej injekcii niekoľkokrát prepláchnutá čistým heptánom.

Stav FID: podľa bodu 5.1.

Poznámka: Detektor ionizácie plameňa sa zapína na začiatku každého pracovného dňa.

7. Integrácia, hodnotenie a kontrola podmienok merania

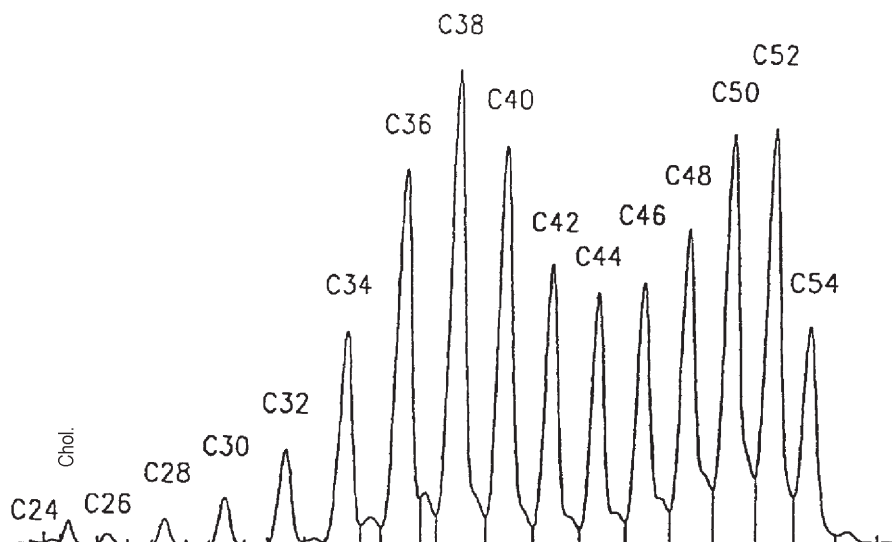
Triglyceridy s nepárnym acyl-c číslom ($2n + 1$) sa kombinujú s predchádzajúcim triglyceridom s párnym číslom ($2n$). Menej reprodukovateľné nízke obsahy C56 sa nezohľadňujú. Zvyšné triglyceridy (plocha vrcholu) v chromatograme, vrátane cholesterolu (vrchol blízko C24) sa násobia príslušnými reakčnými faktormi štandardného tuku (z poslednej kalibrácie) a spolu sa normalizujú na 100. Okrem voľného cholesterolu sa tak hodnotia triglyceridy C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 a C54. Výsledky sú udané v hmotnostnom % (g/100 g).

Hodnotenie vrcholov na chromatograme sa robí integrátorom, s ktorým sa dá naznačiť základná čiara. Reintegrácia optimalizovanými integračnými parametrami by mala byť možná.

Obrázky 5 a 6 znázorňujú dva príklady triglyceridového chromatogramu. Obrázok 5 znázorňuje chromatogram, ktorý sa dá dobre zhodnotiť, zatiaľ čo obrázok 6 znázorňuje sporadickú chybu v rozpätí C50 až C54, kde základná čiara je v porovnaní s obrázkom 5 nesprávna. Takéto bežné chyby sa dajú zistiť s vysokým stupňom istoty a dá sa im vyhnúť len použitím integrátora, ktorým je základná čiara naznačená.

