

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 322/96

af 22. februar 1996

om gennemførelsesbestemmelser for offentlig oplagring af skummetmælkspulver

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 804/68 af 27. juni 1968 om den fælles markedsordning for mælk og mejeriprodukter⁽¹⁾, senest ændret ved Kommissionens forordning (EF) nr. 2931/95⁽²⁾, særlig artikel 7, stk. 5, og artikel 28, og

ud fra følgende betragtninger:

Rådets forordning (EØF) nr. 1014/68 af 20. juli 1968 om fastsættelse af almindelige regler for offentlig oplagring af skummetmælkspulver⁽³⁾, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 3577/90⁽⁴⁾, ophæves med virkning fra den 1. marts 1996 ved Rådets forordning (EF) nr. 1538/95⁽⁵⁾; følgelig bør de regler, som ikke er blevet inkorporeret i forordning (EØF) nr. 804/68, indsættes i de gennemførelsesbestemmelser for offentlig oplagring af skummetmælkspulver, som er fastsat ved Kommissionens forordning (EØF) nr. 625/78⁽⁶⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 1802/95⁽⁷⁾; da forordning (EØF) nr. 625/78 skal tilpasses på en lang række punkter, og da den allerede er blevet ændret mange gange, vil det være hensigtsmæssigt med en omarbejdning for overskuelighedens og klarhedens skyld; følgelig bør forordning (EØF) nr. 625/78 ophæves;

interventionsorganerne må kun opkøbe skummetmælkspulver med et vist mindsteindhold af protein; opkøbsprisen kan desuden variere afhængigt af proteinindholdet; det bør fastlægges, hvilken metode der skal anvendes til bestemmelse af proteinindholdet, og hvordan opkøbsprisen skal beregnes;

for at sikre, at der ikke betales uretmæssigt for det opkøbte skummetmælkspulver, bør det inden betalingen kontrolleres, at alle betingelser er opfyldt, og proteinindholdet bør være konstateret inden betalingen;

der er udviklet en referencemetode til påvisning af kærnemælk; for at sikre en ensartet anvendelse af kontrolforan-

staltningerne bør denne analysemetode anvendes ved kontrol af skummetmælkspulver, der opkøbes af interventionsorganerne;

i Rådets direktiv 92/46/EØF af 16. juni 1992 om sundhedsbestemmelser for produktion og afsætning af rå mælk, varmebehandlet mælk og mælkebaserede produkter⁽⁸⁾, senest ændret ved direktiv 94/71/EF⁽⁹⁾, er det fastsat, at mælk, hvis indhold af stoffer med antimikrobiel virkning er større end det niveau, der er tilladt i henhold til Rådets forordning (EØF) nr. 2377/90⁽¹⁰⁾, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 282/96⁽¹¹⁾, ikke må anvendes til konsum; skummetmælkspulver, der opkøbes af interventionsorganerne, bør kontrolleres for hyppigt anvendte stoffer med antimikrobiel virkning; der må indføres en relevant kontrolmetode;

de øvrige bestemmelser om offentlig oplagring af skummetmælkspulver har stået deres prøve og kan derfor videreføres med visse tekniske tilpasninger;

de udløsende begivenheder for den landbrugsomregningskurs, der skal anvendes i forbindelse med ordningen for offentlig oplagring, er fastlagt ved forordning (EØF) nr. 1756/93⁽¹²⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 693/95⁽¹³⁾;

de i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomitéen for Mælk og Mejeriprodukter —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

1. Interventionsorganerne opkøber kun skummetmælkspulver, der svarer til definitionen i artikel 7, stk. 1, i forordning (EØF) nr. 804/68 og til kvalitetskravene i bilag I, og som opfylder følgende betingelser:

a) Der skal være foretaget kvalitetskontrol efter de i bilag I, V, VI og VII omhandlede analysemetoder og på basis af prøver, der er udtaget efter reglerne i bilag IV.

⁽¹⁾ EFT nr. L 148 af 28. 6. 1968, s. 13.

⁽²⁾ EFT nr. L 307 af 20. 12. 1995, s. 10.

⁽³⁾ EFT nr. L 173 af 22. 7. 1968, s. 4.

⁽⁴⁾ EFT nr. L 353 af 17. 12. 1990, s. 23.

⁽⁵⁾ EFT nr. L 148 af 30. 6. 1995, s. 17.

⁽⁶⁾ EFT nr. L 84 af 31. 3. 1978, s. 19.

⁽⁷⁾ EFT nr. L 174 af 26. 7. 1995, s. 27.

⁽⁸⁾ EFT nr. L 268 af 14. 1. 1992, s. 1.

⁽⁹⁾ EFT nr. L 368 af 31. 12. 1994, s. 33.

⁽¹⁰⁾ EFT nr. L 224 af 18. 8. 1990, s. 1.

⁽¹¹⁾ EFT nr. L 37 af 15. 2. 1996, s. 9.

⁽¹²⁾ EFT nr. L 161 af 2. 7. 1993, s. 48.

⁽¹³⁾ EFT nr. L 71 af 31. 3. 1995, s. 52.

- b) Det skal opfylde de i bilag II og III anførte betingelser angående emballage og mærkning.
- c) Det må ikke indeholde andre produkter, bl.a. kærnemælk eller valle.
- d) Det er fremstillet højst en måned før den dato, hvor interventionsorganet modtager salgstilbuddet, eller i det tilfælde, der er omhandlet i bilag III, litra e), andet punktum, højst fire uger inden den uge, hvor tilbuddet modtages.
- e) Det må ikke overskride de ifølge fællesskabsbestemmelserne gældende maksimalt tilladte niveauer for radioaktivitet.

De gældende niveauer er fastsat i artikel 3 i Rådets forordning (EØF) nr. 737/90 (¹). Omfanget af den radioaktive kontamination kontrolleres kun, hvis situationen kræver det, og i den nødvendige periode. Om nødvendigt fastsættes varigheden og omfanget af kontrolforanstaltningerne efter proceduren i artikel 30 i forordning (EØF) nr. 804/68.

2. I denne forordning forstås ved:

- a) *kærnemælk*: det biprodukt, der fremkommer ved fremstilling af smør efter kærning eller kontinuerlig smørfremstilling af fløden og udskillelse af den faste fedtfase
- b) *valle*: det biprodukt, der fremkommer ved fremstilling af ost eller kasein som følge af indvirkningen fra syre, osteløbe og/eller kemisk-fysiske processer.

3. Den mindste tilbudsmængde udgør 20 tons. Medlemsstaterne kan forøge minimumsmængden og/eller fastsætte, at skummetmælkspulveret tilbydes i hele tons.

4. Interventionsorganet registrerer datoen for modtagelsen af salgstilbuddet og de tilsvarende mængder og fremstillingsdatoer samt stedet, hvor det tilbudte skummetmælkspulver opbevares.

5. Et tilbud er kun gyldigt, såfremt der er ført bevis for, at tilbudsgiveren har stillet en sikkerhed svarende til 12 ECU pr. ton skummetmælkspulver, der tilbydes.

I forbindelse med denne forordning udgør opretholdelse af tilbuddet og levering af skummetmælkspulveret til det af interventionsorganet udpegede lager de primære krav, hvis overholdelse sikres ved nævnte sikkerhed. I tilfælde af, at det af den i stk. 1, litra a), omhandlede kontrol fremgår, at skummetmælkspulveret ikke svarer til de i stk. 1 fastsatte krav, frigives sikkerheden dog for de endnu ikke leverede mængder.

Sikkerheden stilles i den medlemsstat, hvor tilbuddet afgives.

