

VYKONÁVACIE NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2018/150**z 30. januára 2018,****ktorým sa mení vykonávacie nariadenie (EÚ) 2016/1240, pokiaľ ide o metódy analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov oprávnených na verejnú intervenciu a pomoc na súkromné skladovanie**

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1306/2013 zo 17. decembra 2013 o financovaní, riadení a monitorovaní spoločnej poľnohospodárskej politiky a ktorým sa zrušujú nariadenia Rady (EHS) č. 352/78, (ES) č. 165/94, (ES) č. 2799/98, (ES) č. 814/2000, (ES) č. 1290/2005 a (ES) č. 485/2008⁽¹⁾, a najmä na článok 62 ods. 2 bod i),

keďže:

- (1) V delegovanom nariadení Komisie (EÚ) 2016/1238⁽²⁾ a vo vykonávacom nariadení Komisie (EÚ) 2016/1240⁽³⁾ sa stanovujú pravidlá týkajúce sa verejnej intervencie a pomoci na súkromné skladovanie. V nariadení Komisie (ES) č. 273/2008⁽⁴⁾ sa stanovujú metódy, ktoré sa majú použiť na posúdenie toho, či mlieko a mliečne výrobky spĺňajú požiadavky oprávnenosti na verejnú intervenciu a pomoc na súkromné skladovanie stanovené v uvedených nariadeniach.
- (2) Vzhľadom na technický vývoj v metodike používanej na analýzu a hodnotenie kvality mlieka a mliečnych výrobkov by sa mali vykonať podstatné zmeny s cieľom dosiahnuť zjednodušenie a zabezpečiť aktualizované odkazy na normy ISO. V záujme jasnosti a efektívnosti a vzhľadom na rozsah a technický charakter zmien ustanovení nariadenia (ES) č. 273/2008 by sa mali príslušné ustanovenia uvedeného nariadenia začleniť do vykonávacieho nariadenia (EÚ) 2016/1240.
- (3) Aby sa zabezpečilo jednotné dodržiavanie nových noriem a metód vo všetkých členských štátoch, laboratóriám by sa mal poskytnúť dostatočný čas na preskúmanie postupov a uplatnenie aktualizovaných metód.
- (4) Vykonávacie nariadenie (EÚ) 2016/1240 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť.
- (5) V záujme právnej istoty by sa nariadenie (ES) č. 273/2008 malo zrušiť.
- (6) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Výboru pre spoločnú organizáciu poľnohospodárskych trhov,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Vykonávacie nariadenie (EÚ) 2016/1240 sa mení takto:

1. Článok 4 sa mení takto:

a) Odsek 1 sa mení takto:

i) písmeno d) sa nahrádza takto:

„d) pri masle: v častiach I a Ia prílohy IV k tomuto nariadeniu;“;

ii) písmeno e) sa nahrádza takto:

„e) pri sušenom odstredenom mlieku: v častiach I a Ia prílohy V k tomuto nariadeniu.“

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 347, 20.12.2013, s. 549.⁽²⁾ Delegované nariadenie Komisie (EÚ) 2016/1238 z 18. mája 2016, ktorým sa dopĺňa nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1308/2013, pokiaľ ide o verejnú intervenciu a pomoc na súkromné skladovanie (Ú. v. EÚ L 206, 30.7.2016, s. 15).⁽³⁾ Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2016/1240 z 18. mája 2016, ktorým sa stanovujú pravidlá uplatňovania nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1308/2013, pokiaľ ide o verejnú intervenciu a pomoc na súkromné skladovanie (Ú. v. EÚ L 206, 30.7.2016, s. 71).⁽⁴⁾ Nariadenie Komisie (ES) č. 273/2008 z 5. marca 2008, ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá uplatňovania nariadenia Rady (ES) č. 1255/1999 týkajúce sa metód analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov (Ú. v. EÚ L 88, 29.3.2008, s. 1).

b) Odsek 2 sa nahrádza takto:

„2. Metódy používané na zisťovanie kvality obilnín, masla a sušeného odstredeného mlieka oprávnených na verejnú intervenciu uvedené v prílohách I, IV a V sú metódy stanovené v poslednom znení príslušných európskych, prípadne medzinárodných noriem, platnom najmenej 6 mesiacov pred prvým dňom obdobia verejnej intervencie vymedzeného v článku 12 nariadenia (EÚ) č. 1308/2013.“

2. Vkladá sa tento článok 60a:

„Článok 60a

Osobitné ustanovenia o kontrolách v súvislosti s verejnou intervenciou a pomocou na súkromné skladovanie v prípade mlieka a mliečnych výrobkov

1. Oprávnenosť mlieka, sušeného odstredeného mlieka a syra na získanie pomoci na súkromné skladovanie sa stanovuje v súlade s metódami stanovenými v prílohách VI, VII a VIII.

Uvedené metódy sa stanovujú odkazom na posledné znenie príslušných európskych, prípadne medzinárodných noriem, platnom najmenej 6 mesiacov pred prvým dňom obdobia verejnej intervencie vymedzeného v článku 12 nariadenia (EÚ) č. 1308/2013.

2. Výsledky kontrol vykonaných s použitím metód stanovených v tomto nariadení sa vyhodnocujú v súlade s prílohou IX.“

3. Prílohy sa menia v súlade s prílohou k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Nariadenie (ES) č. 273/2008 sa zrušuje.

Článok 3

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

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

V Bruseli 30. januára 2018

Za Komisiu
predseda
Jean-Claude JUNCKER

PRÍLOHA

Prílohy k vykonávaciemu nariadeniu (EÚ) 2016/1240 sa menia takto:

1. Príloha IV sa mení takto:

a) Druhý odsek v bode 2 časti I sa nahrádza takto:

„Každá vzorka sa musí posudzovať individuálne. Opakovaný výber vzorky ani opakované vyhodnocovanie nie je dovolené.“

b) Vkladá sa táto časť Ia:

„ČASŤ IA

Metóda analýzy nesoleného masla pre verejnú intervenciu

Parameter	Metóda
Tuk ⁽¹⁾	ISO 17189 alebo ISO 3727 časť 3
Voda	ISO 3727 časť 1
Beztuková sušina	ISO 3727 časť 2
Kyslosť tuku	ISO 1740
Peroxidové číslo	ISO 3976
Nemliečny tuk	ISO 17678
Senzorické vlastnosti	ISO 22935 časť 2 a 3 a ďalej uvedená tabuľka bodového hodnotenia.

(¹) Použitú metódu schvaľuje platobná agentúra.

Tabuľka bodového ohodnotenia

Vzhľad		Textúra		Vôňa a chuť	
Body	Poznámky	Body	Poznámky	Body	Poznámky
5	<i>veľmi dobrý</i> ideálny typ najvyššia kvalita (rovnomerne suché)	5	<i>veľmi dobrá</i> ideálny typ najvyššia kvalita (rovnomerne rozdielne)	5	<i>veľmi dobrá</i> ideálny typ najvyššia kvalita (úplne čistá najmenejšia aróma)
4	<i>dobrý</i> (žiadne viditeľné nedostatky)	4	<i>dobrá</i> (žiadne viditeľné nedostatky)	4	<i>dobrá</i> (žiadne viditeľné nedostatky)
1, 2 alebo 3	akýkoľvek nedostatok	1, 2 alebo 3	akýkoľvek nedostatok	1, 2 alebo 3	akýkoľvek nedostatok“

2. V prílohe V sa dopĺňa táto časť Ia:

„ČASŤ IA

Metóda analýzy sušeného odstredeného mlieka pre verejnú intervenciu

Parameter	Metóda
Bielkoviny	ISO 8968 časť 1
Tuk	ISO 1736
Voda	ISO 5537
Kyslosť	ISO 6091
Laktáty	ISO 8069
Test fosfatázy	ISO 11816 časť 1
Index nerozpustnosti	ISO 8156
Pripálené častice ⁽¹⁾	ADPI
Mikroorganizmy	ISO 4833 časť 1
Cmar	dodatok I
Syridlová srvátka ⁽²⁾	dodatky II a III
Kyslá srvátka ⁽³⁾	ISO 8069 alebo kontroly na mieste
Zmyslové kontroly ⁽⁴⁾	ISO 22935 časť 2 a 3

⁽¹⁾ Analýzy pripálených častíc možno vykonávať systematicky. Takéto analýzy by sa však vždy mali vykonávať v prípade, že sa nevykonávajú žiadne zmyslové kontroly.

⁽²⁾ Použitú metódu schvaľuje platobná agentúra.

⁽³⁾ Použitú metódu schvaľuje platobná agentúra.

⁽⁴⁾ Zmyslové kontroly sa vykonávajú v prípade, že sa považujú za potrebné na základe analýzy rizík schválenej platobnou agentúrou

Dodatok I

SUŠENÉ ODSSTREDENÉ MLIEKO: KVANTITATÍVNE STANOVENIE FOSFATIDYLSEŘÍNU A FOSFATIDYLETANOLAMÍNU**Metóda: HPLC s reverznou fázou**

1. ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA

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

2. VYMEDZENIE

Obsah PS +PE: hmotnostná frakcia látky stanovená pomocou uvedeného postupu. Výsledok sa vyjadruje v miligramoch dipalmitoyl-fosfatidylethanolamínu (PEDP) na 100 g prášku.

3. PRINCÍP METÓDY

Extrakcia aminofosfolipidov metanolom z obnoveného sušeného mlieka. Stanovenie obsahu PS a PE ako derivátov o-ftalaldehydu (OPA) pomocou HPLC s reverznou fázou (RP) a fluorescenčnou detekciou. Kvantifikácia obsahu PS a PE v testovanej vzorke porovnaním so štandardnou vzorkou obsahujúcou známe množstvo PEDP.

4. REAGENTY

Používajú sa len reagenty uznanej analytickej kvality. Používa sa destilovaná voda alebo voda s prinajmenším ekvivalentnou čistotou, ak nie je uvedené inak.