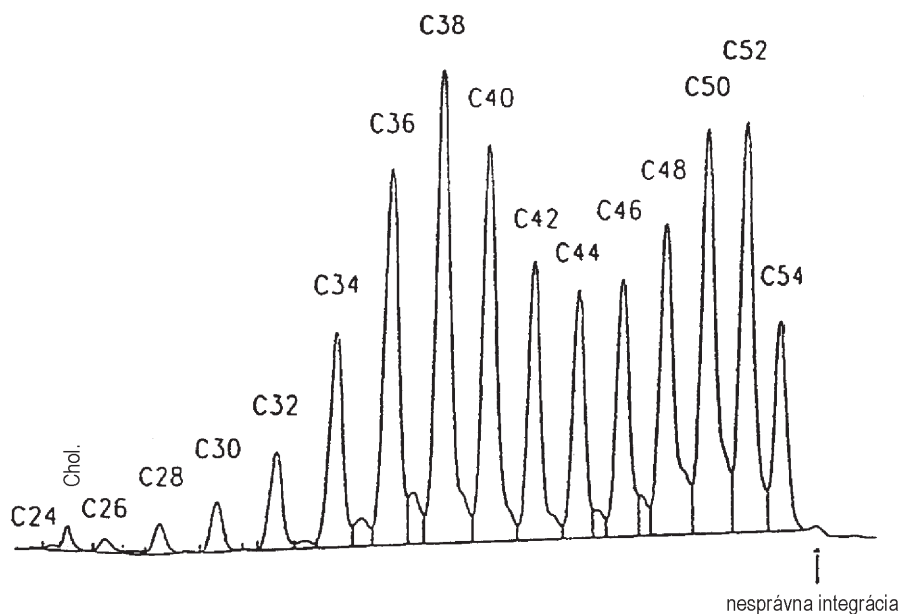
Obrázok 5

Triglyceridový chromatogram mliečneho tuku so zakreslenou základnou čiarou, ktorý sa dá ľahko hodnotiť



Obrázok 6

Nesprávne integrovaný chromatogram mliečneho tuku



Na kontrolu podmienok merania sa pre rôzne triglyceridy môžu použiť relatívne štandardné odchýlky (RSD: variačný koeficient x 100) uvedené v tabuľke 1. Vypočítané boli z 19 následných analýz rovnakého mliečneho tuku.

Tabuľka 1

Relatívne štandardné odchýlky (RSD) obsahov triglyceridu (n = 19)

Triglycerid	RSD (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Ak sú RSD omnoho vyššie ako hodnoty uvedené v tabuľke 1, podmienky chromatografie nie sú vhodné a je potrebné overiť septá alebo prietok nosného plynu. Možno tiež je, že sa na sklenenej vate pri vstupe do valca vytvorili malé čiastočky septa alebo valec už nie je vhodný na použitie kvôli zostatnutiu, teplotným vplyvom atď. (pozri obrázok 3).

Poznámka: Hodnoty uvedené v tabuľke 1 nie sú povinné, ale orientačné na účely kontroly kvality. Ak sa však očakávajú vyššie hodnoty RSD, limity opakovateľnosti a reprodukovateľnosti podľa bodu 11 sa musia napriek tomu dodržať.

8. Kvalitatívne zistenie prítomnosti cudzích tukov

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

Najcitlivejším vzorcom pre zistenie prítomnosti bravčovej masti je napríklad

$$6,5125.C26 + 1,2052.C32 + 1,7336.C34 + 1,7557.C36 + 2,2325.C42 + 2,8006.C46 + 2,5432.C52 + 0,9892.C54 = S$$

Poznámka: Použitím 755 rôznych vzoriek mliečného tuku bolo stanovené s 99 % pravdepodobnosťou rozpätie $S = 97,96 - 102,04$ pre vzorky čistého mliečného tuku so štandardnou odchýlkou $SD = 0,39897$ pre všetky hodnoty S.

Od triglyceridového zloženia vzorky neznámeho tuku takýto vzorec umožňuje bez použitia počítača jednoduchým spôsobom overiť, či uvedený súčet obsahov triglyceridov so zodpovedajúcimi faktormi je mimo rozpätia $97,96 - 102,04$, a teda s najväčšou pravdepodobnosťou ide o vzorku s obsahom cudzieho tuku.

Tabuľka 2 znázorňuje rôzne triglyceridové vzorce pre zistenie obsahu rôznych cudzích tukov. Na zistenie obsahu cudzích tukov sójového oleja, slnečnicového oleja, olivového oleja, repkového oleja, ľanového oleja, oleja z pšeničných a kukuričných klíčkov, bavlníkového oleja, hydrogenizovaného rybieho oleja, rastlinných tukov z kokosovej a z palmovej dužiny, ako aj palmového oleja a hovädzieho loja sa dá použiť jednotný vzorec.

Keďže triglyceridové zloženie cudzích tukov sa tiež mení, použili sa štyri rôzne experimentálne zmerané údaje pre triglyceridy cudzích tukov rovnakého typu. (S rovnakými typmi cudzích tukov sa bral do úvahy najnepriaznivejší limit (pozri tabuľku 4).)

