

I

(Retsakter hvis offentliggørelse er obligatorisk)

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 213/2001**af 9. januar 2001**

om gennemførelsesbestemmelser til forordning (EF) nr. 1255/1999 for så vidt angår metoder til analyse og vurdering af mælks og mejeriprodukters kvalitet og om ændring af forordning (EF) nr. 2771/1999 og (EF) nr. 2799/1999

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

pulver⁽³⁾ for at indlemme deres bilag om analysemetoder i nærværende forordning.

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

(2) De kendetegn for mælks og mejeriprodukters sammensætning og kvalitet, som er fastsat i forbindelse med ordningerne i forordning (EF) nr. 1255/1999, bør verificeres for at sikre, at disse krav opfyldes nøje.

under henvisning til Rådets forordning (EF) nr. 1255/1999 af 17. maj 1999 om den fælles markedsordning for mælk og mejeriprodukter⁽¹⁾, særlig artikel 10 og 15, artikel 26, stk. 3, artikel 29, stk. 1, og artikel 31, stk. 14, og

(3) Det kræves ofte, at referencemetoderne for sådanne verifikationer skal være metoder, der er offentliggjort af internationale organisationer såsom CEN, IDF, ISO og AOAC International, og som regelmæssigt ajourføres af disse organisationer. I nogle tilfælde er der fastsat en EF-referencemethode. I andre tilfælde er ingen referencemethode specificeret i EF-reglerne. For at sikre en ensartet anvendelse af referencemetoder bør der hvert år opstilles en liste over referencemetoder, og det bør anføres, at den metode, der skal anvendes, skal figurere på en sådan liste.

ud fra følgende betragtninger:

(1) Reference- og rutinemetoderne til analyse og vurdering af mælks og mejeriprodukters kvalitet samt området og reglerne for anvendelsen af nævnte metoder er fastsat i Kommissionens forordning (EØF) nr. 1216/68, (EØF) nr. 3942/92, (EF) nr. 86/94, (EF) nr. 2721/95, (EF) nr. 1080/96, (EF) nr. 1081/96, (EF) nr. 1082/96, (EF) nr. 1854/96, (EF) nr. 880/98 og (EF) nr. 1459/98, som der findes fuldstændige referencer for i bilag XXVI til nærværende forordning. For klarhedens skyld og for at udstyre de erhvervsdrivende i sektoren med en enkelt retsakt om nævnte metoder og reglerne for anvendelsen af dem bør ovennævnte forordninger omarbejdes og samles i én enkelt tekst. Med samme mål for øje bør der foretages en ændring af Kommissionens forordning (EF) nr. 2771/1999 af 16. december 1999 om gennemførelsesbestemmelser til Rådets forordning (EF) nr. 1255/1999 for så vidt angår interventionsforanstaltninger på markedet for smør og fløde⁽²⁾ og forordning (EF) nr. 2799/1999 af 17. december 1999 om gennemførelsesbestemmelser til forordning (EF) nr. 1255/1999 for så vidt angår ydelse af støtte til skummetmælk og skummetmælkspulver bestemt til foderbrug og salg af sådant skummetmælks-

(4) Brugen af rutinemetoder bør ikke udelukkes. Betingelserne for anvendelse af dem bør derfor angives.

(5) For at sikre en ensartet praksis for evaluering af analyseresultaterne bør der endvidere fastsættes fælles metoder. Det forholder sig på samme måde med smagsprøvning af de pågældende produkter og omprøvning af resultater, der bestrides.

(6) For visse analyser findes der for tiden ikke internationalt accepterede referencemetoder, der er valideret. Der foreligger derfor ingen oplysninger om variationen af analyseresultater fra laboratorium til laboratorium. Der bør derfor fastsættes metoder på EF-plan, der er valideret efter internationalt fastsatte regler, og som anvendes som referencemetoder.

⁽¹⁾ EFT L 160 af 26.6.1999, s. 48.

⁽²⁾ EFT L 333 af 24.12.1999, s. 11.

⁽³⁾ EFT L 340 af 31.12.1999, s. 3.

- (7) I Kommissionens forordning (EF) nr. 2571/97 af 15. december 1997 om salg af smør til nedsat pris og ydelse af støtte for fløde, smør og koncentreret smør til fremstilling af konditorvarer, konsumis og andre levnedsmidler ⁽¹⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 635/2000 ⁽²⁾, kræves der under visse omstændigheder tilsætning af røbestof til fløde, smør og koncentreret smør for at sikre, at disse produkters endelige anvendelse er korrekt. I betragtning af betydningen af røbestoffer af hensyn til ordningens korrekte anvendelse og for at sikre lige behandling af de erhvervsdrivende, der deltager i ordningen, bør der så vidt muligt fastsættes fælles metoder for bestemmelse af nogle af disse røbestoffer.
- (8) Koncentreret smør bør tilsættes røbestof under kontrol efter Kommissionens forordning (EØF) nr. 3143/85 af 11. november 1985 om afsætning til nedsat pris af interventionssmør bestemt til direkte forbrug i form af koncentreret smør ⁽³⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 101/1999 ⁽⁴⁾, og Kommissionens forordning (EF) nr. 429/90 af 20. februar 1990 om støtte ved licitation til koncentreret smør bestemt til direkte forbrug i Fællesskabet ⁽⁵⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 124/1999 ⁽⁶⁾, og forordning (EF) nr. 2571/97. For at undgå omgåelse af reglerne er det nødvendigt strengt at overholde betingelser for mærkning af koncentreret smør. Der bør derfor fastsættes en fælles metode for påvisning af disse røbestoffer.
- (9) Der kan ydes en støtte til privat oplagring af ost af fåremælk efter artikel 9 i forordning (EF) nr. 1255/1999. Der kan ydes en særlig restitution for de samme produkter efter artikel 31 i samme forordning. Der kan indføres ost fremstillet af fåre-, gede- eller bøffelmælk eller af blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk til EF fra bestemte tredjelande ifølge præferenceordninger. På grund af ovennævnte bestemmelser er det nødvendigt ved passende kontrol at efterprøve, at der ikke er iblandet komælk i de pågældende produkter. Der bør derfor fastsættes en EF-referencemetode til påvisning af komælk, uden at dette berører anvendelsen af rutinemetoder, hvis disse opfylder bestemte kriterier.
- (10) Efter Kommissionens forordning (EØF) nr. 2921/90 af 10. oktober 1990 om ydelse af støtte til skummetmælk med henblik på fremstilling af kasein og kaseinater ⁽⁷⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 2654/1999 ⁽⁸⁾, skal det påvises, at der ikke findes coliforme bakterier i de pågældende produkter. Den referencemetode, der er accepteret på internationalt plan for påvisning af coliforme bakterier i mælk og mejeriprodukter, er den internationale standard IDF 73A:1985. Den kan dog kun anvendes i modificeret form til påvisning af coliforme bakterier i en vis mængde produkt. En EF-referencemetode til påvisning af coliforme bakterier bør derfor baseres på ovennævnte standard.
- (11) I Rådets forordning (EØF) nr. 2658/87 af 23. juli 1987 om told- og statistiknomenklaturen og den fælles toldtarif ⁽⁹⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 254/2000 ⁽¹⁰⁾, differentieres toldsatserne for foderblandinger henhørende under toldposition 2309 ud fra indholdet af mælkeprodukter. For at sikre en ensartet anvendelse af de pågældende bestemmelser bør der fastlægges en metode til bestemmelse af lactoseindholdet, der er obligatorisk for alle medlemsstater, og i denne forbindelse bør der vælges en generelt anerkendt metode.
- (12) I forordning (EF) nr. 125/1999 er det fastsat, at visse krav til kvalitet skal opfyldes, for så vidt angår smør og skummetmælkspulver til intervention eller skummetmælkspulver til dyrefoder. Der bør derfor fastsættes referencemetoder til efterprøvning af, om disse krav er opfyldt.
- (13) Iværksættelsen af nogle af de metoder, der for første gang indføres ved nærværende forordning, behøver en indkøringsperiode. Anvendelsen af dem bør derfor udskydes.
- (14) Forvaltningskomitéen for Mælk og Mejeriprodukter har ikke afgivet udtalelse inden for den af formanden fastsatte frist —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

KAPITEL I

ALMINDELIGE BESTEMMELSER

Artikel 1

Formål og anvendelsesområde

I denne forordning fastsættes der regler for anvendelsen af metoderne til kemisk, fysisk og mikrobiologisk analyse og for organoleptisk vurdering af mælk og mejeriprodukter i forbindelse med ordningerne i den fælles markedsordning for mælk og mejeriprodukter, der er fastsat i forordning (EF) nr. 1255/1999, samt nogle af disse metoder.

⁽¹⁾ EFT L 350 af 20.12.1997, s. 3.

⁽²⁾ EFT L 76 af 25.3.2000, s. 9.

⁽³⁾ EFT L 298 af 12.11.1985, s. 9.

⁽⁴⁾ EFT L 11 af 16.1.1999, s. 14.

⁽⁵⁾ EFT L 45 af 21.2.1990, s. 8.

⁽⁶⁾ EFT L 16 af 21.1.1999, s. 19.

⁽⁷⁾ EFT L 279 af 11.10.1990, s. 22.

⁽⁸⁾ EFT L 325 af 17.12.1999, s. 10.

⁽⁹⁾ EFT L 256 af 7.9.1987, s. 1.

⁽¹⁰⁾ EFT L 28 af 3.2.2000, s. 16.

*Artikel 2***Liste over metoder**

1. Listen over referencemetoder for de i artikel 1 omhandlede analyser er anført i bilag I.
2. Kommissionen ajourfører mindst en gang om året nævnte liste efter proceduren i artikel 42 i forordning (EF) nr. 1255/1999.

*Artikel 3***Rutinemetoder**

Der kan anvendes rutinemetoder til de analyser, der er fastsat i EF-reglerne, hvis de er korrekt kalibreret og regelmæssigt kontrolleres i forhold til referencemetoden.

Den i bilag II anførte procedure kan anvendes til efterprøvning af resultater, der opnås med rutinemetoder, som ligger tæt på de grænseværdier, der er specificeret i de pågældende forordninger.

I tilfælde af tvistemål er de resultater, der opnås med referencemetoden, afgørende.

*Artikel 4***Validering af referencemetoder**

1. En referencemetode er valideret, hvis den opfylder forhåndsopstillede krav til præcision vedrørende repeterbarheds- og reproducerbarhedsgrænsen.
2. Er en referencemetode, der er fastsat i de pågældende forordninger, ikke valideret, fastsætter medlemsstaterne en foreløbig reproducerbarhedsgrænse.

Denne grænse beregnes efter proceduren i bilag III, litra b). I atten måneder efter nærværende forordnings ikrafttrædelse kan medlemsstaterne anvende en ligestillet procedure.

Det kontrolleres mindst én gang om året, om grænsen overholdes.

3. Viser resultaterne af anvendelsen af validerede referencemetoder eller metoder med midlertidige præcisionstal, at en grænse er overskredet, anvendes den i bilag IV beskrevne metode til evaluering af analyseresultater til at fastslå den »kritiske afstand« til en sådan grænse.

*Artikel 5***Accept af analyseresultater**

1. Analyserne foretages på laboratorier, der anvender en intern metode for kvalitetskontrol i overensstemmelse med den

metode, der beskrevet i bilag V, punkt a), eller en metode på lignende niveau.

Der skal foreligge en detaljeret beskrivelse af den anvendte metode i laboratoriet.

2. Laboratorierne udarbejder deres interne præcisionsnormer i en serie for alle metoder efter:

- a) den metode, der er defineret i bilag V, litra b), eller
- b) en offentliggjort valideret metode, der giver en fastslået repeterbarhed.

Det kontrolleres mindst én gang om året efter proceduren i bilag III, litra a), om reproducerbarhedsgrænsen er overholdt.

Andet afsnit anvendes ikke, hvis laboratoriet har deltaget i en præstationsprøvningsordning i årets løb.

3. Laboratorierapporten om resultaterne af analysen skal indeholde tilstrækkelige oplysninger til at muliggøre en evaluering af resultaterne efter bilag IV og VIII.

4. Resultaterne af en analyse anses for acceptable, hvis de er opnået efter acceptkriterier, der er beskrevet i den interne metode for kvalitetskontrol som omhandlet i stk. 1, og interne præcisionsnormer som omhandlet i stk. 2.

*Artikel 6***Sensorisk analyse**

1. Med hensyn til smør anvendes metoderne i bilag VI til at efterprøve smagsdommernes arbejde og resultaternes pålidelighed. Den metode, der er beskrevet i bilag VII, anvendes som referencemetode for sensorisk analyse.

2. Med hensyn til mælk og mejeriprodukter undtagen smør benytter medlemsstaterne som referencemetode for sensorisk analyse enten IDF-standard 99C/1997 eller andre lignende metoder, som de meddeler til Kommissionen.

Metoderne i bilag VI kan anvendes til at efterprøve smagsdommernes arbejde og resultaternes pålidelighed.

*Artikel 7***Prøveudtagning og bestridelse af analyseresultater**

1. Med henblik på de analyser, der er fastsat i EF-reglerne, skal der udtages dobbelte prøver.

2. Den i bilag VIII beskrevne procedure anvendes i tilfælde, hvor resultaterne af en analyse ikke accepteres af den erhvervsdrivende.

KAPITEL II

ANALYSEMETODER

Artikel 8

Indhold af vand/tørstof/fedt i smør

1. Den i bilag IX beskrevne analysemetode benyttes som referencemetode ved bestemmelse af vandindholdet i smør.
2. Den i bilag X beskrevne analysemetode i bilag II benyttes som referencemetode ved bestemmelse af indholdet af fedtfrit tørstof i smør.
3. Den i bilag XI beskrevne analysemetode benyttes som referencemetode ved bestemmelse af fedtstofindholdet i smør.

Artikel 9

Røbestoffer

1. Den i bilag XII beskrevne analysemetode benyttes som referencemetode til bestemmelse af vanillin i koncentreret smør, smør og fløde.
2. Den i bilag XIII beskrevne analysemetode benyttes som referencemetode til bestemmelse af mængden af ethylester af β -apo-8' karotinsyre i koncentreret smør og smør.
3. Den i bilag XIV beskrevne analysemetode benyttes som referencemetode til bestemmelse af indholdet af stigmasterol eller β -sitosterol i smør og koncentreret smør.
4. Koncentreret smør, smør eller fløde tilsættes røbestof efter de relevante EF-regler, hvis de opnåede resultater svarer til specifikationerne i punkt 8 i de bilag, der er omhandlet i stk. 1, 2 og 3.

Artikel 10

Påvisning af kasein i komælk

1. Den i bilag XV anførte referenceanalysemetode benyttes for at sikre, at ost, som udelukkende skal være fremstillet af fåre-, gede- eller bøffelmælk eller af blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk, ikke indeholder kasein af komælk.

Kasein af komælk anses for at være til stede, hvis det konstaterede indhold af kasein af komælk i analyseprøven er lig med eller overstiger indholdet i den referenceprøve med 1 % komælk, som er fastsat i bilag XV.

2. Der kan benyttes rutinemetoder til påvisning af kasein af komælk i de i stk. 1 omhandlede oste på følgende betingelser:

- a) påvisningsgrænsen må højst være 0,5 %
- b) der må ikke forekomme falskpositive resultater
- c) kasein af komælk skal være påviseligt med den fornødne følsomhed selv efter lange modningsperioder, som det kan være tilfældet under almindelige handelsforhold.

Er betingelsen i litra b) ikke opfyldt, skal alle prøver, der giver positivt resultat, analyseres ved hjælp af referencemetoden.

Er kravet i litra c) ikke opfyldt for én af de typer oste, der er omhandlet i stk. 1, skal den pågældende ost analyseres ved hjælp af referencemetoden.

Artikel 11

Påvisning af coliforme bakterier

1. Den i bilag XVI beskrevne referenceanalysemetode skal anvendes til påvisning af tilstedeværelse af coliforme bakterier i smør, skummetmælkspulver, kasein og kaseinater.

2. Der kan benyttes rutinemetoder til påvisning af coliforme bakterier, hvis de fremkomne resultater er sammenlignelige med resultaterne af den referencemetode, der er beskrevet i nævnte bilag. Rutinemetoder skal især have en tilstrækkelig påvisningsgrænse. Falsknegative resultater må ikke forekomme. Hvis det ikke kan udelukkes, at der forekommer falskpositive resultater, skal alle positive resultater bekræftes ved hjælp af referencemetoden.

Artikel 12

Lactoseindhold

Metoden til bestemmelse af indholdet af lactose i produkter henhørende under position 2309 i den kombinerede nomenklatur er beskrevet i bilag XVII.

Artikel 13

Påvisning af løbevalle

1. Metoden til påvisning af løbevalle i skummetmælkspulver til offentlig oplagring er beskrevet i bilag XVIII.
2. Metoden til påvisning af løbevalle i skummetmælkspulver og blandinger til dyrefoder er beskrevet i bilag XIX.

Artikel 14

Påvisning af kærnemælk

Metoden til påvisning af kærnemælk i skummetmælkspulver er beskrevet i bilag XX.

Artikel 15

Restkoncentrationer af antimikrobielle stoffer

Metoden til påvisning af restkoncentrationer af antibiotika og sulfonamid/dapson i skummetmælkspulver er beskrevet i bilag XXI.

Artikel 16

Indholdet af skummetmælkspulver

Metoden til bestemmelse af indholdet af skummetmælkspulver i foderblandinger er beskrevet i bilag XXII.

Artikel 17

Påvisning af stivelse

Metoden til påvisning af stivelse i skummetmælkspulver, denatureret mælkepulver og foderblandinger er beskrevet i bilag XXIII.

Artikel 18

Vandindholdet i syrnet kærnemælkspulver

Metoden til bestemmelse af vandindholdet i syrnet kærnemælkspulver til anvendelse i foderblandinger er beskrevet i bilag XXIV.

Artikel 19

Påvisning af fremmede fedtstoffer

Metoden til påvisning af fremmede fedtstoffer i mælkefedt er beskrevet i bilag XXV.

KAPITEL III

AFSLUTTENDE BESTEMMELSER

Artikel 20

Ændringer af forordning (EF) nr. 2771/1999

I forordning (EF) nr. 2771/1999 foretages følgende ændringer:

- 1) Artikel 4, stk. 1, første punktum, affattes således: »Myndighederne kontrollerer smørrets kvalitet ved hjælp af de metoder, der er omhandlet i bilag I, og på basis af prøver, der er udtaget efter reglerne i bilag IV«.
- 2) I bilag I affattes teksten i fodnote nr. 2 således: »Jf. bilag I til forordning (EF) nr. 213/2001«.

3) Bilag II og III udgår.

- 4) I bilag IV, punkt 2, næstsidste linje, ændres ordene »med bilag III« til »med bilag VII til forordning (EF) nr. 213/2001«.

Artikel 21

Ændring af forordning (EF) nr. 2799/1999

I forordning (EF) nr. 2799/1999 foretages følgende ændringer:

1) Artikel 20, stk. 1, 2, 3 og 4, affattes således:

»1. Blandingers og foderblandingers indhold af skummetmælkspulver kontrolleres ved hjælp af en analyse, der mindst foretages to gange i overensstemmelse med den i bilag XXII til forordning (EF) nr. 213/2001 beskrevne metode, og som suppleres med de kontrolforanstaltninger, der er nævnt i artikel 17, stk. 3, i nærværende forordning. Hvis resultaterne af sådanne kontroller ikke stemmer overens, er resultatet af kontrollen på stedet afgørende.

2. Kontrol af, om der forekommer løbevalle, foretages efter den metode, der er beskrevet i bilag XIX til forordning (EF) nr. 213/2001.

3. Foderblandingerens indhold af stivelse konstateres ved de kontrolforanstaltninger, der er nævnt i artikel 17, stk. 3, i nærværende forordning, og som skal suppleres med den analysemetode, der er beskrevet i bilag XXIII til forordning (EF) nr. 213/2001.

4. Vandindholdet i syrnet kærnemælkspulver bestemmes ved hjælp af den analysemetode, der er beskrevet i bilag XXIV til forordning (EF) nr. 213/2001.«

2) Bilag III, IV, V og VI udgår.

Artikel 22

Ophævelser

Forordning (EØF) nr. 1216/68, (EØF) nr. 3942/92, (EF) nr. 86/94, (EF) nr. 2721/95, (EF) nr. 1854/96, (EF) nr. 1080/96, (EF) nr. 1081/96, (EF) nr. 1082/96, (EF) nr. 880/98 og (EF) nr. 1459/98 ophæves.

Henvisninger til de ophævede forordninger læses som henvisninger til nærværende forordning.

Artikel 23

Ikrafttrædelse

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

De metoder, der er fastsat i bilag III, bilag IV, punkt 4, og bilag V, VI og VIII, tages i anvendelse atten måneder efter nærværende forordnings ikrafttrædelse.

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

Udfærdiget i Bruxelles, den 9. januar 2001.

På Kommissionens vegne

Franz FISCHLER

Medlem af Kommissionen

LISTE OVER REFERENCEMETODER

Indeks

Min. = minimum, Maks. = maksimum, Bilag = bilag til den nævnte forordning, FT = fedtfri tørstof, FF = frie fedtsyrer, PI = peroxidindeks, U = udseende, S = smag, K = konsistens, SK = samlet kimindhold, ITB = indhold af termofile bakterier, MS = medlemsstat, IDF = International Dairy Federation, ISO = Den Internationale Standardiseringsorganisation, IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry, ADPI = American Dairy Products Institute, SKM = sødet koncentreret mælk, IMF = indampet mælk eller fløde, FM = fedtfrit mælketørstof.

DEL A

Kommissionens forordning	Produkt	Parameter	Grænse	Referencemethode	Bemærkning
Forordning (EF) nr. 2771/1999 Offentlig oplagring (EFT L 333 af 24.12.1999, s. 11)	Usaltet smør	Mælkefedtstof Vand FT FF (Maks.) PI (Maks.) Coliforme bakterier Fremmed fedtstof Røbestoffer: sterol Andre røbestoffer: — vanilin — ethylester af karotinsyre — triglycerider af heptansyre Organoleptiske egenskaber Vandfordeling	Min. 82 % Maks. 16 % Maks. 2 % 1,2 mmol/100 g fedtstof 0,3 mekv ilt/1 000 g fedtstof Ikke påviselige i 1 g Ikke påviseligt ved triglyceridanalyse Ikke påviselige Ikke påviselige Ikke påviselige Ikke påviselige Mindst 4 point af 5 for U, S og K Mindst 4 point	Bilag XI Bilag IX Bilag X IDF-standard 6B:1989 IDF-standard 74A:1991 (engelsk udgave) Bilag XVII Bilag XXVI Bilag XIV Bilag XII Bilag XIII IUPAC 2.301 sub 5 Bilag VII IDF-standard 112A:1989	Bemærkning 1 Bemærkning 3
Forordning (EF) nr. 2771/1999 Privat oplagring	Usaltet smør	Mælkefedt Vand	Min. 82 % Maks. 16 %	Bilag XI Bilag IX	Bemærkning 6
Forordning (EF) nr. 2771/1999 Privat oplagring	Saltet smør	Mælkefedt Vand Salt	Min. 80 % Maks. 16 % Maks. 2 %	Bilag XI Bilag IX IDF-standard 12B:1988	Bemærkning 6

Kommissionens forordning	Produkt	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
Forordning (EF) nr. 2571/97 (EFT L 350 af 20.12.1997, s. 3)	Usaltet smør	Mælkefedt Vand Røbestoffer: — sterol — vanillin — ethylester af karotinsyre — triglycerider af heptansyre	Min. 82 % Maks. 16 %	Bilag XI Bilag IX Bilag XIV Bilag XII Bilag XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Forordning (EF) nr. 2571/97	Saltet smør	Mælkefedt Vand Salt Røbestoffer: — sterol — vanillin — ethylester af karotinsyre — triglycerider af heptansyre	Min. 80 % Maks. 16 % Maks. 2 %	Bilag XI Bilag IX IDF-standard 12B:1988 Bilag XIV Bilag XII Bilag XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Forordning (EF) nr. 2571/97	Koncentreret smør	Mælkefedt Vandindhold og FM FF PI (Maks.) Fremmed fedtstof Smag Lugt Andet Røbestoffer: — sterol — vanillin — ethylester af karotinsyre — triglycerider af heptansyre	Min. 99,8 % Maks. 0,2 % Maks. 0,35 % (oliesyre) 0,5 mekv ilt/1 000 g fedtstof Ingen Ren Ingen fremmed lugt Ingen neutraliseringsmidler, iltnings- hæmmende midler og konserve- ringsmidler	IDF-standard 24:1964 IDF-standard 23A:1988 (vandind- hold) IDF-standard 24:1964 (FM) IDF-standard 6B:1989 IDF-standard 74A:1991 (engelsk udgave) Bilag XXV Bilag XIV Bilag XII Bilag XIII IUPAC 2.301 sub 5	Bemærkning 1

Kommissionens forordning	Produkt	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
Forordning (EF) nr. 2571/97	Fløde	Fedtstoffer	35 %	IDF-standard 16C:1987	
		Røbestoffer: — sterol — vanillin — ethylester af karotinsyre — triglycerider af heptansyre		Metoder, der er godkendt af myndighederne Bilag XII Metoder, der er godkendt af myndighederne IUPAC 2.301 sub 5	Bemærkning 2 Bemærkning 2
Forordning (EF) nr. 429/90 (EFT L 45 af 21.2.1990, s. 8)	Koncentreret smør	Mælkefedt	Min. 96 %	Metoder, der er godkendt af myndighederne	Bemærkning 2
		FT	Maks. 2 %	Metoder, der er godkendt af myndighederne	Bemærkning 2
		Røbestoffer:			
		— stigmasterol (95 %)	15 g/100 kg koncentreret smør	Bilag XIV	
		— stigmasterol (85 %)	17 g/100 kg koncentreret smør	Bilag XIV	
		— triglycerider af heptansyre	1,1 kg/100 kg koncentreret smør	IUPAC 2.301 sub 5	
		— ethylester af smørsyre og stigmasterol	Se bilag, punkt 1 c)	Bilag XIV Metode, der er godkendt af myndighederne (smørsyre)	Bemærkning 2
		— Lecithin (E322)	Maks. 0,5 %	Metode, der er godkendt af myndighederne	Bemærkning 2
		Natriumchlorid	Maks. 0,75 %	12B:1988 IDF-standard	
		FF	Maks. 0,35 % (oliesyre)	6B:1989 IDF-standard	
		PI (Maks.)	Maks. 0,5 mekv ilt/1 000 g fedtstof	74A:1991 (engelsk udgave)	Bemærkning 1
		Smag	Ren		
		Lugt	Ingen fremmed lugt		
		Andet	Ingen neutraliseringsmidler, iltningshæmmende midler og konserveringsmidler		
Forordning (EØF) nr. 2191/81 (EFT L 213 af 1.8.1981, p. 20)	Usaltet smør	Mælkefedt	Min. 82 %	Bilag XI	
		Vand	Maks. 16 %	Bilag IX	

Kommissionens forordning	Produkt	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
Forordning (EØF) nr. 2191/81	Saltet smør	Mælkefedt Vand Salt	Min. 80 % Maks. 16 % Maks. 2 %	Bilag XI Bilag IX IDF-standard 12B:1988	
Artikel 9 og afsnit II i forordning (EF) nr. 1255/1999	Ost af fåre- og/eller gede-mælk	Komælk	< 1 %	Bilag XV	
Forordning (EØF) nr. 2921/90	Bilag I — Syrekasein	Vand Fedtstoffer Frie syrer	Maks. 12,00 % Maks. 1,75 % Maks. 0,30 % (mælkesyre)	IDF-standard 78C:1991 IDF 127A: 1988 IDF-standard 91:1979	
Forordning (EØF) nr. 2921/90	Bilag I — Løbekasein	Vand Fedtstoffer Aske	Maks. 12,00 % Maks. 1,00 % Min. 7,50 %	IDF-standard 78C:1991 IDF 127A:1998 IDF-standard 90:1979	
Forordning (EØF) nr. 2921/90	Bilag I — Kaseinat	Vand Mælkeproteiner Fedtstoffer og aske	Maks. 6,00 % Min. 88,00 % Maks. 6,00 %	IDF-standard 78C:1991 IDF-standard 92:1979 IDF 127A:1988 IDF-standard 89:1979 eller IDF-standard 90:1979	
Forordning (EØF) nr. 2921/90	Bilag II — Syrekasein	Vand Fedtstoffer Frie syrer SK (Maks.) Coliforme bakterier ITB (Maks.)	Maks. 10,00 % Maks. 1,50 % Maks. 0,20 % (mælkesyre) 30 000/1 g Ingen/0,1 g 5 000/1 g	IDF-standard 78C:1991 IDF 127A:1988 IDF-standard 91:1979 IDF-standard 100B:1991 Bilag XVI IDF-standard 100B:1991	Bemærkning 3 Bemærkning 3 Bemærkning 3, 4
Forordning (EØF) nr. 2921/90	Bilag II — Løbekasein	Vand Fedtstoffer Aske SK (Maks.) Coliforme bakterier ITB (Maks.)	Maks. 8,00 % Maks. 1,00 % Min. 7,50 % 30 000/1 g Ingen/0,1 g 5 000/1 g	IDF-standard 78C:1991 IDF 127A:1988 IDF-standard 90:1979 IDF-standard 100B:1991 Bilag XVI IDF-standard 100B:1991	Bemærkning 3 Bemærkning 3 Bemærkning 3, 4

Kommissionens forordning	Produkt	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
Forordning (EØF) nr. 2921/90	Bilag II — Kaseinat	Vand Mælkeproteiner Fedtstoffer og aske SK (Maks.) Coliforme bakterier ITB (Maks.)	Maks. 6,00 % Min. 88,00 % Maks. 6,00 % 30 000/1 g Ingen/0,1 g 5 000/1 g	IDF-standard 78C:1991 IDF-standard 92:1979 IDF 127A:1988 IDF 89:1979 eller IDF 90:1979 IDF-standard 100B:1991 Bilag XVI IDF-standard 100B:1991	Bemærkning 3 Bemærkning 3 Bemærkning 3, 4
Forordning (EØF) nr. 2921/90	Bilag III — Kaseinat	Vand Mælkeproteiner Fedtstoffer Lactose Aske SK (Maks.) Coliforme bakterier ITB (Maks.)	Maks. 6,00 % Min. 85,00 % Maks. 1,50 % Maks. 1,00 % Maks. 6,50 % 30 000/1 g Ingen/0,1 g 5 000/1 g	IDF-standard 78C:1991 IDF-standard 92:1979 IDF 127A:1988 IDF-standard 106:1982 IDF 89:1979 eller IDF 90:1979 IDF-standard 100B:1991 Bilag XVI IDF-standard 100B:1991	Bemærkning 3 Bemærkning 3 Bemærkning 3, 4
Forordning (EF) nr. 2799/1999 (EFT L 340 af 31.12.1999, s. 3)	Foderblandinger og skummetmælkspulver (til dyrefoder)	Vand (syret kærnemælkspulver) Proteiner Vand (Skummetmælkspulver) Fedtstoffer (Skummetmælkspulver) Løbevalle (Skummetmælkspulver) Stivelse (Skummetmælkspulver) Vand (blanding) Fedtstof (blanding) Løbevalle (blanding) Indhold af skummetmælkspulver (i det endelige produkt) Fedtstoffer (i det endelige produkt) Stivelse (i det endelige produkt) Kobber (i det endelige produkt)	Maks. 5 % 31,4 % (min. i det fedtfrie tørstof) Maks. 5 % Maks. 11 % Ingen Ingen Maks. 5 % i det fedtfrie tørstof — Ingen Min. 50 % Min. 2,5 % eller 5 % Min. 2 % 25 ppm	IDF-standard 20B:1993 IDF-standard 26A:1993 IDF-standard 9C:1987 Bilag XIX Bilag XXIII IDF-standard 26A:1993 Kommissionens direktiv 84/4/EØF (EFT L 15 af 18.1.1984, s. 28) Bilag XIX Bilag XXII Kommissionens direktiv 84/4/EØF Bilag XXII Kommissionens direktiv 78/633/EØF (EFT L 206 af 26.7.1987, s. 43)	Bemærkning 7 Bemærkning 7 Bemærkning 8 Bemærkning 9

Kommissionens forordning	Produkt	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
Forordning (EF) nr. 322/96 (EFT L 45 af 23.2.1996, s. 5)	Skummetmælkspulver (spraymetoden)	Fedtstoffer	Maks. 1,0 %	IDF-standard 9C:1987	
		Protein	31,4 % (min. i det fedtfrie tørstof)	IDF-standard 20B:1993	
		Vand	Maks. 3,5 %	IDF-standard 26A:1993	
		Syreindhold (0,1 N NaOH)	Maks. 19,5 ml	IDF-standard 86:1981	
		Laktat	Max. 150 mg/100 g	IDF-standard 69B:1987	
		Phosphat	Negativ	ISO-standard 3356:1975	
		Opløselighed	Maks. 0,5 ml ved 24 °C	IDF 129A:1988	
		Brændte partikler	Filter B Min. (15,0 mg)	ADPI:1990	
		SK	40 000/1 g	IDF-standard 100B:1991	Bemærkning 3
		Coliforme bakterier	Negativ/0,1 g	Bilag XVI	Bemærkning 3
		Kærnemælk	Negativ	Bilag XX	
		Løbevalle	Negativ	Bilag XVIII	
		Sur valle	Negativ	Metode, der er godkendt af myndighederne	Bemærkning 2
		Antimikrobielle stoffer		Bilag XXI	

DEL B

Referencemetoderne i del B anvendes ved analyse af produkter, der er omfattet af en af forordningerne i første kolonne.