4.1. **Štandardný materiál: PEDP s čistotou najmenej 99 %**

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

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

4.2.1. Metanol kvality HPLC

4.2.2. Chloroform kvality HPLC

4.2.3. 2-(indol-3-yl)etylamin

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

4.3.1. Hydroxid sodný, vodný roztok 12 M

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

4.3.3. 2-sulfanyletán-1-ol

4.3.4. o-ftalaldehyd (OPA)

4.4. **Elučné rozpúšťadlá HPLC**

4.4.1. Eluenty sa pripravujú použitím reagentov HPLC kvality.

4.4.2. Voda HPLC kvality

4.4.3. Metanol fluorometricky testovanej čistoty

4.4.4. Tetrahydrofurán

4.4.5. Dihydrogénfosforečnan sodný

4.4.6. Octan sodný

4.4.7. Kyselina octová

5. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE
 - 5.1. **Analytické váhy schopné vážiť na najbližší 1 mg s presnosťou 0,1 mg**
 - 5.2. **Kadičky s objemom 25 a 100 ml**
 - 5.3. **Pipety umožňujúce dávkovať 1 a 10 ml kvapaliny**
 - 5.4. **Magnetické miešadlo**
 - 5.5. **Delené pipety, umožňujúce dávkovať 0,2, 0,5 a 5 ml kvapaliny**
 - 5.6. **Odmerné banky s objemom 10, 50 a 100 ml**
 - 5.7. **Striekačky s objemom 20 a 100 µl**
 - 5.8. **Ultrazvukový kúpeľ**
 - 5.9. **Odstredivka schopná prevádzky pri 27 000 × g**
 - 5.10. **Sklenené skúmavky s objemom približne 5 ml**
 - 5.11. **Odmerný valec s objemom 25 ml**
 - 5.12. **pH-meter s presnosťou na 0,1 pH jednotiek**
 - 5.13. **Vybavenie pre HPLC**
 - 5.13.1. *Gradientový čerpací systém nastaviteľný na 1 ml/ min pri 200 bar*
 - 5.13.2. *Automatický dávkovač vzoriek s možnosťou derivatizácie*
 - 5.13.3. *Kolónový termostat schopný udržiavať teplotu kolóny na 30 °C ± 1 °C*
 - 5.13.4. *Fluorescenčný detektor nastavený na vlnovú dĺžku excitácie 330 nm a vlnovú dĺžku emisie 440 nm*
 - 5.13.5. *Integrátor alebo program na spracovanie dát umožňujúci meranie plochy píku*
 - 5.13.6. *Kolóna LiChrospher® – 100 (250 × 4,6 mm) alebo ekvivalentná kolóna naplnená oktadecylsilánom (C 18), veľkosť častíc 5 µm (ODS).*
6. ODBER VZORIEK

Odber vzoriek sa vykoná v súlade s normou ISO 707.
7. POSTUP
 - 7.1. **Príprava interného štandardného roztoku**
 - 7.1.1. *Do 100 ml odmernej banky (5.6) odvážite 30,0 ± 0,1 mg 2-(indol-3-yl)etylaminu (4.2.3) a po značku doplňte metanolom (4.2.1)*
 - 7.1.2. *Do 10 ml odmernej banky (5.6) pipetujte 1 ml (5.3) tohto roztoku a doplňte po značku metanolom (4.2.1) aby ste získali koncentráciu 0,15 mM 2-(indol-3-yl)etylaminu*
 - 7.2. **Príprava roztoku testovanej vzorky**
 - 7.2.1. *Do 25 ml kadičky (5.2) odvážite 1,000 ± 0,001 g vzorky OSM. Pri 40 °C ± 1 °C pipetou (5.3) pridajte 10 ml destilovanej vody a premiešajte magnetickým miešadlom (5.4) počas 30 minút, aby sa rozpustili všetky hrudky*
 - 7.2.2. *Do 10 ml odmernej banky (5.6) napipetujte 0,2 ml (5.5) obnoveného mlieka, pomocou striekačky (5.7) pridajte 100 µl 0,15 mM roztoku 2-(indol-3-yl)etylaminu (7.1) a doplňte metanolom (4.2.1). Opatrne premiešajte prevracaním a vložte do ultrazvukového kúpeľa (5.8) na 15 minút*
 - 7.2.3. *Odstredte (5.9) pri 27 000 × g počas 10 minút a supernatant zachyťte do sklenenej skúmavky (5.10)*

Poznámka: Roztok testovanej vzorky by sa do vykonania analýzy HPLC mal skladovať pri teplote 4 °C

7.3. Príprava externého štandardného roztoku

- 7.3.1. Do 50 ml odmernej banky (5.6) odvážite 55,4 mg PEDP (4.1) a pomocou odmerného valca (5.11) pridajte približne 25 ml chloroformu (4.2.2). Uzavretú banku zohrejte na $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ a opatrne miešajte, pokým sa PEDP nerozpustí. Banku ochlaďte na 20 °C , doplňte metanolom (4.2.1) a premiešajte prevracaním
- 7.3.2. Napipetujte (5.3) 1 ml tohto roztoku do 100 ml odmernej banky (5.6) a doplňte metanolom (4.2.1) po značku. Napipetujte 1 ml (5.3) tohto roztoku do 10 ml odmernej banky (5.6), pridajte 100 μl (5.7) 0,15 mM roztoku 2-(indol-3-yl)etylaminu (7.1) a objem doplňte metanolom (4.2.1). Premiešajte obracaním

Poznámka: Roztok referenčnej vzorky by sa do vykonania analýzy HPLC mal skladovať pri teplote 4 °C

7.4. Príprava derivatizačného činidla

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

Poznámka: Derivatizačné činidlo by sa malo skladovať pri teplote 4 °C v tmavej fľaši a je stabilné jeden týždeň.

7.5. Analýza HPLC**7.5.1. Elučné roztoky (4.4)**

Roztok A: roztok 0,3 mM dihydrofosforečnanu sodného a roztoku 3 mM octanu sodného (upraveného na pH $6,5 \pm 0,1$ kyselinou octovou): metanol: tetrahydrofurán = 558:440:2 (v/v/v)

Roztok B: metanol

7.5.2. Navrhované hodnoty elučného gradientu:

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

Poznámka: S cieľom dosiahnuť rozlíšenie znázornené na obrázku 1 možno bude potrebné mierne prispôsobiť elučný gradient.

Teplota kolóny: 30 °C .

7.5.3. Objem nástreku: 50 μ l derivatizačného činidla a 50 μ l roztoku vzorky

7.5.4. Kondicionovanie kolóny

Pri dennom spúšťaní systému prepláchnite kolónu 100 % rozpúšťadlom B počas 15 minút, potom nastavte pomer A:B = 40:60 a premývajte pri 1 ml/min počas 15 minút. Uskutočnite slepé meranie nástrekom metanolu (4.2.1).

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

7.5.5. Stanovenie obsahu PS + PE v testovanej vzorke

7.5.6. Pri meraní sekvencie chromatografických analýz dodržiavajte rovnaký čas pre každý nástrek, aby sa dosiahli konštantné retenčné časy. Po každej 5 – 10 testovanej vzorke injektujte externý štandardný roztok (7.3) na výpočet reakčného faktora

Poznámka: Kolónu je potrebné po každom 20 – 25. nástreku vyčistiť prepláchnutím 100 % rozpúšťadla B (7.5.1.) najmenej počas 30 minút.

7.6. Spôsob integrácie

7.6.1. Pík PEDP

PEDP sa eluuje ako jeden pík. Plochu píku stanovte integráciou od spodnej časti pred píkom až k spodnej časti za píkom (valley-to-valley).

7.6.2. Pík 2-(indol-3-yl)etylamínu

2-(indol-3-yl)etylamín sa eluuje ako jeden pík (obrázok 1). Plochu píku stanovte integráciou od spodnej časti pred píkom až k spodnej časti za píkom (valley-to-valley).

7.6.3. Skupiny píkov PS a PE

Za opísaných podmienok (obrázok 1) sa PS eluuje ako dva hlavné čiastočne nerozlíšené píky, ktorým predchádza jeden menší pík. PE sa eluuje ako tri hlavné čiastočne nerozlíšené píky. Stanovte celkovú plochu každého zhluku píkov nastavením základnej čiary tak, ako je znázornené na obrázku 1.

8. VÝPOČET A VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Obsah PS a PE v testovanej vzorke sa vypočíta takto:

$$C = 55,36 \times [(A_2)/(A_1)] \times [(T_1)/(T_2)]$$

kde:

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

A₁ = plocha píku PEDP roztoku štandardnej vzorky (7.3)

A₂ = plocha píku PS alebo PE roztoku testovanej vzorky (7.2)

T₁ = plocha píku 2-(indol-3-yl)etylamínu roztoku štandardnej vzorky (7.3)

T₂ = plocha píku 2-(indol-3-yl)etylamínu roztoku testovanej vzorky (7.2)

9. PRESNOSŤ METÓDY

Poznámka: Hodnoty pre opakovateľnosť boli vypočítané podľa normy IDF (*).

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 rovnakej testovanej vzorke za krátky časový interval, nesmie presiahnuť relatívnu hodnotu 2 %. Ak sa dva výsledky získajú za týchto podmienok, relatívna odchýlka medzi týmito dvoma výsledkami nesmie byť väčšia ako 6 % aritmetického priemeru výsledkov.

9.2. Reprodukovateľnosť

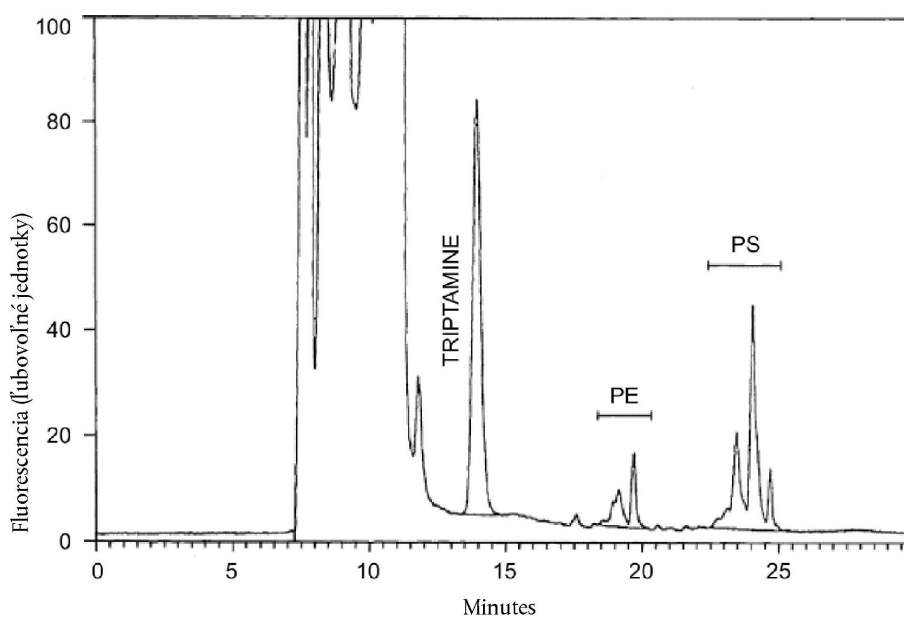
Ak dva výsledky získajú analytici analýzou tej istej testovanej vzorky v dvoch rôznych laboratóriách použitím rôznych prístrojov a v rôznych podmienkach, relatívna odchýlka medzi týmito dvoma výsledkami nesmie byť väčšia ako 11 % aritmetického priemeru výsledkov.

