

Provedení efektivní retrospektivní kalibrace moderní infračervené spektroskopie MIR a MIR-FT na měření bodu mrznutí mléka

Performance of effective retrospective calibration of modern MIR and MIR-FT infrared spectroscopy on milk freezing point depression measurement

Hanuš, O.¹ – Vyleťelová, M.¹ – Landová, H.² – Genčurová, V.² – Kopecký, J.¹

¹ Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.

² Agrovýzkum Rapotín s.r.o.

ABSTRACT

Milk freezing point depression (FPD) is important technological indicator. Aim of this paper was to develop, validate and implement an effective and relevant procedure of calibration of modern instrumental MIR and MIR-FT methods of milk FPD determination for control milk quality on the basis of derivation reference values from verified system of proficiency testing (PT). It means low cost method with adequate reliable results. Till February 2011 26 PTs were carried out for milk FPD. The mean value of unsuccessfulness in PT was 23.9 %. Statistical characteristics (mean \bar{x} and standard deviation s_x) for d (mean difference from reference values) and sd (d standard deviation) values of PT participant sets (all (I) and successful (II)) showed expressive lower values of II set as logical. Mean calibration correlation coefficient (r) of MIR-FT to reference from PT was 0.804 ± 0.162 (mostly $P < 0.001$). Comparable r for cryoscopic method (CRYO) was 0.991 ± 0.009 ($P < 0.001$). During period of repeated use of MIR-FT retrospective calibration on FPD measurement according to PT reference the d from PT reference values (prediction expression) was as mean 0.000123 ± 0.001399 °C. Mean sd of this d from reference values was 0.0062 ± 0.003339 °C. In the same period the MIR-FT successfulness in PT was 10.0 and for CRYO 85.7 %. Mean sd of d from PT reference values was 0.00578 ± 0.003146 for MIR-FT and 0.00115 ± 0.0006 °C for CRYO. Used sets offer values for calculation of some methodical limits of PT ($\times 1.96 = 95\%$ level of confidence interval). Such calculations are important for following validation and accreditation of PT procedure and calibration. The results show on possibility of use of MIR-FT retrospective calibration according to PT results in the laboratory network. However, the result reliability and analytical value of MIR and MIR-FT methods for FPD at relevant calibration is only as screening at raw milk quality control. The results are usable in the practice of reference and routine milk laboratories at increase of quality assurance of analytical values.

Keywords:

milk, freezing point depression, infrared spectroscopy, electrical conductivity, reference, calibration, linear regression, proficiency testing, Euclidian distance from origin

ABSTRAKT

Bod mrznutí mléka (BMM) je důležitý technologický ukazatel. Cílem této práce bylo vyvinout, validovat a implementovat efektivní, tzn. náklady snižující, ale svou věrohodností výsledků adekvátní, postup kalibrace moderních instrumentálních metod MIR a MIR-FT stanovení BMM pro kontrolu kvality mléka na základě derivace referenčních hodnot z verifikovaného systému výkonnostního testování analytické způsobilosti (PT). Do února 2011 bylo provedeno 26 PT pro BMM. Průměrná hodnota neúspěšnosti v PT byla 23,9 %. Statistické charakteristiky (průměr \bar{x} a směrodatná odchylka s_x) hodnot d (průměrná diference od referenčních hodnot) a sd (směrodatná odchylka d) souborů účastníků PT (všech (I) a úspěšných

(II) ukázaly logicky výrazně nižší hodnoty souboru II. Průměrný kalibrační korelační koeficient (r) MIR-FT k referenci z PT byl $0,804 \pm 0,162$ (většinou $P < 0,001$). Srovnatelný r pro kryoskopickou metodu (CRYO) byl $0,991 \pm 0,009$ ($P < 0,001$). V období opakovaného použití retrospektivní kalibrace MIR-FT na měření BMM podle reference z PT byla d od referenčních hodnot PT (predikční vyjádření) průměrně $-0,000123 \pm 0,001399$ °C. Průměrná sd tohoto d od referenčních hodnot byla $0,0062 \pm 0,003339$ °C. Ve stejném období byla úspěšnost pro MIR-FT v PT 10,0 a pro CRYO 85,7 %. Průměrná sd pro d od referenčních hodnot v PT byla $0,00578 \pm 0,003146$ pro MIR-FT a $0,00115 \pm 0,0006$ °C pro CRYO. Použité soubory poskytují podklady pro výpočty některých metodických limitů PT ($\times 1,96 = 95\%$ interval spolehlivosti). Takové výpočty jsou významné při následující validaci a akreditaci postupu PT a kalibrace. Výsledky dokládají možnost použití retrospektivní kalibrace MIR-FT podle výsledků PT v laboratorní síti. Věrohodnost výsledů a analytická hodnota metody MIR a MIR-FT pro BMM při relevantní kalibraci je však pouze screeningová při kontrole kvality syrového mléka. Výsledky jsou použitelné v praxi referenčních a rutinních mléčných laboratořích při zvyšování zajištění kvality analytických výsledků.

Klíčová slova:

mléko, deprese bodu mrznutí, infračervená spektroskopie, elektrická vodivost, reference, kalibrace, lineární regrese, výkonnostní test analytické způsobilosti, Euklidická vzdálenost od počátku

ÚVOD

Legislativní normové limity bodu mrznutí mléka

Bod mrznutí mléka (BMM, popř. MFP nebo FPD) je důležitým fyzikálním a technologickým kvalitativním ukazatelem mléka (EEC 92/46; R 853/2004; Crombrugge, 2003). Většinou je používán pro kontrolu kvality syrového nebo pasterovaného mléka ve smyslu jeho případné falzifikace přídavkem cizí vody. To znamená pro kontrolu technologické disciplíny výrobců a zpracovatelů mléka. Voda může vniknout do mléka z dojícího zařízení jako nevyhnutelný přídavek nebo v důsledku špatné praxe při dojení (Buchberger, 1997). Některé země Evropské unie používají nyní legislativní diskriminační limity BMM (bodu mrznutí mléka) pro standardní kvalitu mléka od $\leq -0,520$ °C do $\leq -0,505$ °C (Buchberger, 1990 a, b, 1997; Rohm *et al.*, 1991; Bossuyt, 2003). V České republice (ČR) byl v předcházejícím období diskriminační limit $\leq -0,515$ °C, nyní je v souladu s EEC 92/46 a Regulation (EC) No. 853/2004 (No. 638/2004 Sb.) pro syrové a pasterované mléko $\leq -0,520$ °C. 20,1 % dodávek do mlékáren v ČR však nevyhovovalo tomuto limitu (Roubal, Kopunecz a Pešinová *et al.*, 2005). Dnes (2010) je to 2,7 % (Kopunecz *et al.*, 2011). Uvedené hodnoty pravděpodobně nemohou být zapříčiněny jen špatnou technologickou kázní, to znamená výhradně přídavky cizí vody. Je docela zřejmé, že existuje diskrepance v určení tohoto limitu. Existovala dříve ovšem neoficiálně také limitní hodnota $\leq -0,530$ °C (Klíčník, 1978). To však bylo spojeno s významně nižší mléčnou užitkovostí krav. Přibližně jedna polovina v porovnání k dnešku. Byla zdůrazněna možnost zhoršení průměru BMM rychlým vzrůstem mléčné užitkovosti v důsledku intenzivního šlechtění během posledních let (Hanuš *et al.*, 2003 a).