Nasledovným celkovým vzorcom je možné pre všetky cudzie tuky dosiahnuť podobne dobré výsledky:

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

Výpočty pre zisťovanie prítomnosti akejkoľvek kombinácie cudzieho tuku v mliečnom tuku ukázali, že napr. hoci v tabuľke uvedený limit pre bravčovú masť je nízky, t. j. 2,7 %, iné tuky, ako napríklad kokosový tuk, palmový olej alebo olej z palmovej dužiny s detekčnými limitmi 26,8, 12,5 a 19,3 % môžu týmto vzorcom byť zistené len vtedy, ak do mliečného tuku boli pridané extrémne vysoké množstvá. Toto platí aj pre ostatné vzorce uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Triglyceridové vzorce na zisťovanie prítomnosti rôznych cudzích tukov v mliečnom tuku, uvádzajúce štandardné odchýlky SD pre S

Vzorec pre sójový, slnečnicový, olivový, repkový, ľanový olej, olej z pšeničných klíčkov, olej z kukuričných klíčkov, bavlníkový a rybácí olej
$2,0983.C30 + 0,7288.C34 + 0,6927.C36 + 0,6353.C38 + 3,7452.C40 - 1,2929.C42 + 1,3544.C44 + 1,7013.C46 + 2,5283.C50 = S$; $SD = 0,38157$
Vzorec pre kokosový olej a olej z palmovej dužiny
$3,7453.C32 + 1,1134.C36 + 1,3648.C38 + 2,1544.C42 + 0,4273.C44 + 0,5809.C46 + 1,1226.C48 + 1,0306.C50 + 0,9953.C52 + 1,2396.C54 = S$; $SD = 0,11323$
Vzorec pre palmový olej a hovädzí olej
$3,6644.C28 + 5,2297.C30 - 12,5073.C32 + 4,4285.C34 - 0,2010.C36 + 1,2791.C38 + 6,7433.C40 - 4,2714.C42 + 6,3739.C46 = S$; $SD = 0,81094$
Vzorec pre bravčovú masť
$6,5125.C26 + 1,2052.C32 + 1,7336.C34 + 1,7557.C36 + 2,2325.C42 + 2,8006.C46 + 2,5432.C52 + 0,9892.C54 = S$; $SD = 0,39897$

Preto ak je vzorka pravdepodobne zmesou mliečného tuku a jedného zo 14 rôznych cudzích tukov alebo kombinácie týchto cudzích tukov, na kontrolu neznámej vzorky tuku sa musia použiť všetky vzorce uvedené v tabuľke 2, ako aj celkový vzorec (2). Ak sa dosadením triglyceridu vzorky tuku získa hodnota S, ktorá spadá mimo rozpätia čo len jedného z piatich vzorcov uvedených v tabuľke 3, vzorka je pravdepodobne modifikovaným mliečnym tukom. Zistenie prítomnosti cudzieho tuku v mliečnom tuku prostredníctvom jedného zo štyroch vzorcov uvedených v tabuľke 2 neumožňuje dospieť k záverom o type takéhoto cudzieho tuku.

Tabuľka 3

Limity S pre mliečne tuky

Vzorec na zisťovanie	Rozsah S
sójového, slnečnicového, olivového, repkového, ľanového oleja, oleja z peničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	98,05 – 101,95
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	99,42 – 100,58
palmového oleja a hovädzieho loja	95,90 – 104,10
bravčovej masti	97,96 – 102,04
celý vzorec	95,68 – 104,32

V tabuľke 4 sú uvedené detekčné limity rôznych cudzích tukov s 99 % pravdepodobnosťou. Prvý stĺpec ukazuje minimálny detekčný limit pre vzorec pre mliečny tuk z tabuľky 2. V druhom stĺpci sa nachádzajú detekčné limity pre celkový vzorec. Hoci tieto limity sú o niečo vyššie, len tento vzorec je potrebný na zistenie trochu vyšších množstiev cudzích tukov. Všetkými vzorcami sa tiež dajú zistiť kombinácie rôznych cudzích tukov. Rozpätia variácií triglyceridov rôznych cudzích tukov jedného typu nemajú na detekčné limity žiadny významný vplyv.

