



Útmutató

Tejalapanyag tartalom meghatározása egyres élelmiszer termékek körében, a népegészségügyi termékadó megállapítása kapcsán



Nemzeti Adó- és Vámhivatal Szakértői Intézete
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal ÉTbI
Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet

Tartalomjegyzék

Az Útmutató célja.....	3
Jogi háttér	3
Az Útmutató jogállása	3
Tejalapanyag tartalom meghatározása.....	4
1. Bevezető, fogalommeghatározás	4
2. Termékkör meghatározása.....	4
3. A tejalapanyag számításhoz szükséges paraméterek és vizsgálati módszereik.....	4
3.1. Szárazanyag tartalom/nedvességtartalom meghatározás.....	4
3.2. Tejzsírtartalom meghatározás.....	5
3.3. Laktóztartalom meghatározás.....	5
3.4. Tejfehérje tartalom meghatározás	5
3.4.1. Tejfehérje tartalom meghatározás tisztán tej eredetű nitrogén tartalmú mátrixok esetében.....	5
3.4.2. Tejfehérje tartalom meghatározása nem csak tej eredetű nitrogén tartalmú mátrixok esetében.....	6
4. A tejalapanyag tartalom számítása	7
Mellékletek.....	8
I. melléklet: Kakaótartalmú élelmiszerek, csokoládék tejzsírtartalmának meghatározása kivont zsírból	8
1. Tárgy és alkalmazási terület.....	8
2. Fogalommeghatározás.....	8
3. A módszer elve.....	8
4. Vegyszerek	8
5. Eszközök	8
6. A vizsgálat menete	9
7. Az eredmények kiszámítása	10
8. Ismételhetőség.....	11
II. melléklet: Laktóztartalom meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC).....	12
1. Tárgy és alkalmazási terület.....	12
2. Fogalom meghatározás.....	12

3.	A módszer elve.....	12
4.	Vegyszerek.....	12
5.	Eszközök.....	12
6.	A vizsgálat menete.....	13
7.	Az eredmények kiszámítása.....	14
8.	Ismételhetőség.....	14

Az Útmutató célja

Az Útmutató célja, hogy az élelmiszer-vállalkozások, gyártók, termelők és kereskedők, a hatósági-, valamint a vizsgálólaboratóriumok számára ajánlást tegyen a 2011. évi CIII. törvényben nevesített egyes élelmiszer-készítmények tejalapanyag tartalmának számítására, a tej összetevőinek analitikai vizsgálatokkal történő meghatározásával.

Jogi háttér

A 2011. évi CIII. törvényben foglaltak értelmében

2. § Adóköteles terméknek minősül az előrecsomagolt termékként forgalomba hozott,

- a) hozzáadott cukrot tartalmazó, 8 gramm cukor/100 milliliter mennyiséget meghaladó cukortartalmú
- aa) 2009, 2202 VTSZ szám alá tartozó - energiatartalnak nem minősülő - termék a legalább 25% gyümölcs, illetve zöldséghányadot tartalmazó nektárok, gyümölcslevek és zöldséglevek, valamint a legalább 50%-ban tejalapanyag felhasználásával készült termékek kivételével,
- cb) 1806 VTSZ szám alá tartozó termék a legalább 50%-ban tejalapanyag felhasználásával készült termékek kivételével, ha hozzáadott cukrot tartalmaz és cukortartalma meghaladja a 40 gramm cukor/100 gramm mennyiséget és kakaótartalma 40 gramm/100 gramm értéknél alacsonyabb.

Az Útmutató jogállása

Ezen Útmutató az egységes jogértelmezés és jogalkalmazás kialakítása, valamint a jogalkalmazói gyakorlat egyértelműségének céljából, illetve kiszámíthatóságának növelése érdekében, a NÉBIH Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatósága, a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, valamint a NAV Szakértői Intézete, mint a módszer kidolgozásban résztvevő szakmai csoport tagjai egyetértésében, a szabályozás alapjait ismertető tájékoztatóként szolgál, amelynek kötelező ereje nincs.

A jogszabályoknak való megfelelés biztosítása az egyes vállalkozások kizárólagos felelőssége. Az Útmutatóban leírt ajánlásnak való megfelelés nem jogszabályi elvárás.