Artikel 2

1. Den i artikel 7, stk. 1, i forordning (EØF) nr. 804/68 omhandlede virksomhed godkendes kun, hvis den:

- a) er autoriseret efter artikel 10 i direktiv 92/46/EØF, og råder over egnet teknisk udstyr
- b) forpligter sig til stadighed til at føre de registre, der er foreskrevet af det kompetente organ i hver medlemsstat, og som angiver råvarernes oprindelse, de behandlede mængder skummetmælk, kærnemælk og valle, arten af den varmebehandling skummetmælken har været underkastet, de fremstillede mængder af produktet, indpakningen, identifikationen og afleveringsdatoen for hvert parti skummetmælkspulver, kærnemælkspulver og vallepulver

c) accepterer at lade fremstillingen af skummetmælkspulver, der kan tilbydes til intervention, underkaste en særlig officiel kontrol

d) forpligter sig til mindst to hverdage i forvejen at informere kontrolorganet om, at det agter at fremstille skummetmælkspulver til intervention. Medlemsstaten kan dog fastsætte en kortere frist.

2. For at sikre, at bestemmelserne i denne forordning overholdes, foretager de kompetente kontrolorganer uanmeldt kontrol på stedet på grundlag af de pågældende virksomheders programmer for produktion af interventionskummetmælkspulver.

Denne kontrol skal mindst omfatte:

— et kontrolbesøg for hver periode på 28 dage, hvor der er blevet produceret til intervention, dog mindst en gang hvert halve år, for at verificere de i stk. 1, litra b), omhandlede oplysninger

— et kontrolbesøg hvert halve år for at kontrollere, at de i stk. 1 omhandlede godkendelsesbetingelser overholdes.

3. Godkendelsen trækkes tilbage, hvis betingelserne i stk. 1 ikke længere er opfyldt. Efter anmodning fra den pågældende virksomhed kan godkendelse igen gives efter en minimumsperiode på seks måneder og efter en omfattende kontrol.

Hvis det konstateres, at en virksomhed ikke har opfyldt en af sine forpligtelser, jf. stk. 1, litra b), c) og d), suspenderes godkendelsen, medmindre der er tale om *force majeure*, for en periode, der strækker sig fra en til tolv måneder afhængigt af, hvor alvorlig den pågældende uregelmæssighed er.

Medlemsstaten kan beslutte at unklade sanktionen, hvis det slås fast, at uregelmæssigheden ikke er begået forsætligt eller ved grov uagtsomhed, og at den er af minimal betydning for effektiviteten af de i stk. 2 fastsatte kontrolbesøg.

(¹) EFT nr. L 82 af 29. 3. 1990, s. 1.

4. Der skal udarbejdes en rapport over de kontrolbesøg, der foretages i henhold til stk. 2 og 3, og rapporten skal indeholde følgende oplysninger:

- dato for kontrollen
- dens varighed
- hvilke kontrolforanstaltninger der er gennemført.

Kontrolrapporten skal underskrives af den ansvarlige medarbejder.

5. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen, hvilke foranstaltninger der træffes i forbindelse med de i stk. 2 og 3 omhandlede kontrolbesøg, senest en måned efter deres vedtagelse.

Artikel 3

Det organ, som sørger for kontrol med overholdelsen af bestemmelserne i artikel 1, stk. 1, optegner analyseresultaterne for hvert tilbudt parti, med nøje redegørelse for alle de produktgenskaber, som er anført i bilag I, pkt. 1, idet disse resultater senere anføres i certifikater, som udstedes efter anmodning, navnlig i tilfælde af samhandel mellem medlemsstater eller udførsel.

Artikel 4

1. Efter at have verificeret oplysningerne i tilbuddet, udsteder interventionsorganet straks et dateret og nummeret leveringsbevis med oplysning om:

- a) den mængde, der skal leveres
- b) fristen for levering af skummetmælkspulveret
- c) det lager, hvortil det skal leveres.

2. Leveringen af skummetmælkspulveret skal finde sted senest 28 dage efter dagen for modtagelsen af det salgstilbud, som omhandles i artikel 1, stk. 1, litra d). Leveringen kan deles op i partier.

3. I forbindelse med anvendelsen af denne forordning overtages skummetmælkspulveret af interventionsorganet den dag, det modtages på lageret, dog tidligst dagen efter den dag, det i stk. 1 omhandlede leveringsbevis er udstedt.

4. Det skummetmælkspulver, der er købt af interventionsorganet, betales mellem den 120. dag og den 140. dag efter den dato, hvor interventionsorganet overtager skummetmælkspulveret, på betingelse af at det kontrolleres, om kravene i artikel 1 er overholdt.

5. Opkøbsprisen på skummetmælkspulver beregnes således:

- Hvis proteinindholdet i tørstofekstrakt uden fedtstoffer, som er påvist med hjælp af den i bilag I anførte metode, udgør 35,6 % eller derover, er opkøbsprisen lig med interventionsprisen.

— Hvis indholdet er mindst 31,4 % og under 35,6 % er opkøbsprisen lig med interventionsprisen minus et beløb, der beregnes således: interventionspris \times $((0,356 - \text{proteinindhold}) \times 1,75)$.

6. Ved sit tilbud forpligter sælgeren sig til følgende, såfremt det af kontrollen fremgår, at skummetmælkspulveret ikke opfylder kravene i artikel 1, stk. 1:

- at tage varen tilbage
- at betale oplagringsomkostninger for de pågældende mængder fra overtagelsesdagen til udlagringsdatoen.

Oplagringsomkostningerne fastsættes som et fast beløb pr. ton på følgende måde:

- a) 21 ECU for de faste omkostninger
- b) 0,10 ECU pr. oplagringsdag for omkostningerne ved opbevaringen på lager.

Beløbene krediteres Den Europæiske Udviklings- og Garantifond for Landbruget (EUGFL), Garantisektionen.

Artikel 5

1. Lagrene, jf. artikel 7, stk. 1, fjerde afsnit, i forordning (EØF) nr. 804/68, skal opfylde følgende betingelser:

- a) være tørre, velholdte og fri for utøj
- b) ikke have fremmede lugte
- c) have gode ventilationsmuligheder og
- d) have tilstrækkelig kapacitet samt udstyr, der svarer til denne kapacitet.

Den risiko, der er forbundet med oplagring af skummetmælkspulver, dækkes af en forsikring, som enten har form af en kontraktmæssig forpligtelse for lagerholderen eller en globalforsikring tegnet af interventionsorganet. Medlemsstaten kan også være selvforsikrende.

2. Interventionsorganerne kræver, at skummetmælkspulveret indlagres og oplagres på paller på en sådan måde, at partierne let kan identificeres, og at der er let adgang til dem.

3. Det kompetente kontrolorgan foretager kontrol af, at produkterne befinder sig på det pågældende lager, jf. artikel 4 i Kommissionens forordning (EØF) nr. 618/90 (¹).

Artikel 6

1. Interventionsorganet vælger det lager, som ligger nærmest det sted, hvor skummetmælkspulveret opbevares.

(¹) EFT nr. L 67 af 15. 3. 1990, s. 21.

Hvis valg af et andet lager ikke giver ekstra oplagingsomkostninger, kan interventionsorganet dog:

- a) vælge et andet lager inden for den afstand, der er fastsat i stk. 2
- b) vælge et andet lager, der er beliggende i større afstand, hvis det betyder en besparelse de pågældende oplagings- og transportomkostninger taget i betragtning. I så fald underretter interventionsorganet straks Kommissionen om sit valg.

2. Den maksimale afstand, jf. artikel 7, stk. 1, tredje afsnit, i forordning (EØF) nr. 804/68, fastsættes til 350 km. Er afstanden større, fastsættes de supplerende transportomkostninger, der afholdes af interventionsorganet, til 0,05 ECU/ton/km.

Hvis det opkøbende interventionsorgan hører under en anden medlemsstat end den, hvor det udbudte skummetmælkspulver opbevares, indgår afstanden mellem sælgerens lager og grænsen i den medlemsstat, hvor det opkøbende interventionsorgan er beliggende, ikke i beregningen af den i maksimumsafstanden, jf. første afsnit.

