ANALÝZA VÝSLEDKŮ KALIBRACÍ PRO STANOVENÍ KASEINU NEPŘÍMOU METODOU INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE

O. Hanuš, T. Yong, J. Kučera, V. Genčurová, K. Hanušová, T. Kopec, J. Kopecký,
R. Jedelská

Došlo: 9. března 2010

Abstract

HANUŠ, O., YONG, T., KUČERA, J., GENČUROVÁ, V., HANUŠOVÁ, K., KOPEC, T., KOPECKÝ, J., JEDELSKÁ, R.: *Analysis of calibration results for casein determination via indirect method of infrared spectroscopy*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2010, LVIII, No. 5, pp. 123–136

Casein measurement is important for cheesemaking and control of dairy cow nutrition. Reference Kjeldahl method is not suitable for routine purposes. Infra-red spectroscopy MIR and MIR-FT use can be a solution. However, their casein specificity is relatively limited. Aim of the work was to assess the quality of performed calibrations for validation of calibration parameters. A retrospective analysis of MIR and MIR-FT calibrations was performed for estimation of limits their suitable parameters. Mean casein values of reference sample sets varied from 2.49 to 2.7% (2.61 ± 0.155). Mean variation range was $0.561 \pm 0.164\%$. The mean correlation coefficient of calibration (KKK) was 0.974 ± 0.018 ($P < 0.001$). The mean standard deviation of mean for individual differences (SDID) was $0.03 \pm 0.011\%$ (from 0.01 to 0.08). MIR-FT results were slightly better both for calibration and for proficiency testing. The high and low KKKs were higher in the case of accepted calibration as in proficiency testing for MIR-FT and MIR ($0.986 > 0.964$ and $0.970 > 0.948$; $0.982 > 0.947$ and $0.947 > 0.911$; $P < 0.001$). The casein number varied from 79.4 to 80.56% in bulk milk samples in three years, its variability was low from 1.4 to 1.5% relatively, which shows on relatively reliable casein analyses by methods MIR and MIR-FT. It does not need to agree fully for individual milk samples. It is linked more to MIR than MIR-FT. Limits for acceptable calibration parameters were derived: ≥ 0.945 for KKK; 0.048 for SDID and 0.029% for mean difference as maximum.

cow, raw milk, sample, reference method, infrared spectroscopy, nitrogen, casein, central calibration system, validation, correlation, regression analysis

Pro možnost dobrého odhadu dusíkato-energetické bilance výživy dojnic je velmi vhodná kombinace výsledků mléčné močoviny s obsahem bílkovin (Erbersdobler *et al.*, 1979, 1980; Oltner a Wiktorsson, 1983; Kirchgessner *et al.*, 1986; Famigli-Bergamini, 1987). V roli představitele rutinně měřených dusíkatých látek v mléce může být vhodný také stanovený obsah kaseinu. Uvedené je umožněno novým stupněm rozvoje sériových nepřímých analytických metod (Karman *et al.*, 1987; Lefier, 1994; Lefier *et al.*, 1996; Foss 1997, 2000; Tsenkova *et al.*, 2000; Kukačková *et al.*, 2000; Fulton *et al.*, 2002; Jankovská a Šustová, 2003; Broutin, 2006; Šustová *et al.*, 2007). Kasein nejenže tedy závisí významně na energe-

tické dotaci dojnic výživou, a může být proto jejím indikátorem, ale zajímavý je také pro mlékařské technology z hlediska výtěžnosti suroviny více než doposud konvenčně nepřímo měřený obsah hrubých bílkovin. Zejména sýraře přirozeně zájímá obsah kaseinu a kaseinové číslo. Podle nedávných výsledků se aktuální hodnoty kaseinového čísla u obou dojených plemen skotu v České republice pohybují kolem $79 \pm 3\%$ (Janů *et al.*, 2007; Hanuš *et al.*, 2007). Také obsah čistých bílkovin je z výše naznačených důvodů výtěžnosti mlékárenských výrobků metodicky zajímavý pro mlékárenské pracovníky (Barbano *et al.*, 1991).

Stanovení kaseinu

Existují určité definiční a metodické problémy stanovení dusíkatých látek v mléce (Hanuš *et al.*, 1995). Týkají se také stanovení kaseinu v mléce nepřímými metodami (Paggi, 2004, cit. Broutin, 2006), což platí rovněž pro MIR a MIR-FT. Druhá metoda je infraanalýzou mléka ve střední vlnové oblasti s vyhodnocením IR spektra pomocí Michelsonova interferometru a Fourierových transformací (Lefier *et al.*, 1996). Broutin (2006) uvedl dobrou shodu, resp. nízkou variabilitu mezi výsledky MIR-FT a referenčními hodnotami (Kjeldahlova metoda) kaseinu v případě bazénových vzorků mléka. U těchto vzorků rovněž méně kolísá kaseinové číslo. V případě použití individuálních vzorků mléka kolísá kaseinové číslo podstatně více, kdy variační koeficient může být dvakrát až čtyřikrát vyšší podle charakteru srovnávaných souborů dat. Podobnou měrou se pak zhoršuje uvedená shoda metod. V případě známého

přídavku kaseinu do mléka a jeho skutečného zvýšení z 2,60 % na 2,97 % byla zaznamenána nižší kaseinová recovery MIR-FT s hodnotou 2,84 % (Obr. 1; Paggi, 2004, cit. Broutin, 2006). Naopak v případě přídavku syrovátkových bílkovin do mléka s kaseinem 2,59 % měla hodnota kaseinu zůstat nezměněna, byla však zaznamenána výtěžnost kaseinu až k hodnotě 2,83 % (Obr. 2; Paggi, 2004, cit. Broutin, 2006). Uvedené pochybnosti lze shrnout do konstatování, že specifita metody infračervené spektroskopie vůči kaseinu není na očekávané úrovni, jinými slovy je poměrně limitovaná. Metoda je použitelná, interpretace výsledků má však podle podmínek měření svá omezení. Postup by bylo hypoteticky možné zlepšit nepřímým určením, resp. specifikací aminokyselin v mléce, o což se pokusili Kráčmar *et al.* (2004). Je však pravděpodobné, že takový postup by byl jen omezeně použitelný v kolostru s vyšším obsahem bílkovin a to pro vybrané aminokyseliny. Proto lze zatím předpokládat, že případná

1: Výtěžnost kaseinu u metody MIR-FT s přímou vzrůstající aplikací kaseinu (dolní křivka, horní křivka je teoretický předpoklad) do vzorku (PAGGI, 2004, cit. BROUTIN, 2006)