Tejalapanyag tartalom meghatározása

1. Bevezető, fogalommeghatározás

Jelen Útmutató a 2011. évi CIII. törvényben nevesített egyes élelmiszer-készítmények tejalapanyag tartalom számítására vonatkozó tudnivalókat tartalmazza. A tejalapanyag tartalom fogalmára, és annak kiszámítására jelenleg nem létezik egységesen alkalmazott előírás, illetve módszer hazai és nemzetközi szinten. Ennek hiányában fontos a tejalapanyag összetevőinek analitikai meghatározásával, a tejalapanyag tartalom számításának módjára ajánlást tenni, amelynek érdekében ezen Útmutató készült. Az Útmutató mellékleteiben leírt analitikai módszerek mellett más mérési módszerek is alkalmazhatók az egyes összetevők meghatározására, amennyiben az alkalmazott módszerek teljesítményjellemzői megfelelnek az Útmutatóban részletezett módszerek teljesítményjellemzőinek.

Az Útmutató kidolgozásában résztvevő szakmai csoport tagjainak egyetértésében a **tejalapanyag** tartalom fogalma: a természetes tejben előforduló összetevők összege, amely nyerstejre visszavetített. A tejalapanyag tartalom meghatározása a fő makrokomponensek, így a tejcukor (laktóz), a tejszír és a tejfehérje, valamint a nedvességtartalom meghatározását jelenti.

A szakmai csoport megfogalmazása alapján a termékekben a fent felsorolt tejösszetevők tömegszázalékban (% m/m) kifejezett értékei kerülnek összeadásra a tejalapanyag tartalom meghatározásánál. A mért tejösszetevők, amelyek 100%-ban tejből származnak (tejfehérje, laktóz, tejszír), összege adja meg a tejtartalmat, figyelembe véve a víztartalmat is. Köztudottan a termékek víztartalma nem csak tejből származhat, ezért az előzetes egyeztetéseket figyelembe véve, az alkalmazás területe szűkítve lett száraz termékekre, megállapodva abban, hogy az eljárás során a termékek összes mért nedvességtartalmát bele kell számítani a tejalapanyag tartalomba, ami a gazdálkodók számára sem okoz hátrányt.

2. Termékkör meghatározása

A 2011. évi CIII. törvényben foglaltak szerint, a tejalapanyag tartalom alapján kivételként szóba jöhető termékek a 1806, a 2009, és a 2202 vtsz. szám alá tartoznak.

A szakmai csoport előzetes vizsgálatai alapján a jelen Útmutatóban leírt eljárás a kis nedvességtartalmú, száraz termékek esetében alkalmazható megbízhatóan.

Figyelembe véve a törvényben is említett vámtarifaszámokat, a leginkább érintett árucsoport a 1806 vtsz. szám alá tartozó csokoládé- és kakaótartalmú más élelmiszer-készítmények (cukrozott kakaópor, töltött-töltetlen tömb, tábla, rúd, csokoládé, kakaótartalmú készítmények italok előállításához stb.).

3. A tejalapanyag számításhoz szükséges paraméterek és vizsgálati módszereik

Az adott termékkör 100%-ban tejből származó komponenseinek, tehát a tejszírnak, a laktóznak, a tejfehérjének és a nedvességtartalomnak a meghatározásaihoz az alábbi analitikai módszerek javasoltak:

3.1. Szárazanyag tartalom/nedvességtartalom meghatározás

Az eljárás alkalmazásához javasolt módszer az *MSZ 20900-1:1987 Édesipari termékek vizsgálata. Szárítási veszteség meghatározása* című szabvány.

Egyéb mátrixok esetében, ha szabvány által nem meghatározott a vizsgálati módszer, a szárazanyag tartalmat szárítószekrényben 103±2 °C-on, tömegállandóságig mérjük.

3.2. Tejsírtartalom meghatározás

A Bizottság 900/2008/EK rendelete, a Bizottság 2015/824 végrehajtási rendeletével módosítva. Az eljárás az extrakcióval kivont zsír zsírsav-komponenseinek metilészterré történő átalakítását követő, belső standard módszert alkalmaz (gázkromatográfiás (GC-s) meghatározás). A tejsír mennyiségének kiszámítása a 900/2008/EK rendeletben meghatározott faktoriala kapott vajsav-metilészter mennyiségéből történik. Egy adott, részletes módszerleírás található az 1. számú mellékletben.