Artikel 7

I tilfælde af levering af skummetmælkspulver af lager stiller interventionsorganet ved udlagring skummetmælkspulveret til rådighed:

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 22. februar 1996.

- ved oplagingsstedet læsset på et transportmiddel, bortset fra stuvning, såfremt det drejer sig om en lastvogn eller en jernbanevogn
- på oplagingsstedets læsserampe, såfremt det drejer sig om et andet transportmiddel, f.eks. en container.

Eventuelle omkostninger ved stuvning og depalettering afholdes af køberen af skummetmælkspulveret. Medlemsstaten fastsætter oplagingsomkostningerne som et fast beløb og informerer efter anmodning alle interesserede herom.

Artikel 8

Forordning (EØF) nr. 625/78 ophæves.

Henvisninger til forordning (EØF) nr. 625/78 skal betragtes som henvisninger til nærværende forordning.

Artikel 9

Denne forordning træder i kraft på syvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Den anvendes fra den 1. marts 1996.

På Kommissionens vegne

Franz FISCHLER

Medlem af Kommissionen

BILAG I

SKUMMETMÆLKSPULVERETS KVALITET

1. Egenskaber

a) Proteinindhold:	mindst 31,4 % i tørstofekstrakt uden fedtstoffer
b) Indhold af mælkefedt:	højest 1,00 %
c) Indhold af vand:	højest 3,5 %
d) Surhedsgrad udtrykt i ml 0,1 normal natriumhydroxidopløsning:	højest 19,5 ml
e) Indhold af laktat:	højest 150 mg pr. 100 g
f) Tilsætningsstoffer:	ingen
g) Phosphatetest:	negativ, dvs. højst 4 µg phenol pr. g rekonstitueret mælk
h) Indhold af uopløselige stoffer:	højest 0,5 ml (24 °C)
i) Antal brændte partikler:	højest 15,0 mg, dvs. mindst skive B
j) Indhold af mikroorganismer:	højest 40 000 pr. g
k) Påvisning af koliformbakterier:	negativ i 0,1 g
l) Påvisning af kærnemælk:	ingen
m) Påvisning af valle:	ingen
n) Smag og lugt:	ren
o) Udseende:	hvid til let gullig farve, ingen urenheder eller brændte partikler
p) Stoffer med antimikrobiel virkning:	ingen (1)

2. Kontrolmetoder

- a) Med forbehold af bestemmelser vedrørende harmonisering af analysemetoder er nedenfor anførte referencemetoder obligatoriske ved anvendelsen af denne forordning:
- | | |
|--|--|
| — Påvisning af protein (N × 6,38): | International Standard F.I.L. 20B: 1993 |
| — Påvisning af mælkefedt: | International Standard F.I.L. 9C: 1987 |
| — Påvisning af vand: | International Standard F.I.L. 26A: 1993 |
| — Påvisning af surhedsgrad: | International Standard F.I.L. 86: 1981 |
| — Påvisning af laktat: | International Standard F.I.L. 69B: 1987 |
| — Phosphatetest: | International Standard ISO 3356: 1975 |
| — Indhold af uopløselige stoffer: | International Standard F.I.L. 129A: 1988 |
| — Påvisning af indhold af brændte partikler: | ADPI Standard Methods 1990 |
| — Tælling af mikroorganismer: | International Standard F.I.L. 100B: 1991 |
| — Påvisning af koliformbakterier: | International Standard F.I.L. 73A: 1985 |
- b) Med hensyn til påvisning af
- | | |
|---------------------------------------|---|
| — Løbevalle: | bestemmelse af glycomakropeptidindholdet ved hjælp af højtryksvæskkekromatografi ifølge analysemetoden, der er anført i bilag V |
| — Sur valle: | tester, der fastlægges af medlemsstaterne |
| — Kærnemælk: | bestemmelsen af fravær af kærnemælk kan ske ved uanmeldt kontrol mindst én gang om ugen af fabriksanlægget på stedet eller ved laboratorieanalyse af slutproduktet ved hjælp af metoden i bilag VI, som påviser højst 69,31 mg PEDP pr. 100 g |
| — Stoffer med antimikrobiel virkning: | ved hjælp af den metode, der er beskrevet i bilag VII |
- c) Prøveudtagningen sker efter metoden i den internationale standard ISO 707; medlemsstaterne kan dog anvende en anden metode til prøveudtagning, såfremt den følger principperne i ovennævnte standard.

(1) Den rå mælk, der anvendes til fremstilling af skummetmælkspulveret, skal overholde kravene i bilag A, kapitel III, del D, til direktiv 92/46/EØF.

*BILAG II***EMBALLAGE****1. Emballage**

Emballagen skal være ny, tør og hel, bestemt til en nettovægt på 25 kg og fremstillet på en af følgende måder:

- a) 4 sække af kraftpapir med en papirtykkelse, der svarer til en vægt på mindst 70 g/m²
 - 1 sæk af tjærepapir som mellemlag, med en papirtykkelse, som svarer til en vægt på mindst 140 g pr. m²
 - 1 polyethylen-inderpose, mindst 0,08 mm tyk, som er svejset eller med dobbelt binding
- b) 1 sæk af kraftpapir med en papirtykkelse, der svarer til en vægt på mindst 70 g/m²
 - 1 sæk af kraftpapir, med polyethylenlag, med en papirtykkelse, som svarer til mindst 80 g + 15 g pr. m²
 - 3 sække af kraftpapir med en papirtykkelse, der svarer til en vægt på mindst 70 g/m²
 - 1 polyethylen-inderpose, mindst 0,08 mm tyk, som er svejset eller med dobbelt binding
- c) 1 ydersæk af kraftpapir med en papirtykkelse, som svarer til en vægt på mindst 85 g/m²
 - 1 sæk af kraftpapir, med polyethylenlag, med en papirtykkelse, som svarer til mindst 70 g + 15 g pr. m²
 - 2 sække af kraftpapir med en papirtykkelse, der svarer til en vægt på mindst 70 g/m²
 - 1 polyethylen-inderpose, mindst 0,12 mm tyk, som er svejset eller med dobbelt binding
- d) 1 ydersæk i let kreppet kraftpapir med en papirtykkelse, som svarer til en vægt på mindst 95 g/m²
 - 1 sæk i let kreppet kraftpapir med et polyethyleninderlag med en papirtykkelse, der svarer til en vægt på mindst 95 g + 15 g/m²
 - 1 sæk i let kreppet kraftpapir med en papirtykkelse, der svarer til en vægt på mindst 85 g/m²
 - 1 polyethylen-inderpose, mindst 0,12 mm tyk, som er svejset eller med dobbelt binding.

2. Påfyldning

Ved påfyldning skal sækkens indhold rystes godt sammen. Det må absolut forhindres, at pulveret kommer ind mellem sækkens forskellige lag.

3. Prøvningsmetode

Emballagen skal i henhold til punkt 1 have en gennemsnitlig brudstyrke på 420 joules/m² ved mindst tre lag papir efter ISO-metoden 1924-2-1985.

*BILAG III***MÆRKNING**

På emballagen skal der mindst være anført følgende oplysninger, eventuelt omsat til kode:

- a) Angivelse på et af Fællesskabets sprog: »Spraytørret skummetmælkspulver«
- b) Nettovægt
- c) Partiets produktionsnummer
- d) Et godkendelsesnummer, der identificerer produktionsvirksomheden og -medlemsstaten
- e) Produktionsdato. Såfremt skummetmælkspulveret oplagres i silo, erstattes datoen for fremstillingen med angivelse af den uge, hvor produktet er fremstillet.