10. ODKAZY

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

Obrázok 1

HPLC záznam OPA derivátov fosfatidylserínu (PS) a fosfatidyletanolamínu (PE) v metanолоvom extrakte obnoveného sušeného odstredeného mlieka. Znázornený je spôsob integrácie pre píky PS, PE a tryptamínu (interný štandard)



Dodatok II

ZISŤOVANIE SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V SUŠENOM ODSŤREDENOM MLEKU URČENOM NA VEREJNÉ SKLADOVANIE STANOVENÍM OBSAHU KAZEÍNMAKROPEPTIDOV VYSOKOÚČINNOU KVAPALINOVOU CHROMATOGRAFIU (HPLC)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

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

2. ODKAZ

Medzinárodná norma ISO 707 – Mlieko a mliečne výrobky – návod na odber vzoriek.

3. DEFINÍCIA

Obsah pevnej syridlovej srvátky je definovaný ako hmotnostné percento obsahu kazeínmakropeptidov stanovených uvedeným postupom.

4. PRINCÍP

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

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

— Vyhodnotenie výsledku sa získa porovnaním vzoriek so štandardnými vzorkami, obsahujúcimi sušené odstredené mlieko s prídavkom alebo bez prídavku známeho percentuálneho podielu sušenej srvátky.

5. REAGENTY

Používajú sa len reagenty uznanej analytickej kvality. Používa sa destilovaná voda alebo voda s prinajmenšom ekvivalentnou čistotou.

5.1. **Roztok kyseliny trichlóroctovej**

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

5.2. **Elučný 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 síranu sodného (Na_2SO_4). Podľa potreby upravte pH na hodnotu 6,0 použitím roztoku kyseliny fosforečnej alebo hydroxidu draselného.

Doplňte objem vodou na 1 000 ml a zhomogenizujte.

Poznámka: Zloženie eluentu možno upraviť tak, aby zodpovedalo osvedčeniu noriem alebo odporúčaniam výrobcu plniacich materiálov do kolón.

Elučný roztok pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s pórní s priemerom 0,45 μm .

5.3. **Premývací roztok**

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 akýkoľvek iný premývací roztok s baktericídny účinkom, ktorý neovplyvňuje rozlišovaciu schopnosť kolóny.

5.4. **Štandardné vzorky**

5.4.1. Sušené odstredené mlieko vyhovujúce požiadavkám tohto nariadenia (t. j. [0])

5.4.2. To isté sušené odstredené mlieko falšované pridaním 5 % (m/m) sušenej srvátky syridloveho typu štandardného zloženia (t. j. [5])

6. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE
 - 6.1. **Analytické váhy**
 - 6.2. **Voliteľné: odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2 200 g, vybavená uzavierateľnými odstredovacími skúmavkami s objemom približne 50 ml**
 - 6.3. **Mechanická trepačka**
 - 6.4. **Magnetické miešadlo**
 - 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. **Delené pipety umožňujúce dávkovať 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A, alebo ISO/R 835) alebo dávkovací systém schopný dávkovať 10,0 ml kvapaliny za dve minúty**
 - 6.9. **Dávkovací systém schopný dávkovať 20,0 ml vody s teplotou okolo 50 °C**
 - 6.10. **Termostatický vodný kúpeľ nastavený na 25 ± 0,5 °C**
 - 6.11. **Zariadenie HPLC pozostávajúce z:**
 - 6.11.1. Čerpadla
 - 6.11.2. Injektora, ručného alebo automatického s kapacitou 15 až 30 µl
 - 6.11.3. Dvoch kolón TSK 2 000-SW v sérii (dĺžka 30 cm, vnútorný priemer 0,75 cm) alebo ekvivalentných kolón (napr. jednej TSK 2 000-SWxl, jednej Agilent Technologies Zorbax 250) a predkolóny (3 cm × 0,3 cm) plnených I 125 alebo materiálom s ekvivalentnou účinnosťou
 - 6.11.4. Kolónového termostatu nastaveného na 35 ± 1 °C
 - 6.11.5. UV detektora s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou, ktorý umožňuje merania pri 205 nm s citlivosťou 0,008 Å
 - 6.11.6. Integrátora na meranie výšky pík

Poznámka: Práca s kolónami ponechanými pri izbovej teplote je možná, avšak ich rozlišovacia schopnosť je o niečo nižšia. V takom prípade by výkyvy teploty mali byť menšie než 5 °C v každom rozpätí analýzy.
7. ODBER VZORIEK
 - 7.1. Vzorky sa musia odberať v súlade s postupom stanoveným v medzinárodnej norme ISO 707. Členské štáty však môžu použiť aj inú metódu odberu vzoriek za predpokladu, že je v súlade so zásadami vyššie uvedenej normy
 - 7.2. Vzorku skladujte v podmienkach vylučujúcich akékoľvek znehodnotenie alebo zmenu zloženia
8. POSTUP
 - 8.1. **Príprava testovanej vzorky**

Sušené mlieko vložte do nádoby s objemom rovnajúcim sa približne dvojnásobku jeho objemu, ktorá je vybavená vzduchotesným vekom. Nádobu ihneď zatvorte. Sušené mlieko dobre premiešajte opakovaným prevracaním nádoby.
 - 8.2. **Testovaná dávka**

Odvážte 2,000 ± 0,001 g testovanej vzorky do odstredovacej skúmavky (6.2) alebo vhodnej banky s uzáverom (50 ml).
 - 8.3. **Odstránenie tukov a bielkovín**
 - 8.3.1. Do dávky testovanej vzorky pridajte 20,0 ml teplej vody (50 °C). Prášok rozpustíte pretrepaním počas piatich minút pomocou mechanickej trepačky (6.3). Skúmavku vložte do vodného kúpeľa (6.10) a nechajte ustátiť na 25 °C

8.3.2. V priebehu dvoch minút pridajte 10,0 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (5.1), ktorá má teplotu okolo 25 °C, za súčasného intenzívneho miešania magnetickým miešačom (6.4). Skúmavku umiestnite na 60 minút do vodného kúpeľa (6.10)

8.3.3. Vzorku odstreďte (6.2) počas 10 minút pri 2 200 g alebo prefiltrujte cez papier (6.6) a prvých 5 ml filtrátu vylejte

8.4. Chromatografické stanovenie

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

Poznámka 1. Možno použiť aj iný prietok v závislosti od vnútorného priemeru použitých kolón alebo pokynov výrobcu kolóny.

Poznámka 2. Kolóny opláchnite vodou počas každého prerušenia. Nikdy v nich nenechávajte elučný roztok (5.2).

Pred každým prerušením dlhším ako 24 hodín prepláchnite kolóny vodou, potom ich premyte roztokom (5.3.) najmenej tri hodiny pri prietoku 0,2 ml za minútu.

8.4.2. Výsledky chromatografickej analýzy testovanej vzorky [E] sa získajú vo forme chromatogramu, v ktorom je každý pík identifikovaný podľa svojho retenčného času RT nasledovne:

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

Výber kolóny, resp. kolón môže podstatne ovplyvniť retenčné časy jednotlivých píkov.

Integrátor (6.11.6) automaticky vypočíta plochu A každého píku:

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

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

V prípade pochybností analýzu zopakujte.

8.5. Kalibrácia

8.5.1. Pri štandardných vzorkách (5.4) použite presne postup opísaný v bodoch 8.2 až 8.4.2

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

8.5.2. Pred chromatografickým stanovením vzoriek kondicionujte kolóny opakovanou injektážou štandardnej vzorky (5.4.2) v roztoku (8.5.1), pokiaľ sa plocha a retenčný čas píku zodpovedajúceho CMP neustália na konštantných hodnotách

8.5.3. Responzné faktory R stanovte injektovaním rovnakých objemov filtrátov (8.5.1), aké sa použili pri vzorkách

9. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

9.1. Metóda výpočtu a vzorce

9.1.1. Výpočet responzných faktorov R:

Pík II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
---------	----------------------------

kde:

R_{II} = responzný faktor píku II

$A_{II} [0]$ = plochy píkov II štandardných vzoriek [0] získaných v bode 8.5.3

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

kde:

- R_{III} = responzný faktor píku III
 $A_{III}[0]$ and $A_{III}[5]$ = plochy píku III v štandardných vzorkách [0] a [5] získaných v bode 8.5.3
 W = množstvo srvátky v štandardnej vzorke [5], t. j. 5

9.1.2. Výpočet relatívnej plochy píkov vo vzorke [E]

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

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

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

kde:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = relatívne plochy píkov II, III a IV vo vzorke [E],
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = plochy píkov II a III vo vzorke [E] získané podľa bodu 8.4.2,
 R_{II} , R_{III} = responzný faktor vypočítaný podľa bodu 9.1.1

9.1.3. Výpočet relatívneho retenčného času píku III vo vzorke [E]:

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

kde:

- $RRT_{III}[E]$ = relatívny retenčný čas píku III vo vzorke [E],
 $RT_{III}[E]$ = retenčný čas píku III vo vzorke [E] získaný v bode 8.4.2,
 $RT_{III}[5]$ = retenčný čas píku III kontrolnej vzorky [5] získaný v bode 8.5.3.