Tabuľka 4

99 % detekčné limity pridaním cudzieho tuku do mlieka v %

	Jednotlivý vzorec	Celkový vzorec
sójový olej	2,1	4,4
slnečnicový olej	2,3	4,8
olivový olej	2,4	4,7
kokosový tuk	3,5	4,3
palmový olej	4,4	4,7
olej z palmovej dužiny	4,6	5,9
repkový olej	2,0	4,4
ľanový olej	2,0	4,0
olej z pšeničných klíčkov	2,7	6,4
olej z kukuričných klíčkov	2,2	4,5
olej z bavlníkových semien	3,3	4,4
bravčová masť	2,7	4,7
hovädzí loj	5,2	5,4
hydrogenizovaný rybácí olej	5,4	6,1

Poznámka: Rozpätia S sú vypočítané tak, že pri prekročení limitov jednotlivých vzorcov sa prítomnosť cudzieho tuku len predpokladá (pozri tabuľku 4).

9. Kvantitatívne stanovenie obsahu cudzieho tuku

S cieľom získania kvantitatívnych informácií o koncentrácii cudzieho tuku vo vzorke mliečného tuku sa používa nasledovný vzorec

$$X(\%) = 100 \cdot |(100-S)/(100-S_F)|,$$

pričom X je množstvo neznámeho cudzieho tuku alebo zmesi cudzích tukov v neznámom mliečnom tuku. S vyplýva z prítomnosti neznámeho cudzieho tuku vloženie triglyceridov zmesi cudzieho tuku/mliečného tuku do vyššie uvedeného celkového triglyceridového vzorca. Ak je v mliečnom tuku prítomný cudzí tuk, za S_F sa považuje stredná hodnota S rôznych cudzích tukov pre celkový vzorec; táto stredná hodnota S sa získa dosadením údajov o triglyceridoch čistých cudzích tukov do tohto vzorca a vypočítaním strednej hodnoty ($S_F = 7,46$). Dobré kvantitatívne výsledky o prítomnosti cudzích tukov sa tiež dajú získať použitím vzorca pre palmový olej/hovädzí loj (tabuľka 2) so strednou hodnotou $S_F = 10,57$.

Pri známych typoch cudzieho tuku sa do vyššie uvedeného vzorca musia dosadiť nasledovné hodnoty S_F a zvoliť sa príslušný vzorec z tabuľky 2:

Tabuľka 5

Hodnoty SF rôznych cudzích tukov

Cudzí tuk	SF
sójový olej	8,18
slnečnicový olej	9,43
olivový olej	12,75
kokosový tuk	118,13
palmový olej	7,55
olej z palmovej dužiny	112,32
repkový olej	3,30
ľanový olej	4,44
olej z pšeničných klíčkov	27,45
olej z kukuričných klíčkov	9,29
olej z bavlníkových semien	41,18
bravčová masť	177,55
hovädzí loj	17,56
rybací olej	64,12

10. Rozsah aplikácie detekčnej metódy

Popísaná metóda sa dá aplikovať na mlieko a je založená na reprezentatívosti vzoriek mliečného tuku.

Možná by bola aj veľmi špecifická detekcia, ak by pre reprezentatívny počet vzoriek mliečného tuku boli odvodené vzorce pre rôzne štáty.

Osobitne vhodné podmienky by sa dali získať, ak by v rôznych štátoch vzorce podľa vyššie uvedeného popisu boli odvodené z reprezentatívneho počtu vzoriek mliečného tuku. V takom prípade nie je použitie zložitých počítačových programov potrebné, ak sa použijú triglyceridové kombinácie uvedené v tabuľke 2 a faktory sa zmenia použitím metódy najmenších štvorcov.

Aplikovaním rozpätí S uvedených v tabuľke 3 sú vzorce v určitých podmienkach kŕmenia, napríklad pri nedostatočnom kŕmení alebo kŕmení kráv kŕmnymi kvasinkami alebo Ca-mydami, vo všeobecnosti platné. Iba v prípadoch extrémneho kŕmenia (napr. vysoký príjem čistých kŕmnych olejov, vysoké dávky Ca-mydíel kombinovaných s kŕmnym tukom atď.) uvedené vzorce čiastočne naznačujú prítomnosť modifikovaného mliečného tuku.