3.3. Laktóztartalom meghatározás

Folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer, mely amino oszlopon történő elválasztást követő, RI detektorral (vagy ezzel egyenértékű, pl. fényszórásos detektorral (ELSD)) történő mérés, külső standard módszerrel. Egy adott módszerleírást lásd részletesen a 2. számú mellékletben.

Enzimes módszer (kereskedelmi kiték, pl. Boehringer Mannheim laktóz/galaktóz UV teszt).

3.4. Tejfehérje tartalom meghatározás

3.4.1. Tejfehérje tartalom meghatározás tisztán tej eredetű nitrogén tartalmú mátrixok esetében

A tejfehérje tartalom meghatározás alapját a 900/2008/EK Bizottsági rendelet írja le (2. cikk 4. pont).

Összes nitrogéntartalom:

A teljes nitrogéntartalmat Kjeldahl-módszerrel kell meghatározni.

Az érintett termékkört figyelembe véve, az eljárás alkalmazásához javasolt módszerek:

- az MSZ 2708-7:1987 *Sűrített tej és tejpör kémiai és fizikai vizsgálata. A tejpör fehérjetartalmának meghatározása* című szabvány alapján,
- a minta jellegétől függően, a fehérje meghatározó készülék Útmutatójában feltüntetett ajánlás alapján.

Nem tejfehérje eredetű nitrogéntartalom meghatározása:

Javasolt módszer:

MSZ EN ISO 8968-4:2002 Tej. A nitrogéntartalom meghatározása. 4. rész: A nem proteineredetű nitrogéntartalom meghatározása (ISO 8968-4:2001)

Tejfehérje tartalom:

A Kjeldahl-módszerrel meghatározott teljes nitrogéntartalomból kivonjuk a nem tejprotein eredetű nitrogéntartalmat és szorozzuk 6,38-dal.

$$F_T = (TN - NPN) \cdot 6,38$$

A számításoknál alkalmazott jelölések:

F_T :tejfehérje tartalom, tömegszázalékban kifejezve

TN: összes nitrogéntartalom, tömegszázalékban kifejezve

NPN: nem tejprotein eredetű nitrogéntartalom, tömegszázalékban kifejezve

3.4.2. **Tejfehérje tartalom meghatározása nem csak tej eredetű nitrogén tartalmú mátrixok esetében**

Összes nitrogéntartalom:

A teljes nitrogéntartalmat Kjeldahl-módszerrel kell meghatározni.

Az eljárás alkalmazásához javasolt módszerek:

- az *MSZ 1385:1987 Élelmiszerek és élvezeti cikkek nitrogéntartalmának meghatározása Kjeldahl-féle módszerrel* című szabvány alapján,
- a minta jellegétől függően, a fehérje meghatározó készülék Utmutatójában feltüntetett ajánlás alapján.

Nem tejfehérje eredetű nitrogéntartalom meghatározása:

A nem tej eredetű nitrogéntartalmat megfelelő vizsgálati módszer hiányában a gyártmánylap alapján kell számítani.

$$F_T = (TN - NPN) \cdot 6,38$$

A számításoknál alkalmazott jelölések:

F_T :tejfehérje tartalom, tömegszázalékban kifejezve

TN: összes nitrogéntartalom, tömegszázalékban kifejezve

NPN: nem tejprotein eredetű nitrogéntartalom, tömegszázalékban kifejezve

4. A tejalapanyag tartalom számítása

A tejalapanyag tartalom számítása, a makrokomponensek ismeretében az alábbi összefüggéssel írható le:

$$T = N + Z_{ST} + L + F_T$$

A számításoknál alkalmazott jelölések:

- T: a számított tejalapanyag tartalom, tömegszázalékban kifejezve
N: nedvességtartalom, tömegszázalékban kifejezve
Z_{ST}: tejsírtartalom, tömegszázalékban kifejezve
L: laktóztartalom, tömegszázalékban kifejezve
F_T: tejfehérje tartalom, tömegszázalékban kifejezve

Számítási példa

Termék: tejsokoládé

Összetétel: cukor, kakaóvaj, sovány tejpor, kakaómassza, tejsavópor, tejsír,ogyorómassza, emulgeálószer (szójalecitin), aroma. A tejsokoládében a kakaó szárazanyag legalább 30%.