Kommissionens forordning	Produkt	KN-kode	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
Forordning (EØF) nr. 2658/87 (EFT L 256 af 7.9.1987, s. 1) Forordning (EF) nr. 2414/98 (EFT L 299 af 10.11.1998, s. 7) Forordning (EF) nr. 1374/98 (EFT L 185 af 30.6.1998, s. 21) Forordning (EF) nr. 2508/97 (EFT L 345 af 16.12.1997, s. 31) Forordning (EF) nr. 174/1999 (EFT L 20 af 27.1.1999, s. 8)	Mælk og fløde, ikke koncentreret og ikke tilsat sukker eller andre sødemidler	0401	Fedtstoffer (≤ 6 %)	Grænserne svarer til de grænser, der er specificeret i beskrivelsen af KN-koden for det særlige produkt, og som eventuelt er præciseret i Kommissionens forordning (EØF) nr. 3846/87 (EFT L 366 af 24.12.1987, s. 1), del 9 i nomenklaturen over eksportrestitutioner, eller i forordning (EF) nr. 1374/98 (EFT L 185 af 30.6.1998, s. 21)	IDF-standard 1D:1996	
			Fedtstoffer (> 6 %)		IDF-standard 16C:1987	

Kommissionens forordning	Produkt	KN-kode	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
	Mælk og fløde, koncentreret eller tilsat sukker eller andre sødemidler	0402	Fedtstoffer (flydende form) Fedtstoffer (fast form) Proteiner Saccharose (normalt indhold) Saccharose (ringe indhold) Tørstof (SKM) Tørstof (IMF) Vand (mælk og flødepulver)		IDF-standard 13C:1987 IDF-standard 9C:1987 IDF-standard 20B:1993 IDF-standard 35A:1992 Metoder, der er godkendt af myndighederne IDF-standard 15B:1991 IDF-standard 21B:1987 IDF-standard 26A:1993	Bemærkning 2
	Kærnemælk, mælk og fløde, fermenteret eller syrnnet, også koncentreret, tilsat sukker eller andre sødemidler	0403	Fedtstoffer Proteiner Saccharose (normalt indhold) Saccharose (ringe indhold) Vand (syrnnet kærnemælks-palvex) Vand (sød kærnermælks-pulver) Tørstof (andre produkter)		IDF 1D:1996, IDF 9C:1987 IDF 16C:1987, IDF 22B:1987 IDF 126A:1988 IDF-standard 20B:1993 IDF-standard 35A:1992 Metoder, der er godkendt af myndighederne Bilag XXIV IDF-standard 26A:1993 Metoder, der er godkendt af myndighederne	Bemærkning 2
	Valle, også koncentreret, eller tilsat sukker eller andre sødemidler; varer bestående af naturlige mælkebestanddele	0404	Fedtstoffer Proteiner Saccharose (normalt indhold) Saccharose (ringe indhold)		IDF 9C:1987, IDF 16C:1987 IDF 22B:1987 IDF-standard 20B:1993 IDF-standard 35A:1992 Metoder, der er godkendt af myndighederne	Bemærkning 2
		0404 90	Proteiner Vand Tørstof (Koncentrerede produkter)		IDF-standard 20B:1993 IDF-standard 26A:1993 IDF-standard 15B:1991 IDF-standard 21B:1987	
	Smør og andre mælkefedtstoffer; smørbare mælkefedtprodukter	0405	Fedtstoffer (hvis = 85 %) Vand		Bilag XI Bilag IX	
		Smør	FT		Bilag X	
		Butteroil	Natriumchlorid Fedtstoffer (hvis > 99 %) Vand (hvis fedtstoffer < 99 %)		IDF-standard 12B:1988 IDF-standard 24:1964 IDF-standard 23A:1988	

Kommissionens forordning	Produkt	KN-kode	Parameter	Grænse	Referencemetode	Bemærkning
	Ost og ostemasse	0406	Fedtstoffer Tørstof Tørstof (Ricotta) Natriumchlorid Lactose		IDF-standard 5B:1986 IDF-standard 4A:1982 IDF-standard 58:1970 IDF-standard 88A:1988 IDF-standard 79B:1991	
Forordning (EØF) nr. 2658/87	Foderblandinger	2309	Lactose		Bilag XVII	

Bemærkninger til listen over EU-referencemetoder.

Bemærkning 1: Isolering af mælkefedt som beskrevet i IDF-standard 6B:1989 (beskyttelse mod lys).

Bemærkning 2: Der er ikke fastsat nogen referencemetode.

Bemærkning 3: Prøven skal tilberedes efter IDF-standard 122C:1996 eller IDF-standard 73A:1985.

Bemærkning 4: Inkubering i 48 timer ved 55 °C. Der skal træffes forholdsregler mod udtørring af dyrkningsmediet.

Bemærkning 5: % FT = % tørstof – % fedtstof.

Bemærkning 6: Smørret skal svare til den producerende stats nationale kvalitetsklasse som omhandlet i bilag V til Kommissionens forordning (EF) nr. 2771/1999.

Bemærkning 7: Kommissionens direktiv 4/84/EØF.

Bemærkning 8: Kommissionens forordning (EF) nr. 1758/94 (EFT L 183 af 19.7.1994, s. 14).

Bemærkning 9: Kommissionens direktiv 78/633/EØF.

BILAG II

(Artikel 3)

EFTERPRØVNING AF RESULTATER, DER ER OPNÅET VED RUTINEMETODER, SOM LIGGER TÆT PÅ DE GRÆNSER FOR KENDETEGNE FOR SAMMENSÆTNING OG KVALITET, DER ER SPECIFICERET I FORORDNINGERNE

Hvis m_o er en grænse for kendetegnene for sammensætning og kvalitet, der er specificeret i en forordning, er beslutningsgrænsen (L)

$$L = m_o$$

hvis $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} \leq 1$

R_{Rout} : Reproducerbarhedsgrænse for rutinemetoden

R_{Ref} : Reproducerbarhedsgrænse for referencemetoden

Hvis m_o er en øvre grænse og $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} > 1$, beregnes beslutningsgrænsen ved anvendelse af formlen:

$$L = m_o - [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

Hvis m_o under de samme betingelser er en nedre grænse, beregnes beslutningsgrænsen ved anvendelse af formlen:

$$L = m_o + [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

hvor

CrD_{95} : er kritisk differens ved anvendelse af referencemetoden, (se bilag IV).

Hvis m_o er en øvre grænse, skal et endeligt resultat, der er opnået med en rutinemetode, og som ligger over beslutningsgrænsen, erstattes af et endeligt resultat, der er opnået med referencemetoden. Dette endelige resultat skal være baseret på mindst samme antal analyser/prøver som det endelige resultat af rutinemetoden.

Hvor m_o er en nedre grænse, skal samme procedure følges for et endeligt resultat, der er opnået ved en rutinemetode, og som ligger under beslutningsgrænsen.

Bemærkning

Den ovenfor beskrevne procedure kan anvendes, hvis der ikke er påviselige matrixeffekter.

Matrixeffekter kan påvises således: For hver prøve anvendt til kalibrering bestemmes forskellen (w_i) mellem de resultater, der er opnået ved henholdsvis reference- og rutinemetoden.

Standardafvigelsen beregnet efter formlen:

$$s = \sqrt{(\sum w_i^2)/2m}$$

m : antal prøver anvendt til kalibrering

sammenlignes med det aritmetiske gennemsnit af repeterbarheds-standardafvigelsen for reference- og rutinemetoden

$$s_r = \sqrt{(s_{r(\text{ref})}^2 + s_{r(\text{rut})}^2)/2}$$

En matrixeffekt kan ikke udelukkes, hvis

$$m \bullet s^2/s_r^2 > \text{Chi}_{f,1-\alpha}^2$$

hvor

f = m (f : antal frihedsgrader)

α = fejlsandsynlighed; $\alpha = 0,05$.

I dette tilfælde er yderligere undersøgelser nødvendige, før en beslutningsgrænse kan fastsættes.

BILAG III

(Artikel 4 og 5)

a) Procedure for bestemmelse af overholdelsen af en opstillet reproducerbarhedsgrænse (kemisk analyse)

Overholdelse af reproducerbarhedsgrænsen kontrolleres ved at sammenligne laboratorieresultaterne med resultaterne i et erfarent laboratorium ⁽¹⁾, der er opnået med en identisk prøve. En dobbeltbestemmelse foretages i begge laboratorier, og resultaterne evalueres under anvendelse af formelen:

$$CrD_{95}(|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

hvor

CrD_{95} : kritisk forskel ($P = 0,95$)

$\bar{y}_1$: aritmetisk gennemsnit af to resultater, der er opnået i laboratorium 1

$\bar{y}_2$: aritmetisk gennemsnit af to resultater, der er opnået i laboratorium 2

R: reproducerbarhedsgrænse: bestemmes ved interpolation

r: repeterbarhedsgrænse; hvis præcisionen varierer med koncentrationen.

Hvis den kritiske forskel overskrides, skal der foretages et andet forsøg inden for to måneder. I tilfælde af, at reproducerbarhedsgrænsen ikke er overholdt ved dette andet forsøg, skal myndighederne tage de nødvendige skridt.

b) Procedure for opnåelse af en foreløbig reproducerbarhedsgrænse (kemisk analyse)

En foreløbig reproducerbarhedsgrænse (R_{prov}) opnås ved hjælp af følgende ligning:

$$R_{prov} = \sqrt{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

hvor

$\bar{y}_1$: gennemsnit af to resultater, der er opnået i laboratorium 1

$\bar{y}_2$: gennemsnit af to resultater, der er opnået i laboratorium 2 (se del a, i bilag III)

r: repeterbarhedsgrænse eller foreløbig repeterbarhedsgrænse.

Bemærkninger:

1. R_{prov} kan anvendes til beregning af kritiske forskelle (se bilag VI).
2. R_{prov} fastsættes til $2r$, hvis den beregnede værdi for R_{prov} er mindre end $2r$.
3. Hvis den beregnede værdi er større end $3r$ eller større end to gange den R-værdi, der fremgår af Horwitz-ligningen (*), er R_{prov} uacceptabelt høj og kan ikke anvendes til beregning af den kritiske forskel.
4. R_{prov} skal bestemmes mindst én gang om året på grundlag af resultater, der er opnået i to laboratorier (se bilag IV).
5. Gennemsnitsværdien af R_{prov} skal anvendes til beregningen af kritiske forskelle. De i punkt 2 og 3 anførte regler gælder for gennemsnitsværdien af R_{prov} .

(*) Horwitz-ligningen:

$$RSD_R(\%) = 2^{1-0,5 \log_{10} c}$$

hvor:

RSD_R : relativ standardafvigelse af reproducerbarhed

c: koncentration udtrykt som decimalbrøk (eksempel: 10 g/100 g = 0,1).

Reference:

Peeler, J.T., Horwitz, W. og Albert, R.
J. Ass. Off. Anal. Chem.
72 (5), 784-806 (1989).

⁽¹⁾ Normalt skal et erfarent laboratorium være et laboratorium, der med succes har deltaget i valideringen af prøvemethoden eller i en præstationsprøvning.

Reproducerbarhedsgrænsen (R -værdi) opnås fra RSD_R -værdien, der beregnes som følger

$$R = 0,0283 \bar{x} RSD_R$$

($\bar{x}$ = aritmetisk gennemsnit af de opnåede resultater)

Eksempler på beregnede RSD_R -værdier

Koncentration	RSD_R (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

For en koncentration af analytten på 1 g/100 g opnås:

$$R = 0,0283 * 1 * 4 = 0,11 \text{ g/100 g.}$$

BILAG IV

(Artikel 4)

EVALUERING AF ANALYSERESULTATER, DER ER OPNÅET VED ANVENDELSE AF VALIDEREDE METODER

Hvis analyseresultaterne viser, at en grænse er overskredet, beregnes det aritmetiske gennemsnit af to eller flere resultater. Følgende procedure anvendes:

1. Hvis analyseresultatet repræsenterer et enkelt resultat, skal der foretages en ny analyse på repeterbarhedsbetingelser. Hvis de to analyser ikke kan foretages på repeterbarhedsbetingelser, foretages der en ny analyse dobbelt på repeterbarhedsbetingelser, og de opnåede resultater anvendes til at vurdere, om den kritiske forskel er overholdt.
2. Den absolutte værdi af forskellen mellem det aritmetiske gennemsnit af resultater, der er opnået på repeterbarhedsbetingelser, og grænsen bestemmes. En absolut værdi for forskellen, som er større end den kritiske forskel, betyder, at den prøve, der er analyseret, ikke opfylder kravene.

Den kritiske forskel bestemmes ved hjælp af følgende formel:

$$CrD_{95}(|y - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

hvor

$\bar{y}$: aritmetisk gennemsnit af de opnåede resultater

m_0 : grænse

n : antal analyser pr. prøve

Hvis præcisionen varierer med koncentrationen, kan det være nødvendigt at bestemme r og R ved interpolation.

Normalt skal et endeligt resultat, som registreres for en prøve, vise at en grænse er overholdt.

Endelige resultater, som ligger:

- inden for intervallet m_0 og $m_0 + CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, hvis grænsen er et maksimum,
- inden for intervallet m_0 og $m_0 - CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, hvis grænsen er et minimum,

bør derfor kun forekomme undtagelsesvis.

Endelige resultater inden for de nævnte intervaller er kun acceptable, hvis de højst forekommer én gang blandt 5 prøver, der er analyseret pr. vareparti. Hvis der analyseres mindre end 5 prøver pr. vareparti, er ét resultat inden for det nævnte interval acceptabelt. Reglen om, at der kun opnås ét resultat inden for de nævnte intervaller pr. 5 analyserede prøver, skal dog overholdes, hvis varepartierne udbydes gentagne gange af en producent.

3. Hvis det endelige resultat x beregnes ved hjælp af en formel af formen $x = y_1 +/ - y_2$ (eksempel: vand + fedtfrit tørstofindhold i smør for at beregne fedtindholdet), hvor y_1 og y_2 er de endelige resultater af en enkelt type analyse, beregnes de overordnede repeterbarheds- og reproducerbarhedsgrænser r_x og R_x af de endelige resultater X således:

$$r_x = \sqrt{r_1^2 + r_2^2}$$

$$R_x = \sqrt{R_1^2 + R_2^2}$$

hvor r_1 og r_2 er repeterbarhedsgrænserne, og R_1 og R_2 er reproducerbarhedsgrænserne for henholdsvis y_1 og y_2 .

x sammenlignes med grænsen m_0 efter reglerne i punkt 1 og 2. Den kritiske forskel bestemmes efter formelen

$$CrD_{95}(|x - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

hvor x er det aritmetiske gennemsnit af de opnåede x_i -resultater.

4. Hvis det endelige resultat beregnes efter en formel af formen

$$x = \frac{y_i}{y_i}$$

(eksempel: indhold af fedtstoffer i tørstoffet i ost)

hvor y_1 og y_2 er de endelige resultater af en enkelt type analyse, kan de overordnede repeterbarheds- og reproducerbarhedsgrænser r_x og R_x beregnes således:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{s1}^2 + r_{s2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{s1}^2 + R_{s2}^2}$$

$$\mu_x = \mu_1 | \mu_2$$

μ_1 : grænse eller målværdi y_1 (eksempel: fedtstof)

μ_2 : grænse eller målværdi y_1 (eksempel: tørstof)

$$r_{s1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0.15 \quad ; \quad r_{s2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

hvor:

r_1 : repeterbarhedsgrænse y_1

r_2 : repeterbarhedsgrænse y_2

$$R_{s1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0.15 \quad ; \quad R_{s2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

hvor

R_1 : reproducerbarhedsgrænse y_1

R_2 : reproducerbarhedsgrænse y_2

Procedurene for beregning af r_x og R_x kan kun anvendes, hvis repeterbarheds- og reproducerbarhedsgrænserne (r_{s1} ; r_{s2} ; R_{s1} ; R_{s2}) er mindre end eller lig med 0,15.

x sammenlignes med grænsen μ_x efter reglerne i punkt 1 og 2. Den kritiske forskel bestemmes efter formlen

$$CrD_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

hvor $\bar{x}$ er det aritmetiske gennemsnit af x -resultaterne, der er opnået i kronologisk rækkefølge (*).

(*) NB: Hvis f.eks. resultaterne y_{11} , y_{12} , y_{21} og y_{22} er opnået, skal det aritmetiske gennemsnit af y_{11}/y_{21} og y_{12}/y_{22} beregnes.

BILAG V
INTERN KONTROL

(Artikel 5)

a) Metode for intern kvalitetskontrol (IQC) (kemisk analyse)

Definition af kontrolmateriale

Et materiale, der anvendes til IQC, underkastes den samme eller del af den samme procedure som analyserede materialer.

Et kontrolmateriale kan f.eks. være:

- et certificeret referencemateriale
- et internt referencemateriale
- et materiale, der er godkendt ved et forsøg laboratorier imellem
- et tilsat materiale.

Procedure for opbygning af IQC

Laboratoriet skal opbygge en intern kvalitetskontrol efter den procedure, der er beskrevet i IUPAC-dokumentet »Harmonized guidelines for internal quality control in analytical laboratories«⁽¹⁾.

Den interne kvalitetskontrol foretages ved, at der medtages kontrolmaterialer i analysesekvensen, eller ved gentagen analyse af den prøve, der skal undersøges. Kontrolmaterialerne skal ved deres kemiske sammensætning ligne de prøver, der skal undersøges, og have en passende stabilitet i den pågældende periode. Det skal godtgøres, at kontrolmaterialerne let kan opdeles i identiske portioner til analyse, og at deres analytkoncentration ligger inden for et passende interval.

Der skal medtages et kontrolmateriale mindst én gang i hver analyseserie, og den opnåede værdi afsættes på et kontrolkort for at observere fejl over længere tid. Herudover skal laboratoriet med mellemrum godtgøre, at det opfylder repeterbarhedsbetingelserne under analyseserien. Dette sker ved en dobbeltanalyse af kontrol- og/eller analysematerialerne. Resultaterne af disse analyser skal sammenlignes med alle offentliggjorte repeterbarhedsgrænser og eksisterende data om intern præcision.

Hvis der anvendes kontrolmaterialer, skal de værdier, der er opnået ved sammenligning mellem analyseserier indbyrdes af kontrolmaterialet, afsættes på et Shewhart-kort (ISO 8258 (1991)) med passende kontrolgrænser. Aktionsgrænserne sættes til

$$x \pm 3s_t$$

hvor s_t er den totale standardafvigelse

og advarselsgrænserne sættes til

$$x \pm 2s_t$$

Standardafvigelse i alt:

$$s_t = \sqrt{s_b^2 + s_w^2/n}$$

hvor:

- s_b : standardafvigelse mellem serier
- s_w : standardafvigelse inden for en serie
- n : antal bestemmelser.

Benyttes der ikke kontrolmaterialer (f.eks. som følge af manglende stabilitet), skal mindst et af analysematerialerne analyseres dobbelt i hver analyseserie.

De absolutte forskelle, der er opnået ved dobbeltbestemmelser inden for en analyseserie (se bilag III) afbildes grafisk. Centerlinjen er $1,128 s_w$, den nedre grænse er 0, den øvre grænse (aktionsgrænse) er $3,686 s_w$, hvor s_w er standardafvigelsen inden for en analyseserie.

Kontrolproceduren skal omfatte materialer med lave og høje niveauer, når koncentrationsintervallet er stort.

⁽¹⁾ M. Thompson and R. Wood: »Pure and Applied Chemistry« 67 (4), 649-666 (1995).

Hvis prøvematerialerne dækker et bredt interval af analytkoncentrationer, skal laboratoriet fastslå forholdet mellem præcision og koncentration. Hvis præcisionen er proportional med koncentrationen, skal den efterfølgende kontrol ske på grundlag af relativ præcision (dvs. absolut forskel som procent af middelværdien).

Analysesystemet er ikke pålideligt, når en af følgende situationer opstår:

- A. den grafisk afbildede værdi falder uden for aktionsgrænserne.
- B. den grafisk afbildede værdi og den foregående værdi falder uden for advarselsgrænserne, men inden for aktionsgrænserne
- C. ni successive værdier falder på samme side af gennemsnitslinjen i det tilfælde, hvor der anvendes kontrolmaterialer.

Laboratoriet skal i denne situation reagere ved at:

- A. ophøre med analysen i afventning af resultatet af diagnoseforsøgene og foranstaltningerne til afhjælpning af situationen, og
- B. kassere resultaterne af analyseserien og foretage en ny analyse af prøvematerialerne.

b) Procedure for udvælgelse af internt kontrolmateriale og for fastsættelse af interne præcisionsgrænser (kemisk analyse)

Data om præcision ved laboratorieforsøg opnås ved gentagen analyse af kontrolmaterialer og/eller gentagen analyse af analyseprøver.

Ved opstilling af præcisionsparametre for variationer inden for en analyseserie og mellem analyseserier med henblik på efterfølgende anvendelse til udarbejdelse af kontrolkort følger laboratorierne følgende procedure. Laboratorierne kan benytte andre procedurer, hvis de på tilfredsstillende måde kan godtgøre, at der er opnået pålidelige præcisionsdata.

1. Udvalgelse af kontrolmaterialer

Hvis det er hensigtsmæssigt for laboratoriet at anvende et kontrolmateriale, skal der først indsamles data for at opstille grænser. Der skal så vidt muligt anvendes certificerede referencematerialer (CRM). Foreslåede kontrolmaterialer skal analyseres på repeterbarhedsbetingelser i en analyseserie med passende certificerede referencematerialer med gentagen analyse og randomisering. Hvis en sådan fremgangsmåde ikke er mulig, søger laboratorierne at deltage i præstationsprøving og fastslå alment accepterede middelværdier (tilskrevne værdier), der kan opfattes som et virkeligt aftalt gennemsnit, som tilskrives en usikkerhed, som giver mening. Andre procedurer omfatter bl.a. tilskrivning af en reel værdi ud fra kendskab til opskriften eller brug af podede (spikede) kontrolmaterialer.

Hertil kommer, at hvis laboratoriet regelmæssigt foretager denne type analyse og allerede har udarbejdet en statistisk kontrol, skal alle nye kontrolmaterialer (f.eks. materialer, der er anmodet om, fordi lageret er ved at være brugt op) opnås ved en reference til analyser, som for tiden efterprøves med de eksisterende materialer.

2. Fastsættelse af grænser

Når laboratoriet har udvalgt et kontrolmateriale, fastsætter det ved hjælp af dette materiale præcisionstal i en analyseserie og mellem analyseserier indbyrdes.

Som et mindstekrav for fastsættelse af præcisionstallene i en analyseserie skal kontrolmaterialet analyseres ved en dobbeltbestemmelse 12 gange. Dobbeltbestemmelsen skal foretages på repeterbarhedsbetingelser, dvs. samme operatør, samme reagenser osv. Dobbeltbestemmelse af kontrolmaterialet skal randomiseres i en analyseserie. Hver dobbeltbestemmelse skal foretages på forskellige dage over en vis periode for at afspejle en rimelig variation mellem serierne under hensyntagen til normale variationer som f.eks. reagenser, rekalkibrering af instrumenter og i givet fald udskiftning af laboranter.

NB: Det skal bemærkes, at brugen af data, som ikke er fuldt repræsentative for variation mellem analyseserier, kan resultere i en unødvendig ny analyse som følge af for snævert satte grænser. Omvendt kan et laboratorium med for upræcise præcisionstal være ude af stand til at overholde grænserne i referencemetoderne. Det kan forventes, at dets ydeevne er ringe i forhold til andre laboratorier, det kan sammenlignes med, og det frembringer måske ikke data, som egner sig for det tilsigtede mål.

2.1. Bestemmelse af præcision i en analyseserie

2.1.1. Præcision i en analyseserie, hvor et kontrolmateriale foreligger

Resultater fra mindst 12 dobbeltbestemmelser skal allerførst underkastes Cochrans maksimumsvariantest. Dette indebærer sammenligning af kvadratet på den maksimale forskel mellem dobbeltbestemmelser

$$c = \frac{d^2 \max}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

hvor

$d_i =$ forskellen mellem dobbeltbestemmelser.

Værdien af Cochrans kriterium, C , sammenlignes med tabelværdier (ISO 5725 (1994)). Hvis en værdi kan klassificeres som suspekt eller meget afvigende, skal resultatet undersøges, for at der kan gives en forklaring, f.eks. en teknisk fejl, en edb-fejl, en fejl under gennemførelsen af analysen, en analyse af en uhensigtsmæssig prøve. Hvis forklaringen på den tekniske fejl er af en sådan art, at det viser sig umuligt at erstatte det mistænkelige resultat med et andet, skal det kasseres som virkelig afvigende. Er der suspekter eller afvigende resultater, som ikke kan forklares, beholdes de suspekter værdier som korrekte, og de statistisk afvigende værdier kasseres. Laboratoriet skal bestræbe sig på at erstatte de kasserede værdier med nye analyseresultater.

Når laboratoriet er overbevist om, at dataene ikke længere omfatter afvigende værdier, beregnes standardafvigelsen i serien s_w således:

For hvert par x_{i1} , x_{i2} af p -dobbeltbestemmelserne beregnes dels summen af dobbeltbestemmelser

$$s_i = x_{i1} + x_{i2}$$

og dels forskellen mellem dobbeltbestemmelser

$$d_i = x_{i2} - x_{i1}$$

Følgende summationsværdier beregnes:

$$A = \sum_{i=1}^p s_i$$

$$B = \sum_{i=1}^p d_i^2$$

$$C = \sum_{i=1}^p s_i^2$$

Et skøn over standardafvigelsen i en analyseserie er:

$$s_w = \sqrt{\frac{B}{2p}}$$

Den interne præcisionsgrænse er $2,8 s_w$.

Hvis der anvendes en referencemetode, sammenlignes den interne præcisionsgrænse med den offentliggjorte repeterbarhedsgrænse. Laboratoriet skal opfylde kravet i referencemetoden. Hvis dette krav ikke opfyldes, skal der foretages en undersøgelse.

De fastsatte grænser skal anses for foreløbige og kan tages op til fornyet gennemgang.

2.1.2. Præcision i en analyseserie, hvor der ikke findes et kontrolmateriale

Laboratoriet kan vælge at fastslå præcisionen i en analyseserie ved dobbeltanalyse af repræsentative prøver (mindst 12 dobbeltanalyser). Hvis det ikke er muligt at anvende kontrolmaterialer (f.eks. på grund af deres ustabilitet), skal der opnås data om dobbeltanalyser efter denne fremgangsmåde.

NB: Det forudsættes, at analyserne omfatter et relativt snævert værdiinterval, og at en enkelt værdi derfor kan anvendes for samtlige prøver. Hvis resultatudsvinget er bredere, f.eks. over en 10-potens, og præcisionen afhænger af koncentrationen, skal laboratorierne bestræbe sig på at bruge relative standardafvigelser.

Dataene bør underkastes Cochrans test som i punkt 2.1.1. Når laboratoriet er overbevist om, at dataene ikke omfatter afvigende værdier, kan standardafvigelsen i en analyseserie og den interne præcisionsgrænse beregnes som i punkt 2.1.1.

Standardafvigelsen i analyseserien, s_w , kan anvendes til at udarbejde kontrollkort (se bilag II). De opstillede grænser skal anses for foreløbige og kan tages op til fornyet gennemgang.

2.2. Bestemmelse af præcision mellem analyseserier indbyrdes

Gennemsnitsværdien ($s_1/2$) for hvert datapar beregnes, og de opnåede værdier underkastes Grubbs test (ISO 5725 (1994)). Afvisnings-/godkendelseskriterierne for afvigende eller suspekte værdier er beskrevet i punkt 2.1.1. Laboratoriet skal foretage en ny analyse efter et afvist resultat. Når laboratoriet er overbevist om, at dataene er fri for afvigende værdier, beregnes standardafvigelsen s_b mellem analyseserier indbyrdes.

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{4(p-1)} \left(C - \frac{p-1}{p} B - \frac{A^2}{p} \right)}$$

eller 0, hvis udtrykket under kvadratrodstegnet er negativt.

Den totale standardafvigelse s_t anvendes til at udarbejde kontrollkort for gennemsnittet af n bestemmelser (se bilag II). De opstillede grænser skal anses for foreløbige og kan tages op til fornyet gennemgang.

3. Revision af oprindelige grænser

Kontrolgrænser fastsat som beskrevet ovenfor skal anses for indledende skøn.

For at ajourføre grænser, som er fastsat på grundlag af en acceptabel præcision i en analyseserie (punkt 2.1.2), skal der indsamles yderligere dobbeltanalysedata om analyseprøverne. Tidsintervallet før en revision vil afhænge af analysefrekvensen. Som en vejledning skal data tages op til fornyet gennemgang, når der er opnået yderligere 10 værdier af dobbeltanalyser. Alle data skal derefter underkastes Cochrans test, og grænserne skal fastsættes på ny på grundlag af den nye værdi for standardafvigelse. Senere beslutninger om gyldigheden af kontrolgrænserne skal træffes under hensyntagen til supplerende data.

En gennemgang af de oprindelige data for præcision i en analyseserie afhænger også af analysefrekvensen. Det tilrådes, at de oprindelige antagelser om standardafvigelse og gennemsnit tages op til fornyet gennemgang, når yderligere 10 data er opnået ved analyse af kontrolmaterialet med en hyppighed på 1 analyse pr. vareparti.

Alle data skal underkastes en Grubbs test for at afsløre ekstremt afvigende værdier. Der skal foretages en ny beregning af gennemsnitsafvigelsen og standardafvigelsen på grundlag af de nye data.

Desuden skal laboratoriet på dette stadium anvende en Cusum-graf (BS S700: (1984) og ændring 5480 (1987)) for at undersøge eventuelle problemer i forbindelse med f.eks. for gamle reagenser. Hvert enkelt resultat, der falder uden for Cusum »V-figurer«, skal undersøges.

De nye grænser (gennemsnitsafvigelse og standardafvigelse) skal regelmæssigt undersøges ved hjælp af Cusum-teknikken. Ethvert tegn på, at der kan være tvivl om gyldigheden af kontrolmaterialet, skal grundigt undersøges.

4. Meddelelse af præcisionsdata

Laboratoriet sender følgende oplysninger til de nationale myndigheder:

- den anvendte metode
- standardafvigelsen i analyseserier, s_w og den interne præcisionsgrænse
- standardafvigelsen mellem analyseserier indbyrdes s_b
- den totale standardafvigelse s_t
- antallet af nødvendige analyser for at opnå præcisionsdata.