Vlivy na bod mrznutí mléka

Hlavní vliv na BMM by mohl být přídavek cizí vody (Demott, 1969; Brouwer, 1981; Buchberger, 1990 b, 1997; Crombrugge, 2003; Hanuš *et al.*, 2011 a). Možný vliv prvního automatického dojícího systému (AMS) na zhoršení BMM byl publikován nedávno (Rasmussen a Bjerring, 2005). BMM byly stabilizovány po zlepšení AMS. Frekvence BMM nad $-0,516$ °C byla 23 % v prvním roce s AMS a klesla v posledním roce na 2,2 %. Nicméně existuje více faktorů vedle přídavku cizí pitné vody, které mohou ovlivnit BMM (Freeman a Bucy, 1967;

Eisses a Zee, 1980; Buchberger, 1990, a, b, 1991, 1994, 1997; Wiedemann *et al.*, 1993; Kirchnerová a Foltys, 2005; Janštová *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2008). Všeobecně to mohou být faremní vlivy jako stádo krav, plemeno dojníc, dojivost stáda, sezóna, pastva, výživa a krmení krav a také jejich zdravotní stav ve smyslu výskytu produkčních poruch (Buchberger, 1990 a; Hanuš *et al.*, 2003 a, 2006 b, 2008 a, b, c, 2009 b, c, 2011 b, c; Kološta, 2003; Chládek a Čejna, 2005; Genčurová *et al.*, 2008). Je velmi důležité správně rozlišovat mezi zmíněnými vlivy a reálným přídavkem cizí vody ve smyslu objektivního určení kvality mléka pro jeho proplácení a kontrolu kvality mléčného potravinového řetězce. To však není v praktických podmínkách vždy jasné. Existují další negativní technologické vlivy na pasterované mléko během jeho zpracování jako přídavek pitné vody nebo tepelný stres bílkovin (Rohm *et al.*, 1991; Roubal *et al.*, 2004; Hanuš *et al.*, 2006 b; Janštová *et al.*, 2007). Ve skutečnosti všechny dodávky mléka do mlékáren na zpracování obsahují v mlékařsky vyspělých zemích do určitého stupně cizí vodu ve smyslu existence strojního dojení.

Složení a vlastnosti mléka a bod mrznutí mléka

Existuje více složek, které ovlivňují hodnotu BMM, hlavně v důsledku jejich osmotického tlaku. Více autorů (Demott, 1969; Brouwer, 1981; Walstra a Jenness, 1984; Hanuš *et al.*, 2003, b) oznámilo, že obsah laktózy způsobuje 53,8 % deprese BMM. Dále v klesajícím pořadí přibližně K^+ 12,7 %, Cl^- 10,5 %, Na^+ 7,2 %, citráty 4,3 %, urea 1,9 % a 6,9 % ostatní složky. Vliv obsahu kyslíčnicku uhličitého v mléce a jeho odpařování nebyl studován pouze pomocí jeho odčerpání ale také pomocí přesycení mléka (Hanuš *et al.*, 2011 a). Kyslíčnick uhličitý ovlivňuje bod mrznutí syrového a pasterovaného mléka v zpracovatelském řetězci průběžným poklesem v důsledku míchání, třepání a zahřívání. Jeho obsah klesá řibližně ze 7 na 2 objemová %.

Dojivost byla spojena s BMM ($r = -0,40$; $P < 0,05$). To dokládá nezbytnost modifikace diskriminačního limitu BMM v závislosti na šlechtění dojníc. Další významné vztahy ($P \leq 0,05$; Hanuš *et al.*, 2010) v mléce byly mezi BMM a: celkovou sušinou ($r = -0,50$); sušinou tukuprostou ($-0,33$); hrubými bílkovinami ($-0,32$); čistými bílkovinami ($-0,43$); bílkovinami syrovátky ($-0,47$); tukem ($-0,46$); elektrickou vodivostí ($-0,35$); laktózou ($-0,35$); počtem somatických buněk ($-0,36$); poměrem tuk/bílkoviny ($-0,36$); kyselinou citronovou ($0,47$); Na ($-0,34$). Vztahy nevýznamné ($P > 0,05$) byly mezi BMM a kaseinem, močovinou a acetonem v mléce. Sýrařské ukazatele také nebyly ovlivněny BMM, který však byl vztažen k ukazatelům fermentace mléka ($r =$ od $-0,34$ do $-0,39$, $P < 0,05$). Význam pro mlékařskou fermentační technologii je argumentem pro kontrolu kvality potravinového řetězce pomocí BMM.

Interpretace kvalitativního limitu BMM

Byly vedeny diskuse o diskriminační hodnotě BMM a jejím určení ve smyslu legislativního vymezení standardní kvality mléka v podmínkách České republiky (Roubal *et al.*, 2004, 2005; Hanuš *et al.*, 2006 b; 2010, 2011 a, c). Cílem bylo nalézt významné vztahy mezi hodnotami BMM a širokým spektrem ostatních ukazatelů (chemicko-složkových, fyzikálních, technologických a zdravotních) v syrovém kravském (ale i kozím a ovčím) mléce bez přídavku objemu cizí vody aby byly získány příslušné informace (Janštová *et al.*, 2007; Hanuš *et al.*, 2008 b, 2009 b, c, 2010, 2011 a, c; Genčurová *et al.*, 2008; Macek *et al.*, 2008). Tyto byly užitečné jako pomocný prostředek pro zlepšení věrohodnosti odhadu relevantního legislativního diskriminačního limitu BMM pro standardní kvalitu mléka. Takový postup je významný pro kontrolu kvality mléčného potravinového řetězce. Studie byly rovněž zaměřeny na testování vlivů přirozených variací BMM na technologické vlastnosti mléka a vysvětlení případných souvisejících zpracovatelských rizik (Hanuš *et al.*, 2010, 2011 a).

Pracovní síť laboratoří

Principy a příznivé přínosy síťového uspořádání referenčních a rutinních mléčných laboratoří pro aplikaci systému centrální kalibrace (Baumgartner, 2007, 2009; Barbano, 2009; Castaneda, 2009) a výkonnostního testování, stejně jako jejich vyhodnocování, byly rozpracovány v řadě

prací (Michalak, 1972; Sherbon, 1975; Michalak *et al.*, 1978; Vines *et al.*, 1986; Grappin, 1993; Leray, 1993, 2006, 2009 a, b, c, 2010; Wood, 1994; Golc-Teger *et al.*, 1996; Golc-Teger, 1996, 1997; Hanuš *et al.*, 1998, 2006 a; Aebi a Bühlmann, 2000 a, b; Fuchs, 2000; Coveney, 2001; Tomáška *et al.*, 2006).

V laboratorních sítích je možná kontrola věrohodnosti výsledků referenčními mléčnými nebo jinými standardy (definovanými vzorky) a metodami výkonnostního testování (kruhové nebo hvězdicové testy). Princip práce zahrnuje specifikaci různých hladin pracovních sítí a jejich hierarchii, metody centrální kalibrace a design statistického vyhodnocování výsledků kalibrací a PT, jako metody určení referenčních hodnot, posouzení variability odchylek atp. (Grappin, 1987; Arndt *et al.*, 1991; Leray, 1993, 2006; Wood *et al.*, 1998; Coveney, 2001). Pro sofistikovanost tohoto přístupu se stal princip tvorby pracovních sítí součástí systémů AQA (analytical quality assurance) mléčných laboratoří a také jejich akreditačních řízení a auditů.

Neshody analytických výsledků

Analytické výsledkové neshody v akreditovaných laboratořích jsou obvykle definovány neúspěšnou účastí ve výkonnostním testu analytické způsobilosti nebo nepřekrytím oborů nejistot při porovnání mezilaboratorních výsledků na identických vzorcích, v tomto případě mléka. Vyšší výskyt výsledkových neshod, resp. chyb, snižuje věrohodnost analytických výsledků. Výsledkové neshody mají teoreticky dva zdroje, systematickou a náhodnou chybu. Statistické zpracování dat při porovnávání analytických výsledků, které dokumentuje momentální a průběžnou věrohodnost výsledků, nezřídka inklinuje svým designem k možnosti diagnózy, o který typ chyby se v případě konkrétní laboratoře jedná. Tyto aparáty zahrnují obvykle různá standardizovaná číselná a jim odpovídající grafická zobrazení jako testy odlehlosti (nejčastěji Grubbsův), Z-score, Euklidická distance, Youden plot, regulační Shewhartovy diagramy a jejich vzájemné kombinace (Grappin, 1987; Leray, 1993; Wood, 1994; Hanuš *et al.*, 1998; Coveney, 2001).