<i>Mért paraméterek:</i>	nedvességtartalom:	0,7 % (m/m)
	tejsírtartalom:	4,3 % (m/m)
	laktóztartalom:	12,2 % (m/m)
	tejfehérje tartalom:	6,5 % (m/m)

Tej eredetű makrokomponensek mennyisége összesen:

$$T = 0,7 + 4,3 + 12,2 + 6,5 = 23,7$$

A tejsokoládé termék tejalapanyag tartalma: 23,7 % (m/m) kerekítve 24 % (m/m).

Mellékletek

A lent ismertetett konkrét mérési módszerek nem kötelezően követendő eljárásokat írnak le, az alkalmazott paraméterek, eszközök, vegyszerek módosíthatók a rendelkezésre álló körülményekhez igazodva, amennyiben az alkalmazott módszerek teljesítményjellemzői megfelelnek az Útmutatóban megjelölt módszerek teljesítményjellemzőinek.

I. melléklet: Kakaótartalmú élelmiszerek, csokoládék tejszírtartalmának meghatározása kivont zsírból

1. Tárgy és alkalmazási terület

Ezzel a módszerrel a következő termékek tejszírtartalmát határozzuk meg: kakaótartalmú élelmiszerek, csokoládék.

2. Fogalommeghatározás

Kakaótartalmú élelmiszerek, csokoládék tejszír tartalma: az ezzel vagy ezzel egyenértékű módszerrel meghatározott tejszírtartalom.

3. A módszer elve

A termék zsírtartalmát szerves oldószeres extrakcióval kivonjuk. A zsír zsírsavkomponenseinek metilészterré alakítása metanolos kálium-hidroxid-oldattal történik. A zsírsav-metilészterek előállítását a vízmentes, homogén mintából végezzük. Az előállított észterek mennyiségét belső standard módszerrel, gázkromatográfiásan határozzuk meg. A mintát az előkészítés után rögtön felhasználjuk a tejszír rendkívül gyors bomlása miatt, ezért kézi injektálást alkalmazunk. A vajsav-metilészter tömegszázalékban meghatározott mennyiségéből számítjuk a zsíradékban, illetve a zsírtartalom ismeretében a termékben lévő tejszír mennyiségét a 900/2008/EK rendelet alapján meghatározott faktorról.

4. Vegyszerek

- 4.1. n-heptán, kromatográfiás tisztaságú
- 4.2. metanol, vízmentes
- 4.3. kálium-hidroxid, purum
- 4.4. vajsav-metilészter, kromatográfiás tisztaságú
- 4.5. nátrium-hidrogén-szulfát-monohidrát, analitikai minőségű
- 4.6. kálium-hidroxid metanolos oldata (kb. 2 mólos oldat készítése: 11,2 g kálium-hidroxidot feloldunk 100 cm³ vízmentes metanolban)
- 4.7. standard oldat I. (készítése: 1 g valeriansav-metilésztert 0,1 mg pontossággal 50 cm³-es mérőlombikba bemérünk és n-heptánnal végtérfogatra feltöltjük)
- 4.8. standard oldat II. (készítése: 200 mg valerianásav-metilésztert 0,1 mg pontossággal 100 cm³-es mérőlombikba bemérünk és n-heptánnal végtérfogatra feltöltjük)

5. Eszközök

5.1. Általános kapilláris gázkromatográf

Gázkromatográfiás analízis körülményei:

- kolonna: kapilláris kolonna, az állófázis polietilén-glikollal impregnált: CPwax52CB, hossza: 30 m, belső átmérő: 0,32 mm, filmvastagság: 0,25 µm

- vivőgáz és nyomás: hélium, 10 psi
- hőmérsékletprogram: 50 °C, 2 perc tartás, 50-80 °C-ig 10 °C/perc fűtési sebességgel, tartás nincs, 80-250 °C-ig 20 °C/perc fűtési sebességgel, 15 perc tartás
- detektor (FID) hőmérséklete: 300 °C
- injektor (PSS) hőmérséklete: 250 °C, split/splitless, split control: flow 50ml/min; -0,5 split 90, 0,5 split 10
- injektált térfogat: 1 µl (KÉZI!)