1: Casein recovery at MIR-FT method with direct increased application of casein (lower curve, upper curve is theoretical presupposition) into sample (PAGGI, 2004, cit. BROUTIN, 2006)

2: Výtěžnost kaseinu u metody MIR-FT s přímou rostoucí aplikací syrovátkových bílkovin (horní křivka, spodní přímka je teoretický předpoklad) do vzorku (PAGGI, 2004, cit. BROUTIN, 2006)

2: Casein recovery at MIR-FT method with direct increased application of whey protein (upper curve, lower curve is theoretical presupposition) into sample (PAGGI, 2004, cit. BROUTIN, 2006)

kombinace uvedených možností specifitu metody infračervené spektroskopie ke kaseinu výrazně nezvyší, nehledě na finanční náročnost kalibrací pro jednotlivé aminokyseliny. Nepřímo lze ovšem obsah kaseinu stanovit také diferenčním způsobem modifikovanou fotometrickou metodou na základě barevné vazebné schopnosti amidočerní (např. na zařízení Pro-Milk, Foss Electric, Denmark), která byla používána především pro stanovení obsahu hrubých bílkovin v mléce (Sherbon, 1975; Michalak *et al.*, 1978).

Důležitá pro kalibraci MIR a MIR-FT na měření obsahu kaseinu je referenční Kjeldahlova metoda. Někteří autoři považují hodnotu Kjeldahlova faktoru (6,38) pro přepočet dusíku na proteinový obsah za zastaralou z důvodu např. šlechtění populací dojeného skotu a růstu dojivosti a s tím spojenými změnami. Byla doporučena revize faktoru na současné poměry. Karman a van Boekel (1986) uvedli, že přepočtové faktory pro kasein, syrovátkové bílkoviny a nebílkovinný dusík činily 6,34, 6,38 a 3,60 a naznačili, že celkový faktor pro mléčné bílkoviny by měl být spíše v hodnotě 6,34 než 6,38.

Je zřejmé, že v souladu s vývojem mlékařské analýzy (Bulletin IDF, 406) je aktuálně potřebné výzkumně podrobněji ověřit teoretické a metodické možnosti moderního postupu MIR-FT včetně podmínek jeho kalibrace pro jeho další rutinní nasazení v kontrole mléčné užitkovosti a v kontrole kvality mléka.

Cíl práce

Cílem práce bylo vyhodnotit retrospektivní analýzou metodické vztahy, výsledky a zkušenosti získané při kalibraci infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT) na měření obsahu kaseinu podle výsledků referenční metody v systému centrální kalibrace v době, kdy systematické rutinní sledování obsahu kaseinu v mléce v českém mlékařském systému povolna začíná.

MATERIÁL A METODY

Bazénové vzorky mléka pro kalibrace

Bazénové vzorky mléka pro referenční analýzy a přípravu referenčních mléčných standardů byly po tři roky (2007 až 2009) odebírány měsíčně v šesti (aktuálně vždy ve čtyřech) stádech dojníc (25 až 350 krav ve stádě) s nadprůměrnou mléčnou užitkovostí (7 až 8,5 tisíc kg mléka za laktaci). Tři vzorkovaná stáda byly holštýnské krávy a tři stáda byly krávy plemene České strakaté.

Referenční analýza obsahu bílkovin, resp. kaseinu v mléce

Jako referenční pro přípravu kalibračních standardů je v ČR používána přímá Kjeldahlova metoda (ČSN 57 0530) k určení obsahu dusíku (celkového, bílkovinného nebo kaseinového) v mléce a následně (faktor 6,38) k výpočtu obsahu hrubých bílkovin, čistých bílkovin nebo kaseinu (Kas), podle typu pří-

pravy vzorku. Kasein je získán srážením roztokem kyseliny octové a promýváním na filtračním papíru. Věrohodnost výsledků referenční metody (celkový dusík) byla každý rok dvakrát ověřována na syrovém kravském mléce ve výkonnostních testech ICAR-CECALAIT (10 vzorků; Francie) a dvakrát ročně ve Sterntestech AMA-AFEMA (2 vzorky; Rakousko). Bylo použito zařízení linky Tecator s jednotkou Kjeltec Auto Distillation 2 200 (Foss-Tecator AB, Sweden). Referenční vzorky kalibračních sad byly připraveny tak, aby poskytl potřebné variační rozpětí hodnot kaseinu a tím i hrubých bílkovin, a to cíleným výběrem bazénových vzorků mléka, případně jejich vhodnými složkovými modifikacemi.

Nepřímé analýzy obsahu kaseinu

Při kalibraci techniky MIR (Bentley 150, Bentley Instruments, USA) a MIR-FT (Foss 6000 FT, Foss Electric, Denmark – a zde zejména Lactoscope IRFT, Delta Instruments, The Netherlands) na měření obsahu kaseinu ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$; %) podle výsledků referenční metody byla zohledněna norma ČSN 57 0536. Metoda MIR je klasickou filtrovou infračervenou spektrofotometrií, u kaseinu se zohledněním kaseinového čísla kalkulací z bílkovinného (peptidická vazba) signálu. Metoda MIR-FT je koncipována jako proměření celého infračerveného spektra mléčného vzorku pomocí Michelsonova interferometru a kalkulace výtěžnosti signálu aplikací Fourierových transformací (Lactoscope IRFT). Do retrospektivní studie bylo zahrnuto období tří roků (2007 až 2009) s 32 centrálními (definováno pracemi Grappin, 1993; Hanuš *et al.*, 1995, 1998, 2009; Baumgartner, 2006, 2009; Leray, 2006, 2009a, c; Barbano, 2009; Castaneda, 2009) a 120 individuálními kalibracemi, to znamená čtyři přístroje opakovaně měsíčně po tři roky. Kalibrace byly provedeny, s ohledem na sezonu pravidelně, zpravidla jedenáctkrát ročně, na desetivzorkových referenčních sadách. Celkem tak bylo použito 320 referenčních (kalibračních) vzorků. Lineární model je, jak známo, obecně přijatým kalibračním modelem nepřímých metod ve vazbě na metody přímé při mlékařských analýzách (Grappin, 1987; Hanuš *et al.*, 1995; Baumgartner, 2006; Leray, 2006). Uvedené platí podle Bulletinu IDF 406 rovněž pro kasein (BROUTIN, 2006).