*BILAG IV***STIKPRØVEKONTROL OG ANALYSE AF SKUMMETMÆLKSPULVER, DER FREMBYDES TIL INTERVENTION**

1. Antal emballager, der skal udvælges ved stikprøvekontrol:
 - fremførsler, der indeholder indtil 800 sække a 25 kg: mindst 8
 - fremførsler, der indeholder over 800 sække a 25 kg: mindst 8 + 1 pr. hele eller delvise yderligere lod på 800 sække.
2. Prøvens vægt: der udtages mindst 200 g af hver emballage.
3. Prøvernes sammengruppering: højst 9 prøver forenes i én samlet prøve.
4. Analyse af prøverne: hver samlet prøve underkastes en analyse, hvorved alle de kvalitetskrav, der er fastsat i bilag I, kan kontrolleres.
5. Retningslinjer, der skal følges, såfremt en prøve ikke består:
 - a) hvis en sammensat prøve ikke består af parametrene, skal den mængde, som den sammensatte prøve repræsenterer, fjernes fra den tilbudte mængde
 - b) hvis en sammensat prøve ikke består flere parametre, skal den mængde, som den sammensatte prøve repræsenterer, fjernes fra den tilbudte mængde, og resten af de tilbudte mængder fra den samme virksomhed skal underkastes en ny og afgørende stikprøvekontrol med henblik på analyse. I så fald
 - fordobles antallet af stikprøver ifølge punkt 1
 - hvis en sammensat prøve ikke består et eller flere af parametrene, skal den mængde, som den sammensatte prøve repræsenterer, fjernes fra den tilbudte mængde.

BILAG V

PÅVISNING AF LØBEVALLE I SKUMMETMÆLKSPULVER TIL OFFENTLIG OPLAGRING VED HJÆLP AF HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRFISK BESTEMMELSE AF GLYCOMAKROPEPTIDINDHOLDET (HPLC-metode)

1. **Formål og anvendelsesområde**

Med denne metode kan det ved bestemmelse af glycomakropeptider påvises, om der er løbevalle til stede i skummetmælkspulver.

2. **Reference**

International standard ISO 707 — Mælk og mejeriprodukter — Prøveudtagningsmetoder i overensstemmelse med bestemmelser omhandlet i sidste afsnit under 2 c) i bilag I.

3. **Definition**

Skummetmælkspulvers indhold af glycomakropeptider: indholdet af sådanne stoffer bestemt ved den nedenfor beskrevne metode og udtrykt i vægtprocent.

4. **Princip**

- Opløsning af skummetmælkspulveret, fjernelse af fedtstoffer og proteiner ved hjælp af trichloreddikesyre og centrifugering.
- Bestemmelse af mængden af glycomakropeptider (GMP) i centrifugatet ved HPLC.
- Vurdering af resultatet i forhold til standardprøver af skummetmælkspulver, som ikke indholder eller er tilsat en kendt mængde vallepulver.

5. **Reagenser**

Alle reagenser skal være af analysekvalitet. Der anvendes destilleret vand eller vand af tilsvarende enhed.

5.1. *Opløsning af trichloreddikesyre*

240 g trichloreddikesyre (Cl_3CCOOH) opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml.

5.2. *Elueringsvæske med pH 6,0*

1,74 g Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), 12,37 g kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) og 21,41 g natriumsulfat (Na_2SO_4) opløses i ca. 700 ml vand.

Om nødvendigt indstilles pH til 6,0 ved hjælp af fortyndet phosphorsyre eller en kaliumhydroxidopløsning.

Der fyldes op til 1 000 ml med vand og blandes. Før brugen filtreres elueringsvæsken gennem et membranfilter med porestørrelse 0,45 μm .

5.3. *Opløsning til skylning og opbevaring af kolonnerne*

En volumendel acetonitril (CH_3CN) blandes med ni volumendele vand. Før brugen filtreres opløsningen gennem et membranfilter med porestørrelse 0,45 μm .

Bemærk: Der kan til skylning anvendes andre opløsninger, der har baktericid virkning, og som ikke ændrer kolonnernes adskillelseevne.

5.4. *Standardprøver*

5.4.1. Skummetmælkspulver, der opfylder kravene i denne forordning, benævnt [0].

5.4.2. Samme pulver tilsat 5 % (v/v) løbevallepulver med normal sammensætning, benævnt [5].

6. Apparatur

- 6.1. Analysevægt.
- 6.2. Centrifuge, der kan præstere en centrifugalkraft på 2 200 g, med tilhørende lukkede centrifugeglas på ca. 25 ml.
- 6.3. Mekanisk omrører.
- 6.4. Magnetomrører.
- 6.5. Glastragte med diameter ca. 7 cm.
- 6.6. Filtrerpapir, mellemfint, med diameter ca. 12,5 cm.
- 6.7. Filtreringsudstyr af glas med tilhørende membranfiltre med porestørrelse 0,45 µm.
- 6.8. Målepipette på 10 ml, som opfylder kravene i ISO 648, klasse A, eller ISO/R 835.
- 6.9. Termostatstyret vandbad på $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$.
- 6.10. HPLC-udstyr bestående af:
 - 6.10.1. Pumpe.
 - 6.10.2. Manuel eller automatisk infektionsenhed på 15-30 µl
 - 6.10.3. To serieforbundne kolonner, TSK 2 000 SW (længde 30 cm, indvendig diameter 0,75 cm) eller kolonner af tilsvarende effektivitet, og en forkolonne (3 cm × 0,3 cm) pakket med I 125 eller et lige så effektivt materiale
 - 6.10.4. Termostatstyret kolonneovn indstillet på $35 \pm 1^\circ \text{C}$
 - 6.10.5. UV-detektor med variabel bølgelængde, hvormed der ved 205 nm kan måles med en følsomhed på 0,008 A
 - 6.10.6. Integrator, der kan integrere over de enkelte toppe.

Bemærk: Der kan arbejdes med kolonner ved stuetemperatur, men adskillelseevnen bliver i så fald lidt mindre. Temperatursvingningerne gennem en analyseække må her ikke overstige $\pm 5^\circ \text{C}$.

7. Stikprøveudtagning

- 7.1. International standard ISO 707 — Mælk og mejeriprodukter — Prøveudtagningsmetoder i overensstemmelse med bestemmelser omhandlet i sidste afsnit under 2 c) i bilag I.
- 7.2. Stikprøven opbevares under sådanne forhold, at der hverken kan ske ødelæggelse eller ændring af sammensætningen.

8. Fremgangsmåde

8.1. Forberedelse af analyseprøven

Mælkepulveret overføres til en beholder, der er ca. dobbelt så stor som pulverets volumen, og som har et lufttæt låg.

Beholderen lukkes straks.

Mælkepulveret blandes omhyggeligt ved flere gange at vende rundt på beholderen.

8.2. Udtagning af analyseprøve

I et centrifugeglas (6.2) afvejes $2,000 \pm 0,001$ g.

8.3. Fjernelse af fedtstoffer og proteiner

- 8.3.1. Der sættes 20 ml 50°C varmt vand til analyseprøven. Pulveret opløses ved omrøring i 5 min. med omrøreren (6.3). Glasset afkøles til 25°C .
- 8.3.2. I løbet af 2 min. tilsættes 10,0 ml trichloredikesyreopløsning (5.1) under omrøring med magnetomrøreren (6.4). Glasset anbringes i vandbadet (6.9), hvori det henstår i 60 min.
- 8.3.3. Der centrifugeres (6.2) ved 2 200 g i 10 min. eller filtreres gennem papirfilter (6.6), idet de første 5 ml filtrat bortkastes.

8.4. *Chromatografisk bestemmelse*

- 8.4.1. Af centrifugatet eller filtratet (8.3.3) indprøjes en nøjagtigt afmålt mængde på mellem 15 og 30 µl i HPLC-apparatet (6.10) under en elueringshastighed på 1,0 ml (5.2) pr. minut.

Bemærk:

1. Elueringsvæsken (5.2) holdes på 85 °C under hele chromatograferingen for at holde den luftfri og fri for bakterievækst. Andre foranstaltninger med tilsvarende virkning er acceptable.
2. Hver gang chromatograferingen afbrydes, skylles kolonnen med vand. Den må aldrig efterlades med elueringsvæske (5.2) i.