9.1.4. Pokusmi sa preukázalo, že medzi relatívnym retenčným časom píku III, t. j. $RRT_{III}[E]$, a percentuálnym podielom sušenej srvátky pridanej v množstve do 10 % je lineárna závislosť

- $RRT_{III}[E]$ je < 1,000, ak je obsah srvátky > 5 %,
- $RRT_{III}[E]$ je \geq 1,000, ak je obsah srvátky \leq 5 %,

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

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

9.2. Výpočet percentuálneho podielu sušenej syridlovej srvátky vo vzorke

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

kde:

- W = hmotnostné percento syridlovej srvátky vo vzorke [E];
 $S_{III}[E]$ = relatívna plocha píku III testovanej vzorky [E] získanej podľa bodu 9.1.2;
1,3 = predstavuje relatívnu priemernú plochu píku III vyjadrenú v gramoch syridlovej srvátky na 100 g stanovenú v nefalšovanom sušenom odstredenom mlieku rôzneho pôvodu. Toto číslo bolo získané experimentálne;
 $S_{III}[0]$ = predstavuje relatívnu plochu píku III, ktorá sa rovná $R_{III} \times A_{III}[0]$. Tieto hodnoty sa získajú v bodoch 9.1.1 a 8.5.3;
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ = predstavuje korekciu, ktorú treba vykonať na relatívnej priemernej ploche 1,3, keď $S_{III}[0]$ sa nerovná 0,9. Experimentálne sa relatívna priemerná plocha píku III kontrolnej vzorky [0] rovná 0,9.

9.3. **Presnosť postupu**9.3.1. *Opakovateľnosť*

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

9.3.2. *Reprodukovateľnosť*

Rozdiel medzi dvoma osobitnými a nezávislými výsledkami, získanými v dvoch rôznych laboratóriách na identickom testovanom materiáli nesmie presiahnuť 0,4 % m/m.

9.4. **Interpretácia**9.4.1. *Nepriítomnosť srvátky sa predpokladá, ak relatívna plocha píku III, S_{III} [E], vyjadrená v gramoch syridlovej srvátky na 100 g výrobku, je $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$,*

kde

2,0	je maximálna povolená hodnota relatívnej plochy píku III s prihliadnutím na relatívnu priemernú plochu píku III, t. j. 1,3, neistotu spôsobenú variáciami v zložení sušeného odstredného mlieka a reprodukovateľnosť metódy (9.3.2),
$(S_{III} [0] - 0,9)$	je korekcia, ktorú treba vykonať, ak je plocha $S_{III} [0]$ iná než 0,9 (pozri bod 9.2)

9.4.2. *Ak je relatívna plocha píku III, S_{III} [E] $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ a relatívna plocha píku II, S_{II} [E] ≤ 160 , obsah syridlovej srvátky stanovte podľa bodu 9.2.*9.4.3. *Ak je relatívna plocha píku III, S_{III} [E] $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ a relatívna plocha píku II, S_{II} [E] ≤ 160 , stanovte celkový obsah bielkovín (P %); následne preskúmajte grafy 1 a 2.*9.4.3.1. *Údaje získané po analýze vzoriek nefalšovaného sušeného odstredného mlieka s vysokým celkovým obsahom bielkovín sú zhrnuté v grafoch 1 a 2.*

Nepřerušovaná čiara predstavuje lineárnu regresiu, ktorej koeficienty sú vypočítané metódou najmenších štvorcov.

Prerušovaná čiara stanovuje horný limit relatívnej plochy píku III, a to s pravdepodobnosťou, že nebude prekročená v 90 % prípadov.

Rovnice pre prerušované čiary v grafoch 1 a 2 sú:

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

kde:

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

P % je celkový obsah bielkovín vyjadrený v hmotnostných %.

S_{II} [E] je relatívna plocha vzorky vypočítaná podľa bodu 9.1.2.

Tieto rovnice sú ekvivalentné s hodnotou 1,3 uvedenou 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 nasledovného vzorca: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P\% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$ $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

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

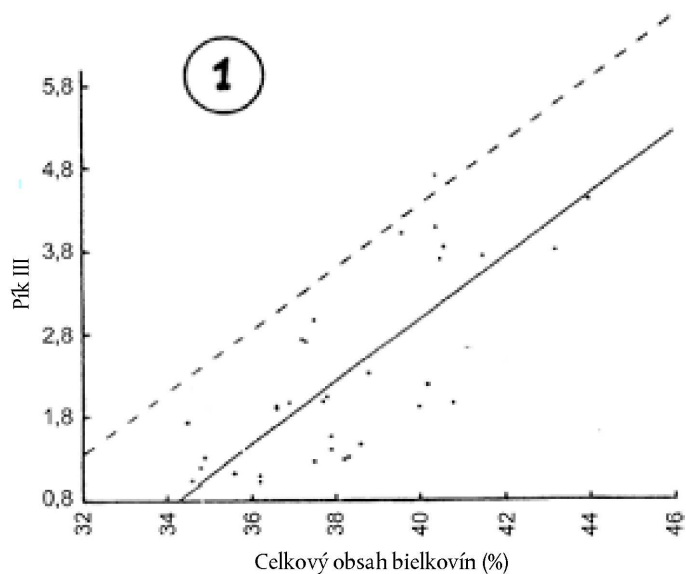
Ak T_1 a T_2 sú vyššie ako nula, syridlová srvátka je prítomná.

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

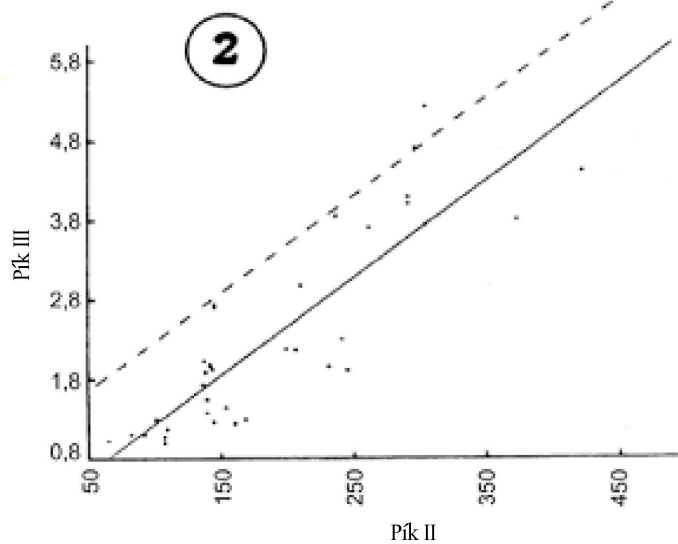
kde:

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

Sušené odstredené mlieko



Sušené odstredené mlieko



Dodatok III

STANOVENIE PEVNEJ SYRIDLOVEJ SRVÁTKY V SUŠENOM ODSSTREDENOM MLEKU

1. ÚČEL: ZISTENIE PRÍDAVKU PEVNEJ SYRIDLOVEJ SRVÁTKY DO SUŠENÉHO ODSSTREDENÉHO MLEKA
2. ODKAZY: MEDZINÁRODNÁ NORMA ISO 707
3. DEFINÍCIA
Obsah sušiny syridlovej srvátky sa definuje ako hmotnostný zlomok stanovený obsahom kazeínmakropeptidov podľa uvedeného postupu.
4. PRINCÍP
Vzorky sa analyzujú na kazeínmakropeptid A metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s reverznou fázou. Vyhodnotenie výsledku sa získa porovnaním vzoriek so štandardnými vzorkami, obsahujúcimi sušené odstredené mlieko s prídavkom alebo bez prídavku známeho percentuálneho podielu sušenej srvátky. Výsledky vyššie ako 1 % (m/m) dokazujú prítomnosť pevnej syridlovej srvátky.
5. REAGENTY
Používajú sa len reagenty uznanej analytickej kvality. Používa sa destilovaná voda alebo voda s prinajmenšom ekvivalentnou čistotou. Acetonitril by mal byť spektroskopickej alebo HPLC kvality.
- 5.1. **Roztok kyseliny trichlóroctovej**
Rozriedte 240 g kyseliny trichlóroctovej (CCl_3COOH) vo vode a doplňte do 1 000 ml. Roztok by mal byť čistý a bezfarebný.
- 5.2. **Eluenty A a B**
Eluent A: do 1 000 ml odmernej banky nadávajte 150 ml acetonitrilu (CH_3CN), 20 ml propán-2-olu ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) a 1 ml kyseliny trifluóroctovej (TFA, CF_3COOH). Doplňte vodou na 1 000 ml.
Eluent B: do 1 000 ml odmernej banky nadávajte 550 ml acetonitrilu, 20 ml propán-2-olu a 1 ml TFA. Doplňte vodou na 1 000 ml. Elučný roztok pred použitím prefiltrujte cez membránový filter s póromi s priemerom 0,45 μm .
- 5.3. **Uchovávanie kolóny**
Po analýzach sa kolóna prepláchne eluentom B (gradientom) a následne sa prepláchne acetonitrilom (gradientom počas 30 minút). Kolóna sa skladuje v acetonitrile.
- 5.4. **Štandardné vzorky**
 - 5.4.1. *Sušené odstredené mlieko spĺňajúce požiadavky pre verejné skladovanie (t. j. [0]).*
 - 5.4.2. *To isté sušené odstredené mlieko falšované pridaním 5 % (m/m) sušenej srvátky syridloveho typu štandardného zloženia (t. j. [5]).*
 - 5.4.3. *To isté sušené odstredené mlieko falšované pridaním 50 % (m/m) sušenej srvátky syridloveho typu štandardného zloženia (t. j. [50]).*
6. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE
 - 6.1. **Analytické váhy**
 - 6.2. **Voliteľné: odstredivka schopná dosiahnuť odstredivú silu 2 200 g, vybavená uzavierateľnými odstredovacími skúmavkami s objemom približne 50 ml**
 - 6.3. **Mechanická trepačka**
 - 6.4. **Magnetické miešadlo**
 - 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. **Delené pipety, umožňujúce dávkovať 10 ml kvapaliny (ISO 648, trieda A alebo ISO/R 835) alebo dávkovací systém schopný dávkovať 10,0 ml kvapaliny za dve minúty**
- 6.9. **Dávkovací systém schopný dávkovať 20,0 ml vody o teplote okolo 50 °C**
- 6.10. **Termostatický vodný kúpeľ nastavený na 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Zariadenie HPLC pozostávajúce z:**
 - 6.11.1. Binárneho gradientového čerpaceho systému
 - 6.11.2. Automatického alebo manuálneho injektora s kapacitou 100 µl
 - 6.11.3. Kolóny Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (dĺžka 25 cm, vnútorný priemer 0,46 cm) alebo ekvivalentnej kolóny s reverznou fázou na báze silikagélu, s veľkými pórmí
 - 6.11.4. Kolónového termostatu nastaveného na 35 ± 1 °C
 - 6.11.5. UV detektora s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou, umožňujúceho merania pri 210 nm (v prípade potreby sa môže použiť vyššia vlnová dĺžka do 220 nm), s citlivosťou 0,02 Å.
 - 6.11.6. Integrátora s možnosťou nastaviť integráciu na obvyklú základnú čiaru alebo integráciu od spodnej časti pred píkom až k spodnej časti za píkom (valley-to-valley).