Analytické možnosti určení BMM

Jako referenční slouží samozřejmě metoda kryoskopie (Walstra a Jenness, 1984; Bauch *et al.*, 1993; Crombrugge, 2003; ČSN 57 0530; ČSN 57 0538; ISO 5764:2002(E)). V našich laboratořích je to často instrumentální řešení Cryo-Star automatic Funke-Gerber (Germany). Jako nepřímé screeningové určení BMM jsou využívány různé instrumentální modifikace metod MIR a MIR-FT. Ty představuje infračervená (IR) spektroskopie ve středové oblasti s filtrovou technologií (ČSN 57 0536) a MIR-FT na bázi proměření celého IR spektra pomocí Michelsonova interferometru a zpracování dat Fourierovými transformacemi. Přístroje pracují na principu určení základního složení mléka, zejména osmoticky aktivní laktózy, dále na stanovení elektrické konduktivity mléka a následném výpočtu ekvivalentu BMM (Koops *et al.*, 1989; Buchberger a Klostermeyer, 1995; Crombrugge, 2003; Tomáška *et al.*, 2005; Hanuš *et al.*, 2009 a) pomocí metody násobné regrese. Postupy MIR a MIR-FT jsou pak přirozeně kalibrovány podle výsledků referenční kryoskopie.

Příprava referenčních standardů pro měření BMM

Zatímco změnou obsahu tuku v mléce pomocí technologické manipulace změnu BMM téměř vyvolat nelze (Hanus *et al.*, 2011 b), lze jí docílit přidávkou NaCl nebo logicky přidávkou cizí vody. Při laboratorní přípravě kontrolních vzorků mléka v NRL-SM pro PT na BMM (kryoskopie a MIR-FT) používáme jen ředění, zatímco při přípravě vodních vzorků výhradně pro kryoskopii přidávky soli.

Cíl práce

Cílem této práce bylo vyvinout, validovat a implementovat efektivní, tzn. náklady snižující, ale svou věrohodností výsledků adekvátní, postup kalibrace moderních instrumentálních metod MIR a MIR-FT stanovení BMM pro kontrolu kvality mléka na základě derivace referenčních hodnot z verifikovaného systému výkonnostního testování analytické způsobilosti (PT).

MATERIÁL A METODY

Podmínky kontrolních analýz na BMM v praktickém systému referenčních a rutinních mléčných laboratořích

Akreditovaná Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM) Rapotín (č. 1340, akreditační certifikát 040/2005) provozuje národní výkonnostní testování (PT) pro určení BMM v rámci její referenční činnosti (v kooperaci pod hlavičkou ANSES, dříve AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) od roku 2007. Kontrolní sada zahrnuje 10 vzorků mléka, nativních i modifikovaných ředěním původního složení a 2 vzorky vodného roztoku NaCl. Test je prováděn kvartálně, pravidelně s cca 8 účastníky (laboratoře výzkumné, centrální chovatelské, mlékárenské a veterinární v České republice, rovněž centrální na Slovensku). Zahrnuty jsou obvykle 2 metody: kryoskop (referenční); nepřímá MIR-FT (MIR). Výsledky PT obdrží laboratoř do dvou týdnů.

Použité metody analýz BMM

V NRL-SM Rapotín byla použita pro stanovení BMM jednak referenční kryoskopická metoda Cryo-Star automatic (CRYO) Funke-Gerber (Germany; ČSN 57 0538; ISO 5764:2002(E)) a dále MIR-FT (Delta Instruments, Lactoscope FTIR, Holandsko). Ostatní pravidelní účastníci výkonnostních testů (OÚPT) použili metody podle seznamu a specifikace níže. Podrobnější charakteristické popisy použitých metod lze nalézt v předchozích pracích (Koops *et al.*, 1989; Buchberger a Klostermeyer, 1995; Crombrugge, 2003; Hanuš *et al.*, 2003 a, b, 2006 b, 2008 b, c, 2009 a, b, c, 2010, 2011 a, c; Tomáška *et al.*, 2005). Následně je uveden stručný sumář: metoda určení BMM v infračervené oblasti spektra (MIR-FT) regrese podle složení mléka a elektrické konduktivity mléka na zařízení Foss 6000 (Foss Electric, Dánsko; OÚPT) a Lactoscope FTIR (Delta Instruments, Holandsko; NRL-SM) byla kalibrována na desetibodové škále vzorků nativního mléka o různých BMM podle výsledků kryoskopické referenční metody (OÚPT), nebo nově odvozeným efektivním referenčním postupem (předmět této práce) retrospektivně podle referenčních hodnot z PT (NRL-SM) pro validaci nově zvoleného postupu.

Použité metody vyhodnocení výsledků nastavení metod měření BMM

Rutinní výkonnostní testy (PT) jsou vyhodnocovány systémem Euklidické vzdálenosti od počátku (Leray, 1993, 2006, 2009 a, b, c, 2010; Hanuš *et al.*, 1998). Výsledky kalibrace byly hodnoceny podle průměrné diference vůči referenčním hodnotám, směrodatnou odchylkou tohoto průměru individuálních diferencí ($n = 10$ referenčních hodnot v sadě) popřípadě korelačním koeficientem (validační) vztahu referenčních a instrumentálních hodnot po přijetí kalibrace. Základními statistickými metodami a popisem byly z výsledků PT ($n = 26$ za období 6,5 roků od června 2004 do února 2011) hodnoceny průměrná odchylka od počátku (systematická chyba), její směrodatná odchylka diferencí metody od referenčních hodnot (náhodná chyba) a pořadí účastníka v PT podle Euklidické vzdálenosti. Podrobnější hodnocení, resp. validace retrospektivní kalibrace, bylo provedeno výběrově za období posledních 3,5 roků a 14 PT, to je z periody aplikace nepřímé metody MIR-FT (Lactoscope FTIR, Delta Instruments) pro měření BMM v NRL-SM.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Hodnocení celkové periody vývoje a stavu v PT u měření BMM prostřednictvím NRL-SM

Kalibrace nepřímých validovaných metod a účast v PT jsou nezbytné podmínky akreditačních auditů. Laboratoř může kalibrovat nepřímou metodu na BMM podle zakoupených referenčních standardů nebo podle výsledků své vlastní referenční metody (kryoskop) na vhodné sadě mléčných vzorků.

V rutinních mléčných laboratořích nezdědka chybí referenční metody. Jejich pořízení, včetně příslušného profesně zdatného analytického personálu, může znamenat vysoké náklady. Rovněž nákup referenčních standardů a účast v PT představuje mnohdy značné náklady. Hledání úspor vede vývojově k myšlence praktické realizace retrospektivního principu efektivní kalibrace (RPEK) na základě derivace a kalibračního použití referenčních hodnot z výsledků PT. Programové zajištění moderních analyzátorů MIR-FT umožňuje takovou dodatečnou adjustaci po získání výsledků z PT. Důležitým předpokladem je, že počet účastníků v PT (odborníků, metod) zvyšuje pravděpodobnost věrohodnosti odvozených referenčních hodnot.

Doposud (únor 2011) bylo provedeno 26 PT pro stanovení BMM. Základní výsledková struktura PT je shrnuta v Tab. 1. Průměrná hodnota % neúspěšnosti v PT byla 23,9 a je ovlivněna charakterem rozptylu hodnot výsledků v PT. Pokud je vyšší počet účastníků, přiblíží se soubor odchylek výsledků od referenčních hodnot charakteru normální frekvenční distribuce (modelu Gaussovy křivky). Pak jsou pro nastavení PT typické podobné hodnoty % neúspěšnosti jako zde.