Skal kolonnerne stå ubenyttede hen i mere end 24 timer, skylles de først med vand og dernæst med opløsning (5.3) i mindst 3 timer med en gennemløbshastighed på 0,2 ml pr. minut.

- 8.4.2. Resultaterne af chromatograferingen af analyseprøven foreligger i form af et chromatogram, hvor hver top identificeres ved sin retentionstid, RT, nemlig:

Top II: chromatogrammets anden top, hvis retentionstid er ca. 12,5 min.

Top III: chromatogrammets tredje top, der svarer til GMP, og hvis retentionstid er $15,5 \pm 1,0$ min.

Top IV: chromatogrammets fjerde top, hvis retentionstid er ca. 17,5 min.

Kolonnernes kvalitet kan påvirke de forskellige toppes retentionstid.

Integratoren (6.10.6) måler automatisk arealet A af hver top, nemlig:

A_{II} : arealet af top II

A_{III} : arealet af top III

A_{IV} : arealet af top IV.

For at afsløre eventuelle afvigelser enten som følge af, at apparaturet eller kolonnerne ikke har fungeret tilfredsstillende, eller på grund af den analyserede prøves oprindelse eller art må alle chromatogrammer bedømmes visuelt, før en kvalitativ tolkning påbegyndes.

I tvivlstilfælde gentages analysen.

8.5. *Kalibrering*

- 8.5.1. Med standardprøverne (5.4) følges den i punkt 8.2-8.4.2 beskrevne fremgangsmåde nøje.

Der benyttes frisk fremstillede opløsninger, da GMP nedbrydes i 8 % trichloreddikesyreopløsning; indholdet heraf falder med ca. 0,2 % pr. time ved 30 °C.

- 8.5.2. Før chromatografering af prøverne konditioneres kolonnerne ved gentagen indsprøjtning af opløsningen (8.5.1) af standardprøven (5.4.2), indtil den top, der svarer til GMP, har konstant areal og retentionstid.

- 8.5.3. Kalibreringsfaktorerne R bestemmes ved at indsprøjte filtrat (8.5.1) i samme mængde som prøverne.

9. **Angivelse af resultaterne**9.1. *Formler og beregning*

9.1.1. Beregning af kalibreringsfaktoren R

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

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

hvor

R_{II} og R_{IV} = kalibreringsfaktorerne for henholdsvis top II og IV og

$A_{II} [0]$ og $A_{IV} [0]$ = de arealer af henholdsvis top II og IV for standardprøven [0], som er bestemt under 8.5.3

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

hvor

R_{III} = kalibreringsfaktoren for top III

$A_{III} [0]$ og $A_{III} [5]$ = de arealer af top III for henholdsvis standardprøve [0] og [5], som er bestemt under 8.5.3

W = indholdet af valle i standardprøven [5], nemlig 5.

9.1.2. Beregning af de relative toparealer for prøven [E]

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

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

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

hvor

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = de relative arealer af henholdsvis top II, III og IV for prøven [E]

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = de arealer af henholdsvis top II, III og IV for prøven [E], som er bestemt under 8.4.2

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = de under 9.1.1 beregnede kalibreringsfaktorer.

9.1.3. Beregningen af de relative retentionstider for top III for prøven [E]

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

hvor

$RRT_{III} [E]$ = den relative retentionstid for top III for prøven [E]

$RT_{III} [E]$ = retentionstiden for top III for prøven [E], som er bestemt under 8.4.2

$RT_{III} [5]$ = retentionstiden for top III for standardprøven [5], som er bestemt under 8.5.3.

9.1.4. Det er vist eksperimentelt, at den relative retentionstid for top III, $RRT_{III} [E]$, er ligefrem proportional med vallepulverindholdet op til 10 %.

— ved et indhold på $> 5\%$ er $RRT_{III} [E] < 1,000$

— ved indhold på $\leq 5\%$ er $RRT_{III} [E] \geq 1,000$.

Den tilladte usikkerhed på RRT_{III} er $\pm 0,002$.

Normalt afviger $RRT_{III} [0]$ -værdien kun lidt fra 1,034. Alt efter kolonnernes tilstand kan denne værdi nærme sig, men skal altid være større end 1,000.

9.2. Beregning af det procentvise indhold af løbevallepulver i prøven nemlig:

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

hvor

W = indholdet af løbevalle i prøven [E], i vægtprocent

$S_{III} [E]$ = det relative areal af top III for prøven [E], som er fremkommet under 9.1.2

1,3 = det relative middelareal af top III udtrykt i g pr. 100 g løbevalle og bestemt i uforfalsket skummetmælkspulver af forskellig oprindelse. Denne værdi er bestemt eksperimentelt

$S_{III} [0]$ = det relative areal af top III og er lig med $R_{III} \times A_{III} [0]$; sidstnævnte størrelser er bestemt under henholdsvis 9.1.1 og 8.5.3

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = korrektionen af det relative middelareal 1,3 når $S_{III} [0]$ -værdien afviger 0,9. Det relative middelareal af top III for standardprøven [0] er bestemt eksperimentelt til 0,9.

9.3. Metodens nøjagtighed

9.3.1. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, der er udført samtidig eller med kort tids mellemrum af samme person, med samme apparatur og på samme stikprøve, må ikke overstige 0,2 vægtprocent.

9.3.2. Reproducerbarhed

Forskellen mellem to resultater, som to forskellige laboratorier er nået frem til med samme stikprøve, må ikke overstige 0,4 vægtprocent.

9.4. *Fortolkning*

9.4.1. Der er ikke valle til stede, hvis det relative areal af top III, S_{III} [E], udtrykt i gram løbevalle pr. 100 gram er $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$:

hvor

2,0 = den højst tilladte værdi for det relative areal af top III; der er her taget hensyn til det relative areal af top III, nemlig 1,3, usikkerheden som følge af variationer i skummetmælkspulverets sammensætning og metodens reproducerbarhed (9.3.2)

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = korrektionen, når arealet $S_{III} [0]$ afviger fra 0,9 (jf. 9.2).

9.4.2. Hvis det relative areal af top III, S_{III} [E] er $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ og samtidig det relative areal af top II, S_{II} [E] er ≤ 160 , beregnes indholdet af løbevalle som angivet i punkt 9.2.

9.4.3. Hvis det relative areal af top III, S_{III} [E] er $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ og samtidig det relative areal af top II, S_{II} [E] er > 160 , bestemmes det samlede proteinindhold (P %); herefter undersøges figur 1 og 2.

9.4.3.1. De tal, der fremkommer efter analyse af uforandrede prøver af skummetmælkspulver med et højt samlet proteinindhold, er anført i figur 1 og 2.

Den fuldt optrukne linje svarer til regressionslinjen, for hvilken koefficienterne beregnes ved hjælp af de mindste kvadraters metode.

Med den stiplede linje fastsættes den øvre grænse for det relative areal af top III med en sandsynlighed for ikke at blive overskredet i 90 % af tilfældene.

Ligningerne for de stiplede linjer i figur 1 og 2 er henholdsvis lig med:

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

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

hvor

S_{III} = det relative areal af top III beregnet enten på grundlag af det samlede proteinindhold eller på grundlag af det relative areal af top S_{II} [E]

P % = det samlede proteinindhold udtrykt som vægtprocent

S_{II} [E] = det i punkt 9.1.2 beregnede relative areal af prøven.

Disse ligninger svarer til det i punkt 9.2 anførte tal 1,3.

Forskellen (T_1 og T_2) mellem det fundne relative areal S_{III} [E] og det relative areal S_{III} fremgår af følgende ligninger:

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

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

9.4.3.2. Hvis T_1 og/eller T_2 er mindre end eller lig med nul, kan et indhold af løbevalle ikke påvises.

Hvis T_1 og T_2 er større end nul, kan det sluttes, at der er løbevalle til stede.