Vyhodnocení kvality kaseinových kalibrací – statistické nástroje

Analýzy referenčních vzorků, kalibrace MIR-FT i proficiency testing byly provedeny v akreditované (podle ČSN EN ISO/IEC 17025) Národní referenční laboratoři pro syrové mléko ve Výzkumném stavu pro chov skotu v Rapotíně (č. 1340, č. certifikátu 040/2005), která kooperuje v síti národních referenčních laboratoří pro mléko pod koordinací AFSSA Paris (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). Byly výzkumně vyhodnoceny výsledky tříletého pilotního provozu centrální kalibrace nepřímých metod analýz kaseinu v nově vzniklém systému centrální kalibrace v České republice.

K vyhodnocení výsledků kaseinových kalibrací přístrojů MIR-FT a MIR (Lactoscope IRFT; Foss 6000 FT; Bentley 150) byly použity následující statistické postupy a charakteristiky: průměr ($\bar{x}$) a směrodatná odchylka (s_d); průměr ($\bar{x}_r$) a směrodatná odchylka referenční sady (s_{dr}); variační koeficient (v_x) v procentech; variační rozpětí referenční sady (R); korelační koeficient kalibrace (KKK , též validační korelační koeficient a KK jako korelační koeficient výkonnostního testu); průměrný rozdíl přístrojového a referenčního měření po kalibraci a ve výkonnostním testu (d); směrodatná odchylka průměru individuálních diferencí ($SDID$; ČSN 57 0536; Eckschlager, 1961; Biggs, 1972; Eckschlager *et al.*, 1980; Grappin, 1987; Valenberg *et al.*, 1990; Meloun a Militký, 1992, 1994; Hanuš *et al.*, 1995, 2009; Kupka, 1997; Suchánek *et al.*, 1999; Feinberg a Laurentie, 2006). K vyhodnocení výkonnostního testu byl použit ukazatel Euklidické vzdálenosti od počátku (Leray, 1993, 2006, 2009a, b, c; Golc-Teger, 1997; Hanuš *et al.*, 1998), jako parametr věrohodnosti výsledků. Použito bylo programové vybavení Excel Microsoft.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Referenční vzorky kalibrace infračervené spektrofotometrie na měření obsahu kaseinu

Výsledky referenčních sad vzorků a parametry provedených složkově specifických kalibrací infraanalýzátorů jsou v rámci srovnání uvedeny v Tab. I. Průměrné hodnoty kaseinu sad vzorků od 2,49 do 2,7 s průměrem průměrů sad 2,61 $\pm$ 0,155 % dobře odpovídají kravskému mléku v po-

rovnání k dřívějším výsledkům (Broutin, 2006; Janů *et al.*, 2007; Hanuš *et al.*, 2007; Sojková *et al.*, 2010; Kopeček a Stachelberger, 2010). Průměrný variační obor kalibračních (referenčních) sad vzorků činil 0,561 $\pm$ 0,164 (od 0,27 do 0,89) %. Průměrné hodnoty a obory jejich variačního rozpětí pro kasein tak poměrně dobře odpovídají mléku, které reprezentují.

Parametry kalibrace infračervené spektrofotometrie na měření obsahu kaseinu

Za nejvýznamnější parametry pro srovnání a hodnocení lze považovat korelační koeficient kalibrace (KKK) a směrodatnou odchylku průměru individuálních diferencí ($SDID$). Ukazatele d a $SDID$ jsou uvedeny po přijaté kalibraci (Tab. I) tzn., že se jedná o validační parametry s ohledem na konkrétní kalibraci. Průměrný KKK činil 0,974 $\pm$ 0,018 (od 0,906 do 0,997; $P < 0,001$). Průměrná $SDID$ činila 0,03 $\pm$ 0,011 (od 0,01 do 0,08) %. Uvedené výsledky jsou srovnatelné k výčtu výsledků v rešerši IDF (Broutin, 2006). Pro kalibraci nepřímých metod (MIR a MIR-FT) a pro výkonnostní testy nepřímých metod (MIR a MIR-FT) jsou uvedeny korespondující parametry v Tab. II a III. Lze konstatovat, že dosažené výsledky metody MIR-FT (2) byly v porovnání k MIR (1) mírně lepší jak pro provedené kalibrace (Tab. II), tak pro uskutečněné výkonnostní testy (Tab. III). To obecně znamená, že korelační koeficienty mezi metodami (referenční a nepřímá) byly v průměru větší a jejich variabilita nižší a $SDID$ byly v průměru nižší a jejich variabilita rovněž pro MIR-FT v porovnání k MIR.

I: Parametry kaseinových kalibrací metody infračervené spektroskopie MIR a MIR-FT

I: Parameters of casein calibrations of infrared spectroscopy method MIR and MIR-FT

Parametr	$\bar{x}_r$	$\pm s_{dr}$	R	KKK	d	$\pm SDID$
n	32	32	32	120	120	120
x	2,61	0,155	0,561	0,974	0	0,03
sd	0,061	0,04	0,164	0,018	0,015	0,011
min.	2,49	0,082	0,27	0,906	-0,06	0,01
max.	2,7	0,255	0,89	0,997	0,05	0,08

n počet případů individuálních kalibrací MIR a MIR-FT; $\bar{x}$ průměr; s_d směrodatná odchylka; $\bar{x}_r$ průměr referenční sady; s_{dr} směrodatná odchylka průměru referenční sady; R variační rozpětí referenční sady; KKK korelační koeficient kalibrace (též validační korelační koeficient vztahu referenční metody a nepřímé metody); d průměrný kalibrační rozdíl (přístrojového měření – referenční výsledek); $SDID$ směrodatná odchylka průměru individuálních diferencí; *min.* minimum; *max.* maximum; kromě KKK všechny parametry v %

II: Parametry kaseinových kalibrací metody infračervené spektroskopie MIR (1) a MIR-FT (2)

II: Parameters of casein calibrations of infrared spectroscopy method MIR (1) and MIR-FT (2)

Parametr	KKK (1)	d (1)	$\pm SDID$ (1)	KKK (2)	d (2)	$\pm SDID$ (2)
n	31	31	31	89	89	89
x	0,974	0	0,035	0,974	0	0,03
sd	0,019	0,023	0,013	0,018	0,012	0,01
min.	0,915	-0,06	0,011	0,906	-0,04	0,02
max.	0,997	0,04	0,079	0,996	0,05	0,07

III: Parametry výkonnostních testů kaseinových kalibračních metody infračervené spektroskopie MIR (1) MIR-FT (2) a obou metod (3) ve vztahu k referenční metodě

III: Parameters of proficiency testing of casein calibrations of infrared spectroscopy method MIR (1) MIR-FT (2) and both methods (3) in relation to reference method