V Tab. 2 a na Obr. 1 je uveden vybraný příklad výsledku PT (NRL-SM) pro BMM, který demonstruje variabilitu analytických výsledků, jejich diagnostické trendy k systematickým a náhodným chybám (souřadnice d a sd v Obr. 1) a tím dosahovanou věrohodnost výsledků měření v praxi rutinních laboratořích. U PT pro BMM lze hovořit o plnohodnotnosti v praxi rutinních mléčných laboratořích a regulérnosti jako podkladu pro akreditační audity. Na Obr. 2 je zobrazen příklad PT pro BMM ve dvou vodných roztocích NaCl výhradně pro kryoskopickou metodu s podobnou diagnostickou účinností pro laboratorní personál. Hodnoty BMM v reálně použitých sadách vzorků se pohybovaly od $-0,5370$ do $-0,4960$ °C.

Výsledky uvedené jako statistické charakteristiky (průměr x a směrodatná odchylka s_x) hodnot d a sd (vedle Euklidické vzdálenosti hlavních charakteristik PT) souborů všech účastníků (I; Tab. 3) z PT a jen úspěšných účastníků (II; Tab. 4) ukazují srovnání jejich variability. Toto srovnání z obou pohledů, jak s_x pro d tak x pro sd , naznačuje logicky výrazně nižší hodnoty pro soubor II (Tab. 4) u testovaného ukazatele BMM.

Vyhodnocení použití postupu retrospektivní kalibrace nepřímé metody MIR-FT k měření BMM podle referenčních výsledků z PT

Opakované přijetí retrospektivní kalibrace MIR-FT na měření BMM podle referenčních (REF) hodnot z PT přineslo průměrný kalibrační korelační koeficient z predikce odhadu $0,804 \pm 0,162$ ($n = 10$; Tab. 5) MIR-FT k REF. Tyto korelační koeficienty kolísaly od $0,538$ ($P > 0,05$) do $0,958$ ($P < 0,001$). Pro srovnání stejná hodnota z prvního měření PT pro referenční metodu CRYO činila $0,991 \pm 0,009$ ($n = 14$; $P < 0,001$; Tab. 5). Korelační koeficienty zde kolísaly od $0,966$ ($P < 0,001$) do $0,998$ ($P < 0,001$). Srovnání výsledků vychází výrazně lépe pro referenční metodu CRYO. Regresní výpočet kalibrační korelace ze všech vzorků PT za uvažované období je pro metodu MIR-FT uveden na Obr. 3 (kontrolní měření ve formě predikce; $0,685$; $P < 0,001$). Totéž u metody CRYO jako první validační měření v PT je zobrazeno na Obr. 4 ($0,978$; $P < 0,001$). Srovnatelnost hodnot korelace je slabší. Možnost přijetí postupu retrospektivní kalibrace existuje, nicméně analytická hodnota nepřímého postupu MIR-FT pro BMM je pouze screeningová. Lze uvést i vybrané lepší příklady individuálních kalibrací (pro MIR-FT) a výsledky PT (pro CRYO) na Obr. 5 a 6 ($0,875$ a $0,882$ ($P < 0,001$); $0,997$ ($P < 0,001$)).

Ve stejném období opakované retrospektivní kalibrace byla průměrná odchylka od referenčních hodnot po přijaté kalibraci MIR-FT podle reference PT (predikční vyjádření) průměrně $-0,000123 \pm 0,001399$ °C ($n = 13$). Průměrná směrodatná odchylka tohoto průměrného rozdílu od referenčních hodnot činila $0,0062 \pm 0,003339$ °C.

Vhodností screeningového stanovení ekvivalentu BMM v kontrole kvality syrového kravského mléka metodou MIR a MIR-FT za využití simultánního měření konduktivity se pozitivně zabývali někteří autoři (Koops *et al.*, 1989; Buchberger a Klostermeyer, 1995;

Crombrugge, 2003; Tomáška *et al.*, 2005; Hanuš *et al.*, 2009 a). Tato práce rovněž dále přispívá vývojově k uvedenému postupu.

Validace použití retrospektivního způsobu kalibrace nepřímé metody MIR-FT na měření BMM podle referenze z PT na bázi vlastních výsledků metody v PT

Validaci retrospektivního kalibračního postupu lze provést hodnocením jeho výsledků v následném PT po cca 10 týdnech od přijetí kalibrace v daném systému laboratorní sítě a jejího provozu. V období, kdy byl opakovaně použit v NRL-SM retrospektivní způsob kalibrace BMM byla úspěšnost metody MIR-FT v PT (Tab. 6) 10,0 % a průměrné pořadí v testu $8,5 \pm 0,5$. Průměrná odchylka od referenčních hodnot se pohybovala od $-0,01378$ do $0,01737$ ($n = 10$) s průměrem $-0,001462 \pm 0,010408$ °C ($n = 10$). Směrodatná odchylka průměrného rozdílu od referenčních hodnot v PT se pohybovala od $0,00238$ do $0,01277$ ($n = 10$) s průměrem $0,00578 \pm 0,003146$ °C ($n = 10$). U stejného období lze pro srovnání uvést korespondující ukazatele kryoskopické metody (CRYO) v NRL-SM: úspěšnost v PT 85,7 %; průměrné pořadí v testu $4,9 \pm 2,2$; průměrná odchylka od referenčních hodnot od $0,00069$ do $0,00492$ ($n = 10$) s průměrem $0,002591 \pm 0,001332$ °C ($n = 14$); směrodatná odchylka průměrného rozdílu od referenčních hodnot od $0,00061$ do $0,00237$ ($n = 10$) s průměrem $0,00115 \pm 0,0006$ °C ($n = 14$). Uvedené porovnání vykazuje poměrně špatně srovnatelné hodnoty zvolených ukazatelů mezi metodami (Tab. 6). Výsledky také ukazují, že metoda MIR-FT se s ohledem na princip vyhodnocování PT mohla jen velmi málo podílet na odvozování referenčních hodnot v PT. Projevil se tak výraznější rozdíl v analytické hodnotě metod ve prospěch metody referenční oproti nepřímé.

Výsledky MIR-FT jsou pro určení BMM zřetelně horší, což potvrzuje pouze screeningovou hodnotu metody pro posunutý pozitivní výběr vzorků při kontrole kvality syrového mléka. Negativně posouzené vzorky musí být zkoumány metodou CRYO tak, aby ještě cca polovina negativně označených vzorků (MIR-FT) mohla být vrácena do skupiny standardní kvality mléka. Za takových okolností a s ohledem na výše uvedené korelační koeficienty kalibrace (na hranici přijatelnosti) lze metodu MIR-FT na měření BMM retrospektivně kalibrovat s přijetím žádoucího posunu pro splnění výše uvedené podmínky pozitivního výběru. Korelační koeficient výsledků BMM metody MIR-FT k referenčním hodnotám v PT za celé období je na Obr. 7 a není analyticky vůbec nijak výrazný $0,399$ ($P < 0,001$). Celkově pak byly výsledky validace kalibrace metody MIR-FT na měření BMM v PT zřetelně horší v porovnání k charakteristikám vlastního výsledku kalibrace s ohledem na získané kalibrační korelační koeficienty (Obr. 7 a 3; $0,399$ ($P < 0,001$), $< 0,685$ ($P < 0,001$)).

Možnost aplikace uvedených výsledků v praxi mléčných laboratoří při měření BMM

Všechny použité soubory (zejména Tab. 3, 4, 5, 6) poskytují informace z dlouhodobé řady pro případné výpočty některých metodických limitů v příslušném PT a systému retrospektivní kalibrace. Např. umožňují $1,96$ násobky s_x pro 95% interval spolehlivosti a model normální frekvenční distribuce pro některou z charakteristik PT nebo retrospektivní kalibrace (d , sd , r). Takové výpočty jsou pak významné při validaci a akreditaci zmíněného postupu PT a kalibrace v jednotlivých laboratořích systému laboratorní sítě a při následných akreditačních auditech.