Poznámka: Frakcionované mliečne tuky sa vo všeobecnosti uznávajú za nemodifikované mliečne tuky, keď sa modifikácia iba predpokladá, ak sú prekročené uvedené limity. Vzorce naznačujú modifikáciu len pri frakcionovaných mliečnych tukoch s nezvyčajným zložením mliečného tuku, ako napríklad v prípade tvrdej frakcie získanej frakcionáciou fyzikálnymi metódami pri teplotách vysokých približne 30 °C s malými zosťatkami len niekoľkých percent alebo frakcionáciou nadkritickým CO₂.

Frakcionácia mliečného tuku sa však dá zistiť použitím iných postupov, napr. diferenciálnou skenovacou kalorimetriou.

11. Presnosť metódy

Stanovená použitím mliečného tuku na základe vzorcov z tabuľky 2 a rozpätí S z tabuľky 3.

11.1. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi hodnotami S dvoch analýz uskutočnených v rámci najkratšieho možného časového intervalu jedným operátorom na rovnakom testovacom materiáli v rovnakých podmienkach (rovnaká osoba, rovnaké nástroje/rovnaké zariadenie, rovnaké laboratórium):

Tabuľka 6

Limity opakovateľnosti (r) pre rôzne vzorce

Vzorec na zisťovanie	r
sójového, slnečnicového, olivového, repkového, ľanového oleja, oleja z pšeničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	0,67
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	0,12
palmového oleja a hovädzieho loja	1,20
bravčovej masti	0,58
celý vzorec	1,49

11.2. *Reprodukovateľnosť*

Rozdiel medzi hodnotami S dvoch analýz uskutočnených operátormi v rôznych laboratóriách podľa rovnakého postupu na rovnakom testovacom materiáli v rôznych podmienkach (rôzne osoby, rôzne prístroje) v rôznom čase:

Tabuľka 7

Limity reprodukovateľnosti (R) pre rôzne vzorce

Vzorec na zisťovanie	R
sójového, slnečnicového, olivového, repkového, ľanového oleja, oleja z pšeničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	1,08
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	0,40
palmového oleja a hovädzieho loja	1,81
bravčovej masti	0,60
celý vzorec	2,07

11.3. *Kritická odchýlka*

S hodnotami limitov opakovateľnosti (r) a reprodukovateľnosti (R) je možné vypočítať kritickú odchýlku pre všetky rozpätia S z tabuľky 3 (duplicitné analýzy). Hodnoty sú uvedené v tabuľke 8.

Tabuľka 8

Kritické odchýlky pre všetky triglyceridové vzorce

Vzorec na zisťovanie	Rozsah
sójového, slnečnicového, olivového, repkového, ľanového oleja, oleja z pšeničných klíčkov, oleja z kukuričných klíčkov, bavlníkového a rybieho oleja	97,43 – 102,57
kokosového oleja a oleja z palmovej dužiny	99,14 – 100,86
palmového oleja a hovädzieho loja	94,91 – 105,09
bravčovej masti	97,65 – 102,35
celý vzorec	94,58 – 105,42

11.4. *Prijateľnosť výsledkov*

Všetky hodnoty obsahu triglyceridov C24, C26, C28 až C54, ako aj cholesterolu kalibrované na dve desatinné miesta musia byť presne normalizované na 100.

Výsledky duplicitnej analýzy sa používajú ako kontrola opakovateľnosti. Ak absolútny rozdiel medzi dvomi výsledkami S pre všetkých päť triglyceridových vzorcov neprekračuje limit opakovateľnosti r uvedený v tabuľke 6, požiadavka opakovateľnosti je splnená.

Na kontrolu optimálnych podmienok chromatografie a najmä kvality valcov sa musí garantovať, že pri 10 opakovaných kolách rozdiel maximálnej a minimálnej hodnoty S všetkých piatich triglyceridových vzorcov neprekračuje rozpätie $x \cdot r$, pričom $x = 1,58$ [pre 10 kôl, pozri zdroje (16)] a limity opakovateľnosti r pre rôzne vzorce uvedené v tabuľke 6.