BILAG VI

(Artikel 6)

EVALUERING AF SMAGSDOMMERE OG PÅLIDELIGHEDEN AF RESULTATER I SENSORISKE ANALYSER

Følgende procedurer benyttes, hvis der gøres brug af karaktergivningsmetoder (IDF — standard 99C/1997).

a) Bestemmelse af »repetierbarhedsindeks«

Der analyseres mindst ti prøver som blinde dobbeltanalyser af en smagsdommer inden for en periode på 12 måneder. Dette vil sædvanligvis finde sted i flere omgange. Resultaterne af de forskellige produkters karakteristika evalueres ved anvendelse af følgende formel:

$$w_1 = 1 + \frac{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2}{n}$$

hvor

w_1 : repetierbarhedsindeks

x_{i1} : point for første evaluering af prøve x_i

x_{i2} : point for anden evaluering af prøve x_i

n : antal prøver

De prøver, der skal evalueres, skal afspejle et bredt kvalitetsudsnit. w_1 må ikke overstige 1,5 (fempunktsskalaer).

b) Bestemmelser af »afvigelsesindekset«

Dette indeks skal anvendes til at checke, om en smagsdommer anvender samme skala for kvalitetsvurdering som en gruppe erfarne smagsdommere. De point, som smagsdommeren har givet, sammenlignes med gennemsnittet af de point, som smagsdommerpanelet har givet.

Følgende formel anvendes for evalueringen af resultaterne:

$$D_1 = 1 + \frac{\sum [(x_{i1} - \bar{x}_{i1})^2 + (x_{i2} - \bar{x}_{i2})^2]}{2n}$$

hvor:

x_{i1} , x_{i2} : se litra a)

$\bar{x}_{i1}$, $\bar{x}_{i2}$: smagsdommerpanelets gennemsnitspoint for henholdsvis første og anden evaluering af prøven x_i

n : antal prøver (mindst 10 pr. tolv månedersperiode).

De prøver, der skal evalueres, skal afspejle et bredt kvalitetsudsnit. D_1 må ikke overstige 1,5 (fempunktsskalaer).

Medlemsstaterne giver meddelelse om alle vanskeligheder, der er opstået under anvendelsen af denne metode.

c) Sammenligning af de opnåede resultater i forskellige regioner af en medlemsstat og i forskellige medlemsstater

Der foretages i givet fald mindst én gang om året en test, som giver mulighed for at sammenligne resultaterne af de vurderinger, som smagsdommere fra forskellige regioner har foretaget. Konstateres der væsentlige forskelle, skal der træffes de nødvendige foranstaltninger for at finde årsagerne hertil og nå frem til sammenlignelige resultater.

Medlemsstaterne kan tilrettelægge tests, som giver mulighed for at sammenligne de resultater, der er opnået af deres egne smagsdommere og af smagsdommere fra nabomedlemsstater. I tilfælde af væsentlige forskelle skal der foretages en tilbundsående undersøgelse for at nå frem til sammenlignelige resultater.

Medlemsstaterne underretter Kommissionen om resultaterne af disse sammenligninger.

BILAG VII

(Artikel 6)

ORGANOLEPTISK BEDØMMELSE AF SMØR**1. Formål**

Formålet med denne metode til organoleptisk bedømmelse af smør er at give en ensartet metode, der kan benyttes i samtlige medlemsstater.

2. Definitioner

Ved *organoleptisk bedømmelse* (vurdering) forstås undersøgelse af et produkts egenskaber ved hjælp af sanseorganerne.

Ved *panel* forstås en gruppe udvalgte smørdommere, der under vurderingen arbejder uden indbyrdes kontakt og uden at påvirke hinanden.

Ved *karaktergivning* forstås et panels organoleptiske vurdering efter en talskala. Der skal benyttes en nomenklatur for fejl.

Ved *klassificering* forstås en kvalitetssortering, der sker på grundlag af karaktergivningen.

Ved *kontroldokumenter* forstås papirer, hvorpå der noteres de enkelte point for hver egenskab samt produktets endelige klasse (samme papir kan også anvendes til angivelse af kemisk sammensætning).

3. Prøvelokale

3.1. Der skal træffes forholdsregler, så smørdommerne i prøvelokalet ikke bliver påvirket af udefra kommende faktorer.

3.2. Prøvelokalet skal være frit for fremmede lugte og let at rengøre. Væggene skal have en lys farve.

3.3. Prøvelokalet og dets belysning skal være således, at de produktegenskaber, der skal bedømmes, ikke påvirkes. Lokalet skal være forsynet med passende temperaturkontrol.

4. Udvalgelse af smørbedømmere

En smørbedømmer skal være velkendt med smørprodukter og kunne foretage organoleptisk vurdering. Vedkommendes egnethed bør vurderes regelmæssigt (mindst en gang om året) af den kompetente myndighed.

5. Krav til panelet

Antallet af smørbedømmere i panelet bør være ulige og mindst tre personer. Flertallet af dem skal være medarbejdere ved den kompetente myndighed eller autoriserede personer, der ikke er ansat i mejeribruget.

Flere faktorer skal tages i betragtning inden vurderingen, for at smagsdommerne kan opnå en optimal dømmekraft:

- Smagsdommerne må ikke lide af sygdomme, der kan påvirke deres dømmekraft. Hvis sådanne sygdomme opstår, skal en anden person indlemmes i panelet.
- Smagsdommerne skal overholde tiden for deltagelse i vurderingen og afsætte tilstrækkelig tid til vurderingen.
- Smagsdommerne skal undgå at bruge stærkt duftende produkter såsom parfumer, aftershave lotioner, deodoranter og undlade at spise stærkt aromatiserede (krydrede) levnedsmidler osv.
- Smagsdommerne må hverken ryge, spise eller drikke andet end vand i den sidste halve time inden vurderingen.

6. Vurdering af værdien af de enkelte egenskaber

6.1. Den organoleptiske vurdering skal omfatte følgende egenskaber: udseende, konsistens, lugt og smag.

Udseende omfatter farve, synlig renhed, mugvækst og vandets fordeling. Vandfordelingen afprøves efter IDF-standard 112A/1989.

Konsistens omfatter hårdhed og smørbarhed.

Der kan benyttes fysiske metoder til vurdering af smørrets konsistens. Kommissionen forudser fremtidig harmonisering af sådanne metoder.

Lugt og smag

En signifikant afvigelse fra den anbefalede temperatur forhindrer pålidelig vurdering af konsistens, lugt og smag. Temperaturen er af altafgørende betydning.

- 6.2. Egenskaberne skal vurderes organoleptisk hver for sig. Der gives karakterer efter tabel 1.
- 6.3. Det kan være ønskværdigt, at smørbedømmerne, inden de begynder vurderingen, sammen giver karakterer for en eller flere referenceprøver med hensyn til udseende, konsistens samt lugt og smag, så der bliver vurderet ensartet.
- 6.4. Karaktererne for, at produktet kan godkendes, er som følger:

	Maksimum	Krævet
Udseende	5	4
Konsistens	5	4
Lugt og smag	5	4

Hvis den krævede karakter ikke opnås, skal fejlen beskrives. De karakterer, den enkelte smørbedømmer giver for hver egenskab, skal optegnes i kontroldokumentet. Produktet godkendes eller afvises på grundlag af en flertalsbeslutning. Der bør ikke ofte forekomme tilfælde (ikke mere end ét pr. 20 prøver), hvor de enkelte smørbedømmeres karakter for hver egenskab giver en forskel på over et point. Hvis det sker, må panellederen kontrollere, om panelet er kompetent.

7. Tilsyn

Lederen af et panel, som skal være en medarbejder ved den kompetente myndighed og kan være medlem af panelet, skal være generelt ansvarlig for hele vurderingen. Vedkommende skal optegne de enkelte smørbedømmeres karakter for hver egenskab i kontroldokumentet og attestere, om produktet er godkendt eller afvist.

8. Udtagning og forberedelse af prøver

- 8.1. — Det er ønskværdigt, at prøvernes identitet er skjult under vurderingen, så enhver form for eventuel partiskhed undgås.
— Panellederen bør arrangere dette inden vurderingen i de øvrige panelmedlemmers fravær.
- 8.2. Når den organoleptiske vurdering foretages på frysehus, udtages prøven med en smørstikker. Hvis den organoleptiske vurdering finder sted på et andet sted end i frysehuset, skal der udtages en prøve på mindst 500 g.
- 8.3. Under vurderingen bør smørret have en temperatur på 10-12 °C. Større afvigelser bør for enhver pris undgås.

9. Nomenklatur

Jf. vedlagte tabel 2.

Tabel 1: Bedømmelsesskema for smør

Udseende			Konsistens			Smag og aroma		
Point	Nr. ⁽¹⁾	Bemærkninger	Point	Nr. ⁽¹⁾	Bemærkninger	Point	Nr. ⁽¹⁾	Bemærkninger
5		Meget tilfredsstillende Ideal type Højeste kvalitet (ensartet, tør)	5		Meget tilfredsstillende Ideal type Højeste kvalitet (godt smørbar)	5		Meget tilfredsstillende Ideal type Højeste kvalitet (absolut ren, fineste aroma)
4		Tilfredsstillende ⁽²⁾ Ingen åbenlyse mangler	4	17 18	Tilfredsstillende ⁽²⁾ hård blød	4		Tilfredsstillende ⁽²⁾ Ingen åbenlyse mangler
3	1 2 3 4 5 6 7 8	Temmelig tilfredsstillende (mindre mangler) synlige vanddråber ikke ensartet farve, tofarvet stribet skjoldet, marmoreret pletet olieudskillelse for stærk farve porøs, åben tekstur	3	14 15 16 17 18	Temmelig tilfredsstillende (mindre mangler) skør, smuldrende dejagtig, fedtet klæbrig hård blød	3	21 22 25 27 33 34 35	Temmelig tilfredsstillende (mindre mangler) uren fremmed smag syrlig kogt smag, sveden smag fodersmag grov, bitter oversaltet
2	1 3 4 5 6 10 11 12	Utilfredsstillende (åbenlyse mangler) synlige vanddråber stribet skjoldet, marmoreret pletet olieudskillelse fremmede bestanddele muggen uopløst salt	2	14 15 16 17 18	Utilfredsstillende (åbenlyse mangler) skør, smuldrende dejagtig, fedtet klæbrig hård blød	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	Utilfredsstillende (åbenlyse mangler) uren fremmed smag gammel smag syrlig oxideret smag, metallisk smag fodersmag grov, bitter oversaltet muggen, fad, rådden kemikaliesmag
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	Særdeles utilfredsstillende (udtalte mangler) synlige vanddråber stribet skjoldet, marmoreret pletet olieudskillelse for stærk farve kornet fremmede bestanddele muggen uopløst salt	1	14 15 16 17 18	Særdeles utilfredsstillende (udtalte mangler) skør, smuldrende dejagtig, fedtet klæbrig hård blød	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	Særdeles utilfredsstillende (udtalte mangler) fremmed smag osteagtig, syrlig ostesmag syrlig gærsmag muggen smag harsk olieagtig, trannet talagtig oxideret smag, metallisk smag grov, bitter muggen, fad, rådden maltagtig kemikaliesmag

⁽¹⁾ Tabel 2.⁽²⁾ De defekter, der er nævnt under »utilfredsstillende«, må kun bestå i meget små afvigelser fra idealtypen.

Tabel 2: Nomenklatur over mangler ved smør*I. Udseende*

1. synlige vanddråber
2. ikke ensartet farve, tofarvet
3. stribet
4. skjoldet, marmoreret
5. plettet
6. olieudskillelse
7. for stærk farve
8. poret, åben tekstur
9. kornet
10. fremmede bestanddele
11. muggen
12. uopløst salt

II. Konsistens

14. skør, smuldrende
15. dejagtig, fedtet
16. klæbrig
17. hård
18. blød

III. Smag og aroma

20. uden smag
21. uren ⁽¹⁾
22. fremmed smag
23. gammel smag
24. osteagtig, syrlig ostesmag
25. syrlig
26. gærsmag
27. a) kogt smag
b) sveden smag
28. muggen smag
29. harsk
30. olieagtig, tranget
31. talagtig
32. a) oxideret smag
b) metallisk smag
33. fodersmag
34. grov, bitter
35. oversaltet
36. muggen, fad, rådden
37. maltagtig
38. kemikaliesmag

⁽¹⁾ Denne benævnelse bør bruges så sjældent som muligt og kun, når manglen ikke kan beskrives mere præcist.

BILAG VIII

(Artikel 7)

PROCEDURE, SOM SKAL FØLGES, NÅR RESULTATERNE AF EN ANALYSE BESTRIDES (KEMISK ANALYSE)

1. Der foretages en yderligere analyse efter anmodning fra den erhvervsdrivende inden syv arbejdsdage efter meddelelsen af resultaterne af den første analyse, hvis forseglede dobbelte prøver af produktet er disponible og opbevares på passende måde hos de ansvarlige organer.
2. Det ansvarlige organ sender på anmodning fra den erhvervsdrivende og dennes omkostninger disse prøver til et andet laboratorium. Dette laboratorium skal være autoriseret til at udføre officielle analyser og skal have en dokumenteret kompetence for de pågældende analyser. Denne kompetence skal være dokumenteret ved en tilfredsstillende deltagelse i ringtest, præstationsprøvninger eller sammenligninger laboratorier imellem. Det andet laboratorium skal anvende referencemetoden. De opnåede resultater i de to laboratorier evalueres således:

a) *Begge laboratorier opfylder repeterbarhedskravet og reproducerbarhedskravet*

Det aritmetiske gennemsnit af prøveresultaterne fra begge laboratorier meddeles som det endelige resultat. Det endelige resultat evalueres ud fra den kritiske forskel og under anvendelse af følgende formel:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_o|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

hvor

$\bar{y}$: aritmetisk gennemsnit af alle resultater, som begge laboratorier har opnået

m_o : grænse

R: reproducerbarhed

r: repeterbarhed

n_1 : antal resultater, som laboratorium 1 har opnået

n_2 : antal resultater, som laboratorium 2 har opnået.

NB: Hvis det endelige resultat beregnes efter formelen

$$x = y_1 \pm y_2 \text{ eller } x = y_1/y_2$$

(se henholdsvis bilag IV, nr. 3 og 4), erstattes R^2 og r^2 med R_x^2 og r_x^2 i formelen.

b) *Begge laboratorier opfylder repeterbarhedskravet, men ikke reproducerbarhedskravet*

Hvis den anden analyse bekræfter den første analyse, afvises den analyserede mængde som ikke værende i overensstemmelse med kravene. I modsat fald accepteres mængden.

c) *Kun et enkelt laboratorium opfylder repeterbarhedskravet*

Det endelige resultat fra det laboratorium, som opfylder repeterbarhedskravet, anvendes til at træffe beslutning om, hvorvidt den analyserede mængde kan accepteres.

d) *Ingen af laboratorierne opfylder repeterbarhedskravet, men opfylder reproducerbarhedskravet*

Litra a) anvendes.

e) *Ingen af laboratorierne opfylder hverken repeterbarhedskravet eller reproducerbarhedskravet*

Den analyserede mængde accepteres, hvis et laboratoriums resultater fører til denne konklusion.

f) *Resultaterne er opnået ved ikke-validerede metoder*

Den analyserede mængde accepteres, hvis et laboratoriums resultater fører til denne konklusion.

3. Myndighederne meddeler den erhvervsdrivende resultaterne af den anden analyse hurtigst muligt. Omkostningerne ved den anden analyse påhviler den erhvervsdrivende, hvis den analyserede mængde afvises.
4. Inden fem arbejdsdage efter prøveudtagningen skal prøveudtagningen om muligt gentages, hvis den erhvervsdrivende godtgør, at prøveudtagningsproceduren ikke var korrekt. Er en ny prøveudtagning ikke mulig, accepteres den analyserede mængde.

BILAG IX

(Artikel 8)

BESTEMMELSE AF VANDINDHOLDET I SMØR**1. Formål og anvendelsesområde**

Denne referencemetode anvendes til bestemmelse af vandindholdet i smør.

2. Reference

IDF-standard 50 C: 1995. Mælk og mejeriprodukter — prøveudtagningsmetoder.

3. Definition

Vandindholdet i smør: Massetabet efter afslutning af den i denne standard specificerede opvarmning. Det angives i g pr. 100 g.

4. Princip

Fordampning af vandet i en prøveportion med tilsat pimpsten ved 102 °C i en tørreovn.

5. Apparatur og materialer

Sædvanligt laboratorieapparatur, især følgende:

- 5.1. Analysevægt, nøjagtighed 1 mg
- 5.2. Ekssikkator med effektivt tørremiddel (f.eks. frisktørret silicagel med indikator for vandindhold)
- 5.3. Tørreovn, ventileret, termostattyret, hvor der er en temperatur på 102 ± 2 °C i hele ovnrummet
- 5.4. Skåle af glas, porcelæn eller korrosionsbestandigt metal, højde ca. 20 mm, diameter 60-80 mm
- 5.5. Pimpsten, granuleret, vasket, med diameter 0,8-10 mm.

6. Prøveudtagning

Se IDF 50 C: 1995.

7. Fremgangsmåde**7.1. Forberedelse af analyseprøven**

Laboratorieprøven opvarmes i den lukkede beholder af glas eller egnet plast, som skal være mellem halvt og to tredjedele fuld, så meget, at prøven er blød nok til let at kunne blandes til en homogen masse (mekanisk eller manuel rystning). Temperaturen bør normalt ikke overstige 35 °C. Prøven afkøles til rumtemperatur. Snarest muligt efter afkøling åbnes beholderen, og indholdet omrøres hurtigt (i højst 10 s) med en egnet indretning, f.eks. en ske eller en spatel, inden vejning.

7.2. Bestemmelse af vandindholdet

7.2.1. Der anbringes ca. 10 g pimpsten i skålen (5.4).

7.2.2. Skålen med pimpstenene tørres i ovnen (5.3) ved 102 ± 2 °C i mindst 1 time.

Bemærk: Tørretiderne i punkt 7.2.2, 7.2.5 og 7.2.7 regnes fra det tidspunkt, hvor ovntemperaturen er 102 ± 2 °C.

7.2.3. Skålen henstilles i ekssikkator (5.2) til afkøling til temperaturen i vejerummet, hvorefter den vejes med en nøjagtighed på 1 mg.

- 7.2.4. Med en nøjagtighed på 1 mg afvejes en analyseprøve på ca. 5 g i skålen.
- 7.2.5. Skålen anbringes i ovnen ved 102 ± 2 °C, hvor den henstår i 3 timer.
- 7.2.6. Skålen henstilles i eksikator til afkøling til temperaturen i vejerummet, hvorefter den vejes med en nøjagtighed på 1 mg.
- 7.2.7. Tørreprocessen gentages med yderligere 1 time i ovnen, afkøling og vejning som anført i punkt 7.2.6, indtil massen er konstant (masseændring højst 1 mg).

Skulle der forekomme en masseforøgelse, benyttes den laveste masse til beregningerne.

8. Angivelse af resultaterne

8.1. Beregningsmåde og formel

Vandindholdet W beregnes i masseprocent efter følgende formel:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

hvor

m_0 er massen i g af skål med pimpsten (7.2.3)

m_1 er massen i g af skål med pimpsten og analyseprøve inden tørring (7.2.4)

m_2 er massen i g af skål med pimpsten og analyseprøve efter tørring (7.2.7).

Resultatet angives med en decimal.

8.2. Repeterbarhed

Den absolutte forskel mellem resultaterne af to enkeltbestemmelser, udført samtidig eller lige efter hinanden af samme person under samme forhold på identisk prøvemateriale, må ikke være større end 0,2 %.

8.3. Reproducerbarhed

Den absolutte forskel mellem resultaterne af to uafhængige enkeltbestemmelser, udført af to forskellige personer i forskellige laboratorier på identisk prøvemateriale, må ikke være større end 0,3 %.

9. Prøverapport

I prøverapporten skal være angivet den anvendte metode og de fundne resultater. Der skal ligeledes være anført alle forsøgsbetingelser, der ikke er specificeret i denne internationale standard, eller som anses for valgfrie, samt en detaljeret beskrivelse af alle forhold, der kan have indvirket på resultatet. Prøverapporten skal indeholde alle de oplysninger, der er nødvendige for fuldstændig identifikation af prøven.

BILAG X

(Artikel 8)

SMØR: BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF FEDTFRIT TØRSTOF**1. Formål og anvendelsesområde**

Denne referencemetode anvendes til bestemmelse af indholdet af fedtfrit tørstof i smør.

2. Reference

IDF-standard 50 C: 1995. Mælk og mejeriprodukter — prøveudtagningsmetoder.

3. Definitioner

Indhold af fedtfrit tørstof i smør: Masseprocenten af stoffer, som bestemmes efter den specificerede metode. Det angives i g pr. 100 g.

4. Princip

Fordampning af vandet fra en kendt smørmasse, ekstraktion af fedtstofferne med petroleumsether og vejning af remanensen.

5. Reagens

Petroleumsether med kogepunkt mellem 30 °C og 60 °C. Efter fordampning af 100 ml af reagentet må der højst efterlades en remanens på 1 mg.

6. Apparatur og materialer

- 6.1. Analysevægt, nøjagtighed 1 mg
- 6.2. Ekssikkator med effektivt tørremiddel (f.eks. frisktørret silicagel med indikator for vandindhold)
- 6.3. Tørreovn, ventileret, termostatstyret, hvor der er en temperatur på 102 ± 2 °C i hele ovnrummet
- 6.4. Skåle af glas, porcelæn eller korrosionsbestandigt metal, med tud i en højde af ca. 20 mm, diameter 60-80 mm, med glasstav
- 6.5. Filterdigel af sintret glas, porediameter 16-40 µm, med sugokolbe.

7. Prøveudtagning

Se IDF-standard 50 C: 1995.

8. Fremgangsmåde**8.1. Forberedelse af analyseprøven**

Laboratorieprøven opvarmes i den lukkede beholder af glas eller egnet plast, som skal være mellem halvt og to tredjedele fuld, så meget, at prøven er blød nok til let at kunne blandes til en homogen masse (mekanisk eller manuel rystning). Temperaturen bør normalt ikke overstige 35 °C. Prøven afkøles til rumtemperatur. Snarest muligt efter afkøling åbnes beholderen, og indholdet omrøres hurtigt (i højst 10 s.) med en egnet indretning, f.eks. en ske eller en spatel, inden vejning.

8.2. Bestemmelse

- 8.2.1. Skålen med glasstaven (6.4) og diglen (6.5) tørres i ovnen (6.3) i 1 time. Genstandene henstilles til afkøling i ekssikkator til afkøling, hvorefter de vejes sammen (dvs. skål, glasstav og digel) med en nøjagtighed på 1 mg (m_0).

Bemærk: — En afkølingstid på 45 min. er i reglen tilstrækkeligt.

— Det er vigtigt, at der benyttes samme kombination af skål, glasstav og digel for hver prøveportion, hvis der analyseres mere end én prøveportion ad gangen.

- 8.2.2. Digelen fjernes, og den samlede vægt af skål og glasstav registreres med en nøjagtighed på 1 mg (m_1).

- 8.2.3. Med en nøjagtighed på 1 mg afvejes en prøveportion på ca. 5 g af analyseprøven i skålen (8.1) (m_2).

- 8.2.4. Skålen (med glasstav og smør) anbringes i ovnen ved 102 ± 2 °C, hvor den henstår natten over.
- 8.2.5. Skålen (8.2.3) henstilles til afkøling til rumtemperatur.
- 8.2.6. Der hældes 15 ml varm (ca. 25 °C) petroleumsether i skålen, og så meget som muligt af det fastsiddende stof i skålen løsnes med glasstaven. Opløsningsmidlet overføres til digelen, og der filtreres ned i sugokolben.
- 8.2.7. Proceduren i punkt 8.2.6 gentages endnu 4 gange. Hvis der ikke er spor af fedtstof på skålens inderside, overføres ved sidste vask så meget som muligt af det faste stof til digelen. I modsat fald gentages proceduren i punkt 8.2.6, indtil alle spor af fedtstof er væk.
- 8.2.8. Det faste stof vaskes i digelen med 25 ml petroleumsether.
- 8.2.9. Skålen, glasstaven og digelen tørres sammen i ovnen ved 102 ± 2 °C i 30 minutter.
- 8.2.10. De henstilles til afkøling i eksikkator til rumtemperatur, hvorefter de vejes med en nøjagtighed på 1 mg.
- 8.2.11. Proceduren i punkt 8.2.9 og 8.2.10 gentages til konstant masse (masseændring højst 1 mg) for skål, stav og digel tilsammen (m_3).

9. Angivelse af resultaterne

9.1. Beregning af indhold af fedtfrit tørstof

Indholdet af fedtfrit tørstof (SNF) beregnes i masseprocent efter følgende formel:

$$\text{SNF} = \frac{m_3 - m_0}{m_2 - m_1} \times 100$$

hvor

m_0 er massen i g af den tomme skål med glasstav og digel (8.2.1)

m_1 er massen i g af den tomme skål med glasstav (8.2.2)

m_2 er massen i g af skål med glasstav og prøveportion (8.2.3)

m_3 er slutmassen i g af skål med glasstav og digel med fast remanens (8.2.11)

Resultatet angives med én decimal.

9.2. Repeterbarhed

Den absolutte forskel mellem resultaterne af to enkeltbestemmelser, udført samtidig eller lige efter hinanden af samme person under samme forhold på identisk prøvemateriale, må ikke være større end 0,1 %.

9.3. Reproducerbarhed

Den absolutte forskel mellem resultaterne af to uafhængige enkeltbestemmelser, udført af to forskellige personer i forskellige laboratorier på identisk prøvemateriale, må ikke være større end 0,2 %.

10. Prøverapport

I prøverapporten skal være angivet den anvendte metode og de fundne resultater. Der skal ligeledes være anført alle forsøgsbetingelser, der ikke er specificeret i denne internationale standard, eller som anses for valgfrie, samt en detaljeret beskrivelse af alle forhold, der kan have indvirket på resultatet. Prøverapporten skal indeholde alle de oplysninger, der er nødvendige for fuldstændig identifikation af prøven.

Bemærk:

Hvis der analyseres saltet smør, bliver det tilsatte salt bestemt som fedtfrit tørstof. For at bestemme indholdet af fedtfrit mælketørstof, må indholdet af tilsat salt trækkes fra indholdet af fedtfrit tørstof. De beregnede nøjagtighedstal for bestemmelse af fedtfrit mælketørstof er følgende:

Repeterbarhed: $r = 0,104$ %

Reproducerbarhed: $R = 0,206$ %.

Det kan konkluderes, at den opnåede nøjagtighed ved bestemmelse af fedtfrit tørstof også er tilstrækkelig for bestemmelse af fedtfrit mælketørstof.

BILAG XI

(Artikel 8)

BESTEMMELSE AF FEDTINDHOLDET I SMØR

Fedtindholdet bestemmes indirekte ud fra bestemmelse af vandindhold og indhold af fedtfrit tørstof efter henholdsvis bilag IX og X. Fedtindholdet i masseprocent er:

$$100 - (W + SNF)$$

hvor

W er vandindholdet i masseprocent

SNF er indholdet af fedtfrit tørstof i masseprocent.

De beregnede nøjagtighedstal for bestemmelse af fedtindholdet er følgende:

Reperterbarhed: $r = 0,22 \%$

Reproducerbarhed: $R = 0,36 \%$.

BILAG XII

(Artikel 9)

BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF VANILLIN I KONCENTRERET SMØR, SMØR OG FLØDE VED HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRAPHI (HPLC)**1. Formål og anvendelsesområde**

Kvantitativ bestemmelse af vanillin i smør, koncentreret smør og fløde.

2. Princip

Ekstraktion af en kendt prøvemængde ved hjælp af en blanding af isopropanol/ethanol/acetonitril (1:1:2). Udskillelse af størsteparten af fedtstoffet ved afkøling (temperatur mellem -15 og -20 °C) efterfulgt af centrifugering.

Efter fortynding med vand bestemmes vanillinindholdet ved HPLC.

3. Apparatur

Sædvanligt laboratorieapparat, herunder især følgende:

- 3.1. fryser med en arbejdstemperatur mellem -15 og -20 °C
- 3.2. injektionssprøjter (engangssprøjter) 2 ml
- 3.3. membranfiltre (porestørrelse: $0,45\text{ }\mu\text{m}$), modstandsdygtige over for en opløsning med 5 % ekstraktionsmiddel (4.4)
- 3.4. væskrokromatografisk system bestående af pumpe (flow $1,0\text{ ml/min.}$), injektionsenhed (20 μl injektion, automatisk eller manuel), UV-detektor (306 nm, fuldt udslag 0,01 absorptionsenhed), skriver eller integrator samt kolonnetermostat indstillet til 25 °C
- 3.5. analysekolonne ($250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$ indvendig diameter) pakket med LiChrospher RP 18 (Merck, $5\text{ }\mu\text{m}$) eller tilsvarende
- 3.6. beskyttelseskolonne (ca. $20\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ indvendig diameter) pakket tørt med Perisorb RP 18 ($30\text{--}40\text{ }\mu\text{m}$) eller tilsvarende.

4. Reagenser

Alle reagenser skal være af anerkendt analysekvalitet

- 4.1. Isopropanol
- 4.2. Ethanol, 96 % (v/v)
- 4.3. Acetonitril
- 4.4. Ekstraktionsopløsning

Isopropanol (4.1), ethanol (4.2) og acetonitril (4.3) blandes i forholdet 1:1:2 (v/v)

- 4.5. Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd)

- 4.5.1. Vanillin-stamopløsning (= $500\text{ }\mu\text{g/ml}$)

Ca. 50 mg ($\approx$ CM $\approx$ mg) vanillin (4.5) afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe; der tilsættes 25 ml ekstraktionsmiddel (4.4) og fyldes op med vand.

- 4.5.2. Vanillinstandardopløsning (= $10\text{ }\mu\text{g/ml}$)

Der afpipetteres 5 ml vanillinstandardopløsning (4.5.1) i en 250 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op med vand.

- 4.6. Methanol, HPLC-kvalitet
- 4.7. Iseddike
- 4.8. Vand, HPLC-kvalitet

4.9. Mobil fase til HPLC

300 ml methanol (4.6), ca. 500 ml vand (4.8) og 20,0 ml iseddike (4.7) blandes i en 1 000 ml målekolbe, og der fyldes op med vand (4.8). Blandingen filtreres gennem et filter (0,45 µm) (3.3).

5. Fremgangsmåde

5.1. Forberedelse af prøven

5.1.1. Smør

Prøven opvarmes, indtil den begynder at smelte. Lokal opvarmning til over 40 °C skal undgås. Når prøven er blevet tilstrækkeligt blød, homogeniseres den ved rystning. Der omrøres i 15 s, inden der udtages en analyseprøve. Der afvejes med en nøjagtighed på 1 mg ca. 5 g («SM» g) smør i en 100 ml målekolbe.

5.1.2. Koncentreret smør

Umiddelbart inden prøveudtagningen anbringes beholderen med koncentreret smør i en ovn ved 40-50 °C, indtil smørret er fuldstændig smeltet. Prøven blandes ved forsigtig omdrejning eller omrøring. For voldsom bevægelse med dannelse af luftbobler skal undgås. Der afvejes med en nøjagtighed på 1 mg ca. 4 g («SM» g) koncentreret smør i en 100 ml målekolbe.

5.1.3. Fløde

Prøven opvarmes i vandbad eller i inkubator ved en temperatur på 35-40 °C. Fedtstoffet fordeles ensartet ved forsigtig omdrejning og om nødvendigt ved omrøring. Prøven afkøles hurtigt (20 ± 2 °C). Prøven skal fremtræde ensartet, ellers gentages proceduren. Der afvejes med en nøjagtighed på 1 mg ca. 10 g («SM» g) fløde i en 100 ml målekolbe.