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

7. ODBER VZORIEK

7.1. **Vzorky sa odoberajú v súlade s postupom stanoveným v medzinárodnej norme ISO 707. Členské štáty však môžu použiť aj inú metódu odberu vzoriek za predpokladu, že je v súlade so zásadami uvedenej normy.**

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

8. POSTUP

8.1. Príprava testovanej vzorky

Sušené mlieko vložte do nádoby s objemom rovnajúcim sa približne dvojnásobku jeho objemu, ktorá je vybavená vzduchotesným vekom. Nádobu ihneď zatvorte. Sušené mlieko dobre premiešajte opakovaným prevracaním nádoby.

8.2. Testovaná dávka

Do odstreďovacej skúmavky (6.2) alebo vhodnej banky s uzáverom (50 ml) odvážte 2,00 ± 0 001 g testovanej vzorky.

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

8.3. Odstránenie tukov a bielkovín

8.3.1. Do dávky testovanej vzorky pridajte 20,0 ml teplej vody (50 °C). Prášok rozpustíte pretrepaním pomocou mechanickej trepačky počas piatich minút (6.3.). Skúmavku vložte do vodného kúpeľa (6.10) a nechajte ustáliť na 25 °C.

8.3.2. V priebehu dvoch minút plynule pridávajte 10 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej s teplotou asi 25 °C (5.1) za súčasného intenzívneho miešania magnetickým miešadlom (6.4). Skúmavku umiestnite na 60 minút do vodného kúpeľa (6.10).

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

8.4. Chromatografické stanovenie

- 8.4.1. Metóda HPLC s reverznou fázou vylučuje možnosť falošne pozitívnych výsledkov spôsobených prítomnosťou sušeného kyslého cmaru.
- 8.4.2. Pred uskutočnením analýzy HPLC s reverznou fázou je potrebné optimalizovať podmienky gradientu. Optimálnym retenčným časom pre CMP_A v prípade gradientových systémov s mŕtvym objemom asi 6 ml (objem od bodu, kde sa spájajú rozpúšťadlá, do objemu nástrekovej slučky vrátane) je 26 ± 2 minúty. Pri gradientových systémoch s nižším mŕtvym objemom (napr. 2 ml) sa za optimálny retenčný čas považuje 22 minút.

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

Do prístroja HPLC, pracujúceho za podmienok skúšobného gradientu uvedených v tabuľke 1 injektujte 100 μ l supernatantu alebo filtrátu (8.3.3).

Tabuľka 1

Podmienky skúšobného gradientu pre optimalizáciu chromatografie

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

Porovnanie dvoch chromatogramov by malo odhaliť miesto píku CMP_A .

Pomocou nižšie uvedeného vzorca možno vypočítať počiatočné zloženie rozpúšťadla použitého pre normálny gradient (pozri 8.4.3) $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) \times 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) \times 1,11$

kde:

RT_{CMP_A} : retenčný čas CMP_A v skúšobnom gradiente

10: počiatočné % B skúšobného gradientu

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

13,5: stredný bod skúšobného gradientu

26: požadovaný retenčný čas CMP_A

6: pomer sklonov skúšobného a normálneho gradientu

30: % B v počiatočnom bode mínus % B po 27 minútach v skúšobnom gradiente

27: čas skúšobného gradientu.

8.4.3. Použite roztoky testovaných vzoriek.

Do prístroja HPLC nastaveného na prietok elučného roztoku (5.2) 1,0 ml za minútu injektujte 100 μ l presne odmeraného supernatantu alebo filtrátu (8.3.3).

Zloženie eluentu na začiatku analýzy sa získava podľa bodu 8.4.2. Za normálnych okolností je to približne A: B = 76: 24 (5.2). Ihneď po injektáži sa spustí lineárny gradient, ktorý spôsobí, že po 27 minútach sa B zvýši o 5 %. Následne sa spustí lineárny gradient ktorý spôsobí, že zloženie eluentu dosiahne za päť minút 90 % B. Toto zloženie sa udržiava počas piatich minút a po piatich minútach sa zloženie zmení prostredníctvom lineárneho gradientu na počiatočné zloženie. V závislosti od vnútorného objemu čerpaceho systému je možné ďalšiu injektáž uskutočniť po 15 minútach od dosiahnutia počiatočných podmienok.

Poznámka 1. Retenčný čas CMP_A je 26 ± 2 minúty. To je možné dosiahnuť zmenou počiatočných a konečných podmienok prvého gradientu. Rozdiel v % B medzi počiatočnými a konečnými podmienkami však zostáva 5 % B.

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

Poznámka 3. Po každých piatich vzorkách by sa mala injektovať referenčná vzorka [5], ktorá sa používa na výpočet nového responzného faktora R (9.1.1).

- 8.4.4. Výsledky chromatografickej analýzy testovanej vzorky (E) sa získavajú vo forme chromatogramu, v ktorom je pík CMP_A identifikovaný svojim retenčným časom približne 26 minút.

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

Poznámka: Ak je pík CMP_A dostatočne oddelený od ostatných píkov, malo by sa použiť umiestnenie základnej čiary 'valley-to-valley'. V opačnom prípade použite zvislé kolmice na obvyklú základnú čiaru, ktorých počiatočný bod by mal byť v blízkosti píku CMP_A (teda nie v čase $t = 0$ min.). V prípade štandardnej vzorky aj vzoriek použite rovnaký druh integrácie a v prípade obvyklej základnej čiary skontrolujte jej zhodnosť pre vzorky a štandardnú vzorku.

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

8.5. Kalibrácia

- 8.5.1. Pri štandardných vzorkách (5.4.1 až 5.4.2) použite presne postup opísaný v bodoch 8.2 až 8.4.4. Použite čerstvo pripravené roztoky, pretože CMP v prostredí 8 % kyseliny trichlóroctovej pri izbovej teplote degraduje. Pri 4 °C je roztok stabilný počas 24 hodín. V prípade dlhých sérií analýz je v automatickom injektore vhodné použiť chladený zásobník na vzorky.

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

Chromatogram referenčnej vzorky [5] by mal byť analogický s obrázkom. 1. Na tomto obrázku predchádzajú píku CMP_A dve malé píky. Je nevyhnutné dosiahnuť podobnú separáciu.

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

Na chromatograme by nemal byť pík v retenčnom čase CMP_A .

- 8.5.3. Responzné faktory R stanovte injektovaním rovnakého objemu filtrátu (8.5.1), aký sa použil pri vzorkách.

9. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

9.1. Metóda výpočtu a vzorce

- 9.1.1. Výpočet responzného faktora R:

$$\text{pík } CMP_A: R = W/H$$

kde:

R = reakčný faktor píku CMP_A

H = výška píku CMP_A

W = množstvo srvátky v štandardnej vzorke [5]

9.2. Výpočet percentuálneho podielu sušenej syridlovej srvátky vo vzorke

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

kde:

$W(E)$ = hmotnostné percento syridlovej srvátky vo vzorke (E)

R = responzný faktor píku CMP_A (9.1.1)

$H(E)$ = výška píku CMP_A vzorky (E)

Sušina syridlovej srvátky je prítomná, ak $W(E)$ je väčšie ako 1 % a rozdiel medzi retenčným časom a retenčným časom štandardnej vzorky [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 s použitím rovnakých prístrojov na identickom testovanom materiáli nesmie presiahnuť 0,2 % m/m.

9.3.2. Reprodukovateľnosť

Nestanovená.

9.3.3. Linearita

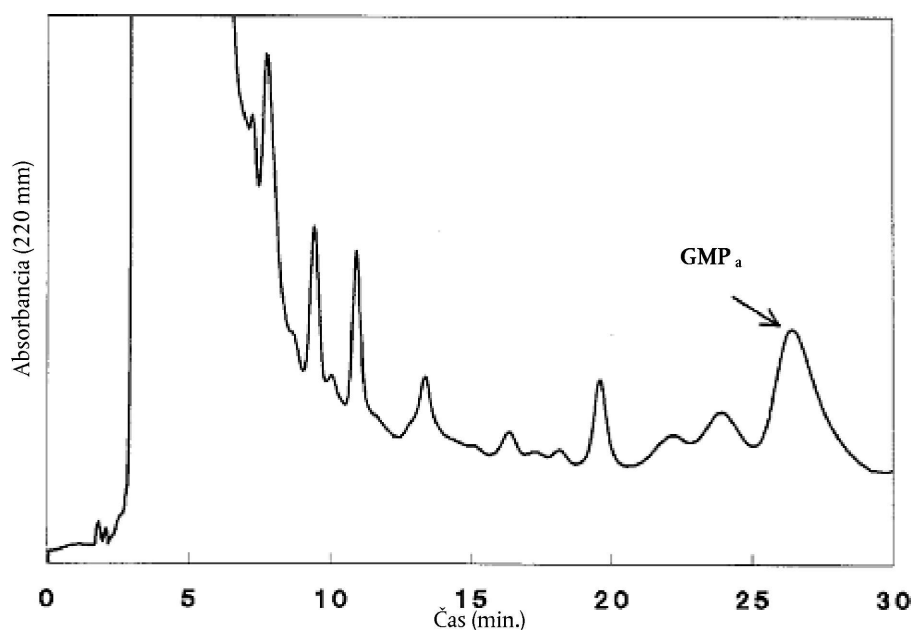
Pre hodnoty od 0 do 16 % syridlovej srvátky by sa mala dosiahnuť lineárna závislosť s koeficientom korelácie > 0,99.

9.4. Interpretácia

Limit 1 % zahŕňa neistotu s ohľadom na reprodukovateľnosť.

Obrázok 1

Ni -4,6 štandard



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

3. Dopĺňajú sa tieto prílohy:

„PRÍLOHA VI

Metódy analýzy masla v súkromnom skladovaní

Parameter	Metóda
Tuk ⁽¹⁾	ISO 17189 alebo ISO 3727 časť 3
Voda	ISO 3727 časť 1
Beztuková sušina (okrem soli)	ISO 3727 časť 2
Soľ	ISO 15648

⁽¹⁾ Použitú metódu schvaľuje platobná agentúra.