12. **Citované normy**

DIN 10336: 1994	Zistenie a overenie prítomnosti cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou chromatografickej triglyceridovej analýzy
norma IDF 1C: 1987	Mlieko. Stanovenie obsahu tuku – Röse Gottliebova gravimetrická metóda
norma IDF 16C: 1987	Smotana. Stanovenie obsahu tuku – Röse Gottliebova gravimetrická metóda
norma IDF 116A: 1987	Zmrzlina na báze mlieka. Stanovenie obsahu tuku – Röse Gottliebova gravimetrická metóda
norma IDF 22B: 1987	Odstredené mlieko, srvátka a cmar. Stanovenie obsahu tuku – Röse Gottliebova gravimetrická metóda

13. **Zdroje**

1. Komisia Európskych spoločenstiev: Zistenie prítomnosti cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou chromatografickej triglyceridovej analýzy, dokument č. VI/5202/90-EN, VI/2645/91
2. Komisia Európskych spoločenstiev: Kontrola čistoty maslového tuku na 100 rôznych vzorkách rôznych kŕmnych období z 11 krajín EHS, dok. č. VI/4577/93
3. Komisia Európskych spoločenstiev: Hodnotenie výsledkov z prvého, druhého, tretieho, štvrtého, piateho a šiesteho kolaboratívneho pokusu EHS: Stanovenie prítomnosti triglyceridov v mliečnom tuku, dok.č VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93
4. Timms, R.E.: Zisťovanie a kvantifikácia nemliečného tuku v zmesiach mliečnych a nemliečnych tukov. Dairy Research 47 295-303 (1980)
5. Precht, D., Heine, K.: Dôkaz modifikovaného mliečného tuku triglyceridovou analýzou. Dôkaz cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou kombinácií triglyceridov, 41 406-410 (1986)
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: Ku dôkazu cudzích tukov v mliečnom tuku pomocou triglyceridovej analýzy. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. príloha 5, 42 29-35 (1987)
7. Precht, D.: Stanovenie prítomnosti rastlinných tukov alebo živočíšnych zásobných tukov v mliečnom tuku. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 42 143-157 (1989)
8. Precht D.: Rýchla extrakcia mliečného tuku. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 42 119-128 (1990)
9. Precht, D.: Rýchla plno-chromatografická triglyceridová analýza mliečného tuku. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 42 139-154 (1990)
10. Precht, D.: Kontrola čistoty mliečného tuku triglyceridovou plynovou chromatografickou analýzou. Kieler Milchwirtsch. Forschungber. 43 (3) 219-242 (1991)
11. Precht, D.: Zisťovanie falšovaného mliečného tuku masťou kyselinou) a triglyceridovou analýzou. Fat. Sci. Technol. 93 538-544 (1991)
12. Precht, D.: Zisťovanie cudzieho tuku v mliečnom tuku. Kvalitatívne zisťovanie triacylglycerolovým vzorcom. Kvantitatívne hodnotenie zmesí cudzích tukov. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992)
13. Precht, D.: Plynová chromatografia triacylglycerolov a iných lipidov na balených valcoch, v: CRC Handbook of Chromatography: Analysis of lipids, s. 123 – 138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkenin J.: Kvantitatívna triglyceridová analýza použitím krátkych kapilárnych valcov, Chroma-pack News 4 16-17 (1993).
15. Molkenin, J., Precht, D.: Porovnanie balených a kapilárnych valcov pre kvantitatívnu plynovú chromatografiu triglyceridov v mliečnom tuku. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: Aplikovaná štatistika, Prvá časť, Jednodimenzionálne problémy, Springer Verlag, Berlin, s. 378 (1970)