5.2. Fremstilling af prøveopløsning

Der tilsættes ca. 75 ml ekstraktionsmiddel (4.4) til prøveportionen (5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3), omrøres eller omrystes kraftigt i ca. 15 min. og fyldes op med ekstraktionsmiddel (4.4). Ca. 10 ml af dette ekstrakt overføres til et reagensglas med prop. Glasset stilles i fryseren (3.1) i ca. 30 min. Det afkølede ekstrakt centrifugeres i 5 minutter ved ca. 2 000 omdrejninger pr. minut, og der dekanteres straks. Den dekanterede opløsning henstår, til den har nået stuetemperatur. Der afpipetteres 5 ml heraf i en 100 ml målekolbe, og der fyldes op med vand. En delprøve heraf filtreres på membranfilter (3.3). Filtratet er klart til HPLC-analyse.

5.3. Størrelsessortering

Der afpipetteres 5 ml vanillinstandardopløsning (4.5.2) i en 100 ml målekolbe. Der tilsættes 5 ml ekstraktionsmiddel (4.4) og fyldes op med vand til mærket. Denne opløsning indeholder 0,5 µg vanillin pr. ml.

5.4. Bestemmelse ved HPLC

Kromatografisystemet stabiliseres i ca. 30 min. Standardopløsningen (5.3) indsprøjtes. Dette gentages, indtil forskellen i topareal eller tophøjde mellem to på hinanden følgende indsprøjtninger er mindre end 2 %. Under de beskrevne forhold har vanillin en retentionstid på ca. 9 min. Der foretages en dobbeltanalyse af standardopløsningen (5.3) med indsprøjtning af 20 µl. Der indsprøjtes 20 µl prøveopløsning (5.2). Arealet eller højden af den fremkomne vanillintop bestemmes. Efter 10 indsprøjtninger af prøveopløsninger (5.2) gentages dobbeltanalysen af standardopløsningen (5.3).

6. Beregning af resultater

Det gennemsnitlige topareal (eller tophøjde) («AC») for de vanillintoppe, der er fremkommet ved de to dobbeltanalyser før og efter hver batch af prøveopløsninger (4 toparealer eller tophøjder), beregnes.

Responsfaktoren (R) beregnes således:

$$R = AC/CM$$

hvor CM er massen af vanillin i mg (4.5.1).

Indholdet (i mg/kg) af vanillin (C) i analyseprøven beregnes ved følgende formel:

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

hvor:

AS = arealet af vanillintoppen fra analyseprøven

SM = massen af analyseprøven i g (5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3).

Når fløden analyseres for vanillin, skal koncentrationen af røbestof udtrykkes som mg røbestof/kg mælkefedt. Dette gøres ved, at man multiplicerer C med 100/f, hvor f er flødens fedtindhold i procent (m/m).

20 = en faktor, hvor der tages hensyn til fortyndingerne af standard- og analyseprøven

0,96 = korrektionsfaktoren for fedtindholdet ved første fortynding af analyseprøven.

Bemærkning: I stedet for toparealer kan der benyttes tophøjder (se punkt 8.3).

7. Metodens nøjagtighed

7.1. Repeterbarhed (r)

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, der er udført hurtigst muligt efter hinanden af samme person med samme apparatur på samme prøvemateriale, må ikke overstige 16 mg/kg.

7.2. Reproducerbarhed (R)

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, der er udført af forskellige personer i forskellige laboratorier med forskelligt apparatur på samme prøvemateriale, må ikke overstige 27 mg/kg.

8. Grænseværdier

8.1. Der skal tages tre prøver fra produktet med røbestof for at kontrollere homogeniteten.

8.2. Røbestof af vanille eller syntetisk vanillin.

8.2.1. Iblandingen af 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd er 250 g pr. t koncentreret smør eller smør. For fløde med røbestof er iblandingen 250 g pr. t smørfedt.

8.2.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier [under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})]:

- 221,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding)
- 159,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding).

Koncentrationen af røbestof i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 221,0 mg/kg og 159,0 mg/kg.

8.3. Røbestof alene fra vanilleplantens frugt eller komplette ekstrakter heraf

8.3.1. Iblandingen af 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd er 100 g pr. t koncentreret smør eller smør. For fløde med røbestof er iblandingen 100 g pr. t smørfedt.

8.3.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier [under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})]:

- 79,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding)
- 54,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding).

Koncentrationen af røbestof i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 79,0 mg/kg og 54,0 mg/kg.

9. Bemærkninger

9.1. Repeterbarheden er den værdi, som den absolutte forskel mellem to enkeltbestemmelser udført med samme metode på samme prøvemateriale under samme forhold (samme apparatur, samme laboratorium og inden for et kort tidsinterval) kan ventes at ligge under med en bestemt sandsynlighed. Når intet andet er anført, er denne sandsynlighed 95 %.

- 9.2. Reproducerbarheden R er den værdi, som den absolutte forskel mellem to resultater af enkeltanalyser udført med samme metode på samme prøvemateriale, men under forskellige forhold (forskellige laboranter, forskelligt apparatur, forskellige laboratorier og/eller på forskellige tidspunkter) kan ventes at ligge under med en bestemt sandsynlighed. Når intet andet er anført, er denne sandsynlighed 95 %.
- 9.3. Genfindingen af vanillin, der er tilsat i en mængde på 250 mg pr. kg butteroil, varierer fra 97,0 % til 103,8 %. I gennemsnit er der fundet 99,9 % med en standardafvigelse på 2,7 %.
- 9.4. Standardopløsningen indeholder 5 % ekstraktionsmiddel for at kompensere for topforbredning som følge af, at prøveopløsningerne indeholder 5 % ekstraktionsmiddel. Derved kan der foretages en kvantificering pr. tophøjde.
- 9.5. Analysen bygger på en lineær kalibreringskurve, der går gennem nulpunktet.

Med passende fortyndinger af standardopløsningen (4.5.2) bør lineariteten kontrolleres, første gang analysen udføres, og derefter regelmæssigt og efter udskiftninger eller reparationer på HPLC-udstyret.

BILAG XIII

(Artikel 9)

BESTEMMELSE AF ETHYLESTER AF β -APO-8'-CAROTENSYRE I KONCENTRERET SMØR OG SMØR VED SPEKTROMETRI**1. Anvendelsesområde**

Det er en metode til kvantitativ bestemmelse af ethylester af β -apo-8'-carotensyre (apocarotenester) i koncentreret smør og smør. Apocarotenester er summen af alle stoffer, der er til stede i et ekstrakt af prøver fremstillet på de i metoden beskrevne betingelser, og som absorberer lys ved 440 nm.

2. Princip

Smørfedt opløses i petroleumsether (light petroleum), og absorbansen måles ved 440 nm. Indholdet af apocarotenester bestemmes ved reference til en ekstern standard.

3. Apparatur

- 3.1. Fuld- eller automatpipetter på 0,25, 0,50, 0,75 og 1,0 ml.
- 3.2. Spektrofotometer, der er egnet til brug ved 440 nm (og 447-449 nm), og som er udstyret med kuvetter med en lysvej på 1 cm.
- 3.3. Målekolber, 20 ml og 100 ml.
- 3.4. Analysevægt med en nøjagtighed på 0,1 mg.

4. Reagenser

Alle reagenser skal være af anerkendt analysekvalitet.

4.1. Opslæmning af apocarotenester (ca. 20 %)**4.1.1. Opslæmningens indhold bestemmes som følger:**

Ca. 400 mg afvejes nøjagtigt ned i en 100 ml målekolbe, opløses i 20 ml chloroform (4.4) og målekolben fyldes op til mærket med cyclohexan (4.5). 5 ml af denne opløsning fortyndes til 100 ml med cyclohexan (opløsning A). 5 ml af opløsning A fortyndes til 100 ml med cyclohexan. Absorbansen måles ved 447-449 nm (maksimum måles med cyclohexan som reference i kuvetter med 1 cm lysvej).

$$\text{Indhold af apocarotenester (\%)} = \frac{A_{\text{max}} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{max} = måleopløsningens absorbans ved maksimum

A = prøvens vægt (g)

2 550 = referenceværdi A (1 %, 1 cm)

P udtrykker opslæmningens renhed (%).

Bemærkning: En opslæmning af apocarotenester er følsom for luft, varme og lys. Den kan opbevares i ca. tolv måneder i uåbnet originalbeholder (forseglet under nitrogen) på et køligt sted. Efter åbning skal indholdet anvendes inden for kort tid.

4.1.2. Standardopløsning af apocarotenester, ca. 0,2 mg/ml

0,1 g $\pm$ 0,1 mg opslæmning af apocarotenester (4.1.1) afvejes (Wg), opløses i petroleumsether (4.2) og overføres kvantitativt til en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med petroleumsether.

Denne opløsning indeholder W*P 10 mg/ml apocarotenester.

Bemærkning: Opløsningen skal opbevares på et køligt sted i mørke. Ubrugt opløsning kasseres efter en måneds forløb.

4.2. Petroleumsether (kogepunktsinterval 40-60 °C).**4.3. Vandfrit natriumsulfat, granuleret, der forud er tørret i to timer ved 102 °C.****4.4. Chloroform****4.5. Cyclohexan**

5. Procedure

5.1. Forberedelse af prøven

5.1.1. Koncentreret smør

Prøven smeltes i ovn ved ca. 45 °C.

5.1.2. Smør

Prøven smeltes i ovn ved ca. 45 °C. En repræsentativ portion filtreres gennem et filter, der indeholder ca. 10 g vandfrit natriumsulfat (4.3), afskærmet fra stærk naturlig eller kunstig belysning, bibeholdt ved en temperatur på 45 °C. En passende mængde smørfedt opsamles.

5.2. Bestemmelse

1 g ± 1 mg koncentreret smør (eller ekstraheret smørfedt (5.1.2)) (m (g)) afvejes. Det overføres kvantitativt til en 20 ml målekolbe (Vml), der fyldes op til mærket med petroleumsether (4.2), og blandes grundigt.

En delmængde overføres til en 1 cm kuvette, og absorbansen måles ved 440 nm med petroleumsether som reference. Koncentrationen af apocarotenester i opløsningen fås ud fra kalibreringskurven (C µg/ml).

5.3. Standardkurve

0, 0,25, 0,5, 0,75 og 1,0 ml standardopløsning af apocarotenester (4.1.2) pipetteres i fem 100 ml målekolber. Der fyldes op til mærket med petroleumsether (4.2) og blandes.

Opløsningernes koncentrationer går fra 0 til 2 g/ml og angives nøjagtigt ved reference til koncentrationen af standardopløsningen (4.1.2) W*P 10 mg/ml. Absorbansen måles ved 440 nm med petroleumsether (4.2) som reference.

Absorbanserne afbildes på y-aksen mod koncentrationen af apocarotenester ad x-aksen.

6. Beregning af resultater

6.1. Indholdet af apocarotenester udtrykt i mg/kg produkt angives ved:

koncentreret smør: $C \cdot V / m$

smør: $0,82 \cdot C \cdot V / m$

hvor:

C = indhold af apocarotenester i µg/ml aflæst på kalibreringskurven (5.3)

V = volumen (ml) af prøveopløsningen (5.2)

m = massen (g) af testportionen (5.2)

0,82 = korrektionsfaktor for indholdet af smørfedt i smør.

7. Metodens nøjagtighed

7.1. Repeterbarhed

7.1.1. Analyse af smør

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser foretaget med det kortest mulige interval af samme laborant, som benytter samme apparatur på identisk testmateriale, må ikke overstige 1,4 mg/kg.

7.1.2. Analyse af koncentreret smør

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser foretaget med det kortest mulige interval af samme laborant, som benytter samme apparatur på identisk testmateriale, må ikke overstige 1,6 mg/kg.

7.2. Reproducerbarhed

7.2.1. Analyse af smør

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser foretaget af laboranter på forskellige laboratorier, som benytter forskelligt apparatur på identisk testmateriale, må ikke overstige 4,7 mg/kg.

7.2.2. Analyse af koncentreret smør

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser foretaget af laboranter på forskellige laboratorier, som benytter forskelligt apparatur på identisk testmateriale, må ikke overstige 5,3 mg/kg.

7.3. Kilde til præcisionsdata

Præcisionsdataene blev fastlagt på grundlag af et forsøg i 1995, der omfattede elleve laboratorier og tolv prøver af smør med røbestof (seks blinde dubletter) og tolv prøver af koncentreret smør med røbestof (seks blinde dubletter).

8. Grænseværdier

8.1. Der udtages tre prøver af produktet med røbestof for at kontrollere, om iblandingen af røbestof i produktet er korrekt.

8.2. Smør

8.2.1. Under hensyntagen til baggrundsabsorbansen er iblandingen for smør 22 mg/kg.

8.2.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})):

- 18,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding)
- 13,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding).

Koncentrationen af røbestoffet i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 18,0 mg/kg og 13,0 mg/kg.

8.3. Koncentreret smør

8.3.1. Under hensyntagen til baggrundsabsorbansen er iblandingen for koncentreret smør 24 mg/kg.

8.3.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})):

- 20,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding)
- 14,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding).

Koncentrationen af røbestoffet i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 20,0 mg/kg og 14,0 mg/kg.

BILAG XIV

(Artikel 9)

BESTEMMELSE AF SITOSTEROL OG STIGMASTEROL I KONCENTRERET SMØR OG SMØR VED GASKROMATOGRAFI I KAPILLARKOLONNE**1. Formål og anvendelsesområde**

Metoden består i en procedure til kvantitativ bestemmelse af sitosterol og stigmasterol i koncentreret smør og smør. Ved sitosterol forstås summen af β -sitosterol og 22-dihydro- β -sitosterol, da de andre sitosteroler anses for at være uden større betydning.

2. Princip

Det koncentrerede smør og smørret forsæbes med kaliumhydroxid i en ethanolopløsning og uforsæbelige bestanddele ekstraheres med diethylether.

Sterolerne omdannes til trimethylsilylethere og analyseres ved gaskromatografi i en kapillarkolonne med betulin som intern standard.

3. Apparat

- 3.1. En 150 ml kolbe til forsøbning med tilbagesvaler med glasslib.
- 3.2. 500 ml skilletragte.
- 3.3. 250 ml kolber.
- 3.4. Trykudligningstragte, 250 ml eller tilsvarende, til opsamling af fordampet diethylether.
- 3.5. Glaskolonne, 350 mm $\times$ 20 mm, med sintret glasskive.
- 3.6. Vandbad eller varmekappe.
- 3.7. Prøveglas, 2 ml.
- 3.8. Gaskromatograf (med splitningssystem), som egner sig til brug med kapillarkolonne, og som består af:
 - 3.8.1. en termostattyret kolonneovn, som kan opretholde den ønskede temperatur inden for $\pm 1^\circ\text{C}$
 - 3.8.2. injektionsblok med temperaturindstilling
 - 3.8.3. flammeioniseringsdetektor og konverter/forstærker
 - 3.8.4. skriver med integrator, som kan anvendes sammen med konverteren/forstærkeren (3.8.3).
- 3.9. Kapillarkolonne i kvartsglas, coated med BP1 eller tilsvarende i en ensartet lagtykkelse på 0,25 μm . Kolonnen skal kunne adskille trimethylsilylderivater af lanosterol og sitosterol. En BP1-kolonne på 12 m med 0,2 mm indre diameter er velegnet.
- 3.10. Mikrosprøjte på 1 μl med hærdet nål til gaskromatografi.

4. Reagenser

Alle reagenser skal være analyserene. Vand skal være destilleret eller af mindst tilsvarende renhedsgrad.

- 4.1. Ethanol, mindst 95 %.
- 4.2. Kaliumhydroxid, 60 %: 600 g kaliumhydroxid (minimum 85 %) opløses i vand og fortyndes til 1 liter med vand.
- 4.3. Betulin, mindst 99 % renhed.
 - 4.3.1. Betulinopløsninger i diethylether (4.4).
 - 4.3.1.1. Betulinopløsningen til bestemmelse af sitosterol skal være af en koncentration på 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. Betulinopløsningen til bestemmelse af stigmasterol skal være af en koncentration på 0,4 mg/ml.

- 4.4. Analytisk ren diethylether (fri for peroxider og rester).
- 4.5. Natriumsulfat, vandfrit, granuleret og forinden tørret ved 102 °C i to timer.
- 4.6. Silyleringsreagens, f.eks. TRI-SIL (kan fås fra Pierce Chemical Co., katalognummer 49001) eller tilsvarende (NB: le TRI-SIL er brændfarligt og giftigt, ætsende og kan være kræftfremkaldende. Laboratoriepersonalet skal have kendskab til sikkerhedsbestemmelserne for TRI-SIL og handle derefter).
- 4.7. Lanosterol.
- 4.8. Sitosterol af en kendt renhedsgrad på ikke under 90 % (P).

Bemærkning 1: Renhedsgraden af standardmaterialer, som anvendes til kalibrering, fastsættes efter standardiseringsmetoden. Det forudsættes, at samtlige steroler, som findes i prøven, kommer til udtryk på kromatogrammet, at toppenes samlede areal repræsenterer 100 % af sterolindholdet og at sterolerne fremkalder samme detektorrespons. Systemets linearitet skal kontrolleres for de aktuelle koncentrationsniveauer.

- 4.8.1. Sitosterolstandardopløsning: Der fremstilles en opløsning af sitosterol (4.8) i diethylether (4.4), der indeholder ca. 0,5 mg/ml, (med en nøjagtighed på 0,001 mg/ml) (W_1).
- 4.9. Stigmasterol af en kendt renhedsgrad på ikke under 90 % (P).
- 4.9.1. Stigmasterolstandardopløsning: Der fremstilles en opløsning af stigmasterol (4.9) i diethylether (4.4), der indeholder ca. 0,2 mg/ml, (med en nøjagtighed på 0,001 mg/ml) (W_1).
- 4.10. Opløsning til kontrol af adskillelsesevne. Der fremstilles en opløsning af 0,05 mg lanosterol (4.7) og 0,5 mg sitosterol (4.8) pr. ml diethylether (4.4).

5. Fremgangsmåde

- 5.1. Tilberedelse af standardopløsninger til kromatografi: den interne standardopløsning (4.3.1) tilsættes til den pågældende sterolstandardopløsning samtidig med tilsætning til den forsæbede prøve (se 5.2.2).
- 5.1.1. Standardkromatografiopløsning for sitosterol: Der overføres 1 ml sitosterolstandardopløsning (4.8.1) til hvert af to prøveglas (3.7), og diethyletheren afdampes med nitrogen. Der tilsættes 1 ml intern standardopløsning (4.3.1.1), og diethyletheren afdampes med nitrogen.
- 5.1.2. Standardkromatografiopløsning for stigmasterol: Der overføres 1 ml sitosterolstandardopløsning (4.9.1) til hvert af to prøveglas (3.7), og diethyletheren afdampes med nitrogen. Der tilsættes 1 ml intern standardopløsning (4.3.1.2), og diethyletheren afdampes med nitrogen.

5.2. Tilberedning af uforsæbelige bestanddele

- 5.2.1. Smørprøven smeltes ved opvarmning til højst 35 °C. Den blandes omhyggeligt ved omrøring.

Der afvejes 1 g smør (W_2) eller koncentreret smør (W_2), med 1 mg nøjagtighed, i en 150 ml kolbe (3.1). Der tilsættes 50 ml ethanol (4.1) og 10 ml kaliumhydroxidopløsning (4.2). Tilbagesvaleren påsættes, og kolben opvarmes til ca. 75 °C i 30 minutter. Svaleren tages af, og kolben afkøles til rumtemperatur.

- 5.2.2. Der tilsættes 1,0 ml intern standardopløsning til kolben (4.3.1.1, hvis indholdet af sitosterol skal bestemmes, eller 4.3.1.2, hvis indholdet af stigmasterol skal bestemmes). Opløsningen blandes omhyggeligt. Kolbens indhold overføres kvantitativt til en 500 ml skilletragt (3.2). Kolben skylles med 50 ml vand og dernæst med 250 ml diethylether (4.4). Skilletragten rystes kraftigt i to minutter, hvorefter man lader faserne adskilles. Det nedre vandige lag tappes af, og etherlaget vaskes ved at ryste kolben med fire hold vand á 100 ml.

Bemærkning 2: For at undgå emulsionsdannelse skal de første to skylninger med vand foretages forsigtigt (kolben vendes ti gange). Ved tredje skylning kan der rystes kraftigt i 30 sekunder. En eventuel emulsion kan brydes ved at tilsætte 5 til 10 ml ethanol. Hvis der tilsættes ethanol, skal der foretages yderligere to grundige skylninger med vand.

- 5.2.3. Det klare, sæbefrie etherlag ledes igennem en glaskolonne (3.5), som indeholder 30 g vandfri natriumsulfat (4.5). Etheren opsamles i en 250 ml kolbe (3.3). Der tilsættes en kogesten, og etheren afdampes til næsten tørhed i vandbad eller varmekappe, mens overskydende opløsningsmiddel omhyggeligt opsamles.

Bemærkning 3: Hvis prøveekstrakter inddampes til fuldstændig tørhed ved for høj temperatur, kan der ske tab af sterol.

5.3. Forberedelse af trimethylsilylethere

- 5.3.1. Den resterende etheropløsning i kolben hældes i et 2 ml prøveglas (3.7) med 2 ml diethylether, og etheren afdampes med nitrogen. Kolben skylles med yderligere to hold diethylether á 2 ml og indholdet hældes hver gang over i prøveglasset, og etheren afdampes med nitrogen hver gang.
- 5.3.2. Prøven silyleres ved tilsætning af 1 ml TRI-SIL (4.6). Prøveglasset lukkes og rystes kraftigt for at opløse prøven. Hvis prøven stadig ikke er fuldstændigt opløst, opvarmes den til 65-70 °C. Prøven henstår i mindst fem minutter, inden den indsprøjtes i gaskromatografen. Standardopløsningerne silyleres på samme måde som prøverne. Opløsningen til kontrol af adskillelsesevnen (4.10) silyleres på samme måde.

Bemærkning 4: Silylering skal foretages i vandfrit miljø. Ved ufuldstændig silylering ses en top tæt ved betulintoppen.

Ethanol kan give interferens ved silylering. Dette kan skyldes utilstrækkelig vaskning ved ekstraktionen. Hvis dette problem forekommer, kan der foretages en femte skylning med kraftig rystning i 30 sekunder ved ekstraktionen.

5.4. Gaskromatografisk analyse

5.4.1. Valg af kromatografibetingelser.

Gaskromatografen indstilles som angivet i betjeningsvejledningen.

De vejledende kromatografibetingelser er som følger:

- søjletemperatur: 265 °C
- injektorblokkens temperatur: 280 °C
- detektorens temperatur: 300 °C
- bæregassens gennemstrømningshastighed: 0,6 ml/minut
- hydrogentryk: 84 kPa
- lufttryk: 155 kPa
- splitningssystemet indstilles til mellem 10:1 og 50:1 og optimeres i henhold til betjeningsvejledningen, hvorefter detektorresponsens linearitet kontrolleres inden for det aktuelle koncentrationsområde.

Bemærkning 5: Det er særlig vigtigt, at injektionsblokkens belægning rengøres regelmæssigt.

- indsprøjet mængde: 1 µl trimethylsilyletheropløsning.

Systemet skal være i ligevægt og grundlinjen stabil, inden analysen påbegyndes.

Disse betingelser kan fraviges, hvis særlige forhold ved kolonnen og gaskromatografen gør det nødvendigt for at opnå kromatogrammer, som opfylder følgende krav:

- sitosteroltoppen skal være tydeligt adskilt fra lanosteroltoppen. I figur 1 ses, hvordan et kromatogram af en silyleret opløsning til kontrol af adskillelsesevnen (4.10) typisk skal se ud
- den relative retentionstid for følgende steroler skal være ca.:
 - kolesterol: 1,0
 - stigmasterol: 1,3
 - sitosterol: 1,5
 - betulin: 2,5
- retentionstiden for betulin skal være ca. 24 minutter.

5.4.2. Analyseprocedure

Der indsprøjtes 1 µl silyleret standardopløsning (stigmasterol eller sitosterol), og integratorens kalibreringsparametre indstilles.

Herefter indsprøjtes yderligere 1 µl silyleret standardopløsning for at bestemme responsfaktorerne for betulin.

Der indsprøjtes 1 µl silyleret prøveopløsning, og toppene aflæses. Hver kromatografisk serie skal begyndes med og efterfølges af indsprøjtning af standardopløsninger.

Som hovedregel kan der indsprøjtes seks prøver i hver serie.

Bemærkning 6: Integration af stigmasteroltoppen skal også omfatte en evt. hale som afgrænset af punkt 1, 2 og 3 i figur 2b.

Integration af sitosteroltoppen skal også omfatte toppen for 22-dihydro- β -sitosterol (stigmastanol), som eluerer umiddelbart efter sitosterol (figur 3b), når den samlede mængde sitosterol bestemmes.

6. Beregning af resultater

- 6.1. Arealet af steroltoppe og betulintoppe i begge referencekromatogrammer omkring en serie bestemmes, og R_1 beregnes således:

$$R_1 = \frac{\text{gennemsnitsarealet af steroltoppen i standardopløsningen}}{\text{gennemsnitsarealet af betulintoppen i standardopløsningen}}$$

Arealet af steroltoppen (stigmasterol og sitosterol) og betulintoppen i prøven bestemmes, og R_2 beregnes således:

$$R_2 = \frac{\text{arealet af steroltoppen i prøven}}{\text{arealet af betulintoppen i prøven}}$$

W_1 = sterolindhold (i mg) i 1 ml standardopløsning (4.8.1 eller 4.9.1)

W_2 = prøvens vægt i g (5.2.1)

P = sterolstandardens renhedsgrad (4.8 eller 4.9)

$$\text{Sterolindhold i prøven (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

7. Metodens præcision

- 7.1. Smør

- 7.1.1. Repeterbarhed

- 7.1.1.1. Stigmasterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages umiddelbart efter hinanden af den samme person med det samme udstyr, må ikke overstige 19,3 mg/kg.

- 7.1.1.2. Sitosterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages umiddelbart efter hinanden af den samme person med det samme udstyr, må ikke overstige 23,0 mg/kg.

- 7.1.2. Reproducerbarhed

- 7.1.2.1. Stigmasterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages i forskellige laboratorier med forskelligt udstyr, må ikke overstige 31,9 mg/kg.

- 7.1.2.2. Sitosterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages i forskellige laboratorier med forskelligt udstyr, må ikke være større end 8,7 % af gennemsnittet af resultaterne.

- 7.1.3. Kilde for præcisionsdata

Præcisionsdataene er fastlagt på grundlag af et eksperiment, som i 1992 blev foretaget med otte laboratorier og seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for stigmasterol samt seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for sitosterol.

7.2. Koncentreret smør

7.2.1. Repeterbarhed

7.2.1.1. Stigmasterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages umiddelbart efter hinanden af den samme person med det samme udstyr, må ikke overstige 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages umiddelbart efter hinanden af den samme person med det samme udstyr, må ikke være større end 3,6 % af gennemsnittet af resultaterne.

7.2.2. Reproducerbarhed

7.2.2.1. Stigmasterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages i forskellige laboratorier med forskelligt udstyr, må ikke overstige 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterol

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, der foretages i forskellige laboratorier med forskelligt udstyr, må ikke være større end 8,9 % af gennemsnittet af resultaterne.

7.2.3. Kilde for præcisionsdata

Præcisionsdataene er fastlagt på grundlag af et eksperiment, som i 1991 blev foretaget med ni laboratorier og seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for stigmasterol samt seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for sitosterol.

8. Grænseværdier

8.1. Der udtages tre prøver af produktet med røbestof for at kontrollere, om produktet er tilsat røbestof på korrekt måde.

8.2. Smør

8.2.1. Stigmasterol

8.2.1.1. Der iblandes 150 g mindst 95 % ren stigmasterol pr. t smør, dvs. 142,5 mg/kg, eller 170 g mindst 85 % ren stigmasterol pr. t smør, dvs. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})):

- 116,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 95 % ren stigmasterol)
- 118,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 85 % ren stigmasterol)
- 81,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 95 % ren stigmasterol)
- 82,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 85 % ren stigmasterol).

Koncentrationen af røbestoffet i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 116,0 mg/kg og 81,0 mg/kg eller mellem 118,0 mg/kg og 82,0 mg/kg.

8.2.2. Sitosterol

8.2.2.1. Der iblandes 600 g mindst 90 % ren sitosterol pr. t smør, dvs. 540 mg/kg.

8.2.2.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})):

- 486,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 90 % ren sitosterol)
- 358,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 90 % ren sitosterol).

Koncentrationen af røbestoffet i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 486,0 mg/kg og 358,0 mg/kg.

8.3. *Koncentreret smør*

8.3.1. Stigmasterol

8.3.1.1. Der iblandes 150 g mindst 95 % ren stigmasterol pr. t koncentreret smør, dvs. 142,5 mg/kg eller 170 g mindst 85 % ren stigmasterol pr. t koncentreret smør, dvs. 144,5 mg/kg.

8.3.1.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})):

- 120,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 95 % ren stigmasterol)
- 122,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 85 % ren stigmasterol)
- 84,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 95 % ren stigmasterol)
- 86,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 85 % ren stigmasterol).

Koncentrationen af røbestoffet i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 120,0 mg/kg og 84,0 mg/kg eller mellem 122,0 mg/kg og 86,0 mg/kg.

8.3.2. Sitosterol

8.3.2.1. Der iblandes 600 g mindst 90 % ren sitosterol pr. t koncentreret smør, dvs. 540 mg/kg.

8.3.2.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD_{95})):

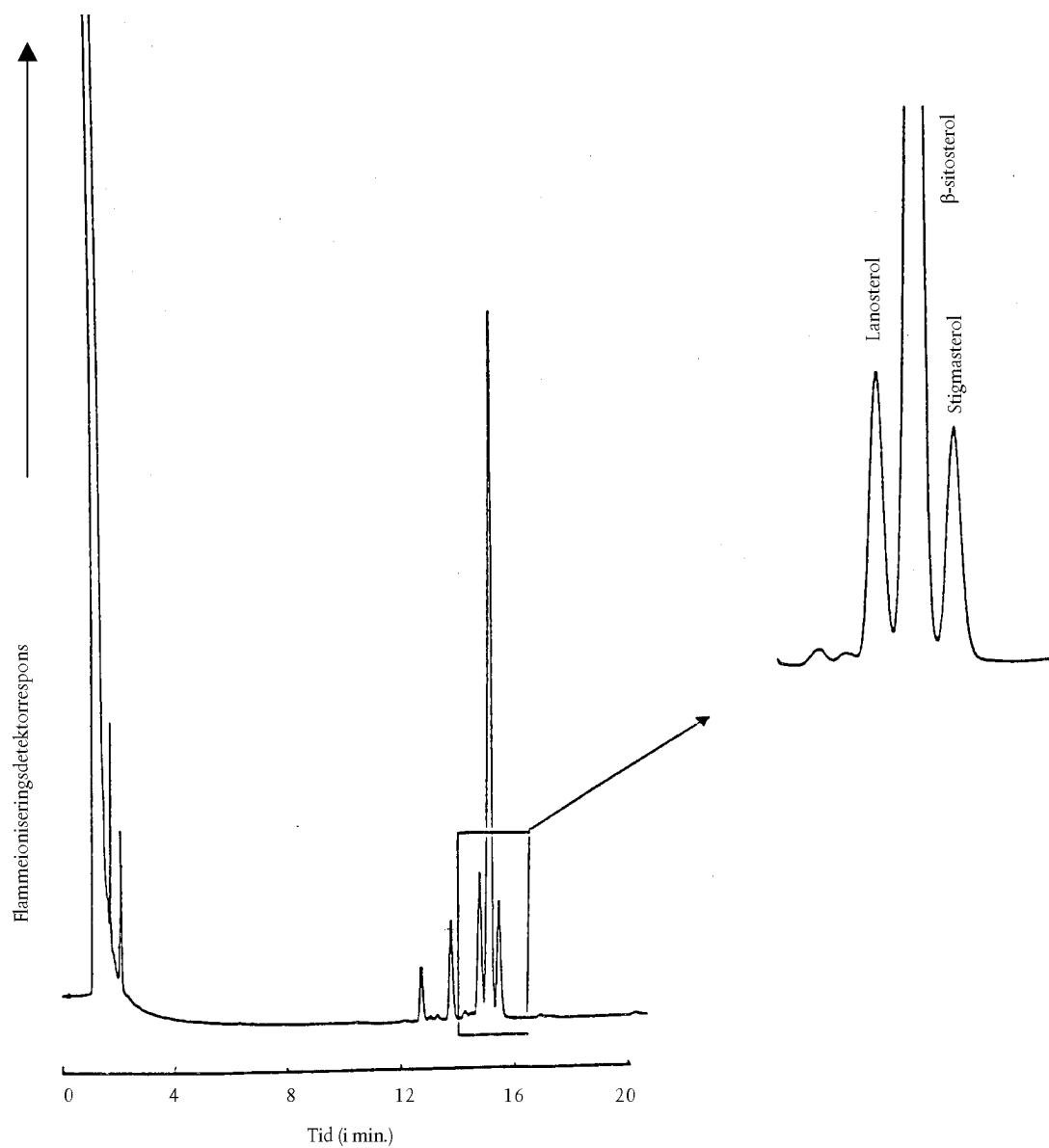
- 486,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 90 % ren sitosterol)
- 358,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 90 % ren sitosterol).