Parametr	KK (1)	d (1)	±SDID (1)	KK (2)	d (2)	±SDID (2)	KK (3)	d (3)	±SDID (3)
n	31	31	31	89	89	89	120	120	120
x	0,964	-0,01	0,042	0,977	0	0,03	0,974	0	0,04
sd	0,037	0,043	0,021	0,017	0,036	0,011	0,024	0,038	0,015
min.	0,840	-0,11	0,017	0,904	-0,09	0,02	0,84	-0,11	0,02
max.	0,992	0,07	0,133	0,998	0,08	0,07	0,998	0,08	0,13

KK korelační koeficient vztahu referenční metody a nepřímé metody; kromě KK všechny parametry v %

Vztahy referenční a nepřímých metod pro měření obsahu kaseinu

Na Obr. 3 až 10 jsou názorně vidět vybrané možnosti ve vztazích mezi referenční metodou (REF) a nepřímými metodami (MIR-FT a MIR) určení kaseinu (Kas) v kravském mléce při kalibraci a ve výkonnostním testu, a to v individuálních měsíčních kalibracích a během celého roku jako uzavřeného sezonního cyklu. Obecně, pro metodu MIR-FT a MIR byly vysoké i nízké korelační koeficienty vyšší v případě přijaté kalibrace (KKK) než ve výkonnostním testu (KK), což je však z hlediska principu kalibračního systému logické (0,996 < 0,998 ale 0,906 > 0,904 (MIR-FT), Obr. 3 a 5; 0,997 > 0,992 (vysoké) a 0,915 > 0,840 (nízké, MIR), Obr. 4 a 6; 0,986 > 0,964 a 0,970 > 0,948, Obr. 7 a 9; 0,982 > 0,947 a 0,947 > 0,911, Obr. 8 a 10; pro všechny korelační koeficienty $P < 0,001$). Dále na Obr. 11 a 12 je patrné zlepšení korelačního vztahu

metod MIR-FT a MIR k referenčním hodnotám přijetím následné kalibrace oproti vztahu ve výkonnostním testu měsíc po předchozí kalibraci (0,980 > 0,953 a 0,967 > 0,928; pro všechny korelační koeficienty $P < 0,001$). Metoda MIR-FT měla obvykle mírně těsnější vztah k referenčním hodnotám než MIR za tříletou retrospektivní periodu jak ve výkonnostních testech, tak po provedených kalibracích (0,980 > 0,967 a 0,953 > 0,928; pro všechny korelační koeficienty $P < 0,001$). To poukazuje na její mírně lepší „specifitu“. Rozdíl však není výrazný s ohledem na věrohodnost získávaných výsledků a lze ho, metodou kvalifikovaného odhadu, zanedbat. Materiál Foss (1997) poskytuje v uvedené souvislosti přehled kalibrací pro MilkoScan FT 120 (MIR-FT) z Nového Zélandu, Dánska a Kanady. Pro správnost byla dosažena variabilita $\pm 0,052\%$. Materiál Foss (2000) pro MilkoScan FT 6000 ve stejných zemích uvedl korespondující hodnotu $\pm 0,028\%$.

$r = 0,996^{***}$ $n = 10$

Korelační koeficient (r) $^{***} = P < 0,001$

3: Nejtěsnější a nejpohnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční (REF; %) a nepřímé instrumentální (MIR-FT) metody stanovení kaseinu (Kas; %) po provedené kalibraci (kontrolní, validační měření)

3: Closest and loosest linear regression relationship between reference (REF; %) and indirect instrumental (MIR-FT) method results for casein (Kas; %) determination after performed calibration (control, validation measurement)

$r = 0,906^{***}$ $n = 10$

$r = 0,997^{***}$ $n = 10$

4: Nejtěsnější a nejpohnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční (REF; %) a nepřímé instrumentální (MIR) metody stanovení kaseinu (Kas; %) po provedené kalibraci (kontrolní, validační měření)

4: Closest and loosest linear regression relationship between reference (REF; %) and indirect instrumental (MIR) method results for casein (Kas; %) determination after performed calibration (control, validation measurement)

$r = 0,915^{***}$ $n = 10$

$r = 0,998^{***}$ $n = 10$

5: Nejtěsnější a nejvolnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční (REF; %) a nepřímé instrumentální (MIR-FT) metody stanovení kaseinu (Kas; %) ve výkonostním testu před kalibrací

5: Closest and loosest linear regression relationship between reference (REF; %) and indirect instrumental (MIR-FT) method results for casein (Kas; %) determination in proficiency testing before calibration

$r = 0,904^{***}$ $n = 10$

$r = 0,992^{***}$ $n = 10$

6: Nejtěsnější a nejvolnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční (REF; %) a nepřímé instrumentální (MIR) metody stanovení kaseinu (Kas; %) ve výkonostním testu před kalibrací

6: Closest and loosest linear regression relationship between reference (REF; %) and indirect instrumental (MIR) method results for casein (Kas; %) determination in proficiency testing before calibration

$r = 0,840^{***}$ $n = 10$

$r = 0,986^{***}$ $n = 100$

7: Nejtěsnější a nejvolnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční a nepřímé instrumentální (MIR-FT) metody stanovení kaseinu (%) po provedených kalibracích (validace) během roku

7: Closest and loosest linear regression relationship between reference and indirect instrumental (MIR-FT) method results for casein (%) determination after performed calibrations (validation) during year

$r = 0,970^{***}$ $n = 100$

$r = 0,982^{***}$ $n = 100$

8: Nejtěsnější a nejvolnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční a nepřímé instrumentální (MIR) metody stanovení kaseinu (%) po provedených kalibracích (validace) během roku

8: Closest and loosest linear regression relationship between reference and indirect instrumental (MIR) method results for casein (%) determination after performed calibrations (validation) during year

$r = 0,947^{***}$ $n = 100$

$r = 0,964^{***}$ $n = 80$

9: Nejtěsnější a nejpočetnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční a nepřímé instrumentální (MIR-FT) metody stanovení kaseinu (%) ve výkonostních testech před kalibracemi během roku

9: Closest and loosest linear regression relationship between reference and indirect instrumental (MIR-FT) method results for casein (%) determination in proficiency testing before calibrations during year

$r = 0,948^{***}$ $n = 110$

$r = 0,947^{***}$ $n = 110$

10: Nejtěsnější a nejpočetnější lineární regresní vztah mezi výsledky referenční a nepřímé instrumentální (MIR) metody stanovení kaseinu (%) ve výkonostních testech před kalibracemi během roku