Předností použití vyvinutého postupu je rovněž fakt, že spolehlivost ověřených (statisticky očištěných a deklarovaných) referenčních hodnot z PT, při nezbytné podstatné účasti referenčních metod v PT, je pak pravděpodobně vyšší než při aplikaci referenčních hodnot jedné referenční metody při kalibraci nepřímého postupu měření BMM v konkrétní laboratoři.

ZÁVĚR

Činnost pracovních laboratorních sítí PT (proficiency testing) je tedy možné efektivně a efektivně (pouze s nákladem na PT, ale bez nákladů na pořízení referenčních standardů pro

kryoskop nebo pro MIR-FT) využít pro nabytí validovaných referenčních hodnot ke kalibraci moderních přístrojů (MIR a MIR-FT) v rutinních mléčných laboratořích. Důležitým předpokladem však je, aby účastníky PT v daném případě (nutno mít pragmaticky ověřeno) pro uvedený ukazatel (bod mrznutí mléka) byla použita nejméně přes 50 % případů metoda referenční (nikoliv nepřímá). Znamená to, že metod s nepřímým principem měření by mělo být ve skupině PT méně než polovina. Použití navržené metody také předpokládá pravidelnou kontrolu funkcí a vlastností přístroje (obecně opakovatelnost měření, stabilitu nastavení – pilotními vzorky, účinnost výplachu, přijatelnou chybu z přenosu atp.) a jejich pozitivní výsledky, zejména v období od účasti v PT do případného přijetí uvedené kalibrace.

Zmíněný retrospektivní postup kalibrace je možné principiálně aplikovat na všechny nepřímé (MIR a MIR-FT) měřené mléčné ukazatele. Přesto, aby byla respektována standardizace, ho lze doporučit jen pro ukazatele metodicky nestandardizované (jako BMM, koncentrace močoviny v mléce, volné mastné kyseliny, kyselina citrónová, ketony), ale ne pro standardizované (tuk, bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá). Nicméně, při jakékoliv relevantní kalibraci má nepřímá metoda MIR nebo MIR-FT určení BMM věrohodnost výsledků a analytický význam pouze na screeningové úrovni.

Práce byla podporována projekty MŠMT LA 09030 a MSM 2678846201 a aktivitami NRL–SM a vzdělávacího projektu MŠMT–CZ.1.07/2.3.00/09.0081.

Literární reference

- AEBI, R. – BÜHLMANN, G. (2000 a): Der FAM-Zellzahl-Standard. *AFEMA Tagung*, Mosonmagyaróvár, 2000.
- AEBI, R. – BÜHLMANN, G. (2000 b): Qualitätssicherung der Zellzahlbestimmung. *AFEMA Tagung*, Mosonmagyaróvár, 2000.
- ARNDT, G. – WEISS, H. – UBBEN, E. H. (1991): Der Gehalt somatischer Zellen in der Rohmilch: Beiträge zu Messung, Interpretation und praktischer Bedeutung für Milchqualität und Mastitisbekämpfung. I. Statistische Verfahren zur Beurteilung der Datenqualität von Ringversuchsergebnissen, dargestellt am Beispiel der Zählung somatischer Zellen in Milch. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, s. 167–178. ISSN 0023-1347
- BARBANO, D. (2009): Reference system and centralized calibration for milk (payment) testing. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, s. 315–316.
- BAUCH, W. – HUBER, B. – BUCHBERGER, J. (1993): Zum Einfluss einiger Parameter auf die Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch mit den Cryostar II – LC. DMZ, *Dtsch. Milchwirtsch. Zeitsch., Lebensmittel und Milchwirtschaft*, 114, 5, 1993, s. 112–114.
- BAUMGARTNER, C. (2007): Reference system – Principle and practice. In: Proceedings of the 35th biennial session of ICAR, Kuopio, Finland, June 2006, *EAAP publication No. 121, Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals*, 2007, s. 309.
- BAUMGARTNER, C. (2009): The way to reference systems and centralised calibration for milk recording testing. Present status in Germany. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, s. 307.
- BOSSUYT, R. (2003): Milk quality payment in Belgium: why and how. *AFEMA Tagung*, Mosonmagyaróvár, May, 2003, MCC Vlaanderen, s. 11.
- BROUWER, T. (1981): Calculations concerning the determination of the freezing-point depression of milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 1981, 35. ISSN 0028-209X
- BUCHBERGER, J. (1990 a): Einfluss von Rasse, Laktationsstadium und Untersuchungsfehler auf den Gefrierpunkt der Milch. *Schule und Beratung*, 11/90, 1990, IV-9-11.
- BUCHBERGER, J. (1997): Erfahrungen mit der Gefrierpunktuntersuchung der Milch. Sborník VÚCHS Rapotín „Management chovu dojnic“, duben 1997.
- BUCHBERGER, J. (1991): Probleme auch ohne Fremdwasser? *Top Agrar*, 2, 1991, R24–R26.

- BUCHBERGER, J. (1991 b): Ursachen von Überschreitungen des Grenzwertes von $-0,515\text{ }^{\circ}\text{C}$ beim Gefrierpunkt der Milch. *Schule und Beratung*, 9-10, 1990, IV-8-10.
- BUCHBERGER, J. (1994): Zum Gefrierpunkt der Milch: Bewertung und Interpretation. *Dtsch. Milchwirtsch. Zeitsch.*, 115, 8, 1994, s. 376–383.
- BUCHBERGER, J. – KLOSTERMEYER, H. (1995): Determination of freezing point in milk with the „System 4000 Milko-Scan” from Foss Electric A/S. DMZ, *Dtsch. Milchwirtsch. Zeitsch.*, 23/24, 1995, s. 1–14.
- CASTANEDA, R. (2009): Reference system and centralized calibration for milk recording testing in Argentina. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, s. 309–313.
- COVENEY, L. (2001): Milk testing proficiency scheme, Round 26 – November 2001. *Example laboratory*, Savant Technologies, 2001, s. 12.
- CROMBRUGGE VAN, J. M. (2003): Freezing Point. *Bulletin of IDF*, 383, 2003, s. 15–22. ISSN 0250-5118
 ČSN 57 0530: *Methods for testing of milk and milk products* (In Czech). Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, 1973, Praha.
- ČSN 57 0536: *Determination of milk composition by mid-infrared analyzer*. (In Czech) Český normalizační institut, 1999, Praha.
- ČSN 57 0538: *Stanovení bodu mraznutí mléka pomocí mléčných kryoskopů*. Determination of freezing point in milk – cryoscope method. Český normalizační institut, 1998, Praha.
- DEMOTT, B. J. (1969): Relationship of freezing point of milk to its specific gravity and concentration of lactose and choride. *J. Dairy Sci.*, 52, 6, 1969, s. 882. ISSN 0022-0302
- EEC 92/46, Council Directive: Milk and milk product quality. Official Journal, L 268, 14/9, s. 1–32.
- EISSES, J. – ZEE, B. (1980): The freezing point of autentic cow’s milk and farm tank milk in the Netherlands. *Neth. Milk Dairy J.*, 34, 1980, s. 162–180. ISSN 0028-209X
- FREEMAN, T. R. – BUCY, J. L. (1967): Distribution of milk freezing points in authentic herd samples. *J. Dairy Sci.*, 50, 6, 1967, s. 951. ISSN 0022-0302
- FUCHS, M.: (2000) Der AFEMA-Sternstest: ein Beitrag zur internationalen Harmonisierung der Rohmilchanalytik. *XXVIII Óvári Tudományos Napok*, Mosonmagyaróvár 2000, s. 71–75.
- GENČUROVÁ, V. – HANUŠ, O. – VYLETĚLOVÁ, M. – LANDOVÁ, H. – JEDELSKÁ, R. (2008): The relationships between goat and cow milk freezing point, milk composition and properties. *Sci. Agric. Boh.*, 39, 4, 2008, s. 324–328.
- GOLC-TEGER, S. (1997): Slovenia in the European network of dairy laboratories. In: 5th International Symposium ”Animal Science Days”, Opatija, 23. – 26. September 1997. *Animal science days, Agriculturae Conspectus Scientificus*, 62, 1997, s. 37–40.
- GOLC-TEGER, S. (1995): Zagotavljanje kakovosti analiz v mlekarških laboratorijih = Analytical quality assurance in dairy laboratories. In: 1. slovenski mednarodni kongres Mleko in mlečni izdelki, Portorož, Slovenija, 20. – 22. September 1995. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*, 1996, s. 279–283.
- GOLC-TEGER, S. – POGAČAR, J. – VALINGER, E. (1996): The Slovenian dairy laboratories proficiency testing scheme. In: *Analytical quality and economic efficiency in dairy food laboratories: abstracts*. Sonthofen, International Dairy Federation (IDF), AOAC International, German Dairy Association, 1996, 3.
- GRAPPIN, R. (1993): European network of dairy laboratories. In: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen, Germany, 1992-05-18/20, Brussels, 1993, s. 205–211.
- GRAPPIN, R. (1987): Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis - application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 1987, s. 3–12.
- HANUŠ, O. – BENDA, P. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (1998): Design and evaluation of the first national qualitative testing of routine milk analyses. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* (Brno), XLVI, 3, 1998, s. 33–53. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – BJELKA, M. – HERING, P. – KLIMEŠ, M. – KOZÁKOVÁ, A. – PODMOLÍKOVÁ, M. – GENČUROVÁ, V. (2003 a): Šlechtitelské a technologické aspekty bodu mraznutí mléka a prevence případných problémů. In: *Šlechtitelské a technologické aspekty chovu dojených krav a kvality mléka (zejména s ohledem na bod mraznutí)*: sborník referátů VÚCHS Rapotín, 2003, s. 81–97. ISBN 80-903142-1-X
- HANUŠ, O. – FRELICH, J. – TOMÁŠKA, M. – VYLETĚLOVÁ, M. – GENČUROVÁ, V. – KUČERA, J. – TRINÁCTÝ, J. (2010): The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health

- indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 55, 1, 2010, s. 11–29. ISSN 1212-1819
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – JANŮ, L. – MACEK, A. – HERING, P. – KLIMEŠ, M. – ZAJÍČKOVÁ, I. (2006): Zajištění kvality výsledků analýz složení mléka modifikacemi testů laboratorní způsobilosti. *Výzkum v chovu skotu*, XLVIII, 173, 1, 2006, s. 1–19. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – JEDELSKÁ, R. – ŠTOLC, L. – KLÍMOVÁ, Z. – MOTYČKA, Z. – KOPECKÝ, J. (2009): Validace a nejistoty měření koncentrace močoviny a bodu mrznutí mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR-FT) pro laboratoře kvality mléka. *Výzkum v chovu skotu*, LI, 186, 2, 2009, s. 40–53. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – KUČERA, J. – VYLETĚLOVÁ, M. – TRINÁCTÝ, J. (2009 b): Analyse of relationships between freezing point and selected indicators of udder health state among cow, goat and sheep milk. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LVII, 5, 2009, s. 103–110. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – VYLETĚLOVÁ, M. – KUČERA, J. – TRINÁCTÝ, J. (2009 c): The effects of milk indicators of sheep mammary gland health state on some milk composition and properties. *Folia Veter.*, 53, 4, 2009, s. 208–216. ISSN 0015-5748
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – VYLETĚLOVÁ, M. – LANDOVÁ, H. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (2008 a): The comparison of relationships between milk indicators in different species of ruminants in the Czech Republic. *Výzkum v chovu skotu*, L, 183, 3, 2008, s. 35–44. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – VYLETĚLOVÁ, M. – LANDOVÁ, H. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. (2008 b): The effect of goat udder health on composition and properties of raw milk. *Folia Veter.*, 52, 3-4, 2008, s. 149–154. ISSN 0015-5748
- HANUŠ, O. – HANUŠOVÁ, K. – VYLETĚLOVÁ, M. – KOPEC, T. – JANŮ, L. – KOPECKÝ, J. (2011 a): Selected abiotic factors influencing raw cow milk freezing point depression. Accepted, *Acta Vet. Brno*, 2011. ISSN 0001-7213
- HANUŠ, O. – JANŮ, L. – MACEK, A. – KOPUNECZ, P. – GENČUROVÁ, V. (2006 b): Vlivy na bod mrznutí syrového kravského mléka od nadojení až po jeho zpracování. *Mliekarstvo*, 1, 37, 2006, s. 44–50. ISSN 1210-3144
- HANUŠ, O. – KLIMEŠ, M. – MIHULA, P. – KOZÁKOVÁ, A. – JEDELSKÁ, R. (2003 b): Impacts of the sampling of milk and the basic milk treatment on its freezing point and other compositional parameters. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu*, XLV, 164, 4, 2003, s. 10–17. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – VYLETĚLOVÁ, M. – GENČUROVÁ, V. – HULOVÁ, I. – LANDOVÁ, H. (2008 c): Differences of some indicators of raw milk properties and especially mineral composition between small ruminants as compared to cows in the Czech Republic. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LVI, 5, 2008, s. 51–56. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – VYLETĚLOVÁ, M. – TOMÁŠKA, M. – SAMKOVÁ, E. – GENČUROVÁ, V. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (2011 b): The effects of sample fat value manipulation on raw cow milk composition and indicators. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIX, 1, 2011, s. 101–112. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – ZHANG, Y. – BJELKA, M. – KUČERA, J. – JANŮ, L. – JEDELSKÁ, R. (2011 c): Chosen biotic factors influencing raw cow milk freezing point. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2011, LIX, 5, s. 65–82. ISSN 1211-8516
- CHLÁDEK, G. – ČEJNA, V. (2005): The relationships between freezing point of milk and milk components and their changes during lactation in Czech Pied and Holstein cows. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIII, 5, 2005, s. 63–70. ISSN 1211-8516
- ISO 5764: 2002 (E), IDF 108: 2002 (E) 2002: International standard. Milk – Determination of freezing point – Thermistor cryoscope method (Reference method) 15.
- JANŠTOVÁ, B. – DRAČKOVÁ, M. – NAVRÁTILOVÁ, P. – HADRA, L. – VORLOVÁ, L. (2007): Freezing point of raw and heat-treated goat milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 52, 11, 2007, s. 394–398. ISSN 1212-1819
- KIRCHNEROVÁ, K. – FOLTYS, V. (2005): The biochemical parameters of milk quality in relationship to freezing point. (In Slovak) Sborník: XXXII. seminář o jakosti potravin a potravinových surovin. Brno MZLU, 2005, s. 17.
- KLÍČNÍK, V. (1978): *Technologie živočišných produktů (Mlékařství)*. SPN, VŠZ Brno, 1978, 270 s.
- KOLOŠTA, M. (2003): Effect of pasture dairy cow nourishment level on the milk freezing point. (In Slovak) *Mliekarstvo*, 34, 3, 2003, s. 25–27. ISSN 1210-3144
- KOPUNECZ, P. (2011): Osobní sdělení ČMSCH a.s.