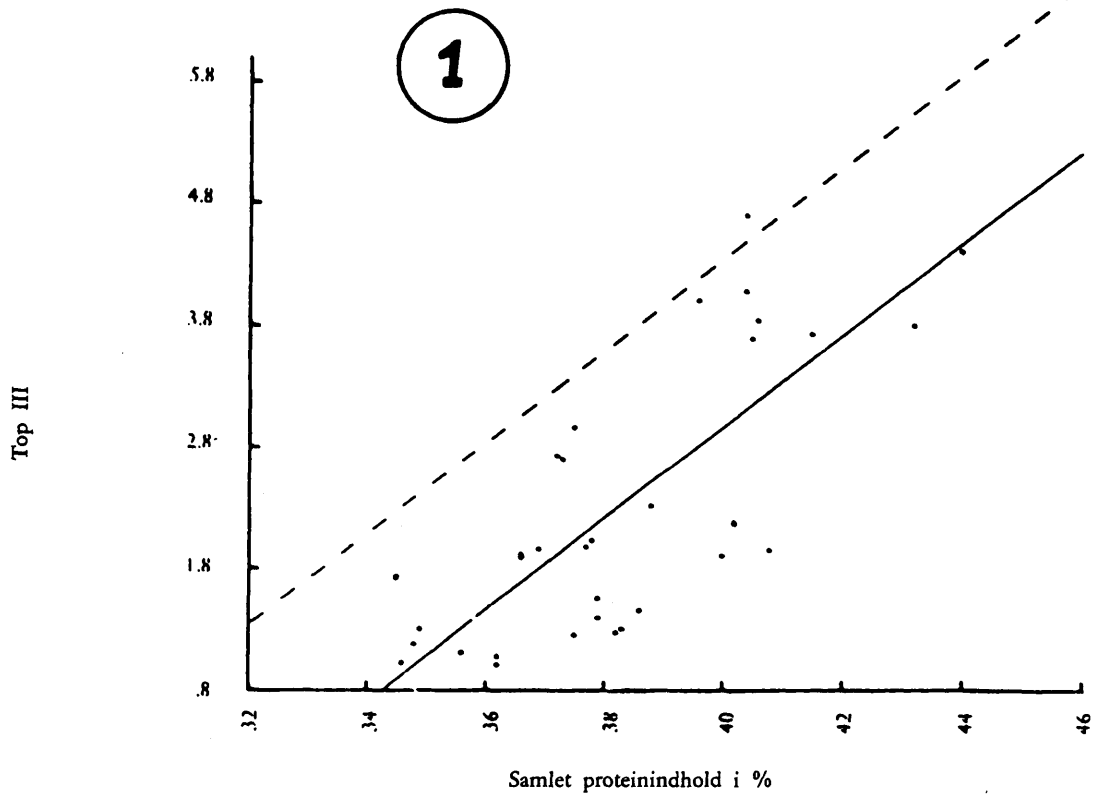
Løbevalleindholdet beregnes ved hjælp af følgende formel:

$$W = T_2 + 0,91$$

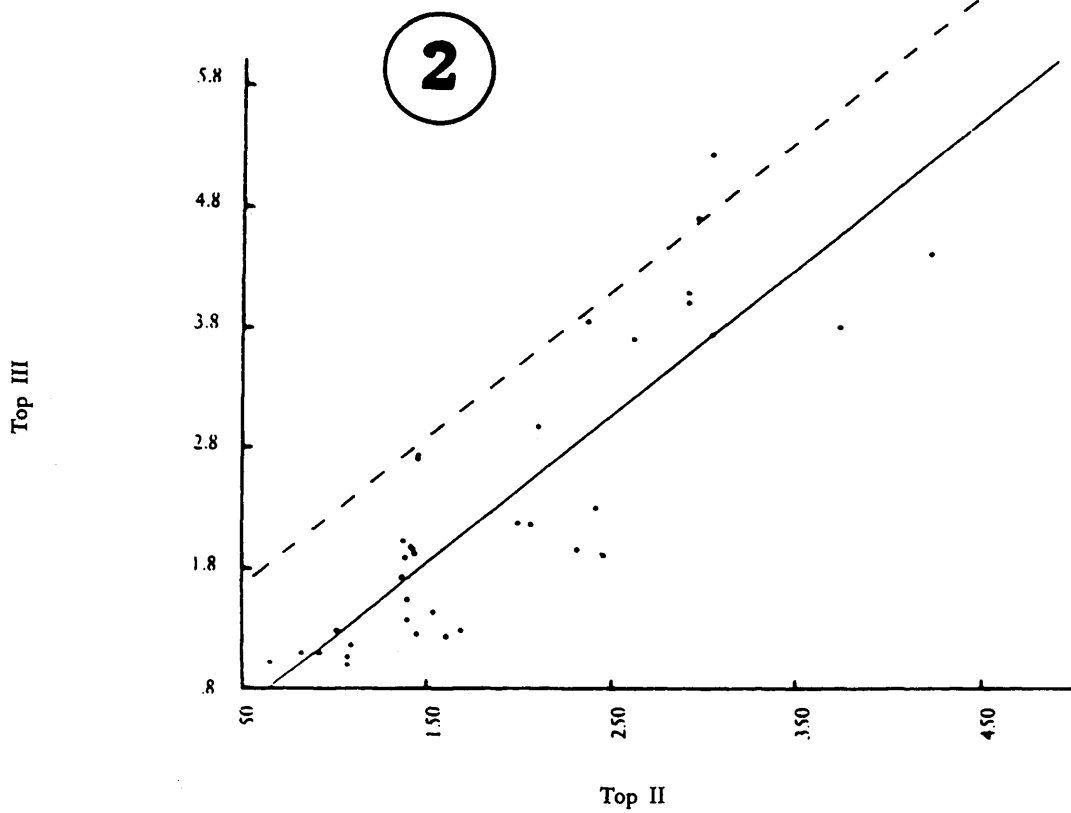
hvor

0,91 svarer til den lodrette afstand mellem den fuldt optrukne linje og den stiplede linje.

SKUMMETMÆLKSPULVER



SKUMMETMÆLKSPULVER



BILAG VI

SKUMMETMÆLKSPULVER: BESTEMMELSE AF PHOSPHATIDYLSERIN- OG PHOSPHATIDYLETHANOLAMINDHOLD

HØJEFFEKTIV VÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC) I OMVENDT FASE

1. **Anvendelsesområde**

Med denne metode beskrives en procedure for kvantitativ bestemmelse af phosphatidylserin (PS) og phosphatidylethanolamin (PE) i skummetmælkspulver (SMP), og som egner sig til påvisning af kærnemælksklumper i SMP.

2. **Definition**

Indhold af PS + PE: massefordelingen af stof bestemt ved anvendelse af den her specificerede procedure. Resultatet udtrykkes som milligram phosphatidylethanolamindipalmitoyl (PEDP) pr. 100 g pulver.

3. **Princip**

Ekstraktion af aminophospholipider fra rekonstitueret mælkpulver ved hjælp af methanol. Bestemmelse af PS og PE som o-phthaldialdehyd (OPA) derivater ved HPLC i omvendt fase og ved fluorescenspåvisning. Kvantificering af PS- og PE-indholdet i analyseprøven ved sammenholdelse med en standardprøve indeholdende en kendt mængde PEDP.

4. **Reagenser**

Alle reagenser skal være analyserene. Vand skal være destilleret eller af mindst tilsvarende renhed, medmindre andet er angivet.