Koncentrationen af røbestoffet i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 486,0 mg/kg og 358,0 mg/kg.

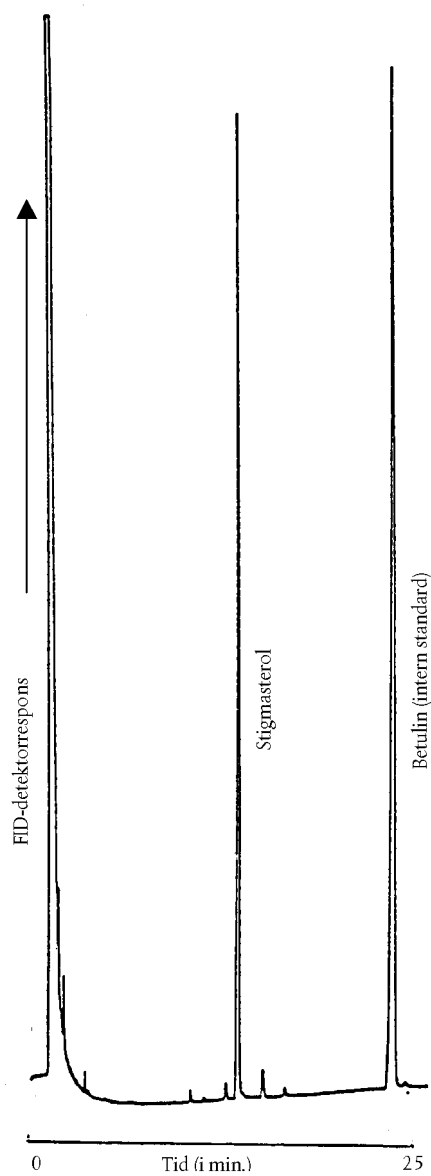
Figur 1

Kromatogram af opløsning til kontrol af adskillelsesevne

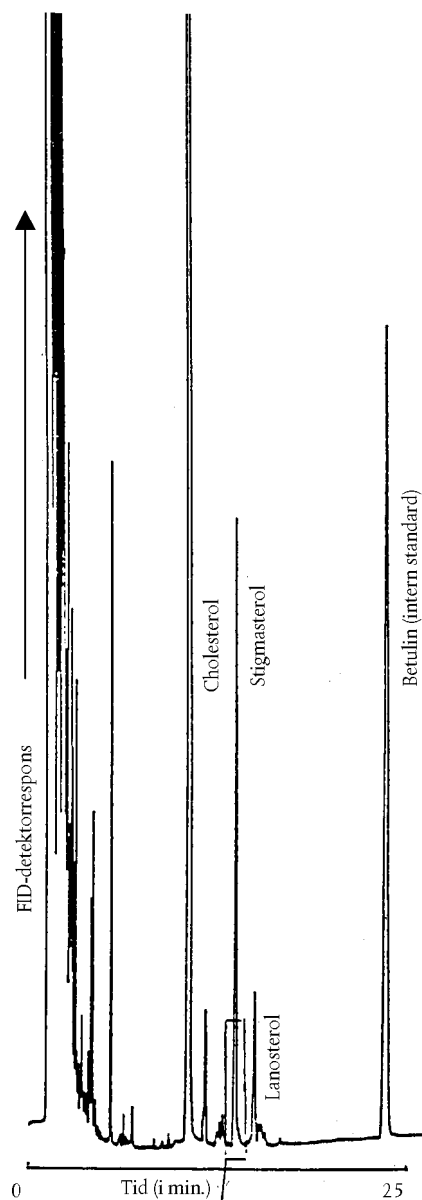
Det er bedst, hvis toppene er fuldstændig adskilt, dvs. at toppen for lanosterol går helt ned til basislinjen, før sitosteroltoppen begynder. En vis overlapning kan dog accepteres.



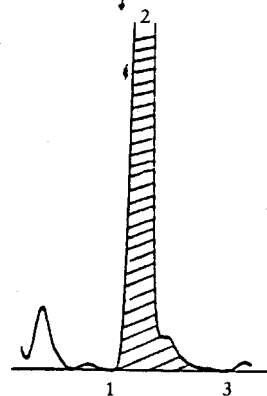
Figur 2a
Stigmasterolstandardopløsning



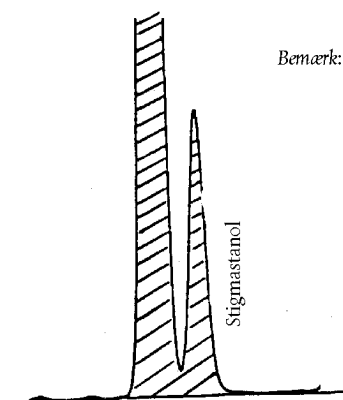
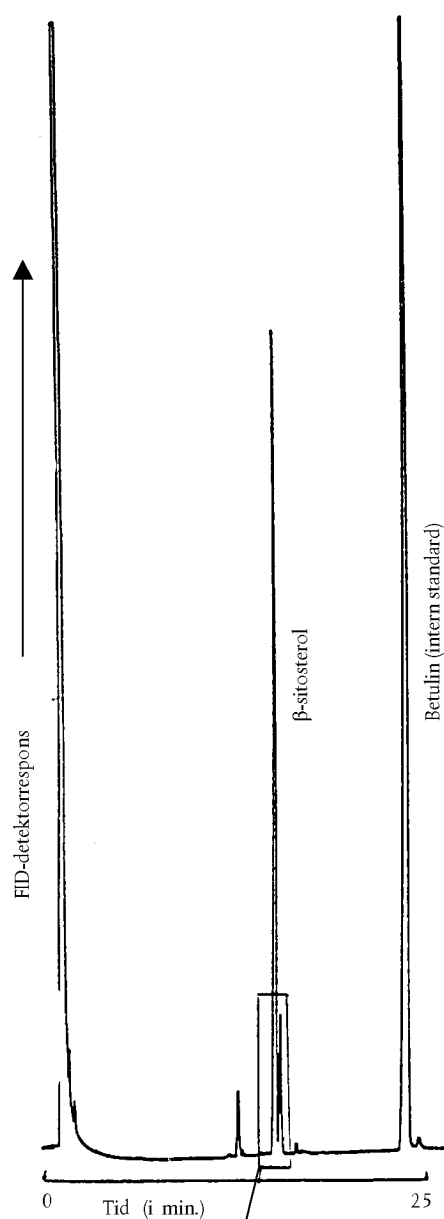
Figur 2b
Smørprøve
denatureret med stigmasterol



Bemærk: Integration af stigmasteroltoppen skal også omfatte en eventuel hale som afgrænset af punkt 1, 2 og 3.

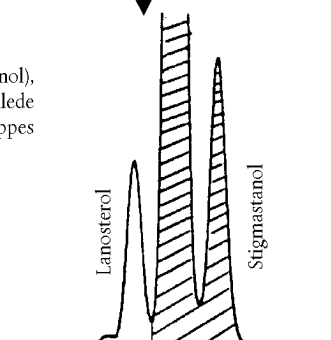
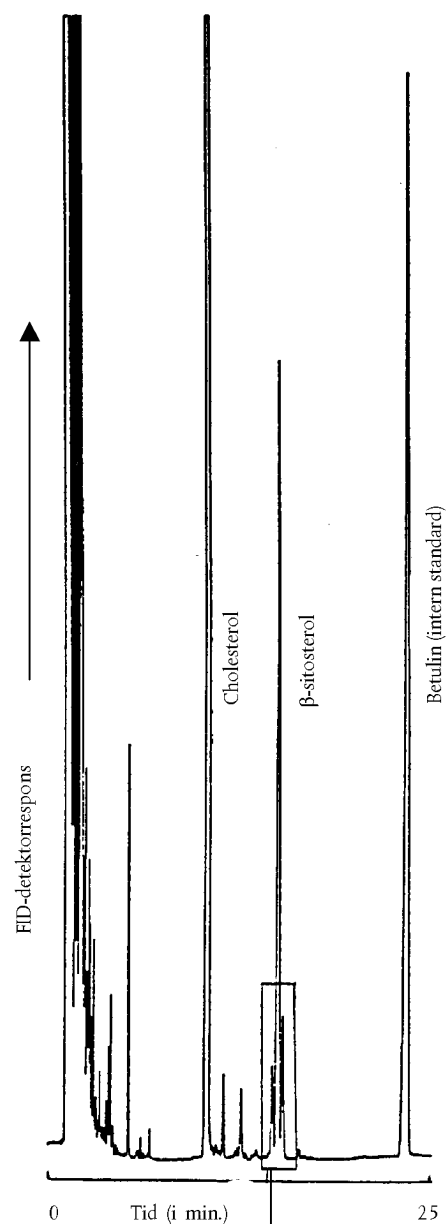


Figur 3a
β-sitosterolstandardopløsning



Bemærk: β-sitosterol indeholder ofte et fremmedstof (stigmastanol), som eluerer umiddelbart efter β-sitosterol. Det samlede indhold af β-sitosterol findes ved at lægge disse to toppes arealer sammen.

Figur 3b
Smørprøve
denatureret med β-sitosterol



BILAG XV

(Artikel 10)

REFERENCEMETODE TIL PÅVISNING AF KOMÆLK OG KASEINAT I OST FREMSTILLET AF FÅRE-, GEDE- ELLER BØFFELMÆLK ELLER AF BLANDINGER AF FÅRE-, GEDE- OG BØFFELMÆLK**1. Omfang**

Påvisning af komælk og kaseinat i ost fremstillet af fåre-, gede- eller bøffelmælk eller af blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk ved isoelektrisk fokusering af γ -kaseiner efter plasminolyse.

2. Område

Metoden er egnet til følsom og specifik påvisning af rå og varmebehandlet komælk og kaseinat i frisk og modnet ost fremstillet af fåre-, gede- eller bøffelmælk eller af blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk. Den er ikke egnet til påvisning af, om mælk og ost er forfalsket med varmebehandlede kovalleproteinkoncentrater.

3. Princip

- 3.1. Isolering af kaseiner fra ost og referenceopløsninger
- 3.2. Opløsning af isolerede kaseiner, som derefter underkastes plasminspaltning (E.C.3.4.21.7).
- 3.3. Isoelektrisk fokusering af de plasminbehandlede kaseiner i tilstedeværelse af urea og farvning af proteinerne.
- 3.4. Vurdering af de farvede γ_3 - og γ_2 -kaseinmønstre (tegn på komælk) ved sammenligning af mønstret fra prøven med dem, der fremkom i samme gel fra referenceopløsninger med 0 % og 1 % komælk.

4. Reagenser

Medmindre andet er angivet, skal der anvendes kemikalier af analysekvalitet. Vandet skal være dobbeltdestilleret eller af tilsvarende renhed.

NB: Nedenstående detaljer gælder for laboratoriefremstillede polyacrylamidgeler, der indeholder urea, af størrelsen $265 \times 125 \times 0,25$ mm. Hvis der bruges gel af en anden størrelse eller type, skal separationsbetingelserne måske justeres.

Isoelektrisk fokusering**4.1. Reagenser til fremstilling af polyacrylamider, der indeholder urea****4.1.1. Stamopløsning**

4,85 g acrylamid

0,15 g N,N'-metylen-bis-acrylamid (BIS)

48,05 g urea

15,00 g glycerol (87 % w/w)

opløses i vand, og der fyldes op til 100 ml. Opbevares i brun flaske i køleskab.

NB: En forblandet acrylamid/BIS-opløsning, der fås i handelen, kan anvendes frem for de angivne vægte af neurotoksiske acrylamider. Hvis en sådan opløsning indeholder 30 % w/v acrylamid og 0,8 % w/v BIS, skal der bruges et volumen på 16,2 ml i formuleringen i stedet for de angivne vægte. Stamopløsningens holdbarhed er højst 10 døgn. Hvis dens ledningsevne er over 5 μ S, afioniseres den ved omrøring med 2 g Amberlite MB-3 i 30 minutter og filtreres derefter gennem en 0,45 μ m membran.

4.1.2. Gelopløsning

Der laves en gelopløsning ved blanding af additiver og amfolytter med stamopløsningen (4.1.1).

9,0 ml stamopløsning

24 mg β -alanin

500 μ l amfolyt pH 3,5-9,5 ⁽¹⁾

250 μ l amfolyt pH 5-7 ⁽¹⁾

250 μ l amfolyt pH 6-8 ⁽¹⁾.

Gelopløsningen blandes og afgasses i 2-3 minutter i et ultralydbad eller i vakuum.

NB: Gelopløsningen laves straks før ophældningen (6.2).

4.1.3. Katalysatoropløsninger

4.1.3.1. N,N,N'-tetrametylendiamin (TEMED)

4.1.3.2. 40 % w/v ammoniumpersulfat (PER)

800 mg PER opløses i vand, og der fyldes op til 2 ml.

NB: Der skal altid bruges frisklavet PER-opløsning.

4.2. Kontaktvæske

Petroleum eller flydende paraffin.

4.3. Anodeopløsning

5,77 g fosforsyre (85 % w/w) opløses i vand og fortyndes til 100 ml med vand.

4.4. Katodeopløsning

2,00 natriumhydroxid opløses i vand og fortyndes til 100 ml med vand.

Tilberedelse af prøven

4.5. Reagenser til proteinisolering

4.5.1. Fortyndet eddikesyre (25,0 ml iseddike fortyndet til 100 ml ved vand).

4.5.2. Diklormetan

4.5.3. Acetone

4.6. Proteinopløsende buffer

Stamopløsning

5,75 g glycerol (87 % w/w)

24,03 g urea

250 mg ditiotritol

opløses i vand, og der fyldes op til 50 ml.

NB: Opbevares i køleskab — holdbarhed 1 uge.

4.7. Reagenser til plasminspaltning af kaseiner

4.7.1. Ammoniumkarbonatbuffer

En 0,2 mol/l ammoniumhydrogenkarbonatopløsning (1,58 g/100 ml vand) med 0,05 mol/l etylenediamin-tetra-eddikesyre (EDTA, 1,46 g/100 ml) titreres med en 0,2 mol ammoniumkarbonatopløsning (1,92 g/100 ml vand) med 0,05 mol/l EDTA til pH 8.

4.7.2. Bovin plasmin (E.C. 3.4.21.7), aktivitet mindst 5 U/ml

4.7.3. ϵ -aminokaprønsyre til enzymhæmning

2,624 g ϵ -aminokaprønsyre (6-amino-n-heksanønsyre) opløses i 100 ml 40 % (v/v) etanol.

⁽¹⁾ Produkterne Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) og Resolyte® pH 5-7 og pH 6-8 (BDH, Merck) har vist sig særligt velegnede til at opnå den ønskede separation af γ -kaseiner.

4.8. Standardopløsninger

- 4.8.1. Godkendte referenceopløsninger af en blanding af løbebehandlet skummet fåre- og gedemælk indeholdende 0 % og 1 % komælk kan fås hos Kommissionen, Institutet for Referencemålinger og -Materialer, B-2440 Geel, Belgien.
- 4.8.2. Fremstilling af midlertidige laboratoriestandardopløsninger af løbebehandlet bøffelmælk indeholdende 0 % og 1 % komælk.

Skummetmælken fremstilles ved centrifugering af bøffelmælk eller rå tankkomælk ved 37 °C ved 2 500 g i 20 minutter. Efter hurtig afkøling af glas og indhold til 6-8 °C fjernes det øverste fedtlag fuldstændigt. Til fremstilling af 1 %-standardopløsningen tilsættes 5,00 ml skummet komælk til 495 ml skummet bøffelmælk i et 1 l bæger. pH-værdien justeres til 6,4 ved tilsætning af fortyndet mælkesyre (10 % w/v). Temperaturen justeres til 35 °C, og 100 µl kalveløbe tilsættes (løbeaktivitet: 1:10 000, ca. 3 000 U/ml). Der omrøres i et minut, hvorefter opløsningen henstår tildækket med alufolie ved 35 °C i en time, så ostemassen kan dannes. Når ostemassen er dannet, frysetørres al den løbebehandlede sødmælk uden forudgående homogenisering eller afdræning af vallen. Efter frysetørringen formales produktet, så der fremkommer et homogent pulver. Til fremstilling af 0 %-standardopløsningen følges samme metode med brug af skummet bøffelmælk. Standardopløsningerne skal opbevares ved -20 °C.

NB: Det kan tilrådes at kontrollere bøffelmælkens renhed ved isoelektrisk fokusering af de plasminbehandlede kaseinater, inden standardopløsningerne fremstilles.

Reagenser til proteinfarvning

4.9. Fikservæske

150 g trikloreddikesyre opløses i vand, og der fyldes op til 1 000 ml.

4.10. Affarvningsopløsning

500 ml metanol og 200 ml iseddike fortyndes til 2 000 ml med destilleret vand.

NB: Affarvningsopløsningen frisklaves hver dag. Den kan fremstilles ved at blande lige store mængder stamopløsninger af 50 % (v/v) metanol og 20 % iseddike.

4.11. Farvningsopløsninger

4.11.1. Farvningsopløsning (stamopløsning 1)

3,0 g Coomassie Brilliant Blue G 250 (C.I. 42655) opløses i 1 000 ml 90 % (v/v) metanol ved hjælp af en magnetisk omrører (ca. 45 minutter) og filtreres gennem to middelhastigheds-foldefiltre.

4.11.2. Farvningsopløsning (stamopløsning 2)

5,0 g kobberfersulfatpenhydrat opløses i 1 000 ml 20 % (v/v) eddikesyre.

4.11.3. Farvningsopløsning (arbejdsopløsning)

125 ml af hver af stamopløsningerne (4.11.1, 4.11.2) sammenblandes umiddelbart før farvningen.

NB: Farvningsopløsningen bør laves samme dag, den skal bruges.

5. Apparat

- 5.1. Glasplader (265 × 125 × 4 mm), gummirulle (bredde 15 cm) og vandret flade
- 5.2. Gelbærefolie (265 × 125 mm)
- 5.3. Dækfolie (280 × 125 mm). Der anbringes en strimmel klæbebånd (280 × 6 × 0,25 mm) på hver langside (jf. figur 1)
- 5.4. Elektrofokuseringskammer med køleplade (f.eks. 265 × 125 mm) og egnet spændingskilde (≥ 2,5 kV) eller automatisk elektroforeseapparat
- 5.5. Cirkulationskryostat, termostatstyret ved 12 ± 0,5 °C
- 5.6. Centrifuge, justerbar til 3 000 g
- 5.7. Elektrodestrimler (længde ≥ 265 mm)

- 5.8. Plastråbetæller til anode- og katodeopløsninger
- 5.9. Analyseprøveapplikatorer (10 × 5 mm, viskose- eller lavproteinabsorberingsfilterpapir)
- 5.10. Saks, skalpel og pincetter af rustfrit stål
- 5.11. Farvnings- og affarvningskåle (f.eks. 280 × 150 mm instrumentbakker) af rustfrit stål eller glas
- 5.12. justerbar homogenisator med stang (10 mm diameter), skala 8 000-20 000 rpm
- 5.13. Magnetisk omrører
- 5.14. Ultralydbad
- 5.15. Filmsvejer
- 5.16. 5-25 µl mikropipetter
- 5.17. Vakuumpkoncentrator eller frysetørrer
- 5.18. Termostatstyret vandbad, der kan indstilles til 35 og 40 ± 1 °C, med rysteaggregat
- 5.19. Densitometerudstyr med aflæsning ved $\lambda = 634$ nm

6. Metodik

6.1. Tilberedelse af prøven

6.1.1. Isolering af kaseiner

En mængde svarende til 5 g tør ostemasse eller standardopløsninger afvejes i et 100 ml centrifugeglas. Der tilsættes 60 ml destilleret vand og homogeniseres med en stanghomogenisator (8 000-10 000 rpm). pH-værdien justeres til 4,6 med fortyndet eddikesyre (4.5.1), og der centrifugeres (5 minutter — 3 000 g). Fedtet og vollen afhældes, restindholdet homogeniseres i 40 ml destilleret vand (pH-værdien justeret til 4-5 med fortyndet eddikesyre (4.5.1)) ved 20 000 rpm. Der tilsættes 20 ml diklormetan (4.5.2), homogeniseres igen og centrifugeres (5 minutter — 3 000 g). Kaseinlaget, der flyder mellem den vandige og den organiske fase (jf. figur 2), fjernes med en spatel, og begge faser afhældes. Kaseinet homogeniseres igen i 40 ml destilleret vand (som ovenfor) og 20 ml diklormetan, og der centrifugeres. Dette gentages, indtil begge ekstraktionsfaser er farveløse (2-3 gange). Proteinresterne homogeniseres med 50 ml acetone (4.5.3) og filtreres gennem et middelhastigheds-foldfilterpapir. Resterne vaskes på filtret med to særskilte portioner acetone på hver 25 ml og henstår til tørring i luft eller en kvælstofstrøm, hvorefter de finknuses i en morter.

NB: Tørre kaseinisolater bør opbevares ved -20 °C.

6.1.2. Plasmingspaltning af β -kaseiner for at intensivere γ -kaseiner

25 mg isoleret kasein (6.1.1) opslættes i 0,5 ml ammoniumkarbonatbuffer (4.7.1) og homogeniseres i 20 minutter, f.eks. ved ultralydbehandling. Der opvarmes til 40 °C og tilsættes 10 µl plasmin (4.7.2), blandes og inkuberes i en time ved 40 °C under stadig omrystning. Til hæmning af enzymer tilsættes 20 µl ϵ -aminokapronsyre (4.7.3) og derefter yderligere 200 mg fast urea og 2 mg ditiotreitol.

NB: For at få større symmetri i de fokuserede kaseinbånd kan det tilrådes at frysetørre opløsningen efter tilsætningen af ϵ -aminokapronsyre og derefter opløse resterne i 0,5 ml ureabuffer (4.6).

6.2. Tilberedelse af polyacrylamidgeler, der inderholder urea

Gelbærefolien (5.2) rulles med et par dråber vand ud på en glasplade (5.1), og eventuelt overskydende vand fjernes med papirhåndklæde- eller serviet. Dækfolien (5.3) udrulles med afstandsstykker (0,25 mm) på en anden glasplade på samme måde. Pladen anbringes plant på en vandret flade.

10 µl TEMED (4.1.3.1) tilsættes til den tilberedte, afgassede gelopløsning (4.1.2), og efter omrystning 10 µl PER-opløsning (4.1.3.2). Opløsningen blandes grundigt og hældes straks derefter jævnt ud på midten af dækfolien. Den ene side af gelbærefolien (med bæresiden nedad) anbringes på dækfoliepladen og sænkes langsomt, således at der dannes sig en gelfilm mellem folierne, som spreder sig regelmæssigt uden bobledannelse (jf. figur 3). Gelbærefolien sænkes forsigtigt helt ned ved hjælp af en tynd spatel, og der lægges endnu tre plader oven på den, der skal tjene som vægte. Når polymeriseringen er fuldstændig (ca. 60 minutter), overføres den polymeriserede gel på gelbærefolien sammen med dækfolien, ved at glaspladerne vipkes. Bærefoliets bagside rengøres omhyggeligt for at fjerne gelrester og urea. Gelsandwichen svejses til et filmglas og opbevares i køleskab (højest 6 uger).

NB: Dækfolien med afstandsstykkerne kan genbruges. Polyacrylamiden kan skæres i mindre størrelser, hvad der kan anbefales, når der kun er få prøver, eller hvis der anvendes et automatisk elektroforeseapparat (2 geler — størrelse 4,5 × 5 cm).

6.3. Isoelektrisk fokusering

Køletermostaten indstilles til 12 °C. Gelbærefoliens bagside aftørres med petroleum, hvorefter et par dråber petroleum (4.2) dryppes på midten af køleblokken. Derpå rulles gelsandwichen (med bæresiden nedad) ud på den, men det skal undgås, at der dannes sig bobler. Eventuel overskydende petroleum tørres af, og dækfolien fjernes. Elektrodestrimlerne gennemvædes med elektrodeopløsningerne (4.3 og 4.4), tilskræres i gelens længde og anbringes de givne steder (elektrodeafstand 9,5 cm).

Fokuseringen foretages på nedenstående betingelser:

6.3.1. Gelstørrelse 265 × 125 × 0,25 mm

Trin	Tid (minutter)	Spænding (V)	Strøm (mA)	Kraft (W)	Volttimer (Vh)
1. Præfokusering	30	maksimum 2 500	maksimum 15	konst. 4	ca. 300
2. Prøvefokusering ⁽¹⁾	60	maksimum 2 500	maksimum 15	konst. 4	ca. 1 000
3. Slutfokusering	60	maksimum 2 500	maksimum 5	maksimum 20	ca. 3 000
	40	maksimum 2 500	maksimum 6	maksimum 20	ca. 3 000
	30	maksimum 2 500	maksimum 7	maksimum 25	ca. 2 500

⁽¹⁾ Prøveapplikation: Efter præfokusering (første trin) afpipetteres 18 µl af prøven og standardopløsningerne over på prøveapplikatorerne (10 × 5 mm), der anbringes på gelen med en indbyrdes afstand på 1 mm og 5 mm fra anoden og trykkes let ned. Fokuseringen foretages på ovenstående betingelser, og prøveapplikatorerne borttages forsigtigt efter de 60 minutters prøvefokusering.

NB: Hvis gelens tykkelse eller bredde ændres, skal strøm og kraft justeres herefter (f.eks. fordobles elstrøm og kraft, hvis der benyttes en 265 × 125 × 0,5 mm gel).

6.3.2. Eksempel på et spændingsprogram for et automatisk elektroforeseapparat (2 geler på 5,0 × 4,5 cm); elektroder anbringes uden strimler direkte på gelen:

Trin	Spænding	Strøm	Kraft	Temperatur	Volttimer
1. Præfokusering	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Prøvefokusering	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusering	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusering	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Prøveapplikatoren anbringes på andet trin ved 0000 Vh.

Prøveapplikatoren fjernes på andet trin ved 0030 Vh.

6.4. Proteinfarvning

6.4.1. Proteinfiksering

Elektrodestrimlerne aftages, så snart der er slukket for strømmen, og gelen kommer straks i en farvnings- eller affarvningskål fyldt med 200 ml fikservæske (4.9). Den henstår i 15 minutter, men omrystes af og til.

6.4.2. Vask og farvning af gelpladen

Fikservæsken drænes grundigt, og gelpladen vaskes i 30 sekunder to gange med 100 ml affarvningsopløsning (4.10). Affarvningsopløsningen afhældes, og skålen fyldes med 250 ml farvningsopløsning (4.11.3). Man lader farven udvikle sig i 45 minutter under forsigtig omrystning.

6.4.3. Affarvning af gelpladen

Farvningsopløsningen afhældes, og gelpladen vaskes med 100 ml affarvningsopløsning (4.10) to gange, hvorefter der omrystes med 200 ml affarvningsopløsning i 15 minutter. Affarvningstrinnet gentages mindst 2-3 gange, indtil baggrunden er klar og ufarvet. Derefter skylles gelpladen med destilleret vand (to gange 2 minutter) og tørres i luft (2-3 timer) eller med en hårtørret (10-15 minutter).

NB 1: Fiksering, vask, farvning og affarvning foretages ved 20 °C. Der må ikke benyttes højere temperaturer.

NB 2: Hvis man foretrækker mere følsom sølvfarvning (f.eks. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code No. 17-1150-01), skal plasminbehandlede kaseinprøver fortyndes til 5 mg/ml.

7. Vurdering

Vurderingen foretages ved sammenligning af proteinmønstrene i den ukendte prøve med referenceprøver på samme gel. Påvisning af komælk i ost fremstillet af fåre-, gede- eller bøffelmælk eller af blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk sker via de γ_3 og γ_2 -kaseiner, hvis isoelektriske punkter ligger mellem pH 6,5 og pH 7,5 (jf. figur 4a, 4b og 5). Påvisningsgrænsen er under 0,5.

7.1. Visuel vurdering

Med henblik på visuel vurdering af indeholdet af komælk kan det tilrådes at justere koncentrationerne af prøve- og standardkoncentrationerne, så der fremkommer samme intensitet af ovine, caprine og/eller bøffel- γ_2 - og γ_3 -kaseiner (jf. » γ_2 E, G, B« og » γ_3 E, G, B« i figur 4a, 4b og 5). Derefter kan indholdet af komælk (mindre end, lig med eller højere end 1 %) i den ukendte prøve bedømmes direkte ved at sammenligne med intensiteten af de bovine γ_3 - og γ_2 -kaseiner (jf. » γ_3 C« og » γ_2 C« i figur 4a, 4b og 5) med 0 %- og 1 %-standardopløsningen (får, ged) eller midlertidige laboratoriestandardopløsninger (bøffel) analyseret på samme gel.

7.2. Densitometrisk vurdering

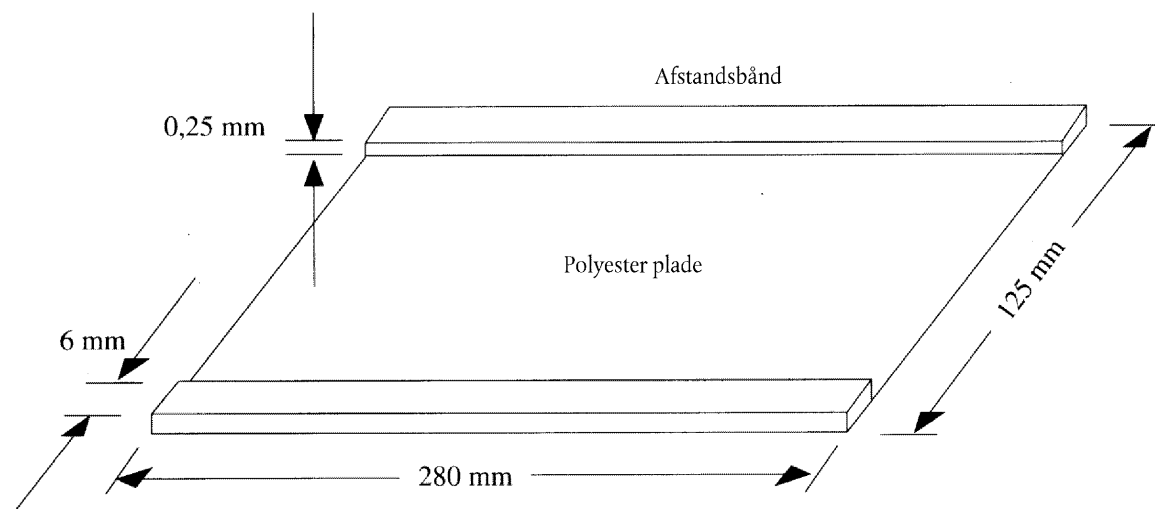
Om muligt benyttes densitometri (5.19) til bestemmelse af forholdet mellem toparealerne for bovine, ovine, caprine og/eller bøffel- γ_2 - og γ_3 -kaseiner i figur 5). Denne værdi sammenlignes med forholdet mellem toparealerne for γ_2 - og γ_3 -kaseiner i 1 %-standardopløsningen (får, ged) eller midlertidige laboratoriestandardopløsninger (bøffel) analyseret på samme gel.