10: Closest and loosest linear regression relationship between reference and indirect instrumental (MIR) method results for casein (%) determination in proficiency testing before calibrations during year

$r = 0,911^{***}$ $n = 100$

$r = 0,953^{***}$ $n = 320$

11: Lineární regresní vztah mezi výsledky referenční a nepřímé instrumentální (MIR-FT) metody stanovení kaseinu (%) ve výkonostních testech a po provedených kalibracích (validace) během tříleté retrospektivní periody

11: Linear regression relationship between reference and indirect instrumental (MIR-FT) method results for casein (%) determination in proficiency testing and after performed calibrations (validation) during three year retrospective period

$r = 0,980^{***}$ $n = 300$

$r = 0,928^{***}$ $n = 310$

12: Lineární regresní vztah mezi výsledky referenční a nepřímé instrumentální (MIR) metody stanovení kaseinu (%) ve výkonostních testech a po provedených kalibracích (validace) během tříleté retrospektivní periody

12: Linear regression relationship between reference and indirect instrumental (MIR) method results for casein (%) determination in proficiency testing and after performed calibrations (validation) during three year retrospective period

$r = 0,967^{***}$ $n = 310$

Případná metodická interference hodnoty kaseinového čísla

Kaseinové číslo a jeho stabilita jsou podle literatury významné pro věrohodné výsledky analýz kaseinu v kravském mléce metodou MIR-FT (Broutin, 2006) a infračervenou metodou (s optickými filtry, MIR) vůbec (Fulton *et al.*, 2002). Průměrné kaseinové číslo (Hanuš *et al.*, 2007; Janů *et al.*, 2007) se podle plemen pohybovalo v České republice od 79,37 do 79,50 % (České strakaté) a od 79,42 do 79,45 % (Holštýn, s nadprůměrnou a průměrnou dojivostí). Průměry se mezi oběma hlavními dojenými plemeny skotu, jak patrně, lišily nepatrně a uvnitř plemen podle dojivosti nevýznamně ($P > 0,05$). Variabilita byla vyšší, typická pro individuální vzorky mléka (sd od $\pm 2,93$ do $\pm 3,11$ %). Podobně v práci Sojková *et al.*, 2010. Materiály Foss (1997 a 2000) uvádějí pro Nový Zéland, Dánsko a Kanadu pro složení vzorků kravského mléka hodnoty v rozpětí od 74 do 83, od 67 do 82 a od 74 do 79 %. Dále v novozélandské studii byl variační obor kaseinového čísla od 77,4 do 79,2 %. Fulton *et al.* (2002) ověřovali pro Kanadu podle sezon průměrné kaseinové číslo 76,5 %. Ve výsledcích pak prokázali v bazénových vzorcích mléka ($n = 1027$) podle kalendářních měsíců kolísání průměrné hodnoty od 76,0 (září) do 77,4 % (březen). V bazénových referenčních vzorcích mléka (dvě plemena, šest stád) z kalibračních sad použitých zde činilo kaseinové číslo podle referenční metody a na bázi hrubých bílkovin podle roků od 79,40 do 80,56 % (Tab. IV). Variabilita byla od 1,4 do 1,5 % relativně, tedy velmi nízká. Tyto hodnoty variability kaseinového čísla bazénových vzorků mléka, v souladu s Bulletinem IDF (Broutin, 2006), naznačují možnost poměrně spolehlivé analýzy kaseinu nepřímými metodami MIR a zejména MIR-FT, zatímco uvedené, při vyšší variabilitě (Broutin, 2006; Hanuš *et al.*, 2007; Janů *et al.*, 2007; Sojková *et al.*, 2010), nemusejí nutně plně souhlasit u analýz individuálních vzorků mléka. Zmíněná argumentace platí obecně, ale vztahuje se nesporně silněji k metodě MIR než MIR-FT, již podle závěru z dříve zmíněných výsledků v Tab. II a III. Fulton *et al.* (2002) ověřovali kalibraci nepřímé klasické filtrové analytické technologie (Foss System 4000, MIR) k určení obsahu kaseinu pro účely stanovení mlékařské výtěžnosti a proplácení mléka podle kvality. Systém nezohledňoval variabilitu při-

bližně pěti procent nebílkovinného dusíku. Uvedli možnost použití pro bazénové vzorky mléka s očekávanou správností a směrodatnou odchylkou průměrné difference kaseinu od referenčních hodnot $\pm 0,049$ % oproti hrubým bílkovinám, kde korespondující hodnota byla $\pm 0,030$ %, resp. $\pm 0,038$ %.

Odhad limitních hodnot parametrů pro validaci kvality kaseinové kalibrace

Podle dříve použité metody (Grappin, 1987; Sojková *et al.*, 2009; Hanuš *et al.*, 2009) byla získána limitní hodnota pro parametr přijatelné kaseinové kalibrace na hladině intervalu spolehlivosti 95 %. Od průměrné hodnoty korelačního koeficientu (0,974) byla odečtena hodnota $sd \times 1,64$ ($0,018 \times 1,64 = 0,0295$, jednostranné dolní omezení) relevantního souboru (Tab. I). Limitní hodnota pro přijatelnost KKK pak byla $\geq 0,945$. Pro další parametr SDID byla naopak relevantní hodnota násobku sd k průměru přičtena (jednostranné horní omezení). Uvedené poskytlo hodnotu maximálně 0,048 % ($0,03 + 0,018$; Tab. I). Pro ukazatel průměrné odchylky výsledků nepřímé metody od referenčních hodnot (d) po přijaté kalibraci (Tab. I) by kalkulací s podobnými předpoklady ($sd \times 1,96$; oboustranné omezení, interval spolehlivosti 95 %; Grappin, 1987) mohl sloužit limit $\pm 0,029$ %.

Výkonnostní testy analytické způsobilosti kaseinové kalibrace

Přestože v České republice uvedené technologie analýz kaseinu je zatím omezený počet instalací a postup centrální kalibrace je teprve v pilotním stadiu, byl z vybraných výsledků konstruován také tzv. graf proficiency testing (Obr. 13 a 14) na bázi srovnání Euklidické vzdálenosti od počátku (Leray, 1993). Jeden jako výsledek výkonnostního testu analytické způsobilosti (Obr. 13), tj. měsíc po kalibraci, druhý jako výsledek úspěšnosti kalibrace (Obr. 14) bezprostředně po jejím provedení, tzn. z výsledků validačního měření. Tuto grafickou metodu lze dále rutinně používat v systému příslušných analytických laboratoří, podobně jako u ostatních doposud měřených složek mléka. Výsledky zřetelně ukázaly snížení variability ve věrohodnosti výsledků měření kaseinu v souboru účastníků po přijetí kalibrace (Obr. 14) v porovnání k vlastnímu výkonnostnímu testu (Obr. 13).