5.2. 1 µl-es fecskendő

5.3. Táramérleg

5.4. Kémcsőkeverő, vortex

5.5. Analitikai mérleg, 0,1 mg pontosságú

5.6. Vízfürdő

5.7. Mintatartó edény

6. A vizsgálat menete

A méréshez kivont zsírra van szükség (*MSZ 20900-2:1987 Édesipari termékek vizsgálata. Zsirtartalom meghatározása* című szabvány alapján). A vizsgálat során minden esetben párhuzamos mérést végzünk. A mérés előtt a hűtött mintákat hagyjuk szobahőmérsékletűre melegedni. A folyékony zsiradékokat szobahőmérsékleten lehet mintázni. A szilárd zsirt analízis előtt fokozatosan fel kell olvasztani vízfürdőn (5.6.).

Az előkészítés során kivont zsír mennyiségétől függően a vízmentes, homogén zsiradékmintából 0,2-1 g-ot, 0,01 g pontossággal bemérünk a mintatartó edénybe (5.7.), majd hozzáadunk 2-10 ml n-heptánt (4.1.). Vajsavtartalom meghatározás esetén 0,2-1 ml standardoldatot is adjunk hozzá a következők szerint:

- ha a zsiradékminta becsült vajsavtartalma 1%-nál nagyobb, akkor standardoldatot I-t használunk (4.7.),
- ha a zsiradékminta becsült vajsavtartalma 1%-nál kisebb, akkor standardoldatot II-t használunk (4.8.).

Ezután az elegyhez még hozzáadunk 0,1-2,5 ml metanolos kálium-hidroxidot (4.6.), majd a mintatartó edényt ledugaszoljuk és tartalmát legalább 1 percig rázzuk vortex keverővel (5.4.) vagy kézzel. Kitisztulás után az oldat ismét zavarossá válik a glicerinn kiválása miatt. Ha rázás után a felső fázis zavaros, akkor adjunk hozzá 1 g nátrium-hidrogén-szulfátot (4.5.) és vortexen rázassuk tovább, amíg tiszta nem lesz az oldat. A glicerinn leülepedése után a kitisztult oldatból a felső (heptános) fázist dekantáljuk. Az így elkészített oldat, amelynek zsírsav-metilészter tartalma kb. 100 mg/ml, a gázkromatográfiás vizsgálatra közvetlenül alkalmas.

A mintából, a két párhuzamosan kivont zsírból készített származékból injektálunk egyszer-egyszer. A felső (heptános) fázisból 1 µl-t injektálunk a gázkromatográfba (5.1.).

7. Az eredmények kiszámítása

A retenciós idő azonosítása azonos körülmények között felvett, C4-C5 metilészter standard gázkromatogramjából történik.

A mérési eredmények értékelése

A vajsav- és valeriánsav-metilészter retenciós ideje:

Összetevő	Retenciós idő (perc)
C4:0	2,29
C5:0	3,10

A retenciós idők kis mértékben változhatnak kézi injektálás esetén.

A vajsav-metilészter (C4) relatív érzékenysége (faktor) valeriánsav-metilészter (C5) belső standardot alkalmazva:

$$\text{faktor}_{C4} = \frac{A_{C4} \cdot m_{C5}}{A_{C5} \cdot m_{C4}}$$

Az alkalmazott jelölések:

A_{C4} : a vajsav-metilészter területe

A_{C5} : a belső standard (valeriánsav-metilészter) területe

m_{C4} : a mintában lévő vajsav-metilészter tömege [g]

m_{C5} : a mintában lévő belső standard (valeriánsav-metilészter) tömege [g]

A mintából nyert zsír vajsav-metilészter tartalmának meghatározása:

$$C_{C4} = \frac{A_{C4} \cdot m_{C5} \cdot 100}{A_{C5} \cdot m_{\text{zsír}} \cdot \text{faktor}_{C4}}$$

$$C_{C4} = A_{C4} \frac{m_{C5} \cdot 100}{A_{C5} \cdot m_{\text{zsír}}}$$

Az alkalmazott jelölések:

C_{C4} : a vajsav-metilészter mennyisége a zsírban [% (m/m)]

A_{C4} : a vajsav-metilészter területe

A_{C5} : a belső standard (valeriánsav-metilészter) területe

m_{C5} : a mintában lévő belső standard (valeriánsav-metilészter) tömege [g]