NB: Metoden fungerer tilfredsstillende, hvis der er et klart, positivt tegn på bovine γ_2 - og γ_3 -kaseiner i 1 %-standardopløsningen, men ikke i 0 %-standardopløsningen. Hvis det ikke er tilfældet, forbedres metoden ved, at den følges ganske nøje i alle detaljer.

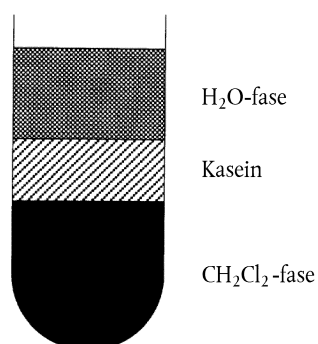
En prøve betragtes som positiv, hvis de bovine γ_2 - og γ_3 -kaseiner eller de tilsvarende toparealforhold er lig med eller højere end niveauet for 1 %-standardopløsningen.

8. Litteraturhenvisninger

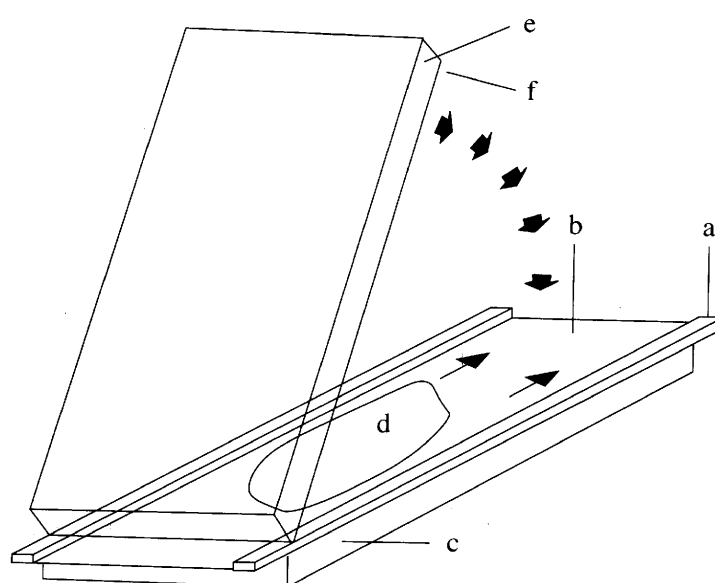
1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: *Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine an/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins*. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: *A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting*. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: *Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilised pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier*. I: *Electrophoresis-Forum '89* (B.J. Radola, ed.) pp. 389-393, Bode-Verlag, München (1989).
4. Krause I., Belitz H.D., Kaiser K.-P.: *Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: *Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films*. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).



Figur 1: Skematisk tegning af dækfolie

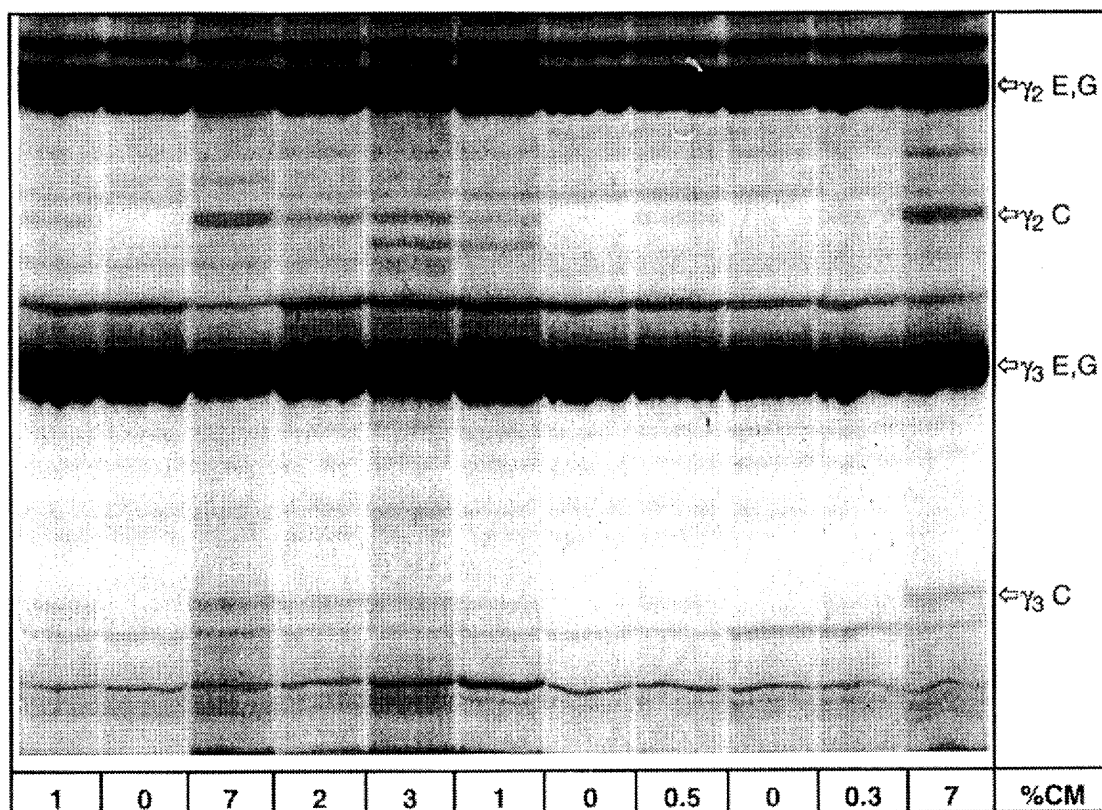


Figur 2: Kaseinlaget, der flyder mellem den vandige og den organiske fase efter centrifugering H₂O-fase; Kasein; CH₂Cl₂-fase



Figur 3: Viftemetode til støbning af ultratynde polyakrylamidgeler.

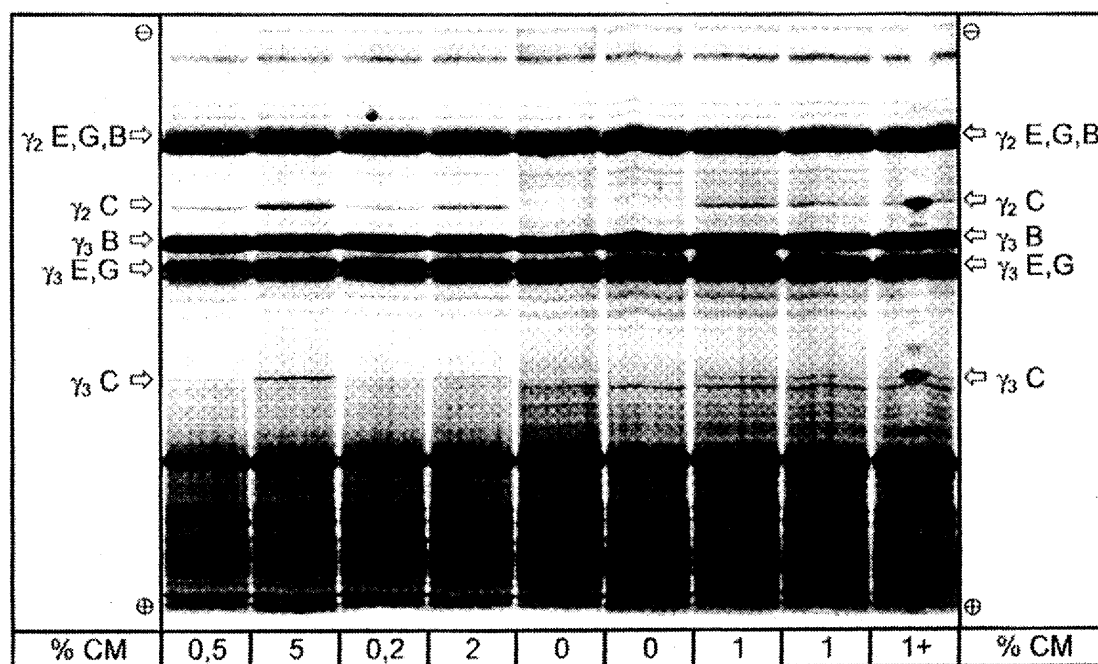
a = afstandsbånd (0,25 mm); b = dækfolie (5.3); c og e = glasplader (5.1); d = gelopløsning (4.1.2); f = gelbærefolie (5.2)



Figur 4a: Isoelektrisk fokusering af plasminbehandlede kaseinater fra ost fremstillet af fåre- eller gedemælk med forskellige mængder komælk.

% CM = procent komælk; C = ko; E = får; G = ged.

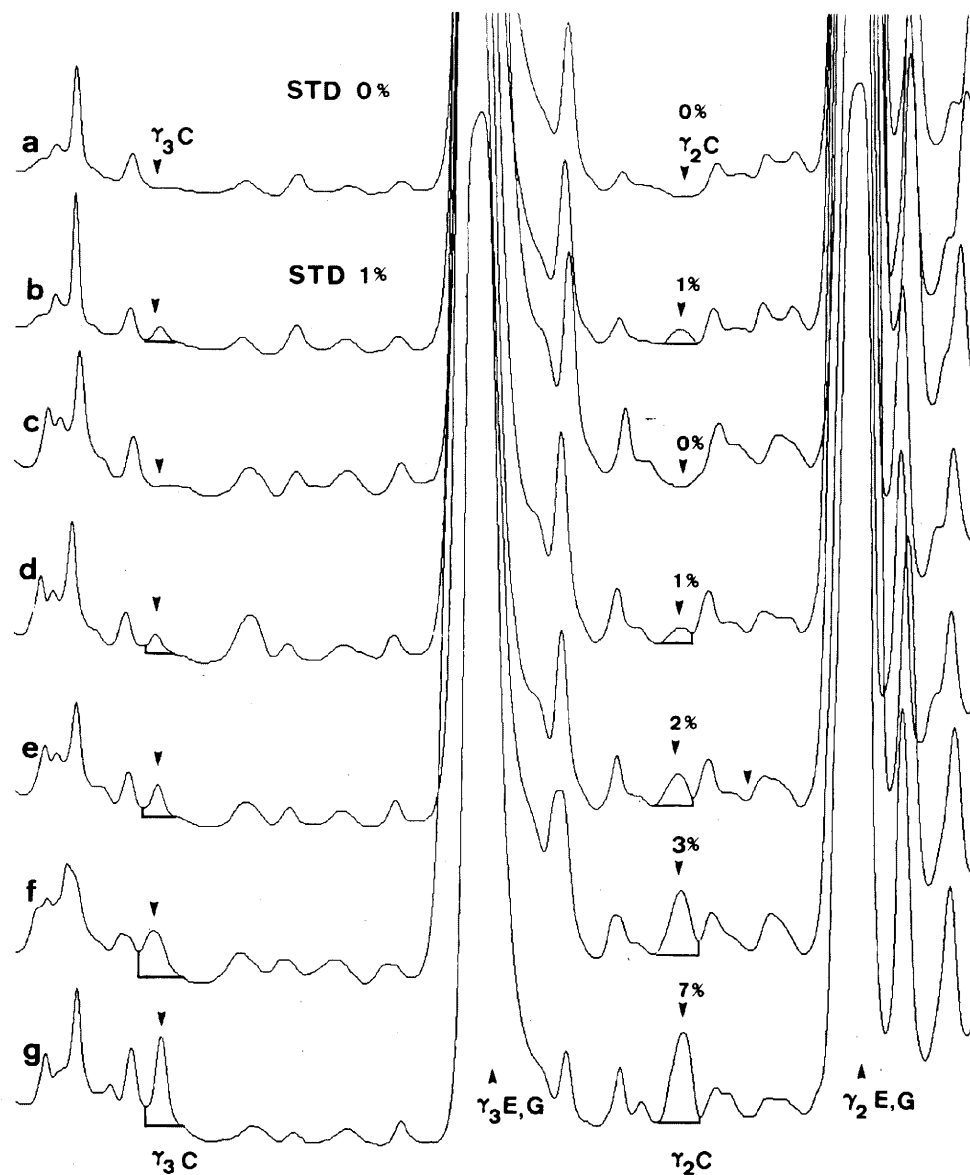
Den øverste halvdel af IEF-gelen ses.



Figur 4b: Isoelektrisk fokusering af plasminbehandlede kaseinater fra ost fremstillet af blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk med forskellige mængder komælk.

% CM = procent komælk; 1 + = prøve indeholdende 1 % komælk og tilsat rent bovint kasein midt på sporet. C = ko; E = får; G = ged; B = bøffel.

IEF-gelens totale separationsafstand ses.



Figur 5: Overlejring af densitogrammer af standardopløsninger (STD) og osteprøver fra en blanding af fåre- og gedemælk efter isoelektrisk fokusering.

a og b = standardopløsninger med 0 og 1 % komælk; c til g = osteprøver med 0, 1, 2, 3 og 7 % komælk; C = ko; E = får; G = ged.

Den øverste halvdel af IEF-gelen er scannet ved $\lambda = 634$ nm.

BILAG XVI

(Artikel 11)

REFERENCEMETODE TIL PÅVISNING AF COLIFORME BAKTERIER I SMØR, SKUMMETMÆLKSPULVER OG KASEIN/KASEINAT

Prøver på 1 g smør podes i dyrkningsmediet ved undersøgelse af smør for tilstedeværelse af coliforme bakterier. Ved undersøgelse af skummetmælkspulver eller kasein/kaseinat for tilstedeværelse af coliforme bakterier podes 0,1 g prøver i dyrkningsmediet.

IDF-standard 73A:1985, metode B, anvendes med følgende modifikationer:

- 1) Der tilberedes en prøve efter IDF-standard 122B:1992. For sur kasein kan som alternativ benyttes den metode til forberedelse af prøve, der er beskrevet i IDF-standard 73A:1985.
- 2) Udelukkende reagensglas podet med henholdsvis 1 g prøver (smør) eller 0,1 g prøver (skummetmælkspulver, kasein/kaseinat) inkuberes og vurderes. Der laves ikke tifoldsfortyndinger.

Vurdering af måleresultaterne

Tre negative resultater:	Kravet opfyldt
To eller tre positive resultater:	Kravet ikke opfyldt
To negative resultater:	Yderligere to prøver med henholdsvis 1 g (smør) eller 0,1 g (skummetmælkspulver, kasein/kaseinat) analyseres. Kravet er opfyldt, hvis de to sidste resultater er negative. I modsat fald er kravet ikke opfyldt.

Bemærkning

Indhold af coliforme bakterier: 1/10 g smør, 1/g skummetmælkspulver eller kasein/kaseinat som gennemsnit:

Resultater, der viser, at kravet er opfyldt, forekommer med en sandsynlighed på 93 %.

Indhold af coliforme bakterier: 1/g smør, 1/0,1 g skummetmælkspulver og kasein/kaseinat som gennemsnit:

Resultater, der viser, at kravet ikke er opfyldt, forekommer med en sandsynlighed på 91 %.

(Hypotese: Poisson-fordeling)

BILAG XVII

(Artikel 12)

ANALYSEMETODE TIL BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF LACTOSE I PRODUKTER HENHØRENDE UNDER POS. 2309 I DEN KOMBINEREDE NOMENKLATUR ⁽¹⁾

DEL I

1. Anvendelsesområde

Metoden er anvendelig ved et lactoseindhold på over 0,5 %.

2. Princip

De indeholdte sukkerstoffer opløses i vand. Det forgærbare sukker forgæres med gær (*Saccharomyces cerevisiae*), hvorved lactosen ikke angribes. Efter klaring og filtrering bestemmes indholdet af lactose i den fremkomne opløsning efter Luff-Schoorl-metoden.

3. Reagenser

0,1 N natriumtiosulfat

Indikator: stivelsesopløsning. En blanding af 5 g opløselig stivelse (eventuelt med 10 mg kviksølvjodid som konserveringsmiddel) og 30 ml vand sættes til 1 liter kogende vand og koges sammen i 3 minutter, hvorefter der afkøles.

Kaliumjodidopløsning p.a. 30 % (g/vol).

Svovlsyreopløsning 6 N

Luff-Schoorl-reagens:

a) 25 g kobbersulfatpenhydrat p.a., jernfrit ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) opløses i 100 ml vand.

b) 50 g citronsyre p.a. ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) opløses i 50 ml vand.

c) 143,8 g vandfrit natriumcarbonat p.a. opløses i ca. 300 ml varmt vand.

b) hældes i c) (efter afkøling) med forsigtig omrystning og dernæst tilføjes a). Der fyldes op til 1 l, henstår en nat og filtreres. Reagensets koncentrationer kontrolleres (0,1 N med hensyn til Cu, 2 N med hensyn til Na_2CO_3). pH skal ligge i nærheden af 9,4.

Carrez-opløsning I: 23,8 g Zn ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂·2H₂O og 3 g iseddike opløses i vand, og kolben fyldes op til 100 ml.

Carrez-opløsning II: 10,6 g $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ opløses i vand, og kolben fyldes op til 100 ml.

Granuleret pimpsten, udkogt med saltsyre, udvasket med vand og tørret. *Saccharomyces-cerevisiae*-opslæmning: Opslæmning bestående af 25 g frisk gær i 100 ml vand (bør ikke opbevares mere end 1 uge i køleskab).

4. Fremgangsmåde

Ca. 1 g af analyseprøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og kommes i en 100 ml målekolbe. Der sættes 25 til 30 ml vand til. Blandingen opvarmes 30 minutter i kogende vandbad, hvorefter der afkøles til ca. 35 °C.

Der tilsættes 5 ml gærsoptionslæmning ⁽²⁾ og omrystes. Kolben med indhold henstår 2 timer i vandbad, som holdes på en temperatur på 38 til 40 °C.

Når forgæringen er afsluttet, afkøles til en temperatur på ca. 20 °C. Derpå tilsættes 2,5 ml af Carrez-opløsning I, og der rystes et halvt minut. Derpå tilsættes 2,5 ml af Carrez-opløsning II, og der rystes på ny et halvt minut. Så fyldes der op med vand til 100 ml, blandes og filtreres. Af det udvundne filtrat afpipetteres en mængde på maksimalt 25 ml, der så vidt muligt skal indeholde 40 til 80 mg lactose. Om nødvendigt fyldes der op med vand til et volumen på 25 ml, og indholdet af vandfri lactose bestemmes efter Luff-Schoorl-metoden.

Samtidig udføres en fuld blindprøve med gæren.

⁽¹⁾ Forordning (EØF) nr. 222/88

⁽²⁾ I tilfælde af produkter, der indeholder over 40 % gæringsdygtigt sukker, forøges opslæmningsmængden.

DEL II

1. Bestemmelse af lactoseindhold efter Luff-Schoorl-metoden

Der afpipetteres 25 ml af reagenset efter Luff-Schoorl-metoden, som kommer i en Erlenmeyerkolbe på 300 ml. Derefter tilsættes nøjagtigt 25 ml klaret opløsning.

Efter tilsætning af to stykker granuleret pimpsten opvarmes der under manuel omrystning over en middelstor åben flamme, og væsken bringes i kog i ca. 2 minutter. Herefter anbringes Erlenmeyerkolben på et trådnæt med asbestplade, hvorunder der skal brænde en flamme. Flammen er indstillet således, at Erlenmeyerkolben kun opvarmes i bunden. Derefter anbringes en tilbageløbskøler. Fra dette øjeblik lader man væsken koge i nøjagtigt 10 minutter. Derpå afkøles der straks ved hjælp af koldt vand og efter ca. 5 minutters forløb titreres der som følger:

Væsken tilsættes 10 ml kaliumjodid-opløsning og i umiddelbar tilslutning hertil — men forsigtigt (på grund af risiko for kraftig skumdannelse) — tilsættes 25 ml 6 N svovlsyre.

Herefter titreres der med natriumtiosulfat, indtil der fremkommer en matgul farve, og ved afslutningen af titreringen tilsættes stivelsesindikatoren.

Samme titrering udføres i en blanding af nøjagtigt 25 ml af reagenset efter Luff-Schoorl-metoden og 25 ml vand, efter at der er tilsat 10 ml kaliumjodid-opløsning og 25 ml 6 N svovlsyre. Denne gang bringes opløsningen imidlertid ikke i kog.

I tabellen findes den lactosemængde (i mg), som svarer til differencen i resultaterne for de to titreringer (udtrykt i ml 0,1 N natriumtiosulfat).

TABEL

Tabel for 25 ml reagens efter Luff-Schoorl-metoden
(se betingelserne i teksten)

1. 0,1 N natriumtiosulfat

2. Lactose $C_{12}H_{22}O_{11}$

1			2		
ml			mg		
			forskell		
1	3,6		12	44,6	
		3,7			3,8
2	7,3		13	48,4	
		3,7			3,8
3	11,0		14	52,2	
		3,7			3,8
4	14,7		15	56,0	
		3,7			3,9
5	18,4		16	59,9	
		3,7			3,9
6	22,1		17	63,8	
		3,7			3,9
7	25,8		18	67,7	
		3,7			4,0
8	29,5		19	71,7	
		3,7			4,0
9	33,2		20	75,7	
		3,8			4,1
10	37,0		21	79,8	
		3,8			4,1
11	40,8		22	83,9	
		3,8			4,1
			23	88,0	

BILAG XVIII

(Artikel 13)

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 indeholder eller er tilsat en kendt mængde vallepulver.

5. Reagenser

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

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 $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. HPLC-udstyr bestående af:
 - 6.10.1. Pumpe.
 - 6.10.2. Manuel eller automatisk injektionsenhed 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 ± 1 °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 analyserække må her ikke overstige ± 5 °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 ± 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 indsprøje 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

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

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

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

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

hvor

R_{III} = kalibreringsfaktoren for top III

$A_{II}[0]$ 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 valde 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 $S_{III} [0]$ afgiver 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_{III} [E]

P % det samlede proteinindhold udtrykt som vægtprocent

$(S_{III} [E])$ 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.

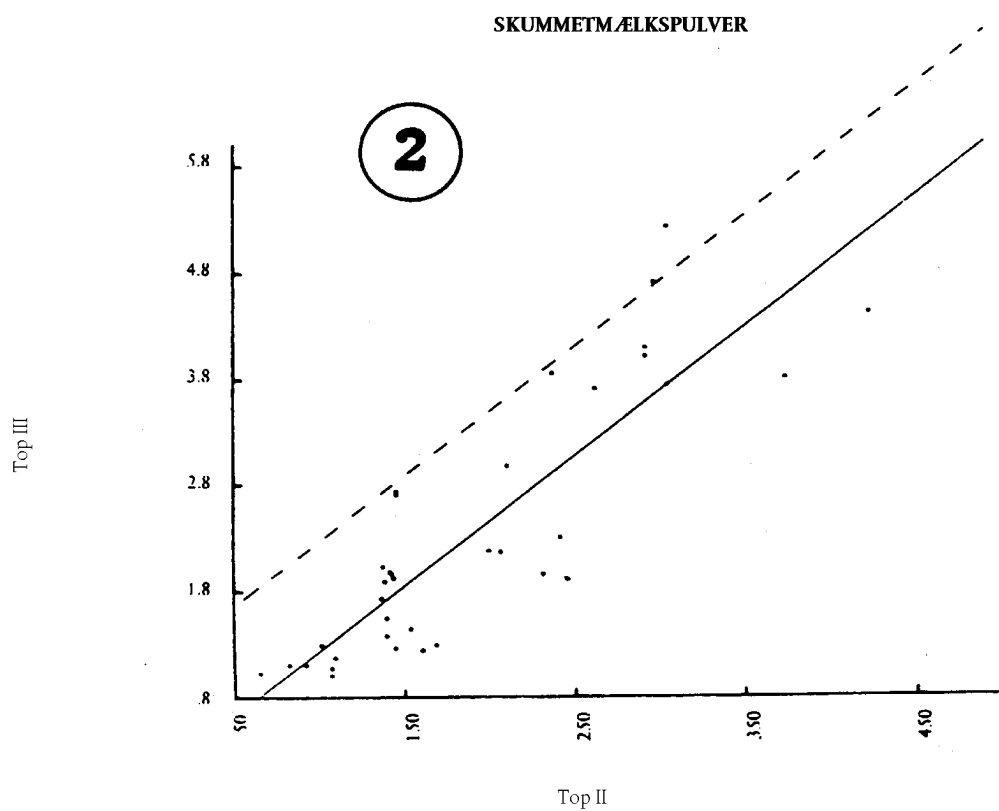
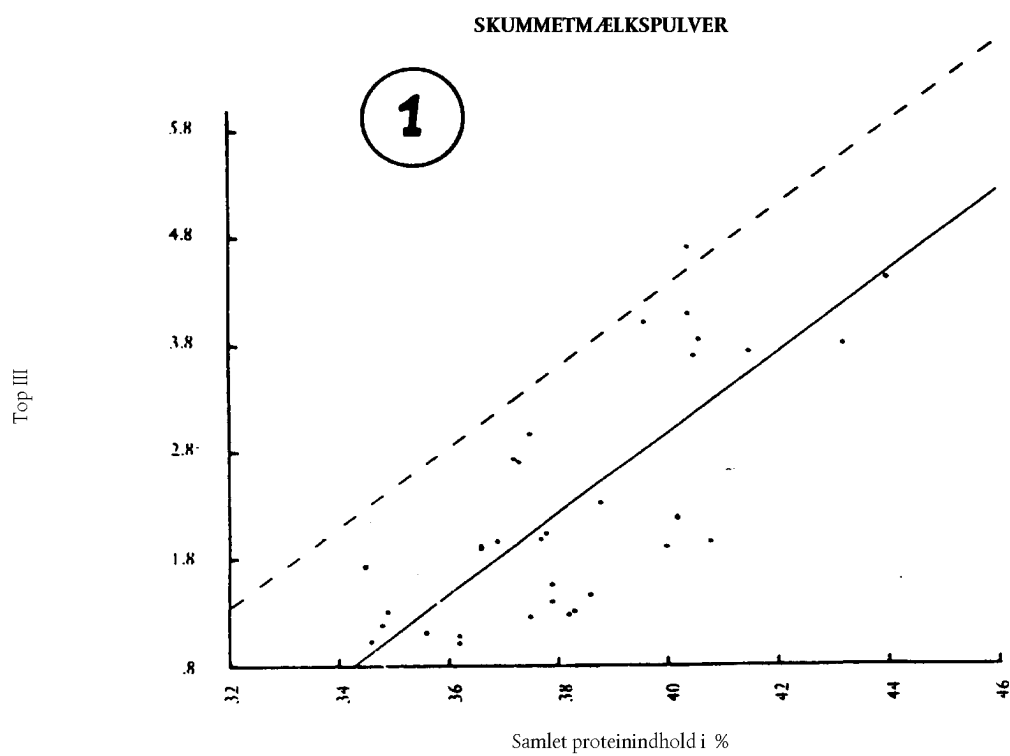
Hvis T_1 og T_2 er større end nul, kan det sluttes, at der er løbevalle til stede.

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.



BILAG XIX

(Artikel 13)

BESTEMMELSE AF LØBEVALLETØRSTOF I SKUMMETMÆLKSPULVER OG BLANDINGER I HENHOLD TIL FORORDNING (EØF) Nr. 2799/1999**1. Formål: Påvisning af tilsætning af løbevalletørstof til følgende produkter:**

- a) Skummetmælkspulver som defineret i artikel 2 i forordning (EØF) nr. 2799/1999
- b) Blandinger som defineret i artikel 4 i forordning (EØF) nr. 2799/1999

2. Referencer: International standard ISO 707**3. Definition**

Indholdet af løbevalletørstof defineres som indholdet udtrykt i vægtprocent som bestemt ved den beskrevne fremgangsmåde.

4. Princip

Bestemmelse af indholdet af glycomakropeptid A, jf. bilag XVIII. Prøver, der giver et positivt resultat, analyseres for glycomakropeptid A (GMPA) ved højtryksvæskekromatografi med omvendt fase (HPLC-metoden). Vurdering af resultatet i forhold til standardprøver af skummetmælkspulver med og uden et kendt procentvist indhold af vallepulver. Resultater over 1 % (m/m) er tegn på, at der er løbevalletørstof til stede.

5. Reagenser

Alle reagenser skal være analyserene. Der anvendes destilleret vand eller vand af tilsvarende renhed. Acetonitril skal være af spektroskopisk kvalitet eller HPLC-kvalitet.

De reagenser, der er nødvendige for metoden, er beskrevet i bilag XVIII til nærværende forordning.

Reagenser til HPLC med omvendt fase.

5.1. Opløsning af trichloreddikesyre

240 g trichloreddikesyre (CCl_3COOH) opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml.

5.2. Elueringsvæske A og B

Elueringsvæske A: 150 ml acetonitril (CH_3CN), 20 ml isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) og 1,00 ml trifluoreddikesyre (TFA, CF_3COOH) blandes i en 1 000 ml målekolbe. Der fyldes op med vand til 1 000 ml. Elueringsvæske B: 550 ml acetonitril, 20 ml isopropanol og 1,00 ml TFA blandes i en 1 000 ml målekolbe. Der fyldes op med vand til 1 000 ml. Før brugen filtreres elueringsvæsken gennem et membranfilter med porestørrelse på 0,45 mikrometer (μm).

5.3. Opbevaring af kolonnen

Efter analyserne skylles kolonnen med elueringsvæske B (under anvendelse af en gradient), og derefter skylles den med acetonitril (under anvendelse af en gradient i 30 minutter). Kolonnen opbevares i acetonitril.

5.4. Standardprøver

- 5.4.1. Skummetmælkspulver, der opfylder kravene til offentlig oplagring, benævnt (0).
- 5.4.2. Samme skummetmælkspulver tilsat 5 % (v/v) løbevallepulver med normal sammensætning, benævnt (5).
- 5.4.3. Samme skummetmælkspulver tilsat 50 % (m/m) løbevallepulver med normal sammensætning, benævnt (50).

6. Apparat

Det apparatur, der er nødvendigt for metoden, er beskrevet i bilag XVIII til nærværende forordning.

6.1.1. Analysevægt.

- 6.2. Centrifuge, der kan præstere en centrifugalkraft på 2 200 g, med tilhørende lukkede centrifugeglas på ca. 50 ml.

- 6.3. Mekanisk omrører, der er udrustet til omrøring ved 50 °C.
- 6.4. Magnetomrører.
- 6.5. Glastragte med diameter på ca. 7 cm.
- 6.6. Filtrerpapir, mellemfint, med diameter på ca. 12,5 cm.
- 6.7. Filtreringsudstyr af glas med tilhørende membranfiltre med porestørrelse 0,45 µm.
- 6.8. Målepipette på 10 ml (ISO 648, klasse A, eller ISO/R 835) eller et system, som muliggør gennemløb af 10,0 ml på 2 min.
- 6.9. Termostatstyret vandbad indstillet på $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. HPLC-udstyr bestående af:
 - 6.10.1. Binært gradientpumpesystem
 - 6.10.2. Manuel eller automatisk injektionsenhed på 100 mikroliter (µl).
 - 6.10.3. En Dupont Protein Plus kolonne (længde: 25 cm, indvendig diameter: 0,46 cm) eller en tilsvarende bredporet siliciumbaseret kolonne med omvendt fase.
 - 6.10.4. Termostatstyret kolonneovn indstillet på 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5. UV-detektor med variabel bølgelængde, hvormed der ved 210 nm kan måles med en følsomhed på 0,02 Å (om nødvendigt kan en større bølgelængde på op til 220 nm benyttes).
 - 6.10.6. Integrator, der kan integrere over de enkelte toppe.

Bemærkning

Der kan arbejdes med kolonnen ved stuetemperatur, hvis stuetemperaturen ikke svinger med mere end 1 °C. I modsat fald vil der være for stor variation i retentionstiden for GMP_A .

7. Prøveudtagning

- 7.1. Prøveudtagningen sker efter metoden i den internationale standard ISO 707. Medlemsstaterne kan dog anvende en anden metode til prøveudtagning, hvis den følger principperne i ovennævnte standard.
- 7.2. Stikprøven opbevares under sådanne forhold, at der hverken kan ske ødelæggelse eller ændring af sammensætningen.

8. Fremgangsmåde

8.1. Forberedelse af prøven

Pulveret overføres til en beholder, der er cirka dobbelt så stor som pulverets volumen, og som har et lufttæt låg. Beholderen lukkes straks. Mælkepulveret blandes omhyggeligt ved, at beholderen vendes flere gange rundt.