PRÍLOHA VII

Metóda analýzy sušeného odstredeného mlieka v súkromnom skladovaní

Parameter	Metóda
Tuk	ISO 1736
Bielkoviny	ISO 8968 časť 1
Voda	ISO 5537

PRÍLOHA VIII

Metódy analýzy syrov v súkromnom skladovaní

1. Na overenie toho, že syr, ktorý sa vyrába výlučne z ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka, alebo zo zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka, neobsahuje kazeín z kravského mlieka, sa používa analytická metóda uvedená v dodatku.

Prítomnosť kazeínu z kravského mlieka sa považuje za preukázanú, ak je obsah kazeínu z kravského mlieka v analyzovanej vzorke rovnaký alebo vyšší ako obsah v referenčnej vzorke obsahujúcej 1 % kravského mlieka, ako sa uvádza v dodatku.

2. Metódy na zisťovanie prítomnosti kazeínu z kravského mlieka v syroch uvedených odseku 1 je možné použiť, ak:

- a) detekčný limit je maximálne 0,5 % a
- b) neexistujú žiadne falošne pozitívne výsledky a
- c) kazeín z kravského mlieka je zistiteľný s požadovanou citlivosťou aj po dlhom čase zrenia, k čomu môže dôjsť v bežných obchodných podmienkach.

Ak nie je splnená niektorá z uvedených požiadaviek, použijú sa referenčné metódy uvedené v dodatku.

Dodatok

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

1. ROZSAH

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

2. OBLASŤ POUŽITIA

Metóda je vhodná na citlivé a špecifické zisťovanie prírodného a tepelne upraveného mlieka a kazeinátu v čerstvých a zrejúcich syroch vyrobených z ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka, alebo zo zmesí kozieho, ovčieho a byvolieho mlieka. Nie je vhodná na zisťovanie falšovania mlieka a syra tepelne upravenými bielkovinovými koncentrátmi z kravskej srvátky.

3. PRINCÍP METÓDY

3.1. Izolácia kazeínov zo syra a referenčných štandardov

3.2. Rozpustenie izolovaných kazeínov a prevedenie plazmínového (EC.3.4.21.7) štiepenia

3.3. Izoelektrická fokusácia plazmínovaných kazeínov za prítomnosti močoviny a farbenie bielkovín

3.4. Hodnotenie zafarbených γ_3 a γ_2 -kazeínových záznamov (dôkaz prítomnosti kravského mlieka) porovnaním záznamu získaného zo vzorky so záznamami získanými z rovnakého gélu z referenčných štandardných roztokov obsahujúcich 0 % a 1 % kravského mlieka.

4. REAGENTY

Ak nie je uvedené inak, použijú sa chemikálie analytickej kvality. Použije sa dvojnásobne destilovaná voda alebo voda ekvivalentnej čistoty.

Poznámka: Nasledujúci podrobný popis použite na laboratórne pripravené polyakrylamidové gély obsahujúce močovinu s rozmermi 265 × 125 × 0,25 mm. Ak sa použije iná veľkosť a typ gélu, môže byť potrebná úprava podmienok separácie.

Izoelektrická fokusácia

4.1. Reagenty pre výrobu polyakrylamidových gélov obsahujúcich močovinu

4.1.1. Zásobný gélový roztok

Vo vode rozpusťte:

4,85 g akrylamidu

0,15 g N, N'-metyléndiakrylamidu (BIS)

48,05 g močoviny

15,00 g glycerolu (87 % hm.)

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

Poznámka: Namiesto uvedených pevne stanovených hmotností neurotoxických akrylamidov možno použiť komerčne dostupný namiešaný roztok akrylamidu a BIS. Ak takýto roztok obsahuje 30 % hm./obj. akrylamidu a 0,8 % hm./obj. BIS, namiesto uvedených presne stanovených hmotností sa na zmiešanie roztoku použije objem 16,2 ml komerčného roztoku. Trvanlivosť zásobného roztoku je maximálne 10 dní; ak je jeho vodivosť väčšia ako 5 μ S, deionizujte ho miešaním s 2 g amberlitu MB-3 počas 30 minút a potom ho prefiltrujte cez membránový filter s veľkosťou pórov 0,45 μ m.

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

250 μ l amfolytu pH 5 – 7

250 μ l amfolytu pH 6 – 8

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

Poznámka: Gélový roztok pripravte 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 % hm./obj. peroxidisíran diamónny (PER):

Rozpusťte 800 mg PER vo vode a doplňte vodu do 2 ml.

Poznámka: Vždy používajte čerstvo pripravený roztok PER.

4.2. Kontaktná kvapalina

Kerozín alebo kvapalný parafín

4.3. Anódový roztok

Vo vode rozpusťte 5,77 g kyseliny fosforečnej (85 % hm.) a doplňte na 100 ml.

4.4. Katódový roztok

Vo vode rozpusťte 2 g hydroxidu sodného a doplňte vodou na 100 ml.

Príprava vzorky

4.5. Reagenty na izoláciu bielkovín

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

4.5.2. Dichlórmetán

4.5.3. Acetón

4.6. Tlmivý roztok rozpúšťajúci bielkoviny

Vo vode rozpusťte

5,75 g glycerolu (87 % hm.)

24,03 g močoviny

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

doplňte vodou do 50 ml.

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

4.7. Reagenty pre plazmínové štiepenie kazeínov**4.7.1. Tlmivý roztok uhličitanu amónneho**

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

4.7.2. Plazmín z kravského mlieka (EC. 3.4.21.7), s aktivitou najmenej 5 U/ml**4.7.3. Roztok kyseliny ϵ -aminohexánovej na inhibíciu enzýmov**

Rozpusťte 2,624 g kyseliny ϵ -aminohexánovej (kyselina 6-amino-n-hexánová) v 100 ml 40 % (obj.) etanolu.

4.8. Referenčné štandardy

4.8.1. Certifikované referenčné štandardy zmesi odstredeného ovčieho a kozieho mlieka upraveného syridlom s obsahom 0 % a 1 % kravského mlieka sú dostupné v Inštitúte Komisie pre referenčné materiály a merania (Commission's Institute for Reference Materials and Measurements), B-2440 Geel, Belgicko.

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

Odstredené mlieko sa pripraví odstredením buď byvolieho, alebo kravského surového mlieka pri podmienkach 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 % štandardu pridajte do 495 ml byvolieho odstredeného mlieka 5 ml kravského odstredeného mlieka v kadičke s objemom 1 liter a pridaním zriedenej kyseliny mliečnej (10 % hm./obj.) upravte pH na 6,4. Teplotu nastavte na 35 °C a pridajte 100 μ l teľacieho syridla (aktivita syridla 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), miešajte 1 minútu a potom kadičku prikryte hliníkovou fóliou a nechajte jednu hodinu odstáť pri teplote 35 °C, aby sa vytvoril tvaroh. Po vytvorení tvarohu celé mlieko upravené syridlom vysušte mrazom bez predošlej homogenizácie alebo zliatia srvátky. Po vysušení mrazom je roztok vhodný na vytvorenie homogénneho prášku. Na prípravu 0 % štandardného roztoku uskutočnite rovnaký postup s použitím pravého byvolieho odstredeného mlieka. Štandardy sa musia skladovať pri teplote – 20 °C.

Poznámka: Pred prípravou štandardného roztoku sa odporúča skontrolovať čistotu byvolieho mlieka izoelektrickou fokusáciou plazmínovaných kazeínov.

Reagenty na farbenie bielkovín**4.9. Ustáľovač**

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

4.10. Roztok na odfarbovanie

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

Poznámka: Roztok na odfarbovanie pripravte každý deň čerstvý; môže sa pripraviť zmiešaním rovnakých objemov zásobných roztokov 50 % (obj.) metanolu a 20 % (obj.) 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 % (obj.) metanolu magnetickým miešadlom (miešajte asi 45 minút), prefiltrujte cez dva stredne rýchle skladané filtre.

4.11.2. Roztok na farbenie (zásobný roztok 2)

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

4.11.3. Roztok na farbenie (pracovný roztok)

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

Poznámka: Roztok na farbenie by sa mal pripraviť v deň použitia.

5. VYBAVENIE
 - 5.1. Sklenené platničky (265 × 125 × 4 mm); gumený valček (šírka 15 cm); vyrovnávacía 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. Elektrofokusačná komora s chladiacou doskou (napr. 265 × 125 mm) a vhodným zdrojom energie ($\geq 2,5$ kV) alebo automatické elektroforézne zariadenie
 - 5.5. Cirkulačný kryostat s termostatickou kontrolou na $12 \pm 0,5$ °C
 - 5.6. Odstredivka nastaviteľná na 3 000 g
 - 5.7. Elektródy (≥ 265 mm dlhé)
 - 5.8. Plastové fľaše s kvapkadlom na anódový a katódový roztok
 - 5.9. Aplikátory vzoriek (10 × 5 mm, viskóznový papier alebo papier s nízkou absorpciou bielkovín)
 - 5.10. Nerezové alebo sklenené misky na farbenie a odfarbovanie (napr. podnosy na nástroje s rozmermi 280 × 150 mm)
 - 5.12. Nastaviteľný tyčový homogenizátor (priemer hriadeľa 10 mm), 8 000 až 20 000 ot/min
 - 5.13. Magnetické miešadlo
 - 5.14. Ultrazvukový kúpeľ
 - 5.15. Zváračka fólií
 - 5.16. Mikropipety na 25 μ l
 - 5.17. Vákuový koncentrátor alebo lyofilizátor
 - 5.18. Termostaticky kontrolovaný vodný kúpeľ nastaviteľný na 35 a 40 ± 1 °C, s možnosťou pretrepiania
 - 5.19. Denzitometer umožňujúci meranie pri vlnovej dĺžke $\lambda = 634$ nm
6. POSTUP
 - 6.1. **Príprava vzorky**
 - 6.1.1. *Izolácia kazeínov*

Do odstreďovacej skúmavky s objemom 100 ml odvážte množstvo syra alebo referenčných štandardov zodpovedajúce 5 g sušiny, pridajte 60 ml destilovanej vody a homogenizujte tyčovým homogenizátorom (8 000 až 10 000 ot/min). Hodnotu pH upravte na 4,6 zriedenou kyselinou octovou (4.5.1) a odstredíte (5 minút, 3 000 g). Zlejte tuk a srvátku, rezíduum homogenizujte pri 20 000 ot/min v 40 ml destilovanej vody s pH upraveným na 4,5 zriedenou kyselinou octovou (4.5.1), pridajte 20 ml dichlórmetánu (4.5.2), opäť homogenizujte a odstredíte (5 minút, 3 000 g). Špachtličkou odstráňte vrstvu kazeínu, ktorá sa nachádza medzi vodnou a organickou vrstvou (pozri obrázok 2) a zlejte obe vrstvy. Kazeín znova homogenizujte v 40 ml destilovanej vody (pozri vyššie) a 20 ml dichlórmetánu (4.5.2) a odstredíte. Tento postup opakujte, pokiaľ nebudú obe extrakčné vrstvy bezfarebné (dva až trikrát). Bielkovinové rezíduum homogenizujte s 50 ml acetónu (4.5.3) a prefiltrujte cez stredne rýchly skladaný filtračný papier. Rezíduum z filtra zakaždým zmyte dvoma osobitnými 25 ml dávkami acetónu a nechajte vyschnúť na vzduchu alebo pod prúdom dusíka a potom ho rozdrvte na jemný prášok v mažiari.