$m_{\text{zsír}}$: a bemért zsír tömege [g]

A mintából nyert zsír tejszír tartalmának meghatározása:

$$C_{\text{tejszír}} = \frac{C_{\text{zsír}} \cdot C_{C4} \cdot F}{100}$$

A számításoknál alkalmazott jelölések:

$C_{\text{tejszír}}$: a tejszír mennyisége a zsírban [% (m/m)]

$C_{\text{zsír}}$: az extrakcióval kivont zsír mennyisége [% (m/m)]

- C_{C4}: a vajsav-metilészter mennyisége a zsírban [% (m/m)]
 F: 25, illetve 50 (a 900/2008/EK rendelet alapján a tejszír mennyisége a vajsav mennyiségének 25-szöröse, azonban a 2015/824 EU Bizottsági végrehajtási rendeletben foglaltak szerint az olyan termékekben, mint a sovány tejpör, a tejfehérje-koncentrátum, a tejfehérje-izolátum, az írópor, az édes tejsavópor, a savanyú tejsavópor, a tejsavófehérje-koncentrátum és a tejsavófehérje-izolátum, csökken az előállítás során ezen termékek tejszír tartalmának vajsav mennyisége, ezért amennyiben a vizsgálandó termék tejszíron kívül más zsírokat is tartalmaz, továbbá tejfehérje-tartalmuk legalább 30 % (m/m) és tejszírtartalmuk kevesebb, mint 6 % (m/m), az 50-es szorzófaktor alkalmazása szükséges).

A minta vajsav-metilészter tartalmának [% (m/m)] meghatározása:

$$C_{\text{vajsav,minta}} = \frac{C_{\text{zsír,termék}} \cdot C_{\text{vajsav,zsír}}}{100}$$

A minta tejszír tartalmának [% (m/m)] meghatározása:

$$C_{\text{tejszír,minta}} = \frac{C_{\text{zsír,termék}} \cdot C_{\text{tejszír,zsír}}}{100}$$

A számításoknál alkalmazott jelölések:

C_{zsír,termék}: az extrakcióval kivont zsír mennyisége [% (m/m)]

C_{vajsav,zsír}: a vajsav mennyisége a zsírban [% (m/m)]

C_{tejszír,zsír}: a tejszír mennyisége a zsírban [% (m/m)]

A vajsav-metilészter mennyiségét 0,01 pontossággal a mintára vonatkoztatva adjuk meg tömegszázalékban. A tejszír tartalmat 0,1 pontossággal szintén a mintára vonatkoztatva adjuk meg tömegszázalékban.

8. Ismételhetőség

Ugyanabból a mintából, azonos vizsgáló által, azonos körülmények között, egy időben vagy közvetlenül egymás után végzett két meghatározás eredménye közötti különbség legfeljebb 15 rel.% lehet.

II. melléklet: Laktóztartalom meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC)

1. Tárgy és alkalmazási terület

Ez a módszer alkalmas a 2011. évi CIII. törvényben nevesített egyes élelmiszer termékek: cukorkaáru (beleértve a fehér csokoládét is), kakaótartalmú élelmiszerek, édesipari lisztes készítmények, cukrászsütemények, sütőipari termékek, fagyalt és más ehető jégkrém stb. vizes oldatainak laktóz tartalmának folyadékkromatográfiás minőségi és mennyiségi meghatározására. Ez a vizsgálati módszer a termékek 1-100 % (m/m) közötti cukortartalmának (laktóz) meghatározására alkalmazható.

2. Fogalom meghatározás

Kakaótartalmú élelmiszerek, csokoládék laktóztartalma: az ezzel a módszerrel meghatározott laktóztartalom.

3. A módszer elve

A folyadékkromatográfiás módszerrel szétválasztott cukorkomponenseket RI detektorral (vagy ezzel egyenértékű, pl. fényszórásos detektorral (ELSD)) mérjük és külső standardokkal összehasonlítva meghatározzuk a % (m/m)-ban kifejezett laktóztartalmat. ELSD használatkor a mérési bizonytalanságot ellenőrizni kell!