PRÍLOHA XXVI

Zoznam nariadení uvedených v hlavnom texte

- nariadenie Komisie (EHS) č. 1216/68 z 9. augusta 1968 ustanovujúce metódu pre stanovenie obsahu laktózy v kŕmnych zmesiach dovezených z tretích krajín ⁽¹⁾, zmenená a doplnená nariadením Komisie (EHS) č. 222/88 z 22. decembra 1987 o zmene a doplnení určitých opatrení o uplatňovaní spoločnej organizácie trhu s mliekom a mliečnymi výrobkami po zavedení kombinovanej nomenklatúry ⁽²⁾
- nariadenie Komisie (EHS) č. 3942/92 z 22. decembra 1992 ustanovujúce referenčnú metódu na stanovenie obsahu sitosterolu a stigmasterolu v maslovom tuku ⁽³⁾, naposledy zmenené a doplnené nariadením Komisie (ES) č. 175/1999 novelizujúceho nariadenia (EHS) č. 3942/92, (ES) č. 86/94, (ES) č. 1082/96 a (ES) č. 1459/98, ktorým sa ustanovujú referenčné metódy pre stanovenie obsahu určitých stopových látok v masle, maslovom tuku, maslovom oleji a smotane ⁽⁴⁾
- nariadenie Komisie (ES) č. 86/94 z 19. januára 1994 ustanovujúce referenčnú metódu na stanovenie obsahu sitosterolu a stigmasterolu v masle ⁽⁵⁾, v znení nariadenia (ES) č. 175/1999
- nariadenie Komisie (ES) č. 2721/95 z 24. novembra 1995 ustanovujúce pravidlá aplikácie referenčných a rutinných metód pre analýzu a hodnotenie kvality mlieka a mliečnych výrobkov na spoločnom trhu ⁽⁶⁾
- nariadenie Komisie (ES) č. 1080/96 zo 14. júna 1996 ustanovujúce referenčnú metódu na zisťovanie koliforiem v masle, odstredenom mlieku v prášku a kazeíne/kazeinátach ⁽⁷⁾
- nariadenie Komisie (ES) č. 1081/96 zo 14. júna 1996 ustanovujúce referenčnú metódu na zisťovanie kravského mlieka a kazeinátu v syroch vyrobených z ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka alebo zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka a zrušujúce nariadenie (EHS) č. 690/92 ⁽⁸⁾
- nariadenie Komisie (ES) č. 1082/96 zo 14. júna 1996 ustanovujúce referenčnú metódu na stanovenie obsahu etyl esteru beta-apo-8 karotenickej kyseliny v koncentrovanom masle a masle ⁽⁹⁾, v znení nariadenia (ES) č. 175/1999
- nariadenie Komisie (ES) č. 1854/96 z 26. septembra 1996 ustanovujúce zoznam referenčných metód určených na analýzu a hodnotenie kvality mlieka a mliečnych výrobkov podľa spoločnej organizácie trhu ⁽¹⁰⁾, v znení nariadenia (ES) č. 881/1999 ⁽¹¹⁾
- nariadenie Komisie (ES) č. 880/98 z 24. apríla 1998 ustanovujúce referenčné metódy na stanovenie obsahu vody, beztukovej sušiny a tuku v masle ⁽¹²⁾
- nariadenie Komisie (ES) č. 1459/98 z 8. júla 1998 ustanovujúce referenčnú metódu stanovenia obsahu vanilínu v koncentrovanom masle, masle alebo smotane ⁽¹³⁾, v znení nariadenia (ES) č. 175/1999

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 198, 10.8.1968, s. 13.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 28, 1.2.1988, s. 1.

⁽³⁾ Ú. v. ES L 399, 31.12.1992, s. 29.

⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 20, 27.1.1999, s. 22.

⁽⁵⁾ Ú. v. ES L 17, 20.1.1994, s. 7.

⁽⁶⁾ Ú. v. ES L 283, 25.11.1995, s. 7.

⁽⁷⁾ Ú. v. ES L 142, 15.6.1996, s. 13.

⁽⁸⁾ Ú. v. ES L 142, 15.6.1996, s. 15.

⁽⁹⁾ Ú. v. ES L 142, 15.6.1996, s. 26.

⁽¹⁰⁾ Ú. v. ES L 246, 27.9.1996, s. 5.

⁽¹¹⁾ Ú. v. ES L 111, 29.4.1999, s. 24.

⁽¹²⁾ Ú. v. ES L 124, 25.4.1998, s. 16.

⁽¹³⁾ Ú. v. ES L 193, 9.7.1998, s. 16.