Poznámka: Suché izoláty kazeínu by sa mali skladovať pri -20 °C.

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

V 0,5 ml tlmivého roztoku uhličitanu amónneho (4.7.1.) rozpustíte 25 mg izolovaných kazeínov (6.1.1.) a 20 minút ich homogenizujte napr. použitím ultrazvuku. Zohrejte ich na 40 °C a pridajte 10 μ l plazmínu (4.7.2), premiešajte a inkubujte 1 hodinu pri teplote 40 °C za stáleho pretrepávania. Na inhibovanie enzýmu pridajte 20 μ l roztoku kyseliny ϵ -aminohexánovej (4.7.3) a následne pridajte 200 mg pevnej močoviny a 2 mg (2R,3S)-1,4-disulfanylbután-2,3-diolu (dithiothreitolu).

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

6.2. Príprava polyakrylamidových gélov s obsahom močoviny

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

Do pripraveného a odvdzdušeného gélového roztoku (4.1.2) pridajte 10 µl Temeđu (4.1.3.1), premiešajte a pridajte 10 µl roztoku PER (4.1.3.2), dôkladne premiešajte a ihneď rovnomerne nalejte na stred krycej fólie. Jeden okraj platničky s gélom (s fóliou otočenou smerom dole) položte na platničku s krycou fóliou a pomaly ju pritlačte tak, aby sa medzi platničkami vytvorila rovnomerne rozotretá gélová vrstva bez bubliniek (obrázok 3). Pomocou tenkej špachtle opatrne pritlačte doštičku s gélom po celom povrchu a na vrch umiestnite ďalšie tri sklenené doštičky ako závažie. Po ukončení polymerizácie (približne 60 minút) odstráňte gél polymerizovaný na fólii na gél spolu s krycou fóliou tak, že sklenené doštičky nakloníte. Opačnú stranu fólie na gél pozorne očistite, aby ste odstránili zvyšky gélu a močovinu. Gélový „sendvič“ zverte do fólie a uskladnite stočený do rúrky v chladničke (maximálne šesť týždňov).

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

6.3. Izoelektrická fokusácia

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

Podmienky izoelektrickej fokusácie:

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

Krok	Čas (min.)	Napätie (V)	Prúd (mA)	Výkon (W)	Volthodiny (Vh)
1. Predbežná fokusácia	30	maximálne 2 500	maximálne 15	konštantný 4	c. 300
2. Fokusácia vzorky (1)	60	maximálne 2 500	maximálne 15	konštantný 4	c. 1 000
3. Záverečná fokusácia	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) Použitie vzorky: po predbežnej fokusácii (etapa 1) napipetujte 18 µl vzorky a štandardného roztoku do aplikátorov vzorky (10 × 5 mm), uložte ich na gél vo vzdialenosti 1 mm od seba a 5 mm pozdĺž anódy a zľahka pritlačte. Vykonajte fokusáciu podľa uvedených podmienok, po 60 minútach od fokusácie vzorky tieto aplikátory opatrne vyberte

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

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

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

Aplikátor vzorky vložte v kroku 2 pri 0 Vh.

Aplikátor vzorky odstráňte v kroku 2 pri 30 Vh.

6.4. Farbenie bielkovín

6.4.1. Ustálenie bielkovín

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

6.4.2. Umývanie a farbenie gélovej platničky

Dôkladne odstráňte ustaľovač a gélovú platničku premyte dvakrát počas 30 sekúnd 100 ml roztokom na odfarbovanie (4.10). roztok na odfarbovanie vylejte a misku naplňte 250 ml roztokom na farbenie (4.11.3.); nechajte ho pôsobiť za jemného pretrepávania počas 45 minút.

6.4.3. Odfarbenie gélovej platničky

Roztok na farbenie vylejte, gélovú platničku zakaždým dvakrát premyte pomocou 100 ml roztoku na odfarbovanie (4.10.), následne pretrepte s 200 ml roztoku na odfarbovanie počas 15 minút a postup odfarbenia opakujte najmenej dva alebo trikrát, pokiaľ nie je pozadie čisté a bezfarebné. Potom gélovú platničku 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 vykonávajúte pri teplote 20 °C. Nepoužívajte vyššie teploty.

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

7. HODNOTENIE

Hodnotenie sa vykonáva porovnaním záznamov bielkovín neznámej vzorky s referenčnými štandardmi na tom istom géle. Obsah kravského mlieka v syroch z ovčieho mlieka, kozieho mlieka a byvolieho mlieka a zo zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka sa detekuje prostredníctvom γ_3 - a γ_2 -kazeínov, ktorých izoelektrické body sú v rozmedzí pH 6,5 a pH 7,5 (obrázky 4a, 4b a 5). Detekčný limit je nižší ako 0,5 %.

7.1. Vizuálny odhad

Pri vizuálnom hodnotení množstva kravského mlieka sa odporúča upraviť koncentrácie vzoriek a štandardných roztokov s cieľom dosiahnuť rovnakú úroveň intenzity v prípade ovčích, kozích a/alebo byvolích γ_2 - a γ_3 -kazeínov (pozri hodnoty „ γ_2 E,G,B“ a „ γ_3 E,G,B“ v obrázkoch 4a, 4b a 5) Následne možno posúdiť množstvo kravského mlieka (menej ako 1 %, 1 % alebo viac ako 1 %) v neznámej vzorke, a to priamo porovnaním intenzity hovädzích γ_3 - a γ_2 -kazeínov (pozri „ γ_3 C“ a „ γ_2 C“ na obrázkoch 4a, b a na obrázku 5) s intenzitou kazeínov v 0 % a 1 % referenčných štandardoch (ovčie, kozie) alebo v dočasných laboratórnych štandardoch (byvolie).

7.2. Denzitometrický odhad

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

Poznámka: Metóda funguje uspokojivo, ak je jasný pozitívny signál v prípade oboch hovädzích γ_2 - a γ_3 -kazeínov v 1 % referenčnom štandarde, ale nie v 0 % referenčnom štandarde. V opačnom prípade postup optimalizujte presným dodržaním pokynov stanovených v danej metóde.

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

8. ODKAZY

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

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

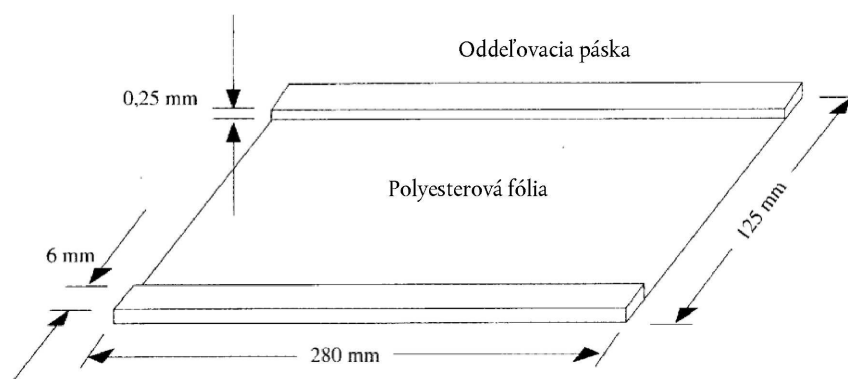
Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393,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

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

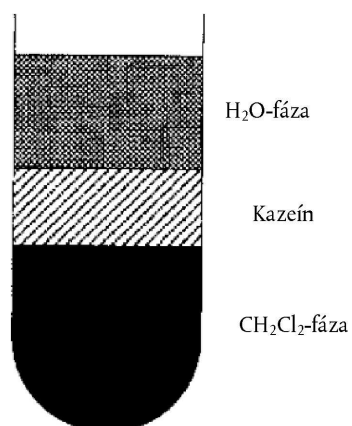
Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

Obrázok 1

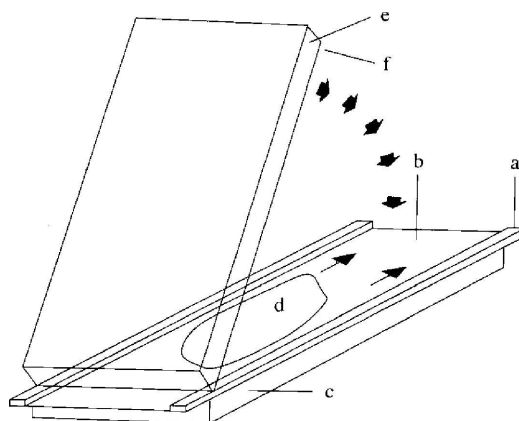
Schematický náčrt krycej fólie



Obrázok 2

Kazeínová vrstva plávajúca medzi vodnou a organickou fázou po odstredení

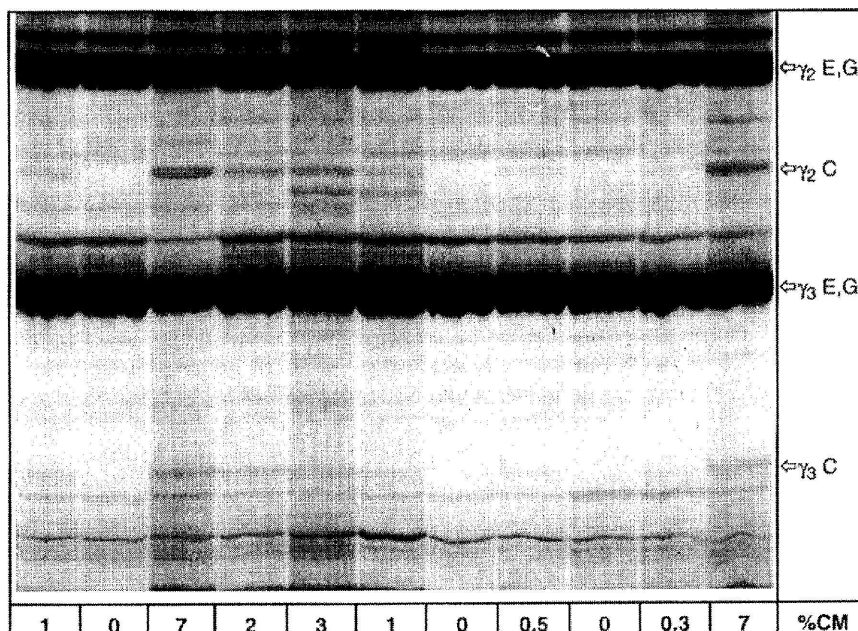
Obrázok 3

Klapková technika liatia ultratenkých polyakrylamidových gélov

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

Obrázok 4a

Izoelektrická fokusácia kazeínov ošetrovaných plazmínom z ovčieho a kozieho syra s obsahom rôznych množstiev kravského mlieka