4. Vegyszerek

- 4.1. acetonitril, HPLC minőség
- 4.2. kétszer desztillált víz vagy ultra tiszta víz
- 4.3. eluens: kétszer desztillált víz és acetonitril 25:75 arányú elegye
- 4.4. derítőszer: Carrez reagens I-II.
- 4.5. laktóz, hatóanyag-tartalom > 99% (HPLC),
- 4.6. ellenőrző standard oldat: ~1 % (m/m)-os laktóz oldat
- 4.7. hitelesített referencia anyagok (CRM): pl.: BCR-644, MUVA-S-0811 Milk Chocolate

5. Eszközök

- 5.1. HPLC rendszer, pl.:
 - 5.1.1. Perkin Elmer pumpa PE Series 200
 - 5.1.2. Oszlop termosztát PE Series 200
 - 5.1.3. Automata mintaadagoló PE Series 200
 - 5.1.4. RI detektor PE Series 200a
 - 5.1.5. Kolonna+előtét kolonna: Pinnacle II Amino 5µm 250x4,6 mm (Trident XG-XF Fitting 1cm)
 - 5.1.6. Interfész
 - 5.1.7. Vákuumos gázmentesítő PE Series 200
- 5.2. Asztali számítógép, kiértékelő szoftverrel
- 5.3. Analitikai mérleg, 0,1 mg pontosságú
- 5.4. Automata pipetta 1-5 ml-es
- 5.5. Normál lombik: „A” jelű (50ml, 100 ml)
- 5.6. Kétjelű hasas pipetta: 5 ml, 10 ml, 25 ml
- 5.7. Mérőhengerek (500 ml, 100 ml, 50 ml, 2 ml)
- 5.8. Redős szűrő
- 5.9. 0,45 µm-es fecskendőszűrő

6. A vizsgálat menete

6.1. Kalibráció

Standardok: cukor (laktóz) törzsoldat készítése: kétszer desztillált vízben (4.2.) feloldunk kb. 5,0 g laktózt (4.5.) egy 250 ml-es normál lombikban (5.5.) és jelig töltjük, lemérjük a tömegét analitikai mérlegen (5.3.). Az oldat koncentrációja kb. 2,00 % (m/m). Ebből a törzsoldatból hígítással tömegmérés alapján közelítőleg 0,10 % (m/m)-os, 0,50 % (m/m)-os, 1,00 % (m/m)-os és 1,50 % (m/m)-os oldatokat készítünk. A kalibrációs oldatok injektálásával kapott csúcsterületek koncentráció függvényében történő ábrázolásával vegyük fel a kalibrációs görbét. Ellenőrizzük a regressziós görbe linearitását, ha $R^2 > 0,99$, elfogadható a kalibráció, a megengedettnél nagyobb eltérés esetén új kalibrációt végzünk.

Ezt a linearitást a napi mérések során egy pontban ellenőrizzük az ellenőrző standarddal (4.6.).

Ellenőrző standard készítése (4.6.): a standard cukorból (4.5.) kb.1 g-ot mérünk be analitikai mérlegen 0,1 mg pontossággal egy 100 ml-es normál lombikba (5.5.), kétszer desztillált vízben (4.2.) feloldjuk, jelig töltjük, lemérjük a tömegét.

A kalibráló és az ellenőrző oldat fagyasztószekrényben 12 hónapig eltartható. A mélyhűtőből kivett oldatokat a felengedés után homogenizáljuk.

További ellenőrző vizsgálatként CRM (certified reference material, 4.7.) minta mérése javasolt adott időközönként (legalább évente egyszer).

6.2. Stabilitás vizsgálat

A folyadékkromatográfias rendszer stabilitásának ellenőrzése céljából injektáljuk az ismert koncentrációjú, kb. 1 % (m/m)-os ellenőrző standard cukoroldatot (4.6.) a HPLC rendszerbe (5.1.). Méréssorozatoknál a minták előtt és után, illetve tíznél több minta esetén 10 mintánként injektáljuk az ellenőrző standardot. A kapott koncentráció adatokat kontroll-diagram vezetve ellenőrizhető a rendszer stabilitása. Ha az ellenőrző standard vizsgálata során kapott eredmény kívül esik a kontroll diagram alsó vagy felső elfogadhatósági határán, hibafeltárás, új kalibráció felvétele szükséges, mérési eredmény nem adható ki.