8.2. Prøveportion

I et centrifugeglas (6.2) eller en tilproppet kolbe (50 ml) afvejes $2,0 \pm 0,001$ g analyseprøve.

8.3. Fjernelse af fedtstoffer og proteiner

- 8.3.1. Der sættes 20,0 g 50 °C varmt vand til analyseprøven. Pulveret opløses ved omrøring med omrøreren (6.3) i 5 minutter eller i 30 minutter, såfremt det drejer sig om kærnemælk fra syrnet fløde. Reagensglasset anbringes i vandbadet (6.9), og det afventes, at der indtræder en ligevægt ved 25 °C.
- 8.3.2. I løbet af 2 minutter tilsættes med konstant hastighed 10 ml trichloreddikesyreopløsning på 25 °C (5.1) under kraftig omrøring med magnetomrøreren (6.4). Glasset anbringes i vandbadet (6.9), hvori det henstår i 60 minutter.
- 8.3.3. Der centrifugeres (6.2) ved 2 200 g i 10 minutter eller filtreres gennem papirfilter (6.6), idet de første 5 ml filtrat bortkastes.

8.4. Kromatografisk bestemmelse

- 8.4.1. Der foretages en HPLC-analyse som beskrevet i bilag XVIII. Hvis der opnås et negativt resultat, indeholder den analyserede prøve ikke løbevalle i påviselige mængder. Hvis der opnås et positivt resultat, må den nedenfor beskrevne HPLC-metode med omvendt fase anvendes. Tilstedeværelse af syrnet kærnemælkspulver kan give anledning til falske positive resultater. HPLC-metoden med omvendt fase udelukker denne mulighed.

- 8.4.2. Før HPLC-analysen med omvendt fase gennemføres, må gradientbetingelserne optimeres. En retentionstid på 26 minutter $\pm$ 2 minutter for GMP er optimal for gradientsystemer med et dødvolume på ca. 6 ml (volumenet fra det punkt, hvor opløsningerne blandes, til det punkt, hvor injektionssløjfen slutter). For gradientsystemer med et mindre dødvolume (f.eks. 2 ml) bruges 22 minutter som optimal retentionstid.

Der anvendes opløsninger af standardprøverne (5.4) uden og med 50 % løbevalle.

Af centrifugatet eller filtratet (8.3.3) indsprøjtes 100 μ l i HPLC-apparatet under anvendelse af de kontrolgradientvilkår, der fremgår af tabel 1.

Tabel 1

Kontrolgradientvilkår for optimering af kromatografien

Tid (min.)	Gennemstrømning (ml/min.)	% A	% B	Kurve
Init	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

Sammenligning af de to kromatogrammer vil vise beliggenheden af toppen af GMP_A.

Ved anvendelse af nedenstående formel kan den oprindelige sammensætning af den opløsning, der skal bruges til den normale gradient (se 8.4.3), beregnes

$$\% B = 10 - 2.5 + (13.5 + RT_{\text{GMP}_A} - 26)/6 * 30/27$$

$$\% B = 7,5 + (13.5 + RT_{\text{GMP}_A} - 26)/6 * 1.11$$

hvor:

RT_{GMP_A}: retentionstiden for GMP_A ved anvendelse af kontrolgradienten

10: den oprindelige % B af kontrolgradienten

2.5: % B midtvejs minus % B ved begyndelsen ved anvendelse af den

13.5: midtvejspunkt for kontrolgradienten

26: den krævede retentionstid for GMP_A

6: hældningskoefficient for kontrolgradienten og den normale gradient

30: % B på begyndelsestidspunktet minus % B efter 27 minutter ved anvendelse af kontrolgradienten

27: varighed for kontrolgradienten.

- 8.4.3. Der udtages opløsninger af analyseprøverne.

Af centrifugatet eller filtratet (8.3.3) indsprøjtes en nøjagtigt afmålt mængde på 100 μ l i HPLC-apparatet under en elueringshastighed på 1,0 ml pr. minut (5.2).

Sammensætningen af elueringsvæsken ved analysens begyndelse opnås fra 8.4.2. Den er normalt tæt på A:B = 76:24 (5.2). Umiddelbart efter indsprøjtningen startes en lineær gradient, således at B bliver 5 % højere efter 27 minutter. Derefter startes en lineær gradient, hvorved elueringsvæskens indhold af B kommer op på 90 % i løbet af 5 minutter. Denne sammensætning opretholdes i 5 minutter, hvorefter sammensætningen i løbet af 5 minutter ændres ved hjælp af en lineær gradient til den oprindelige sammensætning. Afhængigt af pumpe-systemets indre volumen kan den næste indsprøjtning foretages 15 minutter efter de oprindelige betingelser.

Bemærkninger

- Retentionstiden for glycomakropeptid bør være 26 minutter $\pm$ 2 minutter. Dette kan opnås ved at ændre begyndelses- og slutbetingelserne for den første gradient. Imidlertid skal forskellen i % B for begyndelses- og slutbetingelserne for den første gradient fortsat være 5 % B.
- Elueringsvæskerne må afgasses tilstrækkeligt og skal forblive afgassede. Dette er vigtigt for gradientpumpe-systemets tilfredsstillende virkning. Standardafvigelsen for retentionstiden for GMP-toppen skal være på under 0,1 min. (n = 10).
- Efter hver femte prøve skal referenceprøven (5) indsprøjtes og benyttes til beregning af en ny kalibreringsfaktor R (9.1.1).

- 8.4.4. Resultaterne af kromatograferingen af analyseprøven [E] foreligger i form af et kromatogram, hvor GMP-toppen identificeres ved sin retentionstid på ca. 26 minutter.

Integratoren (6.10.6) måler automatisk GMP-toppens højde H. Basislinjens beliggenhed skal kontrolleres for hvert kromatogram. Analysen eller integrationen skal gentages, hvis basislinjens beliggenhed ikke er korrekt.

For at afsløre eventuelle afvigelser enten som følge af, at apparaturet eller kolonnen ikke har fungeret tilfredsstillende, eller på grund af den analyserede prøves oprindelse eller art, må alle kromatogrammer bedømmes visuelt før en kvantitativ tolkning påbegyndes. I tvivlstilfælde gentages analysen.

8.5. Kalibrering

- 8.5.1. Med standardprøverne (5.4.1 og 5.4.2) følges den i punkt 8.2 til 8.4.4 beskrevne fremgangsmåde nøje. Der benyttes frisk fremstillede opløsninger, da GMP nedbrydes i 8 % trichloreddikesyreopløsning ved stuetemperatur. Ved 4 °C forbliver opløsningen stabil i 24 timer. Skal der foretages en lang række analyser, er det ønskeligt at anvende en kølet prøvebakke i den automatiske injektor.

Bemærkning

8.4.2 kan udelades, hvis % B på begyndelsesbetingelserne er kendt fra tidligere analyser.

Kromatogrammet for referenceprøven (5) skal svare til figur 1. På denne figur er der inden GMP_A-toppen to små toppe. Det er vigtigt at opnå en lignende separation.

- 8.5.2. Før den kromatografiske bestemmelse af prøverne indsprøjtes 100 µl af standardprøven uden løbevalle [0] (5.4.1).

Kromatogrammet må ikke indeholde nogen top ved retentionstiden for GMP_A-toppen.

- 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:

GMP-toppen: $R = W/H$

hvor:

R = kalibreringsfaktoren for GMP-toppen

H = højden af GMP-toppen

W = mængden af valle i standardprøven (5).

- 9.2. Beregning af det procentvise indhold af løbevallepulver i prøven

$W[E] = R \times H[E]$

Hvor:

W[E] = indholdet af løbevalle i prøven [E], i % m/m

R = kalibreringsfaktoren for GMP-toppen (9.1.1)

H[E] = højden af GMP-toppen af prøven [E].

Hvis W[E] er større end 1 % og forskellen mellem retentionstiden og retentionstiden for standardprøven (5) er mindre end 0,2 min., er der løbevalletørstof til stede.

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 % m/m.

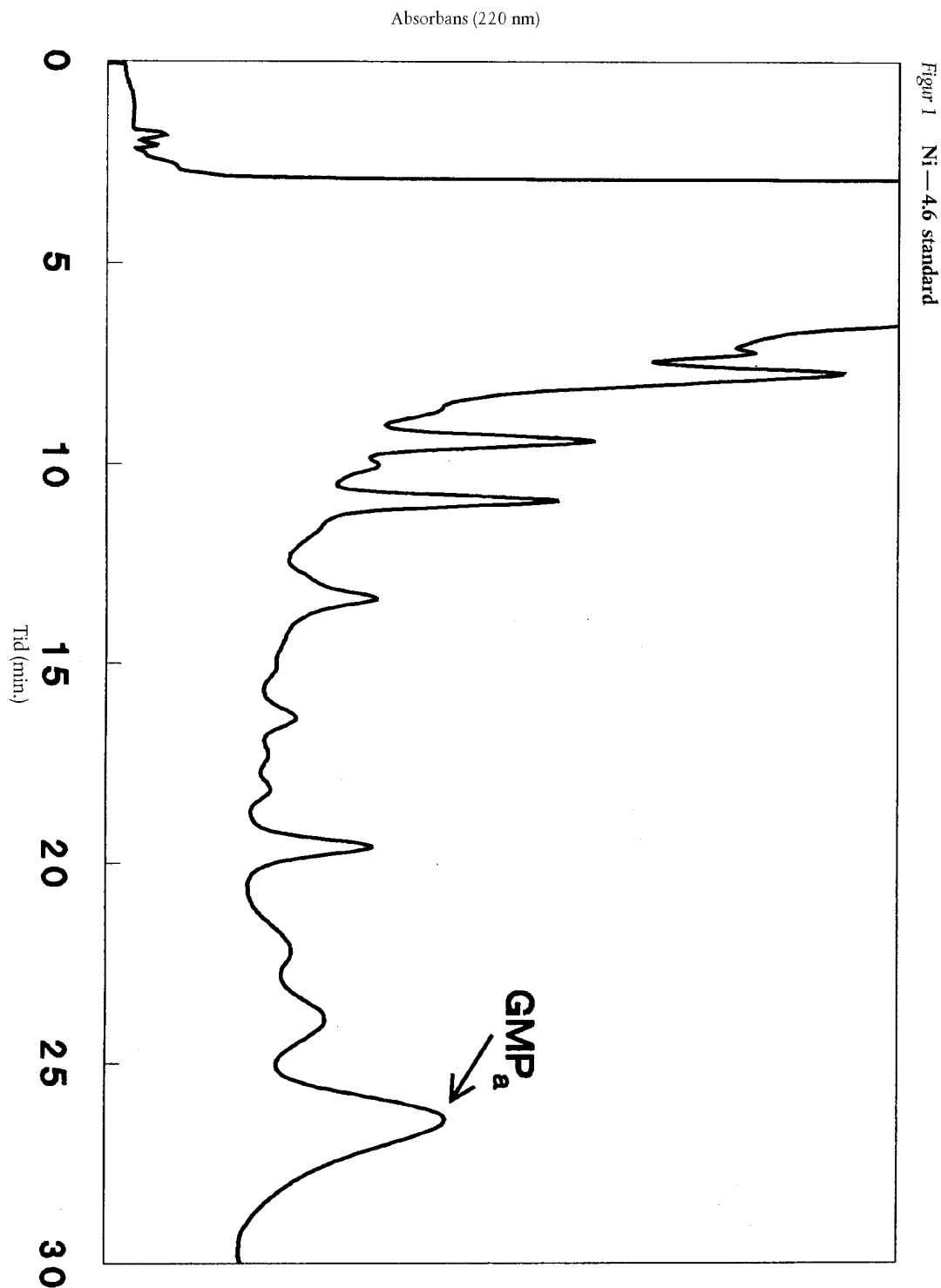
9.3.2. Reproducerbarhed
Endnu ikke fastlagt.

9.3.3. Linearitet

For mellem 0 og 16 % løbevalle skal der opnås en lineær sammenhæng med en korrelationskoefficient $> 0,99$.

9.4. Fortolkning

9.4.1. Prøven anses for at indeholde valle, hvis resultatet fra 9.2 ligger over 1 % m/m, og retentionstiden for GMP-toppen afgiver mindre end 0,2 minutter fra retentionstiden for standardprøven (5). Grænsen på 1 % er fastsat i overensstemmelse med bestemmelserne i forordning (EØF) nr. 625/78, bilag V, punkt 9.2 og 9.4.1.



BILAG XX

(Artikel 14)

SKUMMETMÆLKSPULVER: BESTEMMELSE AF PHOSPHATIDYLSEIN- OG PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN-INDHOLD**HPLC-metode i omvendt fase****1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode er en procedure for kvantitativ bestemmelse af phosphatidylserin (PS) og phosphatidylethanolamin (PE) i skummetmælkspulver (SMP) og egner sig til påvisning af kærnemælksklumper i SMP.

2. Definition

Indhold af PS + PE: massefordelingen af stof bestemt ved anvendelse af denne 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

NB: 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 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. Apparat****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 µl
- 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 (C 18) med en partikelstørrelse på 5 µm.

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 tryptaminconcentration.

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 µl 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 prøveglass (5.10).

NB: 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 µl (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.

NB: Standardanalyseopløsningen skal opbevares ved 4 °C indtil HPLC-analysen.

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 µl 2-mercaptoethanol (4.3.3) med en sprøjte (5.7).

NB: Derivateringsreagenset skal opbevares ved 4 °C i en mørk flaske. Det er holdbart i en uge.

7.5. HPLC-bestemmelse

7.5.1. Elueringsvæsker (4.4)

Væske A:

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

Væske B:

methanol

7.5.2. Foreslået elueringsgradient:

Tid (minut)	Væske A (%)	Væske B (%)	Gennemstrømningshastighed (ml/minut)
Start	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

NB: 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 foretages en blindprøve ved injektion af methanol (4.2.1).

NB: 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

7.5.6. 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.

NB: 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 analyseprøveopløsningen (7.2)

T₁ = topareal af tryptamin i standardprøveopløsningen (7.3)

T₂ = topareal af tryptamin i analyseprøveopløsningen (7.2).

9. Præcision

NB: Værdierne for repeterbarhed blev beregnet efter den internationale IDF-standard ⁽¹⁾. Den foreløbige reproducerbarhedsgrænse er beregnet efter bilag III, punkt b).

9.1. Repeterbarhed

Den relative standardafvigelse for repeterbarheden, som er et udtryk for variationen i uafhængige analyseresultater, der er opnået af samme laborant under anvendelse af samme apparatur på samme betingelser på samme analyseprøve inden for et kort tidsinterval, må 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.

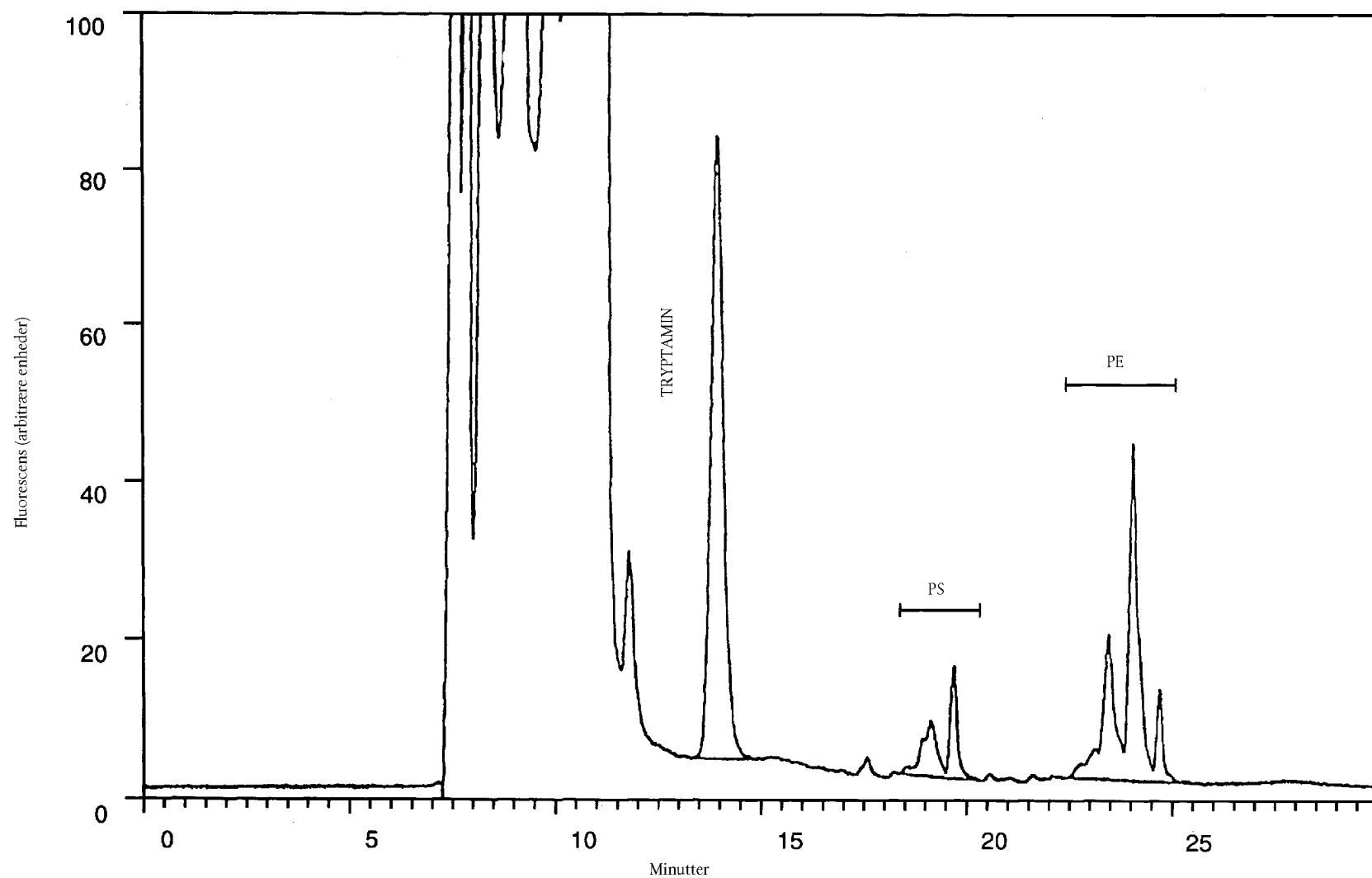
9.2. Reproducerbarhed

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

10. Bibliografi

- 10.1. P. Resmini, L. Pellegrino, J. A. Hogenboom, V. Sadini, M. Rampilli: »Detection of buttermilk solids in skimmed milk 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 XXI

(Artikel 15)

BESTEMMELSE AF RESTER AF ANTIBIOTIKA OG SULFONAMID/DAPSON I SKUMMETMÆLKSPULVER

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. l mælk og 100 µg sulfadimidin pr. l 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.

BILAG XXII

(Arikel 16)

KVANTITATIV BESTEMMELSE AF SKUMMETMÆLKSPULVER I FODERBLANDINGER VED ENZYMATISK KOAGULATION AF PARA-KASEIN**1. Formål**

Kvantitativ bedømmelse af skummetmælkspulver i foderblandinger ved koagulering af para-kaseinet ved hjælp af løbe-enzymet.

2. Anvendelsesområde

Denne metode anvendes ved analyse af foderblandinger, som indeholder mindst 10 % skummetmælkspulver. Tilstedeværelsen af store mængder kærnemælkspulver og/eller visse ikke-mælkeproteiner kan forårsage interferens.

3. Princip

- 3.1. Kaseinet i foderblandingen opløses ved ekstraktion med en natriumcitratopløsning.
- 3.2. Calciumionkoncentrationen justeres til det niveau, der er nødvendigt for udfældningen af para-kasein; ved tilsætning af løbe omdannes kaseinet til para-kasein.
- 3.3. Kvælstofindholdet i det udfældede para-kasein bestemmes ved hjælp af Kjeldahl-metoden, som er beskrevet i IDF 20A 1986, og resultatet beregnes på basis af et mindsteindhold på 27,5 % kasein i skummetmælkspulver.

4. Reagenser

Der anvendes reagenser af analysekvalitet. Vandet skal enten være destilleret eller af tilsvarende renhed. Alle anvendte reagenser og opløsninger skal være fri for kvælstof, med undtagelse af løbe-enzymet (4.5).

- 4.1. Trinatriumcitrat 2-hydrat (1 % vægt/vol.-opløsning).
- 4.2. Calciumklorid (2M-opløsning). 20,018 g CaCO_3 (analysekvalitet) afvejes i en porcelænsskål af passende størrelse (150 til 200 ml) eller et bægerglas. Der tilsættes destilleret vand, indtil pulveret er dækket, og der opvarmes på kogende vandbad. Der tilsættes langsomt 50 til 60 ml HCl-opløsning (koncentreret saltsyre: vand = 1:1), indtil karbonatet er fuldstændigt opløst. Opløsningen henstår på det kogende vandbad, indtil udfældningen af CaCl_2 har fundet sted, hvorved det overskydende HCl fjernes. Opløsningen overføres til en 100 ml målekolbe med destilleret vand, og der fyldes op til mærket. pH kontrolleres og må ikke være under 4,0. Opløsningen opbevares i køleskab.
- 4.3. 0,1 N natriumhydroxid.
- 4.4. 0,1 N saltsyre.
- 4.5. Opløsning af kalve-løbe 1:10 000. Opbevares i køleskab ved 4-6 °C.
- 4.6. Reagenser til bestemmelse af kvælstofindholdet som anført for Kjeldahl-metoden i IDF 20A 1986.

5. Apparatur

Sædvanligt laboratorieudstyr og især:

- 5.1. Morter eller mølle
- 5.2. Analysevægt
- 5.3. Bordcentrifuge (2 000 til 3 000 omdr./min.), udstyret med centrifugerør på 50 ml.
- 5.4. Magnetomrører med magnetpinde på 10 til 15 mm
- 5.5. 150-200 ml bægerglas
- 5.6. 250 ml til 500 ml-erlenmeyerkolber
- 5.7. Glastragte med en diameter på 60 til 80 mm
- 5.8. Hurtigfiltrerende askefri rundfiltre med en diameter på 150 mm (S.S. 589² S.S. 595 1/2)
- 5.9. Pipetter af forskellig størrelse

- 5.10. Termostatreguleret vandbad indstillet på 37 °C.
- 5.11. pH-meter
- 5.12. Kjeldahl-apparatur
- 5.13. 25 ml burette
- 5.14. Plastiksprøjteflaske til destilleret vand
- 5.15. Rustfri stålspatel.
- 5.16. Termometer
- 5.17. Varmeskab med temperaturregulering.

6. Udførelse

- 6.1. Tilberedning af prøven
 - 10 til 20 g af prøven formales i morter eller mølle for at opnå en homogen blanding.
- 6.2. Opløsning af mælkepulveret og udskillelse af det uopløselige bundfald.
 - 6.2.1. $1,000 \pm 0,002$ g af den homogeniserede foderblanding (6.1) afvejes direkte i et 50 ml-centrifugerør. Der tilsættes 30 ml trinatriumcitratopløsning (4.1), som i forvejen er opvarmet til 45 °C og omrøres i mindst 5 min. på magnetomrører
 - 6.2.2. Der centrifugeres 500 g ved 2 000 til 3 000 omdr./min. i 10 min. hvorefter den klare, vandige opløsning dekanteres over i et 150 til 200 ml bægerglas. Undgå at overføre uopløselige partikler fra bunden af centrifugerøret.
 - 6.2.3. Det foretages yderligere to ekstraktioner på bundfaldet med samme fremgangsmåde, og hver gang dekanteres der oven i den første opløsning.
 - 6.2.4. Dersom der viser sig et lag af fedtstof på overfladen af den opsamlede dekanterede opløsning, anbringes opløsningen i køleskab, indtil fedtet er størket, fjernes derefter ved hjælp af en spatel.
- 6.3. Koagulering af kaseinet ved hjælp af løbe-enzymet.
 - 6.3.1. 3,4 ml mættet (calciumchlorid (4.2) tilsættes; justeres dråbevis under omrøring til den samlede opløsning (ca. 100 ml). pH-værdien justeres til 6,4-6,5 ved tilsætning af fortyndede opløsninger af natriumhydroxid (4.3) eller saltsyre (4.4). Opløsningen sættes i et termostatreguleret vandbad ved 37 °C i 15 til 20 min. for at opnå saltbalance. Dette viser sig ved, at opløsningen bliver mælkehvid.
 - 6.3.2. Væsken overføres til et (eller to) centrifugeglas, og bundfaldet fjernes ved centrifugering ved 2 000 g i 10 minutter. Centrifugatet overføres til et (eller to) centrifugeglas, uden at bundfaldet vaskes.
 - 6.3.3. Centrifugatet opvarmes atter til 37 °C. Under omrøring tilsættes der dråbevis 0,5 ml kalveløbeopløsning (4.5) til ekstraktet. Koaguleringen indtræder i løbet af 1 til 2 minutter.
 - 6.3.4. Prøven anbringes igen på vandbadet og henstår ved 37 °C i 15 minutter. Prøven fjernes fra vandbadet, og koaglet skilles ved omrøring. Der centrifugeres ved 2 000 g i 10 minutter. Centrifugatet filtreres gennem et passende papirfilter ⁽¹⁾, Whatman nr. 541 eller tilsvarende, som gemmes. Bundfaldet i centrifugeglasset vaskes med 50 ml ca. 35 °C varmt vand under omrøring.

Der centrifugeres igen ved 2 000 g i 10 minutter. Centrifugatet filtreres igennem det samme filter, som er benyttet ovenfor.
- 6.4. Bestemmelse af kvælstof.
 - 6.4.1. Efter vaskning overføres bundfaldet kvantitativt til det i punkt 6.3.4 omhandlede filter med destilleret vand. Filteret anbringes i en Kjeldahl-kolbe. Kvælstofindholdet bestemmes ved Kjeldahl-metoden, som beskrevet i IDF 20A 1986.

7. Blindbestemmelse

- 7.1. Der foretages regelmæssig en blindbestemmelse på et askefrit filter (5.8), der er fugtet med en blanding af 90 ml natriumcitratopløsning (4.1), 1 ml mættet calciumkloridopløsning (4.2), 0,5 ml flydende løbe (4.5) og derefter vaskes med 3×15 ml vand, inden det destrueres ifølge Kjeldahl-metoden som anført i IDF 20A 1986.
- 7.2. Forbruget af syre ved titreringen af blindprøven fratrækkes den mængde (4.4), der er anvendt ved titrering af prøven.

⁽¹⁾ Der skal anvendes hurtigfiltrerende askefrit papir.

8. Kontrollforsøg

- 8.1. Til kontrol af analyse og reagenser foretages en bestemmelse på basis af en standardfoderblanding, hvis indhold af skummetmælkspulver er bestemt ved en collaborativ analyse. Gennemsnitsresultatet ved en dobbeltbestemmelse på standardfoderblandingen må ikke afvige mere end 1 % fra det resultat, der er fundet ved den collaborative analyse.

9. Beregning af resultaterne

- 9.1. Procenten af skummetmælkspulver i foderblandinger beregnes ved hjælp af følgende formel:

$$\% \text{ MMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) - 2,81}{0,908}$$

hvor N er det fundne indhold af para-kasein kvælstof i blandingen udtrykt i procent, medens 27,5 er en faktor til omregning af den fundne kaseinmængde til skummetmælkspulver, og 2,81 og 0,908 er korrektionsfaktorer fundet ved regressionsanalyse.

10. Metodens nøjagtighed**10.1. Repeterbarhed**

I mindst 95 % af de undersøgte tilfælde har den samme prøve analyseret af samme analytiker i samme laboratorium ved to bestemmelser ikke givet en større afvigelse end 2,3 g skummetmælkspulver pr. 100 g foderblanding.

10.2. Reproducerbarhed

I mindst 95 % af de undersøgte tilfælde har den samme prøve analyseret af to forskellige laboratorier ikke givet en større afvigelse end 6,5 g skummetmælkspulver pr. 100 g foderblanding.

11. Tolerance

CrD₉₅-værdien (kritisk difference; 95 % konfidensinterval) beregnes efter følgende formel (ISO 5725):

$$\text{CrD}_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

(R: reproducerbarhed; r: repeterbarhed)

Dobbeltbestemmelse: CrD₉₅ = 4,5 g

Hvis resultatet af den kemiske analyse ikke afviger med mere end 4,5 g (dobbelbestemmelse) fra det angivne indhold af skummetmælkspulver, anses partiet af foderblandingen at være i overensstemmelse med denne forordning.

12. Bemærkninger

- 12.1. Tilstedeværelse af en stor procentdel af visse ikke-mælkeproteiner og specielt sojaprotein kan, for så vidt de er blevet opvarmet med mælkepulveret, medføre for høje resultater, fordi de udfældes sammen med para-kasein.
- 12.2. Tilstedeværelse af kærnemælkspulver kan undertiden medføre for lave resultater, da bestemmelsen kun omfatter den fedtfrie del af prøven. Tilstedeværelse af sur kærnemælk kan give meget lave resultater på grund af en ufuldstændig opløsning i citrat-koncentrationen.
- 12.3. Tilstedeværelse af mere end 0,5 % lecithin kan ligeledes medføre for lave resultater.
- 12.4. Foderblandinger med indhold af skummetmælkspulver, der har været opvarmet til høje temperaturer (high heat), kan give for høje resultater på grund af, at visse mælkeserumproteiner udfældes sammen med para-kaseinet.

BILAG XXIII

(Artikel 17)

KVALITATIV BESTEMMELSE AF STIVELSE I SKUMMETMÆLKSPULVER, DENATURERET MÆLKEPULVER OG FODERBLANDINGER**1. Anvendelsesområde**

Denne metode anvendes til påvisning af stivelse, der bruges som røbestof i denatureret mælkepulver.

Metodens påvisningsgrænse er ca. 0,05 g stivelse pr. 100 g prøve.

2. Princip

Der benyttes samme reaktion som ved jodometri:

- kollidernes binding af fri jod i vandig opløsning
- stivelsesmicellernes absorption og farvedannelse.

3. Reagenser**3.1. Jodopløsning**

- jod: 1 g
- kaliumjodid: 2 g
- destilleret vand: 100 ml.

4. Apparatur

- 4.1. Analysevægt
- 4.2. Vandbad
- 4.3. Reagensglas, 25 mm × 200 mm.

5. Udførelse

1 g af prøven afvejes og hældes på reagensglas (punkt 4.3).

Der tilsættes 20 ml destilleret vand, og glasset rystes, så vandet fordeler sig i prøven.

Glasset anbringes i kogende vandbad (punkt 4.2) og henstår i fem minutter.

Glasset tages op af vandbadet og afkøles ved rumtemperatur.

Der tilsættes 0,5 ml jodopløsning (punkt 3.1), glasset rystes, og farven iagttages.

6. Angivelse af resultaterne

Hvis indholdet farves blåt, viser det, at prøven indeholder naturlig stivelse.

Hvis prøven indeholder modificeret stivelse, må den ikke farves blå.

7. Bemærkninger

Farven, farvestyrken og stivelsens udseende under mikroskop varierer afhængigt af den naturlige stivelses oprindelse (f.eks. majs eller kartoffel), og hvilken type modificeret stivelse der findes i prøven.

Indeholder prøven modificeret stivelse, farves den violet, rød eller brun, alt efter i hvilken grad den naturlige stivelses krystallinske struktur er modificeret.

BILAG XXIV

(Artikel 18)

BESTEMMELSE AF VANDINDHOLDET I SYRNET KÆRNEMÆLKSPULVER

1. Anvendelsesområde

Bestemmelse af vandindholdet i syrnede kærnemælkspulver til foder.

2. Princip

Prøven tørres under vakuum. Massetabet bestemmes ved vejning.

3. Apparatur

3.1. Analysevægt

3.2. Tørre vejekar af korrosionsbestandigt metal eller glas med tætsluttende låg; nyttearealet skal være stort nok til, at prøven kan fordeles med ca. 0,6 g/cm².