ZÁVĚR

Tato vývojová metodická práce přinesla odhad maximálních a minimálních hodnot parametrů kvality pro akceptování kalibrace nepřímých metod MIR a MIR-FT ke stanovení kaseinu v kravském mléce. Ty doposud zcela chybějí v příslušné mlékařské analyticko-metodické legislativě. Výsledky slouží pro přímou aplikaci v referenčních i rutinních mléčných laboratořích. Provedená retrospektivní analýza může přispět k: 1) přesnějšímu určení vhodných číselných charakteristik sad kalibračních vzorků pro kasein; 2) přesnějšímu stanovení některých limitních hodnot základních parametrů kvality kalibrací in-

IV: Hodnoty kaseinového čísla (v % podle hrubých bílkovin) souboru bazénových vzorků mléka kalibrační sady ve sledované periodě se zastoupením plemene České strakaté a Holštýn (1 : 1)

IV: Casein number values (in % on crude protein basis) for bulk milk sample (with Czech Fleckvieh and Holstein breed (1 : 1)) calibration set in investigated period

Rok	n	x	sd	vx
2007	55	80,56	1,197	1,5
2008	50	80,10	1,129	1,4
2009	55	79,40	1,075	1,4

vx variační koeficient (v % relativně)

d = průměrná odchylka (diference, nepřímá metoda – referenční hodnota v %); sd = variabilita průměrné difference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek (párový t-test, Studentovo rozdělení), kdy body pod liniemi jsou významně odchylené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamně ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník velmi úspěšný výsledek.

13: Výsledky výkonostního testu analytické způsobilosti metody MIR a MIR-FT ($n = 4$ přístroje, březen 2009) měsíc po provedené centrální kalibraci na měření obsahu kaseinu

13: Proficiency testing results of MIR and MIR-FT method ($n = 4$ instruments, March 2009) one month after performed central calibration on casein content determination

14: Hodnocení úspěšnosti provedené centrální kalibrace metody MIR a MIR-FT ($n = 4$, březen 2009), výsledky získané bezprostředně po provedené kalibraci na měření obsahu kaseinu

14: Evaluation of efficiency of performed central calibration of MIR and MIR-FT method ($n = 4$, March 2009). The results were obtained immediately after performed calibration on casein content determination.

fraanalyzátorů (MIR a MIR-FT) na měření obsahu kaseinu v kravském bazénovém mléce. Minimální přijatelná hodnota korelačního koeficientu validace kalibrace by mohla činit 0,945 na hladině pravděpodobnosti 95%. Na stejné hladině pravděpodobnosti pak maximální hodnota směrodatné odchylky průměru individuálních diferencí a difference po provedené kalibraci by mohla činit 0,048 a 0,029% (obojí ve smyslu $\pm$). Uvedené podpoří kvalitu metodik mlékařských analytických postupů v referenčních i rutinních laboratořích (Leray, 1993, 2009 a, b, c). Kon-

trolu kvality mléka podle obsahu kaseinu (na technologickou výtěžnost, resp. efektivitu zpracování mléka) lze metodou MIR a MIR-FT provádět poměrně spolehlivě u bazénových vzorků mléka (pro mlékárny). Logicky, výsledky individuálních vzorků budou vykazovat nižší spolehlivost ze zmíněných důvodů. Protože se však pro účely šlechtění mléčného skotu používají průměrné výsledky kontroly užitkovosti za celou laktaci, není třeba zmíněné měření ani zde apriori diskvalifikovat.

SOUHRN

Měření obsahu kaseinu v mléce je významné pro sýrařství a také alternativně pro kontrolu stavu výživy dojníc. Referenční Kjeldahlova metoda je méně efektivní pro rutinní účely. Řešením může být použití infračervené spektroskopie MIR a MIR-FT. Ta musí být kalibrována podle výsledků referenční metody. Specifita metody pro kasein však je, podle literárních výsledků, poměrně limitovaná. Interpretace výsledků má tak svá omezení. Cílem práce bylo vyhodnotit kvalitu provedených kalibračních metody MIR a MIR-FT pro validaci parametrů kalibrace pro účely práce rutinních mléčných laboratoří. Byla provedena retrospektivní analýza řady realizovaných individuálních kalibrací MIR a MIR-FT pro měření obsahu kaseinu v systému centrální kalibrace s odhadem limitů vhodných parametrů kalibrace. Průměrné hodnoty kaseinu sad referenčních vzorků kolísaly od 2,49 do 2,7 s průměrem průměrů sad $2,61 \pm 0,155\%$. Průměrný variační obor kalibračních sad vzorků činil $0,561 \pm 0,164$ (od 0,27 do 0,89) %. Průměrný korelační koeficient kalibrace (KKK) činil $0,974 \pm 0,018$ (od 0,906 do 0,997; $P < 0,001$). Průměrná směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů (SDID) činila $0,03 \pm 0,011$ (od 0,01 do 0,08) %. Výsledky metody MIR-FT byly v porovnání k MIR mírně lepší jak pro kalibrace, tak pro výkonnostní testy. To znamená, že korelační koeficienty mezi metodami (referenční a nepřímá) byly v průměru většinou vyšší a jejich variabilita nižší a SDID byly v průměru nižší a jejich variabilita rovněž pro MIR-FT v porovnání k MIR. Pro metodu MIR-FT a MIR byly vysoké i nízké korelační koeficienty vyšší v případě přijaté kalibrace než ve výkonnostním testu. To je však z hlediska principu kalibračního systému logické ($0,996 < 0,998$ ale $0,906 > 0,904$ (MIR-FT); $0,997 > 0,992$ (vysoké) a $0,915 > 0,840$ (nízké, MIR); $0,986 > 0,964$ a $0,970 > 0,948$; $0,982 > 0,947$ a $0,947 > 0,911$; pro všechny korelační koeficienty $P < 0,001$). V bazénových vzorcích mléka (dvě plemena, Holštýn a České strakaté, šest stád) činilo kaseinové číslo od 79,4 do 80,56 % ve třech rocích. Variabilita byla od 1,4 do 1,5 % relativně, tedy nízká. To naznačuje na poměrně spolehlivé analýzy kaseinu nepřímými metodami MIR a MIR-FT. Uvedené nemusí platit plně pro vyšší variabilitu individuálních vzorků mléka. Zmíněné se vztahuje silněji k metodě MIR než MIR-FT. Výsledky výkonnostního testu zřetelně ukázaly snížení variability ve věrohodnosti výsledků měření kaseinu v souboru účastníků po přijetí měsíční kalibrace v porovnání k vlastnímu výkonnostnímu testu. Byly odvozeny limitní hodnoty pro parametry přijatelné kaseinové kalibrace (pravděpodobnost 95 %). Pro KKK to bylo $\geq 0,945$, pro SDID maximálně 0,048 % a pro průměrný rozdíl maximálně 0,029 %.