- 4.1. *Standardmateriale: PEDP, mindst 99 % rent.*
Note. Standardmateriale skal opbevares ved -18°C .
- 4.2. *Reagenser for forberedelse af standardprøve og analyseprøve*
 - 4.2.1. Methanol af HPLC-renhed
 - 4.2.2. Chloroform af HPLC-renhed
 - 4.2.3. Tryptamin-monohydrochlorid
- 4.3. *Reagenser til o-phthaldialdehyd-derivatisering*
 - 4.3.1. Natriumhydroxid, 12 M opløsning i vand
 - 4.3.2. Borsyre, 0,4 M opløsning i vand, indstillet til pH 10,0 med natriumhydroxid (4.3.1)
 - 4.3.3. 2-mercaptoethanol
 - 4.3.4. o-phthaldialdehyd (OPA)
- 4.4. *HPLC-elueringsvæsker*
Elueringsvæsker skal fremstilles ved anvendelse af reagenser af HPLC-renhed
 - 4.4.1. Vand af HPLC-renhed
 - 4.4.2. Methanol af fluorimetri-testet renhed
 - 4.4.3. Tetrahydrofuran
 - 4.4.4. Natriumdihydrogenphosphat
 - 4.4.5. Natriumacetat
 - 4.4.6. Eddikesyre.

5. **Apparatur**

- 5.1. *Analysevægt*
- 5.2. *Bægerglas på 25 og 100 ml*
- 5.3. *Pipetter på 1 og 10 ml*
- 5.4. *Magnetomrører*

- 5.5. Målepipetter på 0,2, 0,5 og 5 ml
- 5.6. Målekolber på 10, 50 og 100 ml
- 5.7. Sprøjter på 20 og 100 μ l
- 5.8. Ultralydsbad
- 5.9. Centrifuge, som arbejder ved 27 000 \times g
- 5.10. Prøveglass på ca. 5 ml
- 5.11. Måleglas på 25 ml
- 5.12. pH-meter
- 5.13. HPLC-udstyr
- 5.13.1. Gradient-pumpesystem, i stand til at arbejde ved 1,0 ml/min. ved 200 bar
- 5.13.2. Autosampler med mulighed for derivatisering
- 5.13.3. Søjleopvarmningsenhed, indstillet til 30 °C
- 5.13.4. Fluorescensdetektor indstillet på en exciteringsbølglængde på 330 nm og en emissionsbølglængde på 440 nm.
- 5.13.5. Integrator eller databehandlingsprogrammel, som er i stand til at måle toparealer
- 5.13.6. En Lichrosphere — 100 søjle (250 \times 4,6 mm) eller en tilsvarende søjle pakket med octadecylisan (C18) med en partikelstørrelse på 5 μ m.

6. Prøveudtagning

Prøveudtagning skal ske i overensstemmelse med IDF standard 50B:1985.

7. Fremgangsmåde

7.1. Forberedelse af den interne standardopløsning

30,0 \pm 0,1 mg tryptamin-monohydrochlorid (4.2.3) afvejes i en 100 ml målekolbe (5.6) og der fyldes op til mærket med methanol (4.2.1). Med en pipette (5.3) overføres 1 ml af denne opløsning til en 10 ml målekolbe (5.6), og der fyldes op til mærket med methanol (4.2.1) for at opnå en 0,15 mM tryptamin-koncentration.

7.2. Forberedelse af analyseopløsningen

1,000 \pm 0,001 g af SMP-prøven i et 25 ml bægerglas (5.2). Der tilsættes 10 ml destilleret vand ved 40 °C med pipette (5.3) og omrøres med magnetomrører (5.4) i 30 minutter for at opløse alle klumper. 0,2 ml af den rekonstituerede mælk pipetteres (5.5) over i en 10 ml målekolbe (5.6), hvorefter der med en sprøjte (5.7) tilsættes 100 μ l 0,15 mM tryptaminopløsning (7.1) med en injektionsnål (5.7) og fyldes op til mærket med methanol (4.2.1). Der blandes omhyggeligt ved at vende kolben på hovedet flere gange og anbringelse i ultralydsbad (5.8) i 15 min. Derefter centrifugeres (5.9) ved 27 000 \times g i 10 min., og den overliggende væske indsamles i et prøveglas (5.10).

Note. Analyseopløsningen skal opbevares ved 4 °C, til HPLC-analysen er gennemført.

7.3. Forberedelse af den eksterne standardopløsning

55,4 mg PEDP (4.1) afvejes i en 50 ml målekolbe (5.6), og der tilsættes ca. 25 ml chloroform (4.2.2) ved anvendelse af et måleglas (5.11). Den tilproppede kolbe opvarmes til 50 °C, og der blandes omhyggeligt, indtil PEDP opløses. Derefter afkøles kolben til 20 °C, og der fyldes op til mærket med methanol (4.2.1) og blandes ved at vende kolben på hovedet flere gange. 1 ml af denne opløsning pipetteres (5.3) over i en 100 ml målekolbe (5.6), og der fyldes op til mærket med methanol (4.2.1). 1 ml af denne opløsning pipetteres (5.3) over i en 10 ml målekolbe (5.6), hvorefter der tilsættes 100 μ l (5.7) 0,15 mM tryptaminopløsning (7.1) og fyldes op til mærket med methanol (4.2.1). Der blandes ved at vende kolben på hovedet flere gange.

Note. Standardanalyseopløsningen skal opbevares ved 4 °C, indtil HPLC-analysen er gennemført.

7.4. Forberedelse af derivateringsreagenset

25,0 \pm 0,1 mg OPA (4.3.4) afvejes i en 10 ml målekolbe (5.6), hvorefter der tilsættes 0,5 ml (5.5) methanol (4.2.1) og blandes omhyggeligt for at opløse OPA. Der fyldes op til mærket med borsyreopløsning (4.3.2) og tilsættes 20 μ l 2-mercaptoethanol (4.3.3) med en sprøjte (5.7).

Note. Derivateringsreagenset skal opbevares ved 4 °C i en mørk flaske og er holdbar i en uge.

7.5. HPLC bestemmelse

7.5.1. Elueringsvæsker (4.4)

Væske A:

0,3 mM natriumdihydrogenphosphat og 3 mM natriumacetatopløsning (indtillet til pH 6,5 med eddikesyre) methanol: tetrahydrofuran = 558 : 440 : 2 (v/v/v).

Væske B:

methanol.

7.5.2. Foreslået elueringsgradient:

Tid (min.)	Væske A %	Væske B %	Gennemstrømnings- hastighed (ml/min.)
Begyndelsesværdi	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Note. Elueringsgradienten vil kunne skulle ændres lidt for at opnå den opløsning, der er vist i figur 1.

Søjletemperatur: 30 °C.

7.5.3. Injektionsrumfang: 50 µl derivateringsreagens og 50 µl analyseopløsning.

7.5.4. Søjlekalibrering

Ved daglig opstart af systemet gennemskylles søjlen med 100 % væske B i 15 min., hvorefter der indstilles A : B = 40 : 60 og kalibreres ved 1 ml/min. i 15 min. Der udføres en blindprøve ved injektion af methanol (4.2.1).

Note. Forud for opbevaring over længere tid gennemskylles søjlen med methanol: chloroform = 80 : 20 (v/v) i 30 min.

7.5.5. Bestemmelse af indhold af PS + PE i analyseprøven

Rækken af kromatografianalyser gennemføres under overholdelse af et konstant tidsforhold mellem de enkelte analyserunder for at opnå konstante retentionstider. Den eksterne standardopløsning (7.3) indsprøjtes for hver 5.-10. analyseopløsning for at evaluere responsfaktoren.

Note. Søjlen skal renses ved gennemskylning med 100 % væske B (7.5.1) i mindst 30 min. for hver 20.-25. analyserunde.

7.6. Integrationsmåde

7.6.1. PEDP-top

PEDP elueres som en enkelt top. Toparealet bestemmes ved dal-til-dal integration.

7.6.2. Tryptamin-top

Tryptamin elueres som en enkelt top (figur 1). Toparealet bestemmes ved dal-til-dal integration.

7.6.3. Grupper af PS- og PE-toppe

Under de beskrevne betingelser (figur 1) elueres PS som to delvis uopløste hovedtoppe efter en mindre top. PE elueres som 3 delvis uopløste hovedtoppe. Hele arealet for hver samling af toppe bestemmes ved at sætte basislinjen som rapporteret i figur 1.