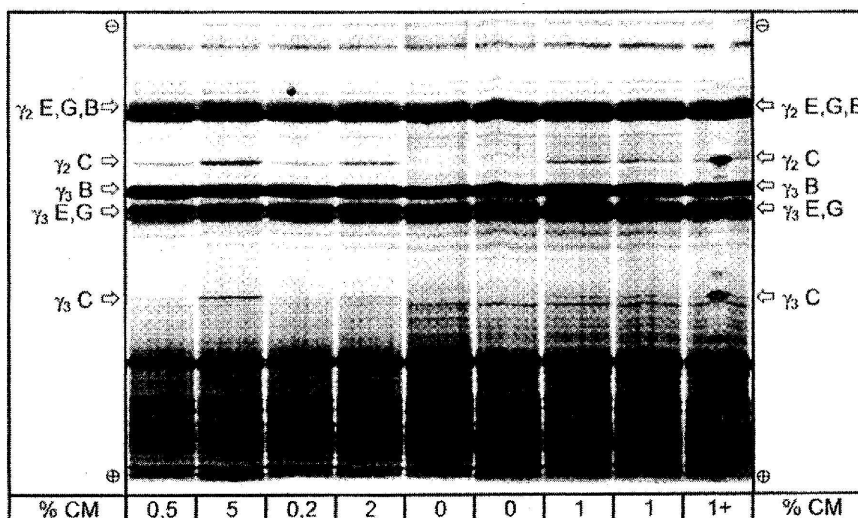


% CM = percentuálny podiel kravského mlieka, C = krava, E = ovca, G = koza

Znázornená je horná polovica izoelektricky fokusovaného gélu.

Obrázok 4b

Izoelektrická fokusácia kazeínov ošetrovaných plazmínom zo syra vyrobeného zo zmesi ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka s obsahom rôznych množstiev kravského mlieka

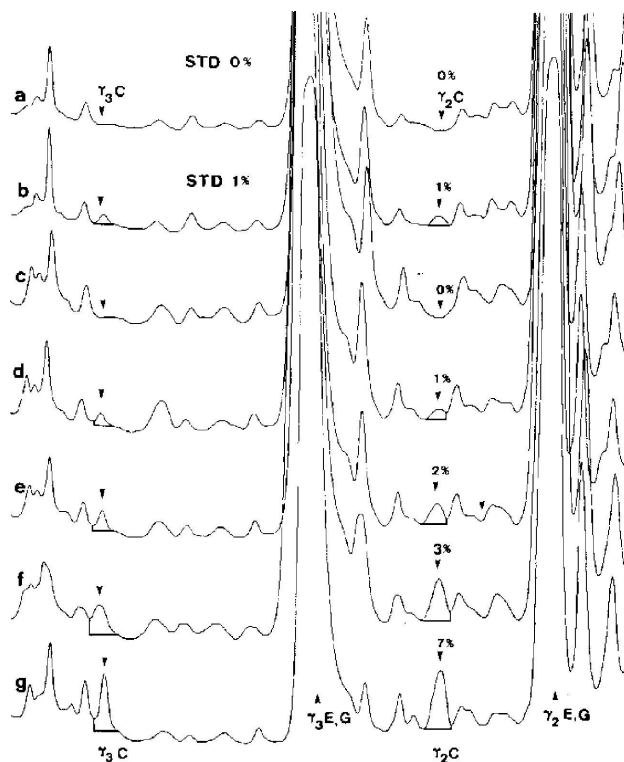


% CM = percentuálny podiel kravského mlieka; 1+ = vzorka obsahujúca 1 % kravského mlieka s pridaním čistého kravského kazeínu v strede stopy. C = krava, E = ovca, G = koza, B = byvol.

Znázornená je celková separačná vzdialenosť izoelektricky fokusovaného gélu.

Obrázok 5

Superpozícia denzitogramov štandardných roztokov (STD) a vzoriek syra vyrobeného zo zmesi ovčieho a kozieho mlieka po izoelektrickej fokusácii



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

Horná polovica IEF gélu bola skenovaná pri $\lambda = 634$ nm.

PRÍLOHA IX

Hodnotenie analýz**1. Zabezpečenie kvality**

Analýzy sa vykonávajú v laboratóriách určených v súlade s článkom 12 nariadenia (ES) č. 882/2004 (**) alebo vymenovaných príslušným orgánmi členského štátu.

2. Odber vzoriek a spory týkajúce sa výsledkov analýz

1. Vzorky sa odoberajú v súlade s príslušným nariadením vzťahujúcim sa na posudzovaný výrobok. Ak nie sú výslovne stanovené žiadne ustanovenia o odbere vzoriek, použijú sa ustanovenia normy ISO 707 – Mlieko a mliečne výrobky – návod na odber vzoriek.
2. Laboratórne správy o výsledkoch analýz obsahujú dostatočné informácie na vyhodnotenie výsledkov, ktoré sa vykoná v súlade s dodatkom.
3. Na analýzy požadované podľa pravidiel Únie sa odoberajú duplicitné vzorky.
4. Ak vznikne spor v súvislosti s výsledkami, platobná agentúra nechá opätovne vykonať potrebnú analýzu dotknutého výrobku, pričom náklady znáša strana, ktorá v spore nebola úspešná.

Uvedená analýza sa vykoná za predpokladu, že sú k dispozícii zapečatené duplicitné vzorky výrobku a že tieto boli riadne uskladnené na príslušnom orgáne. Výrobca zašle platobnej agentúre žiadosť, aby vykonala analýzu do 7 pracovných dní po oznámení výsledkov prvej analýzy. Platobná agentúra vykoná túto analýzu do 21 pracovných dní od prijatia žiadosti.

5. Výsledok odvolacieho konania sa považuje za konečný.
6. Ak môže hospodársky subjekt do piatich pracovných dní od odberu vzorky dokázať, že postup odberu vzorky sa neuskutočnil správne, odber vzorky sa podľa možnosti zopakuje. Ak sa odber vzorky nemôže zopakovať, zásielka sa akceptuje.

Dodatok

Hodnotenie súladu zásielky so zákonom stanovenými medznými hodnotami**1. Princíp**

Ak sa v právnych predpisoch týkajúcich sa verejnej intervencie a súkromného skladovania stanovujú podrobné postupy odberu vzoriek, dodržia sa tieto postupy. Vo všetkých ostatných prípadoch sa používajú najmenej tri jednotky vzorky náhodne odobraté zo zásielky predloženej na kontrolu. Môže sa pripraviť súhrnná vzorka. Získaný výsledok sa porovnáva so zákonom stanovenými medznými hodnotami na základe výpočtu 95 % intervalu spoľahlivosti ako dvojnásobku štandardnej odchýlky, pričom príslušná štandardná odchýlka závisí od toho, 1. či je metóda validovaná prostredníctvom medzinárodnej spolupráce na základe hodnôt pre σ_r a σ_R , alebo 2. v prípade internej validácie od toho, či je vypočítaná interná reprodukovateľnosť. Tento interval spoľahlivosti sa potom rovná neistote merania výsledku.

2. Metóda je validovaná prostredníctvom medzinárodnej spolupráce

V tomto prípade sa stanovila štandardná odchýlka opakovateľnosti σ_r a štandardná odchýlka reprodukovateľnosti σ_R a laboratórium môže preukázať zhodu s prevádzkovými charakteristikami validovanej metódy.

Vypočítajte aritmetický priemer \bar{x} z počtu n opakovaných meraní.

Vypočítajte rozšírenú neistotu ($k = 2$) z \bar{x} takto:

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

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

Zásielka sa považuje za zásielku nespĺňajúcu hornú zákonom stanovenú medznú hodnotu UL, ak

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

inak sa považuje za zásielku, ktorá je v súlade s UL.

Zásielka sa považuje za zásielku nespĺňajúcu dolnú zákonom stanovenú medznú hodnotu LL, ak

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

inak sa považuje za zásielku, ktorá je v súlade s LL.

3. Interná validácia na základe výpočtu štandardnej odchýlky internej reprodukovateľnosti

V prípadoch, v ktorých sa používajú metódy, ktoré nie sú vymedzené v tomto nariadení, a neboli stanovené presné kritériá, vykoná sa interná validácia. Namiesto σ_r a σ_R sa vo vzorci na výpočet rozšírenej neistoty U použije štandardná odchýlka internej opakovateľnosti s_r a štandardná odchýlka internej reprodukovateľnosti s_R .

Pravidlá, ktoré sa majú dodržiavať na účely overenia súladu so zákonom stanovenou medznou hodnotou, sú stanovené v bode 1. Ak sa však zásielka považuje za nespĺňajúcu zákonom stanovenú medznú hodnotu, merania sa zopakujú s použitím metódy určenej v tomto nariadení a výsledok sa vyhodnotí v súlade s bodom 1.

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

(**) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 z 29. apríla 2004 o úradných kontrolách uskutočňovaných s cieľom zabezpečiť overenie dodržiavania potravinového a krmivového práva, a predpisov o zdraví zvierat a o starostlivosti o zvieratá (Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1).“