- KOOPS, J. – KERKHOFF MOGOT, M. F. – VAN HEMERT, H. (1989): Routine testing of farm tank milk by infra-red analysis. IV Prediction of the freezing-point depression from infra-red measurements and conductivity. *Neth. Milk Dairy J.*, 43, 1989, s. 3–16. ISSN 0028-209X
- LERAY, O. (1993): CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen, Germany, 1992-05-18/20, Brussels, 1993, s. 349–360.
- LERAY, O. (2007): Reference and calibration system for routine milk testing – advantages / disadvantages, choice criteria. 3rd ICAR reference laboratory network meeting – Kuopio, Finland – 6th June, 49–65. *Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals. EAAP publication No. 121*, 2007, Proceedings of the 35th biennial session of ICAR, ISBN 978-90-8686-030-2, 2006, s. 311–317.
- LERAY, O. (2009 a): Update on ICAR reference laboratory network. Identification, breeding, production, health and recording of farm animals. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, s. 291–294.
- LERAY, O. (2009 b): ICAR AQA strategy – International anchorage and harmonisation. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, s. 295–300.
- LERAY, O. (2009 c): Interlaboratory reference system and centralised calibration – Prerequisites and standard procedures. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, s. 301–305.
- LERAY, O. (2010): Analytical precision performance in ICAR proficiency testing programmes. *ICAR 37th Annual Meeting*, Riga, Latvia, 31 May – 4 June, 2010.
- MACEK, A. – HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – VYLETĚLOVÁ, M. – KOPECKÝ, J. (2008): The relations of sheep's and cow's freezing point of milk to its composition and properties. *Sci. Agric. Boh.*, 39, 4, 2008, s. 329–334. ISSN 1211-3174
- MICHALAK, W. (1972): Porównanie oznaczeń zawartości białka w mleku wykonywanych przez Laboratoria Wojewodzkich Stacji Oceny Zwierząt. *Biul. Inst. Gen. Hodow. Zwierząt PAN*, 27, 1972.
- MICHALAK, W. – CYNALEWSKA, H. – OCZKOWICZ, H. (1978): Collaborative testing among laboratories routinely testing fat and protein milk. *J. Dairy Sci.*, 61, 1978, s. 1634–1636. ISSN 0022-0302
- RASMUSSEN, M. D. – BJERRING, M. (2005): Development of bulk milk quality from herds with automatic milking system. 26th–28th April, ICAR Technical Series – No 10, Physiological and Technical Aspects of Machine Milking, Nitra, Slovak Republic, 2005, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-07-3, s. 71–86.
- REGULATION (EC) No. 853/2004.
- ROHM, H. – PLESCHBERGER, C. – FOISSY, F. (1991): Der Gefrierpunkt pasteurisierter Milch in Österreich. *Ernährung / Nutrition*, 15, 11/12, 1991, s. 667–671.
- ROUBAL P. – KOPUNECZ P. – PEŠINOVÁ H. *et al.* (2005): SCL pro hodnocení jakosti mléka, Praha, červen, 2005, 19 s.
- ROUBAL, P. – SNÁŠELOVÁ, J. – BUCHVALDKOVÁ, T. (2004): The freezing point of the raw and heat treated cow milk. (In Czech) Proceeding of seminar contributions of VÚCHS Rapotín: *The actual problems of management in the cattle keeping*, 2004, s. 71–76.
- SHERBON, J. W. (1975): Collaborative study of the Pro-Milk method for the determination of protein in milk. *J. AOAC*, 58, 4, 1975, s. 770–772.
- TOMÁŠKA, M. – HOFERICOVÁ, M. – KOLOŠTA, M. (2005): The measurement of equivalent of milk freezing point. (In Slovak) *Mliekarstvo*, 36, 4, 2005, s. 7–9. ISSN 1210-3144
- TOMÁŠKA, M. – SUHREN, G. – HANUŠ, O. – WALTE, H. G. – SLOTTOVÁ, A. – HOFERICOVÁ, M. (2006): The application of flow cytometry in determining the bacteriological quality in raw sheep's milk in Slovakia. *Lait*, 86, 2006, s. 127–140. ISSN 0023-7302
- VINES, D. T. – JENNY, B. F. – WRIGHT, R. E. – GRIMES, L. W. (1986): Variation in milk fat, protein and somatic cell count from four dairy herd improvement laboratories. *J. Dairy Sci.*, 69, 1986, s. 2219–2223. ISSN 0022-0302
- WALSTRA, P. – JENNESS, R. (1984): *Dairy Chemistry and Physics*, Wiley, 1984, 467 s. ISBN 9780471097792
- WIEDEMANN, M. – BUCHBERGER, J. – KLOSTERMEYER, H. (1993): Ursachen für anomale Gefrierpunkte der Rohmilch. *Dtsch. Milchwirtsch. Zeitsch.*, 1. und 2. Mitteilung, 114, 1993, 22, s. 634–644; 114, 23, 1993, s. 656–663.
- WOOD, R. (1994): Proficiency testing and accreditation of food analysis Laboratories. In: *I. Conference on practical application of European legislation on foodstuffs*. Bled, Slovenia 1994-10-517, Ljubljana, 1994, s. 55–65.

WOOD, R. – NILSSON, A. – WALLIN, H. (1998): Role of proficiency testing in the assessment of laboratory quality. In: *Quality in the food analysis laboratory*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1998, s. 172–202.

Tab. 1 Dosavadní charakteristiky výkonnostního testu (PT) pro BMM z NRL-SM

Ukazatel	BMM
Počet PT	26
Počet účastníků celkem (opakovaně)	184
Průměrný počet účastníků v PT	7,08±1,87
Počet neúspěšných účastníků	44
Průměrný počet neúspěšných účastníků	1,69±0,74
% neúspěšných účastníků	23,9

Tab. 2 Výsledky výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení deprese bodu mrznutí mléka (BMM; difference v °C) metodami kryoskopie, MIR a MIR-FT z NRL-SM

u	d	sd	RE	t	význ.
165	-0,00028	0,00112	0,00115	0,79	ns
168	-0,00044	0,00112	0,00120	1,24	ns
164	-0,00023	0,00126	0,00128	0,58	ns
167	-0,00108	0,00160	0,00193	2,13	ns
166	-0,00160	0,00137	0,00211	3,69	**
169	-0,00193	0,00098	0,00216	6,23	***
163	0,00198	0,00131	0,00237	4,78	***
162	0,00003	0,00256	0,00256	0,04	ns
161	0,00492	0,00130	0,00509	11,97	***
D	0,0014	0,0014			
sD	0,0020	0,0004			

→ diskriminační limit úspěšnosti účastníků (90 %)

u = účastník (přístroj); d = průměrná diference LAB-REF (°C; laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů; RE = Euklidická vzdálenost od počátku; t = hodnota kritéria párového t-testu; význ. významnost rozdílů (ns = $P > 0,05$; * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$); N = nevyhověl; D = průměr d a sd; sD = směrodatná odchylka D pro d a sd.

Tab. 3 Statistické charakteristiky (průměr x a směrodatná odchylka sx) hodnot d a sd souborů všech účastníků (I) z PT pro BMM (°C) (statistika všech účastníků testů)

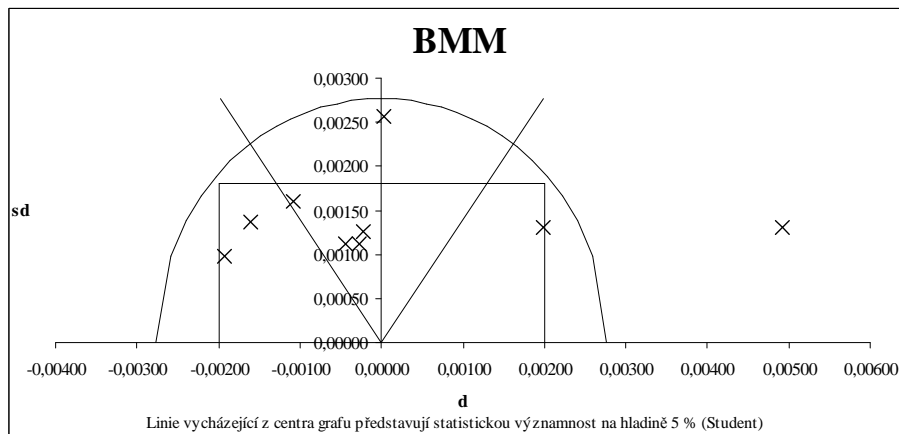
Ukazatel		d	sd
BMM	n	184	184
	x	0,0000203	0,0019995
	sx	0,0032808	0,0022453

n = počet účastníků všech PT; x = aritmetický průměr; sx = směrodatná odchylka; d = průměrná diference LAB-REF (°C; laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů.