kráva, syrové mléko, vzorek, referenční metoda, infračervená spektroskopie, dusík, kasein, systém centrální kalibrace, validace, korelace, regresní analýza

SUMMARY

Measurement of the casein in milk is important for cheesemaking and also as alternative for control of dairy cow nourishment state. Reference Kjeldahl's method is less effective for routine purposes. Use of infra-red spectroscopy MIR and MIR-FT can be a solution. This has to be calibrated according to reference method results. However, method casein specificity is relatively limited according to literature results. So the result interpretation has its own limitations. The aim of the work was to assess the quality of performed calibrations of MIR and MIR-FT method for validation of calibration parameters for working purposes of routine milk laboratories. A retrospective analysis of series of performed MIR and MIR-FT individual calibrations for casein content measurement with estimation of limits of suitable calibration parameters was carried out in the centralized calibration system. Mean casein values of reference sample sets varied from 2.49 to 2.7 with mean of means $2.61 \pm 0.155\%$. Mean variation range of sets of calibration samples was $0.561 \pm 0.164\%$ (from 0.27 to 0.89). The mean correlation coefficient of calibration (KKK) was 0.974 ± 0.018 (from 0.906 to 0.997; $P < 0.001$). The mean standard deviation of mean for individual differences (SDID) was $0.03 \pm 0.011\%$ (from 0.01 to 0.08). MIR-FT method results were slightly better both for calibration and for proficiency testing as compared to MIR. It means on average that correlation coefficients between methods (reference and indirect) were mostly higher and their variability lower and SDIDs were lower and their variability as well for MIR-FT as compared to MIR. The high and low correlation coefficients were higher in the case of accepted calibration as in proficiency testing for MIR-FT and MIR method. However, it is logical in terms of calibration system principle ($0.996 < 0.998$ but $0.906 > 0.904$ (MIR-FT); $0.997 > 0.992$ (high) and $0.915 > 0.840$ (low, MIR); $0.986 > 0.964$ and $0.970 > 0.948$; $0.982 > 0.947$ and $0.947 > 0.911$; for all correlation coefficients $P < 0.001$). In bulk milk samples (two breeds, Holstein and Czech Fleckvieh, six herds) the casein number varied from 79.4 to 80.56 % in three years. The variability was from 1.4 to 1.5 % relatively, which means low. It shows on relatively reliable casein analyses by indirect methods MIR and MIR-FT. It does not need to agree fully for higher variability in individual milk samples. This mentioned fact is linked more strongly to MIR method than MIR-FT. The proficiency testing results showed clearly variability decrease for result reliability of casein measurement in participant set after month calibration acceptance as compared to original proficiency testing. The limit values for para-

meters of acceptable casein calibration (95% probability) were derived. It was ≥ 0.945 for KKK, 0.048% for SDID and for mean difference 0.029% as maximum.

Poděkování

Tato výzkumně-vývojová metodická práce byla podporována projekty MŠMT, MSM 2678846201 a KONTAKT ME 09081 a provedena v rámci aktivit NRL-SM.

REFERENCE

- 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, 315–316.
- BARBANO, D. M., LYNCH, J. M., FLEMING, J. R., 1991: Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis: collaborative study. *Journal of the AOAC*, 281–288.
- BAUMGARTNER, C., 2006: Reference system – principle and practice. 3rd ICAR reference laboratory network meeting – Kuopio, Finland – 6th June 2006, 41–48. 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, 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, 307.
- BIGGS, D. A., 1972: Precision and accuracy of infrared milk analysis. *Journal of AOAC*, 55, 3, 488–497.
- BROUTIN, P. J., 2006: New applications of mid-infrared spectrometry for the analysis of milk and milk products. 1 Casein. *Bulletin of the IDF*, 406, 2–21.
- 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, 309–313.
- ČSN 570536, 1999: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) Český normalizační institut, Praha.
- ČSN 570530, 1972: Methods for testing of milk and milk products. (In Czech) Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO/IEC 17025, 2005: Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. Conformity assessment – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ČNI Praha.
- ECKSCHLAGER, K., 1961: Chyby chemických rozborů. SNTL Praha, 163.
- ECKSCHLAGER, K., HORSÁK, I., KODEŠ, Z., 1980: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL Praha, 176.
- ERBERSDOBLER, H. F., ECKART, K., ZUCKER, H., 1979: Harnstoffanalysen in der Milch unterschiedlich versorgte Kühe. *Landwirtsch. Forsch.*, 98–103.
- ERBERSDOBLER, H. F., ECKART, K., ZUCKER, H., 1980: Milk urea levels as a measure of imbalances in energy and protein intake. *Pro. IV th Int. Conf. on Production Disease in Farm Animals*, München, Germany, 4.
- FAMIGLI-BERGAMINI, P., 1987: Rapporti tra patologia (non mammaria) ed aspetti quali-quantitativi del latte nella bovina. *Società Italiana di Buiatria*, Bologna, 19, 8–10, 89–99.
- FEINBERG, M., LAURENTIE, M., 2006: A global approach to method validation and measurement uncertainty. *Accred. Qual. Assur.*, 11, 3–9.
- FOSS, 2000: MilkoScan FT 6000, Casein measurement Issue 76 100–55GB, November, 13.
- FOSS, 1997: Calibration for casein in cow milk – the only method for fast determination of the casein contents in milk, MilkoScan FT 120. Foss Electric, Application note No. 102, February, P/N 578377, 8.
- FULTON, C., MELICHERCIK, J., SZIJARTO, L., HILL, A., 2002: Development of rapid direct casein testing methodology for milk utilizing high speed infrared instrument technology. FP4079, Research Projects Summary, Ontario Food Processing Research Fund, 7.
- GOLC-TEGER, S., 1997: Slovenia in the European network of dairy laboratories. V: 5th International Symposium "Animal Science Days", Opatija, 23.–26. September 1997. *Animal science days, Agriculturae Conspectus Scientificus*, 62, 37–40.
- 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 IDF*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 3–12.
- GRAPPIN, R., 1993: European network of dairy laboratories. V: Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories. Sonthofen / Germany, 1992-05-18/20, Brussels, 205–211.
- 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), ISSN 1211-8516, XLVI, 3, 33–53.
- HANUŠ, O., FICNAR, J., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J., BERANOVÁ, A., GABRIEL, B., 1995: Methodical problems of nitrogen matters determination in