6.3. Meghatározás

6.3.1. A mintából a becsült cukortartalomtól függően annyit mérünk be, hogy a mért érték az általunk meghatározott lineáris tartományba essen (kb. 0,1-2,0 % (m/m)). Ezt a mennyiséget analitikai mérlegen (5.3.) mérjük ki (0,01 g pontossággal) egy 50-100 ml-es normál lombikba (5.5.), vízzel homogenizáljuk, pl.:

- keksz: ~ 4-5 g/100 ml desztillált víz
- jégkrém: ~ 4-5 g/100 ml desztillált víz
- cukorka: ~ 3-5 g/100 ml desztillált víz
- csokoládé: ~ 3-4 g/100 ml desztillált víz

6.3.2. Ha szükséges, derítsük a mintaoldatokat Carrez I-II. oldatokkal (4.4.), és szűrjük redős szűrőn (5.8.). Ha nem tükrös a szűrlet, 0,45 mikronos fecskendőszűrőn (5.9.) is átszűrjük.

6.3.3. A mintából kioldott komponenseket a választott kromatográfias körülmények között szétválasztjuk és a laktózt a retenciós idő alapján azonosítjuk.

6.3.3.1. A rendszer mérés előtti bekapcsolása: Vákuumos gázmentesítő (5.1.7.), RI detektor (5.1.4.), interfész (5.1.6.), automata mintaadagoló (5.1.3.), pumpa

- (5.1.1.) bekapcsolása. Oszlop termosztát (5.1.2.) bekapcsolása és a hőmérséklet 30 °C-ra állítása manuálisan.
- 6.3.3.2. Számítógép elindítása, vezérlőszoftver indítása (5.2.).
- 6.3.3.3. A pumpán a szükséges paraméterek (rendszeről függően) beállítása: eluens áramlási sebesség 0,8 ml/perc, 23 perc mérési idő, maximális nyomás 1600 psi.
- 6.3.3.4. A mérendő mintákból mérési sorozatot készítünk. Az alkalmazott szoftverben kitöltjük a szükséges adatokat (pl.: a minta azonosítója, a módszer, eredmény file, hígítás).
- 6.3.3.5. Az RI detektor (5.1.4.) stabilizálódása után indítható a mérés. Az RI detektor bemelegedéséhez kb. 20-25 perc szükséges, ezt a detektor kijelzőjén megjelenő érték stabilizálódása jelzi. A mérés körülményei: eluens: kétszer desztillált víz és acetonitril 25:75 arányú elegye (4.3.), áramlási sebesség 0,8 ml/perc, injektálási térfogat 10 µl, detektálás RI detektorral, oszlophőmérséklet 30 °C. Mérés indítása: a számítógépben a megfelelő szekvencia kiválasztása, eredmény file megadása.
- 6.3.3.6. Az automata mintaadagoló (5.1.3.) beállítása: mintaszám, injektált mennyiség: 10 µl, mérési idő: 24 perc, Start.

7. Az eredmények kiszámítása

A vizsgálatoknál a minőségi elemzést a retenciós idő alapján, standarddal történő összehasonlítást követően végezzük el. A menyiségi meghatározás a csúcs alatti terület koncentráció függvényében történő ábrázolásával készített kalibrációs görbe alapján történik. Az ismeretlen laktóztartalmú minták csúcs alatti területeit összevetjük a külső standard csúcs alatti területével így % (m/m)-ban megkapjuk a hígított minta laktóztartalmát. A hígított mintára kapott eredményt megszorozva a hígítási faktorial (oldat/bemérés) az eredeti minta laktóztartalma % (m/m)-ban kiszámítható, folyadékok esetében a sűrűséggel átszámolva g/100 ml-ben adható meg az eredmény.

Minden mintából két párhuzamos vizsgálatot végzünk, ahol a két vizsgálat közt megengedhető legnagyobb eltérés legfeljebb: ± 10 rel.% lehet.

Az eredeti minta mért laktóztartalmát, egy tizedes jegy pontossággal, % (m/m)-ban vagy a sűrűség felhasználásával g/100 ml-ben egy tizedes jegy pontossággal adjuk meg.

8. Ismételhetőség

Ugyanabból a mintából, azonos vizsgáló által, azonos körülmények között, egy időben vagy közvetlenül egymás után végzett két meghatározás eredménye közötti különbség legfeljebb 10 rel.% lehet.