8. Beregning og angivelse af resultater

Indholdet af PS og PE i analyseprøven beregnes således:

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

hvor:

C = indhold af PS eller PE (mg/100 g pulver) i analyseprøven

A₁ = PEDP topareal af standardprøveopløsningen (7.3)

A₂ = topareal af PS eller PE i analyseopløsningen (7.2)

T₁ = tryptamin topareal i standardprøveopløsningen (7.3)

T₂ = tryptamin topareal i analyseopløsningen (7.2)

9. Præcision

Note. Værdierne for repeterbarhed blev beregnet efter den internationale IDF-standard⁽¹⁾. Den midlertidige reproducerbarhedsgrænse blev beregnet efter retningslinjer for fortolkning af analyseresultater og anvendelse af sensorevaluering i forbindelse med mælk og mejeriprodukter under den fælles markedsordning (Kommissionens dokument VI/2721/95).

9.1. Repeterbarhed

Den relative standardafvigelse for repeterbarheden, som er et udtryk for variationen i uafhængige analyseresultater opnået af samme operatør under anvendelse af samme apparatur under samme betingelser på samme analyseprøve og inden for et kort tidsinterval, bør ikke overstige 2 % relativ. Hvis der opnås to bestemmelser under disse betingelser, bør den relative forskel mellem de to resultater ikke overstige 6 % af det aritmetiske gennemsnit af resultaterne.

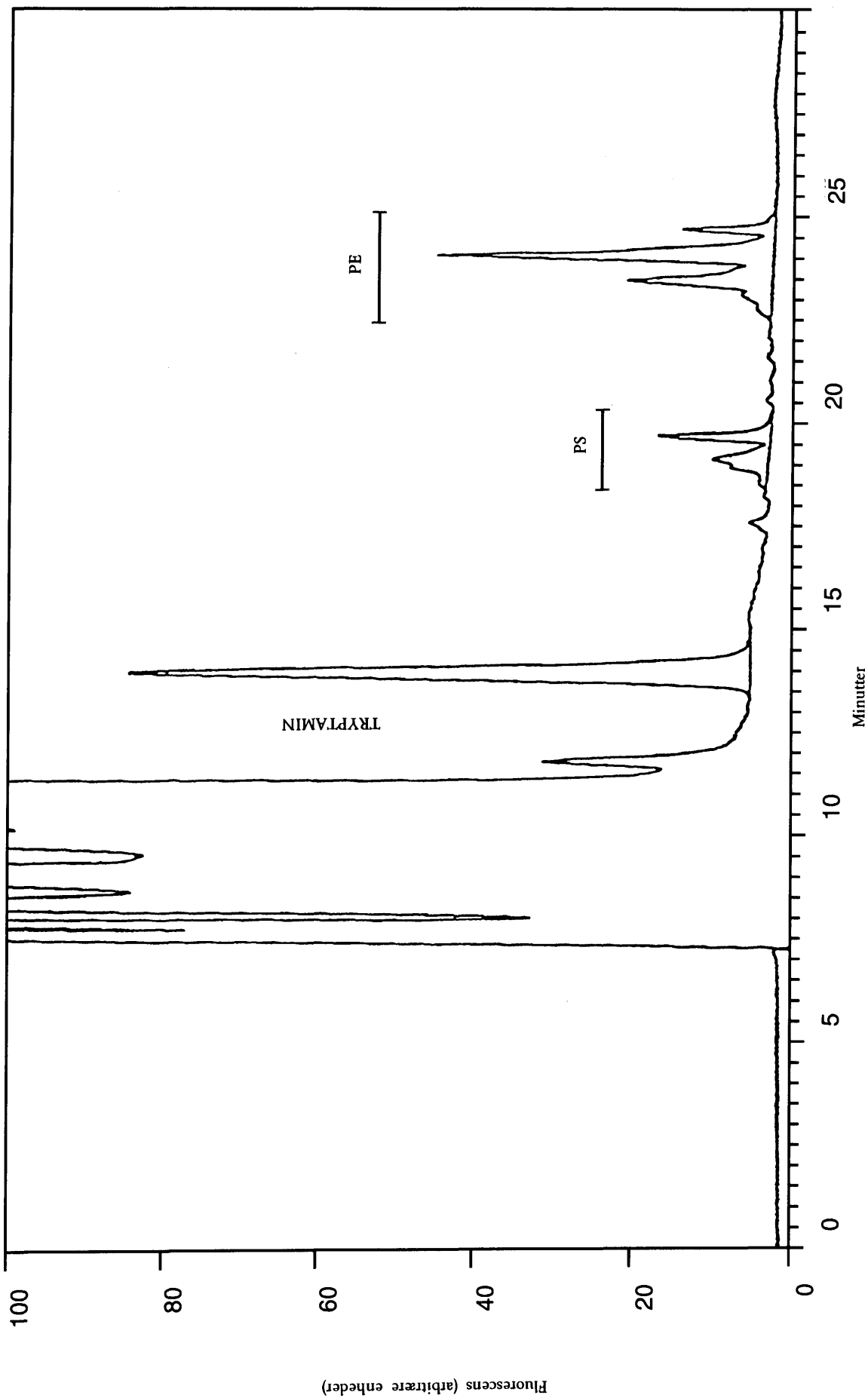
9.2. Reproducerbarhed

Hvis to bestemmelser foretages af operatører i forskellige laboratorier under anvendelse af forskelligt apparatur under forskellige betingelser for analyse og samme analyseprøve, bør den relative forskel mellem de to resultater ikke overstige 11 % af det aritmetiske gennemsnit af resultaterne.

10. Litteraturhenvisning

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

⁽¹⁾ International IDF-standard 135B/1991. Milk and Milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure.



Figur 1: HPLC-mønster for OPA-derivater af phosphatidylserin (PS) og phosphatidylethanolamin (PE) i methanolekstrakt af rekonstitueret skummetmælkspulver. Integrationsmåde for toppene af PS, PE og tryptamin (intern standard) rapporteres.

BILAG VII

BESTEMMELSE AF RESTER AF ANTIBIOTIKA OG SULFONAMID/DAPSON I SKUMMET-MÆLKSPULVER

Der skal anvendes en mikrobe-inhibitor screening test, hvor *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 anvendes som test-mikroorganisme, og som er tilstrækkelig følsom til at påvise 4 µg benzylpenicillin pr. 1 mælk og 100 µg sulfadimidin pr. 1 mælk. Analysesæt findes i handelen og kan anvendes, hvis de har den tilstrækkelige følsomhed for benzylpenicillin og sulfadimidin (¹).

Til testen anvendes rekonstitueret skummetmælkspulver (1 g pulver + 9 ml destilleret vand). Testen gennemføres som beskrevet i IDF — Bulletin nr. 258/1991, sektion 1, kapitel 2, eller efter anvisningerne fra fabrikanten i prøvesættet.

Positive resultater fortolkes således:

1. Gentag testen ved tilsætning af penicillinase til testsystemet:

Positivt resultat: det inhiberende stof kan ikke identificeres ved denne procedure.

Negativt resultat: det inhiberende stof er et β -lactam antibiotikum.

2. Gentag testen ved tilsætning af p-aminobenzosyre til testsystemet:

Positivt resultat: det inhiberende stof kan ikke identificeres ved denne procedure.

Negativt resultat: det inhiberende stof er et sulfonamid/dapson.

3. Gentag testen ved tilsætning af penicillinase + p-aminobenzosyre til testsystemet:

Positivt resultat: det inhiberende stof kan ikke identificeres ved denne procedure.

Negativt resultat: de inhiberende stoffer er et β -lactam antibiotikum og et sulfonamid/dapson.

(¹) *Vigtig note:* Falsk-positive resultater kan forekomme, når skummetmælkspulver analyseres. Det er derfor vigtigt at verificere, at det anvendte testsystem ikke giver falsk-positive resultater.