- cow's milk. (In Czech) *Vet. Med. – Czech.*, 40, 12, 387–396.
- HANUŠ, O., FRELICH, J., JANŮ, L., MACEK, A., ZAJÍČKOVÁ, I., GENČUROVÁ, V., JEDELSKÁ, R., 2007: Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. *Acta Vet. Brno*, 76, 4, 563–571.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., ŠTOLC, L., KUČERA, J., SOJKOVÁ, K., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J., DOLÍNKOVÁ, A., 2009: A comparison and evaluation of calibration parameters of infrared spectroscopy method (MIR and MIR-FT) according to results of reference methods for cow, goat and sheep milk composition. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 51–59.
- JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., 2003: Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 21, 4, 123–128.
- JANŮ, L., HANUŠ, O., FRELICH, J., MACEK, A., ZAJÍČKOVÁ, I., GENČUROVÁ, V., JEDELSKÁ, R., 2007: Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 76, 4, 553–561.
- KARMAN, A. H., VAN BOEKEL, M. A. J. S., 1986: Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Neth. Milk Dairy J.*, 40, 315–336.
- KARMAN, A. H., VAN BOEKEL, M. A. J. S., ARENTSEN-STRASSE, A. P., 1987: A simple and rapid method to determine the casein content of milk by infra-red spectrophotometry. *Neth. Milk Dairy J.*, 41, 175–187.
- KIRCHGESSNER, M., KREUZER, M., ROTH MAIER DORA, A., 1986: Milk urea and protein content to diagnose energy and protein malnutrition of dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.*, 36, 192–197.
- KOPUNECZ, P., STACHELBERGER, J., 2010: Přehledy jakosti nakupovaného mléka v roce 2009 podle výsledků bazénových vzorků. *Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Praha, LRM Buštěhrad, LRM Brno-Tuřany, Hradištko*, leden 2010, 38.
- KRÁČMAR, S., JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., ZEMAN, L., 2004: Analysis of amino acid composition of sheep colostrum by near-infrared spectroscopy. *Czech J. Anim. Sci.*, 49, 5, 177–182.
- KUKAČKOVÁ, O., ČURDA, L., JINDŘICH, J., 2000: Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 18, 1, 1–4.
- KUPKA, K., 1997: *Statistické řízení jakosti. Tri-LoByte*. ISBN 80-238-1818-X, 119.
- LEFIER, D., 1994: Le dosage direct des caséines du lait par spectroscopie infrarouge. *Mémoire de D. E. A. Science de l'alimentation, Université de Bourgogne. Dijon. S.R.T.A.L., Station de Recherches en Technologie et Analyses Laitières, Poligny, France*.
- LEFIER, D., GRAPPIN, R., POCHET, S., 1996: Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. *Journal of AOAC*, 79, 3, 711–717.
- 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, 349–360.
- LERAY, O., 2006: Reference and calibration system for routine milk testing – advantages / disadvantages, choice criteria. 3rd ICAR reference laboratory network meeting – Kuopio, Finland – 6th June 2006, 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, 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*, 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*, 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*, 301–305.
- MELOUN, M., MILITKÝ, J., 1992: Statistical processing of experimental data by personal computer. *Díl IIA, Pardubice*, 102.
- MELOUN, M., MILITKÝ, J., 1994: *Statistické zpracování experimentálních dat. Plus spol. s r. o.*, ISBN 80-85297-56-6, 839.
- MICHALAK, W., CYNALOWSKA, H., OCZKOWICZ, H., 1978: Collaborative testing among laboratories routinely testing fat and protein milk. *J. Dairy Sci.*, 61, 1634–1636.
- OLTNER, R., WIKTORSSON, H., 1983: Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. *Livestock Prod. Sci.* 10, 457–467.
- SHERBON, J. W., 1975: Collaborative study of the Pro-Milk method for the determination of protein in milk. *Journal of AOAC*, 58, 4, 770–772.
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., ŘÍHA, J., GENČUROVÁ, V., HULOVÁ, I., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J., 2010: Impacts of lactation physiology at higher and average yield on composition, properties and health indicators of milk in Holstein breed. *Sci. Agric. Boh.*, ISSN 1211-3174, v tisku.
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., KUČERA, J., GENČUROVÁ, V., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J., 2009: A determination of acceptability limit for validation correlation coefficient as calibration quality parameter of infrared spectroscopy (MIR) at

- measurement of basic cow milk composition. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 188, 4, ISSN 0139-7265, 50-55.
- SUCHÁNEK, M., PLZÁK, Z., ŠUBRT, P., KORUNA, I., 1999: Kvalimetrie, 7. Validace analytických metod. Eurachem, 140.
- ŠUSTOVÁ, K., RŮŽIČKOVÁ, J., KUČTÍK, J., 2007: Application of FT near spectroscopy for determination of true protein and casein in milk. Czech J. Anim. Sci., 52, 9, 284-291.
- TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., ITOH, K., OZAKI, Y., TOYODA, K., 2000: Near infrared spectroscopy for biomonitoring: Cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. J. Anim. Sci., 78, 515-522.
- VALENBERG VAN, H. J. F., 1990: Standardization and control of instruments for analysis of milk. IDF Congress, Montreal, 1316-1321.

Adresa

doc. Ing. Oto Hanuš, Ph.D., Jaroslav Kopecký, Výzkumný ústav pro chov skotu Rapotín, Research Institute for Cattle Breeding Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13 Víkřovice, Česká republika, The Czech Republic; Ing. Václava Genčurová, Ph.D., Radoslava Jedelská, Kristýna Hanušová, Agrovýzkum Rapotín, Agriresearch Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13 Víkřovice, Česká republika, The Czech Republic; Dr. Tao Yong, Anhui Agricultural University, Department of Animal Sciences, College of Animal Science and Technology, Changjiang West Rd. 130, 230036 Hefei, P. R. China; doc. Dr. Ing. Josef Kučera, Ing. Tomáš Kopec, Svaz chovatelů českého strakatého skotu, Czech Fleckvieh Breeders Association, Horní 28, 591 01 Žďár nad Sázavou, Česká republika, The Czech Republic