Tab. 4 Statistické charakteristiky (průměr x a směrodatná odchylka sx) hodnot d a sd souborů jen úspěšných účastníků (II) vybraných z PT pro BMM (°C)

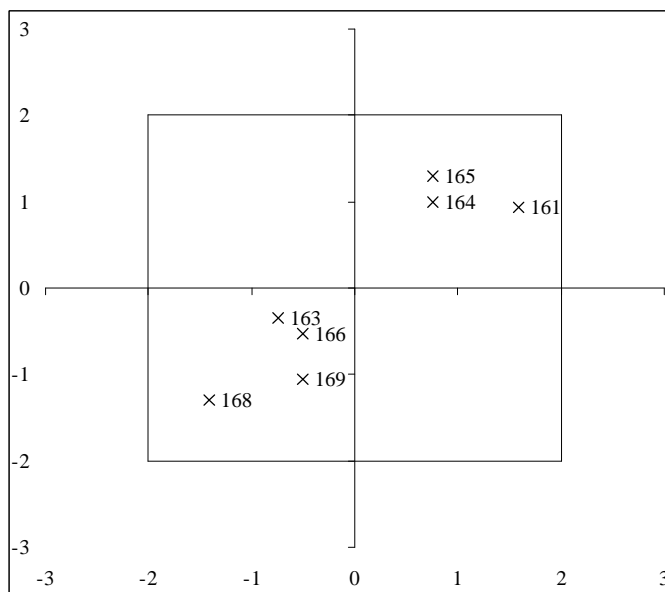
Ukazatel		d	sd
BMM	n	140	140
	x	0,000220	0,001259
	sx	0,001711	0,000546

Obr. 1 Graf Euklidické vzdálenosti výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení bodu mrznutí mléka (BMM; °C) metodami kryoskopie, MIR a MIR-FT z NRL-SM (Tab. 1)



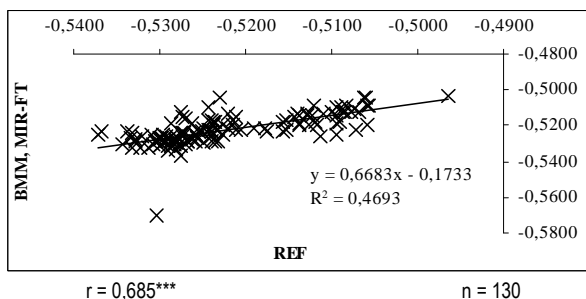
d = průměrná odchylka; sd = variabilita průměrné diference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek, kdy body pod liniemi jsou významně odchýlené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamné ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník velmi úspěšný výsledek.

Obr. 2 Zobrazení PT stanovení bodu mrznutí (°C) vodných roztoků NaCl kryoskopicky (2 vzorky) z NRL-SM

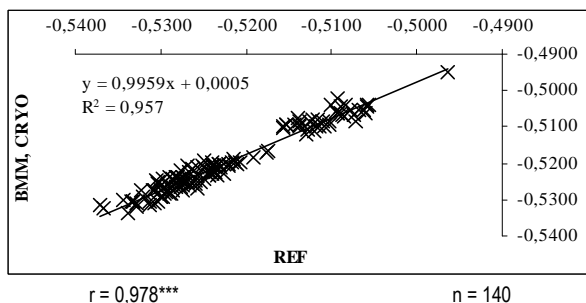


Zobrazení pozice a čísla účastníka standardizované podle směrodatné odchylky z PT (osa x vzorek 1 a osa y vzorek 2), rámce úspěšnosti účasti v hodnotě ± 2 sigma, úhlopříčka stoupající zleva doprava značí polohu s ohledem na systematickou chybu a úhlopříčka stoupající zprava doleva značí polohu v relaci k chybě náhodné z hlediska analyticko-diagnostické účinnosti grafu.

Obr. 3 Regresní výpočty korelace ze všech vzorků PT za uvažované období pro metodu MIR-FT (kontrolní měření (KM) ve formě predikce) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření bodu mrznutí mléka (BMM; °C)

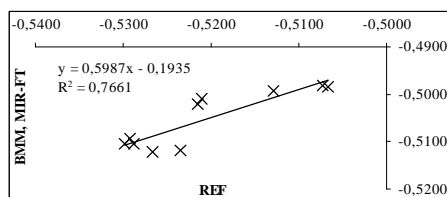


Obr. 4 Regresní výpočet korelace ze všech vzorků PT za uvažované období pro metodu CRYO (první reálné měření) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření BMM (°C)



Obr. 5 Vybrané výsledky regrese individuální retrospektivní kalibrace metody MIR-FT (1. měření (PM) a kontrolní měření (KM) ve formě predikce; n = 10) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření BMM (°C)

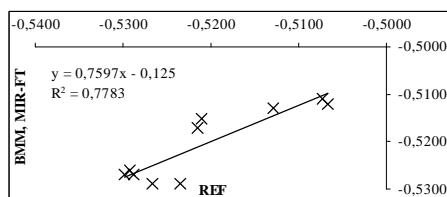
PM



$r = 0,875^{***}$

$n = 10$

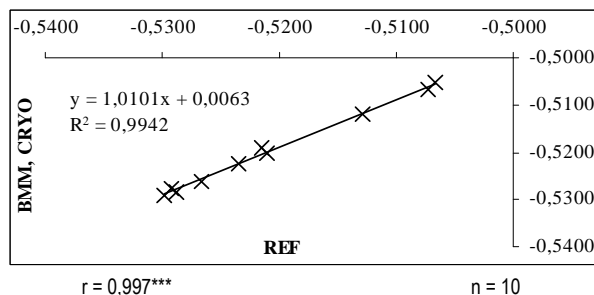
KM



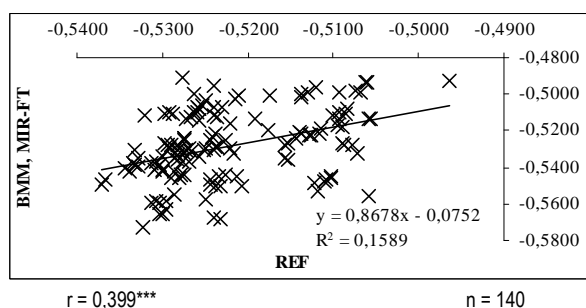
$r = 0,882^{***}$

$n = 10$

Obr. 6 Vybraný výsledek regrese individuálního PT (metoda CRYO, 1. měření – validace) podle referenčních výsledků (REF) pro měření BMM (°C)



Obr. 7 Regresní výpočet korelace ze všech vzorků PT za uvažované období pro metodu MIR-FT (1. reálné měření) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření BMM (°C)



Tab. 5 Výsledky metod MIR-FT při aplikaci retrospektivní kalibrace a CRYO při určení BMM (°C) v regulérním PT

Metoda	xr	xd	xsd
MIR-FT	0,804 ± 0,162	-0,000123 ± 0,001399	0,0062 ± 0,003339
CRYO	0,991 ± 0,009	viz Tab. 6	viz Tab. 6

xr = průměrný korelační koeficient mezi hodnotami metody a referenčními hodnotami v PT; xd = průměr průměrných rozdílů od referenčních hodnot; xsd = průměr směrodatných odchylek individuálních rozdílů od referenčních hodnot

Tab. 6 Výsledky validace metod MIR-FT po aplikaci retrospektivní kalibrace a CRYO při určení BMM (°C) v regulérním PT

Metoda	% +	x Poř.	xd	xsd
MIR-FT	10,0	8,5 ± 0,5	-0,001462 ± 0,010408	0,00578 ± 0,003146
CRYO	85,7	4,9 ± 2,2	0,002591 ± 0,001332	0,00115 ± 0,0006

+ = úspěšnost v PT; x Poř. = průměrné pořadí v PT

Kontaktní adresa

doc. Dr. Ing. Oto Hanuš
 Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.
 Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice
 Tel.: + 420 583 392 172, e-mail: oto.hanus@vuchs.cz