3.3. Elektrisk opvarmet justerbart vakuumtørreskab med oliepumpe, som enten er forsynet med en anordning til tilførsel af tørret varmluft eller med et tørremiddel (f.eks. calciumoxid).

3.4. Ekssikkator med et effektivt tørremiddel.

3.5. Ventileret tørreskab med termostatregulering (ved 102 ± 2 °C).

4. Fremgangsmåde

Et vejekar (punkt 3.2) med låg opvarmes i tørreskabet (punkt 3.5) i mindst 1 time. Låget lægges på karret, som straks flyttes over i en ekssikkator (punkt 3.4), afkøles til rumtemperatur og vejes med 0,5 mg nøjagtighed.

Et vejekar (punkt 3.2) med låg vejes med 0,5 mg nøjagtighed. Ca. 5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i det tarerede kar og fordeles jævnt. Karret stilles uden låg ind i vakuumtørreskabet (punkt 3.3), som på forhånd er opvarmet til 83 °C. For at undgå at temperaturen i tørreskabet falder for meget, stilles karret ind så hurtigt som muligt.

Trykket indstilles til 100 torr (13,3 kPa), og prøven tørres i 4 timer ved dette tryk enten under tilførsel af varm, tør luft eller ved hjælp af et tørremiddel (ca. 300 g til 20 prøver). I sidstnævnte tilfælde afbrydes forbindelsen til vakuumpumpen, så snart det foreskrevne tryk er nået. Tørringstiden regnes fra det tidspunkt, hvor temperaturen i tørreskabet atter er nået op på 83 °C. Efter tørringstiden er udløbet, bringes vakuumtørreskabet forsigtigt op på atmosfærisk tryk. Efter åbning af vakuumtørreskabet lukkes karret straks med låget, tages ud af skabet, henstilles til afkøling i 30 til 45 minutter i ekssikkatoren (punkt 3.4) og vejes derefter med 1 mg nøjagtighed. Der tørres i yderligere 30 minutter i vakuumtørreskabet (punkt 3.3) ved 83 °C, og derefter vejes på ny. Forskellen mellem de to vejeresultater må ikke overstige 0,1 % vandindhold.

5. Beregning

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

hvor:

E = prøvens begyndelsesmasse i gram

m = den tørre prøves masse i gram.

6. Nøjagtighed**6.1. Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført inden for det kortest mulige tidsrum af den samme person med det samme apparatur på identisk prøvemateriale må ikke overstige 0,4 g vand/100 g syrnede kærnemælkspulver.

6.2. *Reproducerbarhed*

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført af forskellige personer i forskellige laboratorier med forskelligt apparatur på identisk prøvemateriale må ikke overstige 0,6 g vand/100 g syrnnet kærnemælkspulver.

6.3. *Kilde*

Nøjagtighedsdataene blev bestemt ud fra et forsøg, der blev udført i 1995, og som omfattede otte laboratorier og to prøver (seks blinde dobbeltanalyser).

BILAG XXV

(Artikel 19)

**REFERENCEMETODE TIL PÅVISNING AF FREMMEDE FEDTSTOFFER I MÆLKEFEDT VED GASKROMATO-
GRAFISK ANALYSE AF TRIGLYCERIDER — REVISION 1****1. Anvendelsesområde**

Denne standard fastsætter en metode til påvisning af fremmede fedtstoffer, såvel vegetabiliske som animalske og animalske som f.eks. oksetalg og svinefedt, i mælkefedtet fra mælk og mælkeprodukter ved gaskromatografisk analyse af triglycerider.

Ved brug af veldefinerede triglyceridformler påvises vegetabiliske og animalske fedtstoffer kvalitativt og kvantitativt i rent mælkefedt uanset fodrings- eller laktationsforholdene.

Note 1: Skønt smørsyre (C4), der udelukkende forekommer i mælkefedt, gør det muligt at foretage kvantitative skøn over lave til middelstore mængder af mælkefedt i vegetabiliske fedtstoffer, kan der næppe fremskaffes kvalitative og kvantitative oplysninger inden for området af tilsætning af indtil 20 % (vægtprocent) fremmed fedtstof til rent mælkefedt fordi C4 har et vidtspændende område, der går fra omkring 3,5 til 4,5 % (vægtprocent).

Note 2: Kvantitative resultater kan praktisk taget kun fås ved triglyceridanalyse, da vegetabiliske fedtstoffers sterolindhold er forskelligt alt efter produktions- og behandlingsbetingelser.

2. Definition

Fremmede fedtstoffer i mælkefedt: Ved fremmede fedtstoffer forstås i denne standard alle vegetabiliske og animalske fedtstoffer undtagen mælkefedt.

3. Princip

Efter ekstrahering af mælkefedtet fremstilles en stamopløsning. Triglyceriderne bestemmes fra denne opløsning gaskromatografisk på pakkede kolonner. Ved indsættelse af vægtprocenten af fedtmolekyler af forskellig størrelse (C24 til C54 kun lige numre) i triglyceridformlen påvises fremmede fedtstoffer kvalitativt eller de bestemmes kvantitativt.

Note: Ved den her beskrevne vurdering kan der benyttes gaskromatografi på en kapillarkolonne, hvis det sikres, at der opnås sammenlignelige resultater ⁽¹⁾.

4. Reagenser

Der skal anvendes kemikalier af analysekvalitet.

- 4.1. Bæregas: nitrogen, renhedsgrad 99,996 % eller derover.
- 4.2. Standardtriglycerider ⁽²⁾, mættede samt kolesterol til standardisering af standardmælkefedt efter punkt 6.5.4.
- 4.3. Methanol, vandfri.
- 4.4. n-hexan.
- 4.5. n-heptan.
- 4.6. Toluen.
- 4.7. Dimethylchlorsilanopløsning: 50 ml dimethylchlorsilan opløses i 283 ml toluen.
- 4.8. Forbrændningsgas: Hydrogen og syntetisk luft.
- 4.9. Stationær fase, 3 % OV-1 på 125/150 µm (100/120 mesh) GasChromQ ⁽³⁾.
- 4.10. 10 % kakaosmøropløsning.

5. Apparat

Normalt laboratorieapparat og navnlig følgende:

- 5.1. Højtemperaturgaskromatograf, der er egnet til temperaturer på mindst 400-450 °C, og som er forsynet med en flammeionisationsdetektor (FID) og konstantstrømsregulator for bæregassen. Forbrændingsgas: 30 ml/min. H₂, 270 ml/min. syntetisk luft.

⁽¹⁾ Egnede metoder er allerede beskrevet, jf. D. Precht and J. Molkentin: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. Chrompack News 416-17 (1993).

⁽²⁾ Egnede produkter kan fås i handelen.

⁽³⁾ Handelsnavne, f.eks. Extrelut, GasChromQ og Chrompack er eksempler på egnede produkter, der fås i handelen. Disse oplysninger tjener til, at brugeren let kan benytte standarden, men udgør ikke et krav til produktet. Partikelangivelsen er udtrykt i SI-enhed µm ifølge BS 410:1988 »British Standard Specification for test sieves«.

På grund af den høje bæregashastighed bør instrumentet gøre brug af en særligt bred »flamejet«.

Note: På grund af de høje temperaturer, der forekommer under triglyceridanalyser, skal glasindsatsen i FID eller injektorsystemet hyppigt rengøres.

Gaskromatografen skal være forsynet med septa, der kan modstå høje temperaturer, og som kan bruges hyppigt og grundlæggende viser meget lille blødning.

Note: Hertil egner sig (f.eks. Chromblue (tm) septa (Chrompack(2)).

Septa skal udskiftes med regelmæssige mellemrum (f.eks. efter omkring 100 injektioner, eller så snart adskillelsen forringes (jf. fig. 4)).

5.2. Kromatografikolonne:

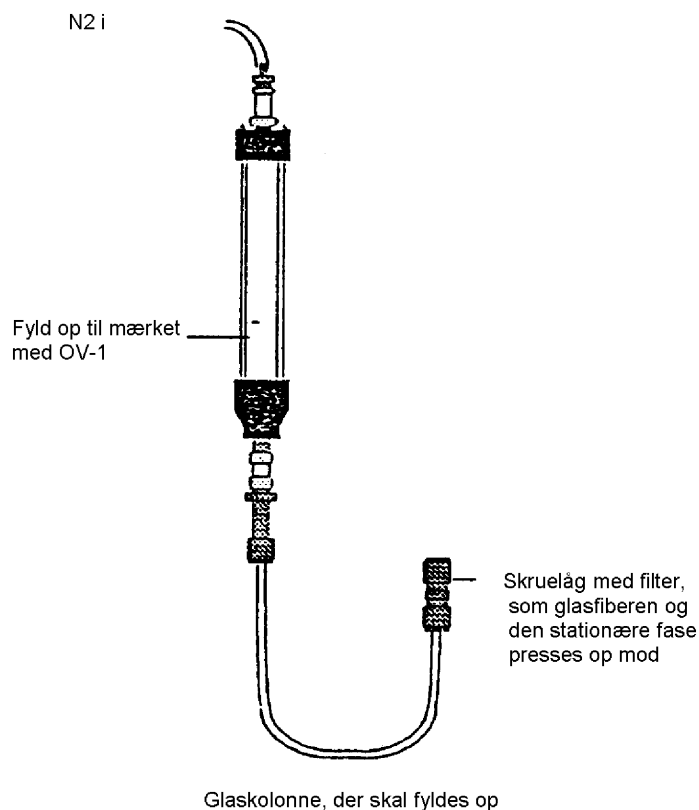
U-formet glaskolonne (2 mm i.d. 500 mm lang), som forinden silaniseres efter punkt 6.1 med dimethylchlorosilan for at deaktivere glasoverfladen.

Note: Egnet er tillige noget længere (800-2000 mm lange) pakkede kolonner. Med sådanne kolonner kan der opnås en noget bedre reproducerbarhed af resultaterne. Imidlertid opstår i den stationære fase lejlighedsvis revner efter en vis brug, som på deres side kan give ringere kvantitative resultater. Desuden slukkes FID-flammen let som følge af det anvendte yderst høje bæregasflow på 75-85 ml/min.

5.3. Fyldning af kolonnen (jf. fig. 1).

Figur 1

Opstilling til kolonnefyldning



- 5.3.1. Plastkolonne med påskruede endestykker og et mærke, der viser, hvortil den krævede mængde stationære fase kan påfyldes.
- 5.3.2. Finmasket si (mesh på ca. 100 µm) med skruelåg, der er egnet til at forsegle glaskolonnen som i fig.
- 5.3.3. Deaktiveret, silaneret glasuld.
- 5.3.4. Vibrator til hjælp ved pakning af kolonne.
- 5.4. 1-3 ml Extrelut-kolonne ⁽¹⁾ med silicagel. Denne kolonne kan også benyttes til ekstrahering for at fremskaffe mælkefedt.

⁽¹⁾ Jf. fodnote 3 s. 86.

- 5.5. Grafitferrule 6,4 mm (1/4") med 6 mm hul.
- 5.6. Udstyr til silanisering af kolonnens glasoverflade efter punkt 6.1.
 - 5.6.1. Woulff-flaske.
 - 5.6.2. Vandstrålepumpe.
- 5.7. Vandbad, justerbart til $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
- 5.8. Tørreskab, justerbart til $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ og $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
- 5.9. Mikroliterpipette.
- 5.10. 5 ml målpipette til dosering af 1,5 ml methanol.
- 5.11. 50 ml rundbundet kolbe.
- 5.12. Erlenmayer-kolbe, nominelt rumfang 50 ml.
- 5.13. Tragt.
- 5.14. Finporet filter.
- 5.15. Rotationsfordamper.
- 5.16. Prøveglas, nominelt rumfang 1 ml, der kan forsegles med et aluminiumslåg, med indvendigt septum.
- 5.17. Injektionssprøjte; den benyttede sprøjtes stempel må ikke trænge ind i kanylespidsen.

Note: Sådanne sprøjter gør det muligt at opnå en bedre reproducerbarhed af resultaterne.

For at undgå forringelse af septum bør kanylespidsen regelmæssigt kontrolleres (f.eks. med et stereomikroskop).

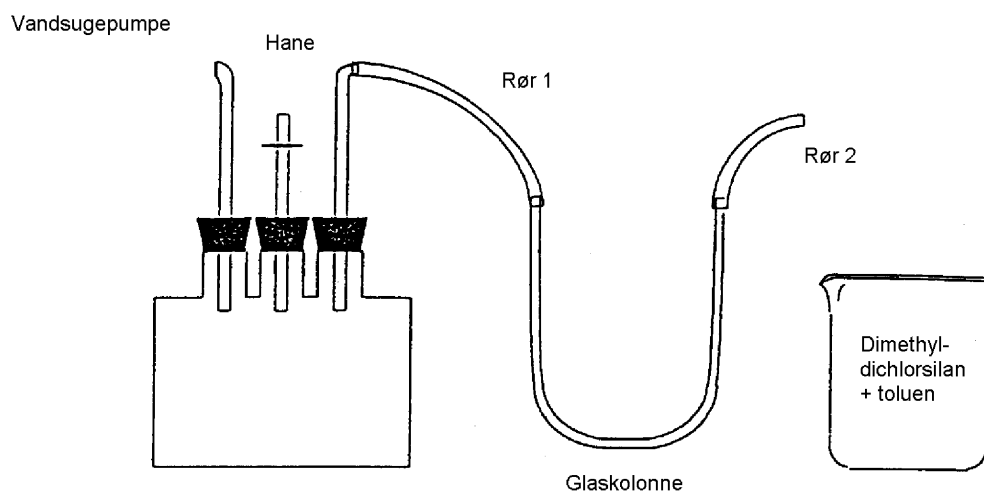
6. Metodik

6.1. Forberedelse af kolonnen (silanisering):

Efter at Woulff-flasken, jf. fig. 2, er forbundet med vandstrålepumpen, dyppes slang 2 ned i opløsningen efter punkt 4.7. Ved aflukning af hanen er kolonnen fyldt. Derefter fjernes de to slanger.

Figur 2

Opstilling til silanisering



Kolonnen fastgøres på et stativ og fyldes helt op med dimethyldichlorosilanopløsningen ved hjælp af en pipette.

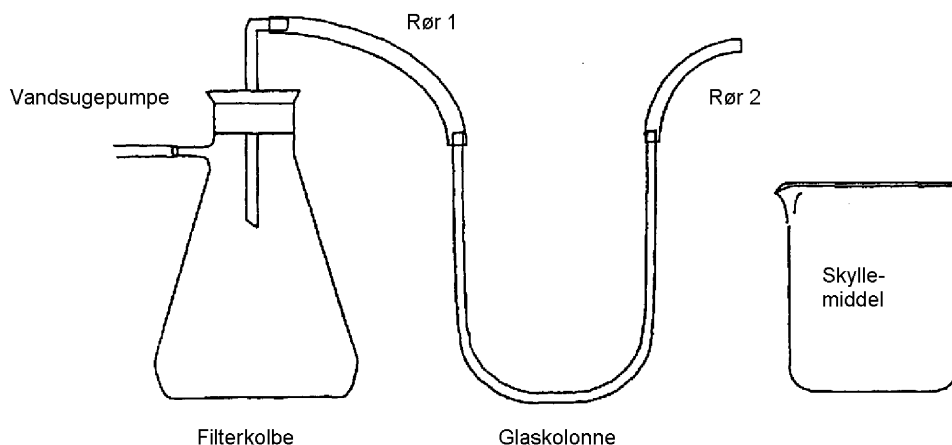
Efter 20-30 min. skiftes Woulff-flasken ud med en sugokolbe ved at forbinde den med vandstrålepumpen (jf. fig. 3).

6.2. Kolonnefyldning:

Herefter gennemskyldes kolonnen successivt med 75 ml toluen og 50 ml methanol; den tømte kolonne tørres i tørreskabet ved 100 °C i ca. 30 min.

Figur 3

Opstilling til gennemskyldning



Til kolonnefyldningen benyttes opstillingen som vist i fig. 1. Den stationære fase efter punkt 4.9 fyldes i plastkolonnen op til mærket.

Den nederste ende af den glaskolonne, som skal fyldes, forsegles med en ca. 1 cm lang tot glasuld, der på forhånd er silaniseret, og som presses ind med en stålstang. Kolonnens ende lukkes derefter med sien efter punkt 5.3.2.

Kolonnen fyldes med den stationære fase under tryk (3 bar, med N₂). For at få en ensartet, sammenhængende og fast pakning føres en vibrator op og ned i glaskolonnen under fyldningen. Efter fyldningen presses en massiv tot silaniseret glasuld ind i den anden ende af den pakkede kolonne; de ender, der rager frem, afskæres, og glasuldstøtten presses nogle få millimeter ind i kolonnen med en spatel.

6.3. Forbehandling af prøver:

En af følgende tre metoder benyttes til forbehandling af prøver:

6.3.1. Isolering af mælkefedtet fra smør.

5-10 g smør smeltes i en egnet beholder i vandbad efter punkt 5.7 ved 50 °C.

En 50 ml Erlenmeyer-kolbe og en tragt med filterindsats efter punkt 5.14 opvarmes i tørreskabet til 50 °C. Fedtfasen filtreres ved brug af det forhåndenværende udstyr.

Et sådant mælkefedt er så godt som fri for fosfolipider.

6.3.2. Ekstrahering af fedtfraktionen efter Rose-Gottliebmetoden.

Ekstrahering foretages efter IDF-standard 1C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 eller 22B: 1987.

Med et sådant mælkefedt gør fosfolipiderne det muligt at opnå en kolesteroltop, der øges med ca. 0,1 %.

Triglyceridspektret standardiseret til 100 med kolesterol bliver derved kun påvirket i uvæsentligt omfang.

6.3.3. Ekstrahering fra mælk ved brug af silicakolonner.

0,7 ml af en mælkeprøve lunet til 20 °C påføres en 1-3 ml Extrelut-kolonne med mikroliterpipette efter punkt 5.4, og man lader den fordele sig ensartet på silicagelen i ca. 5 min.

Til denaturering af proteinlipidkomplekser tilsættes der med pipette 1,5 ml methanol. Derefter ekstraheres prøven med 20 ml n-hexan; n-hexanen tilsættes langsomt i små mængder, og opløsningsmidlet samles i en 50 ml rundbundet kolbe, som er tørret til en konstant, kendt vægt.

Efter ekstrahering henstår kolonnen til afdrypning, indtil den er tom.

Opløsningsmidlerne afdampes fra eluatet på en rotationsfordamper ved en vandbadstemperatur på 40-50 °C.

Kolben tørres, og fedtmængden bestemmes ved vejning.

Note: Fedtekstraheringer ifølge Gerber, Wibull-Berntrop, Schmid-Bondsinsky-Ratzlaff eller isolering af mælkefedt ved brug af detergenter (BDI-metode) er ikke egnet til triglyceridanalyse, da mere eller mindre store mængder partielle glycerider eller fosfolipider kan medgå i fedtfasen.

6.4. Fremstilling af prøveopløsningen.

Til gaskromatografi bruges der en 5 %-opløsning af fedtstoffet i n-heptan som fremstillet efter punkt 6.3. Til tilberedelse af denne prøveopløsning afvejes tilsvarende mængder af prøvematerialet fremstillet efter punkt 6.3.1 og 6.3.2 og opløses i tilsvarende mængder n-heptan.

For prøver forbehandlet efter punkt 6.3.3 beregnes den mængde n-heptan, der skal tilsættes til prøvematerialet i kolben, ved vejning, og det resterende opløses heri.

Ca. 1 ml af prøveopløsningen fyldes i et prøveglas, jf. punkt 5.16.

6.5. Kromatografisk triglyceridanalyse.

Med så høje temperaturer som op til 350 °C til eluering af de langkædede triglycerider C52 til C56 sker det nemt, at basislinjen stiger, især hvis kolonnerne ikke er blevet tilstrækkeligt konditioneret fra starten. Basislinjens drift ved høje temperaturer kan fuldstændigt undgås enten ved kombineret af to kolonner eller ved basislinjesubtraktion.

Ved kompensationsmetode eller arbejde med enkeltkolonner skal der tillige for glasindsatserne i injektoren og i detektoren anvendes grafitferruler, jf. punkt 5.5.

6.5.1. Basislinjekorrektion.

For at undgå, at basislinjen stiger, benyttes en af følgende fire metoder:

6.5.1.1. Kombineret af kolonner.

Der anvendes to pakkede kolonner efter kompensationsmetoden.

6.5.1.2. Basislinjekorrektion ved gaskromatografi.

Ved at lade gaskromatografen køre en enkelt gang uden injektion af fedtopløsning og efterfølgende subtraktion af den målte basislinje kan det undgås, at basislinjen stiger.

6.5.1.3. Basislinjekorrektion ved integrationsprogrammel.

Ved at lade integrationssystemet køre en enkelt gang uden injektion af fedtopløsning og efterfølgende subtraktion af den målte basislinje kan det undgås, at basislinjen stiger.

6.5.1.4. Basislinjekorrektion ved passende konditionering.

Ved tilstrækkelig initialkonditionering af kolonnen og en snes injektioner med mælkefedtopløsninger er basislinjens drift ved høje temperaturer hyppigt så lille, at basislinjekorrektioner ikke er nødvendige.

6.5.2. Injektionsteknik.

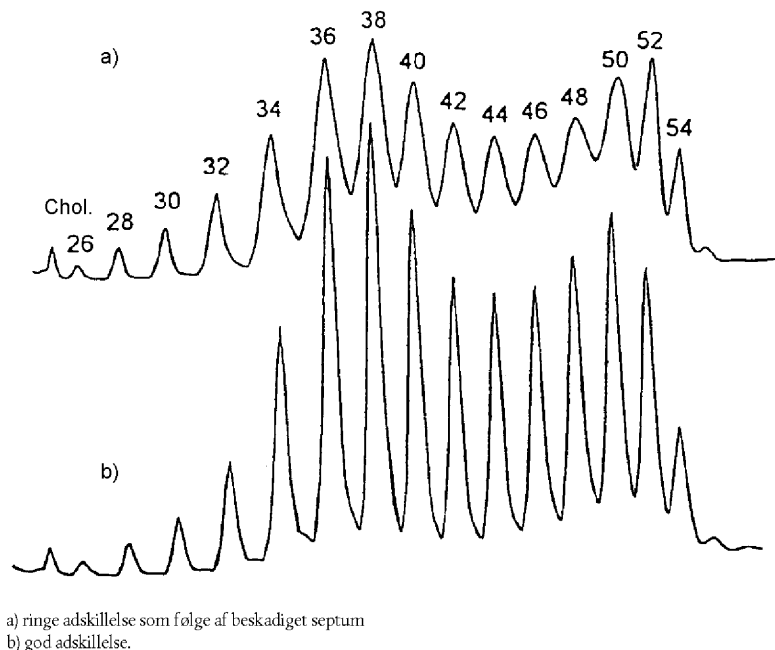
For at undgå fraktionering benyttes der »hot injection«, hvorved der opnås bedre kvantitative resultater med de højt kogende triglyceridkomponenter. Fedtopløsningen trækkes op i sprøjten, og den kolde sprøjtekanyle opvarmes inden injektionen ca. 3 sek. i injektorblokken. Derefter injiceres sprøjtens indhold meget hurtigt.

Note: Med denne injektionsteknik nedsættes risikoen for fraktioneringsfænomener inden i sprøjten eller injektionsblokken. Der benyttes ikke direkte injektion på kolonnen i den øvre, udvidede og opvarmede del af kolonnen, da fragmenter af septum, der akkumuleres her, såvel som forureninger let kan elimineres med den benyttede metode, ved at der jævnlige skiftes injektorindsats, uden at kolonnen afmonteres.

Det må absolut undgås at bøje kanylespiden ved berøring af prøvebægerets bund (også selv om dette knap er synligt med det blotte øje) for ikke at ødelægge septum.

Figur 4

Triglyceridkromatogram af en mælkefedtprøve



6.5.3. Konditionering af en pakket kolonne.

Under trin a) til c) er kolonnens top ikke forbundet med detektoren for at undgå forurening.

De efter punkt 6.2 fyldte kolonner konditioneres som følger:

- 15 min. 40 ml/min. N_2 -flow ved 50 °C
- opvarming med 1 K/min. indtil 355 °C ved 10 ml N_2 /min.
- Henstand i 12-15 timer ved 355 °C
- 2 injektioner med 1 μ l kakaosmøropløsning efter punkt 4.10 og dertil hørende temperaturprogram
- 20 injektioner med 0,5 μ l mælkefedtopløsning i 2-3 døgn efter punkt 6.4.

Note: Kakaosmør består næsten udelukkende af højt kogende C50 til C56 triglycerider. Injektion med kakaosmør tjener til særlig konditionering i denne langkædede række. Med de højt kogende triglycerider C50 til C54 kan der forekomme responsfaktorer på indtil ca. 1,20. Normalt må der ved gentagen injektion af en mælkefedtopløsning forventes et fald i de initialt høje responsfaktorer for C50 til C54. For triglycerider med lavt acyl-c-tal ligger faktorerne på omkring 1.

Der tilberedes tre par kolonner fyldt efter punkt 6.2. De konditionerede par kontrolleres med en mælkefedt-analyse til rutinetest. Det par, der har de bedste kvantitative resultater (responsfaktorer næsten 1), anvendes til det efterfølgende. Kolonner med responsfaktorer > 1,20 anvendes ikke.

6.5.4. Kalibrering.

Til kalibrering bestemmes responsfaktorerne af de respektive triglycerider såvel som af kolesterol af et mælkefedt (standardiseret fedt) ved anvendelse af de standardiserede triglycerider (mindst de mættede triglycerider C24, C30, C36, C42, C48 og C54 samt kolesterol; endnu bedre hvis C50 og C52 også medtages). Mellemliggende responsfaktorer kan findes ved matematisk interpolering.

Når der anvendes standardiseret fedt, må der hver dag foretages 2-3 kalibreringer. Hvis der fremkommer så godt som identiske resultater, opnås der velreproducerbare kvantitative resultater ved triglyceridanalyse af prøverne.

Det standardiserede mælkefedt har en holdbarhed på flere måneder ved en temperatur på maks. -18 °C og kan derfor benyttes som standard.

NB: Responsfaktoren af hver bestanddel kan også bestemmes ved anvendelse af et referencefedtstof, hvis sammenensætning af triglycerider er certificeret, såsom CRM 519 (vandfrit mælkefedt), der sælges af »Institutet for referencemålinger og -materialer«.

6.5.5. Temperaturprogram, bæregas og andre betingelser for triglyceridanalyse.

Temperaturprogram: Initial kolonnetemperatur 210 °C holdes i 1 min., hvorefter der programmeres ved 6 °C/min. til 350 °C, og kolonnen holdes ved sluttemperaturen i 5 min.

Detektor- og injektortemperatur: Begge 370 °C.

Note: Detektor-, injektor- og ovntemperaturer (initialtemperaturer) bør holdes konstante (også natten over, i weekender og på helligdage).

Bæregas: Nitrogen, hastighed 40 ml/min.

Note: Hvis der benyttes 80 cm kolonner, skal bæregasflow være mindst 75 ml/min. N₂. Bæregasflowet bør holdes konstant (også natten over, i weekender og på helligdage). Det nøjagtige bæregasflow bør reguleres således, at C54 uanset kolonnelængde elueres ved 341 °C.

Analysevarighed: 29,3 min.

Injektionsvolumen: 0,5 µl.

Note: Sprøjten skal skylles flere gange efter hver injektion med ren heptan.

FID-betingelser efter punkt 5.1.

Note: Flammeionisationsdetektoren tændes ved hver arbejdsdags begyndelse.

7. Integration, evaluering og kontrol af målebetingelserne

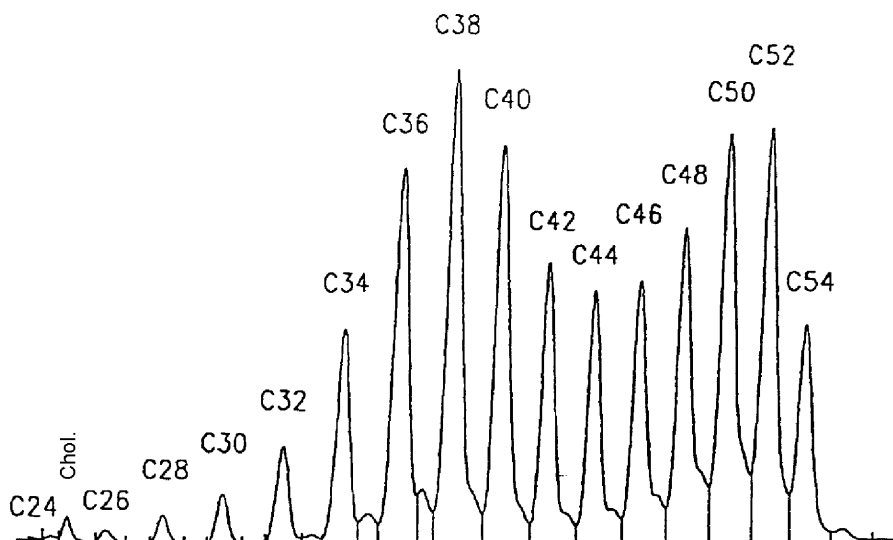
Triglycerider med ulige acyl-c-nummer ($2n + 1$) kombineres med det forudgående triglycerid med lige nummer ($2n$). De mindre reprocerbare, lave C56-indhold tages ikke i betragtning. De resterende triglycerider (toparealet) i kromatogrammet, inkl. kolesterol (top nær C24), multipliceres med de forskellige responsfaktorer for standardfedtet (sidste kalibrering), og summen sættes til 100. Foruden fri kolesterol evalueres således triglyceriderne C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 og C54. Resultaterne gengives i vægtprocent (g/100 g).

Kromatogrammets toppe bør evalueres med en integrator, hvormed basislinjen kan plottes. Reintegrering med optimerede integrationsparametre bør være mulig.

Fig. 5 og 6 viser to eksempler på triglyceridkromatogrammer. Fig. 5 viser et kromatogram, der kan evalueres godt, mens fig. 6 viser en sporadisk fejl i området C50 til C54, idet basislinjen løber ukorrekt i sammenligning med fig. 5. Sådanne fejl kan kun påvises og undgås ved brug af en integrator, som tillader plotning af basislinjen.

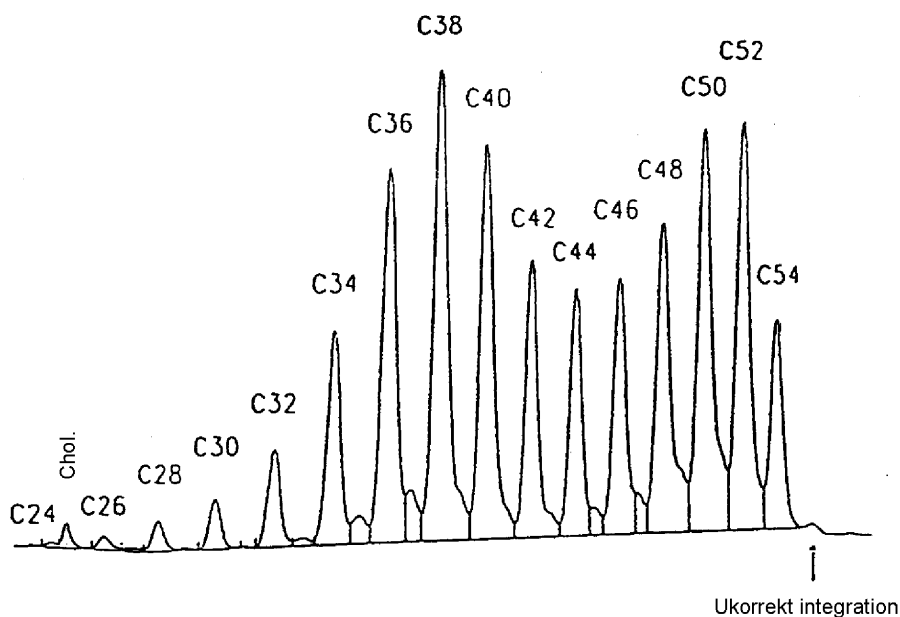
Figur 5

Triglyceridkromatogram (der er let at evaluere) af et mælkefedt med basislinjen indtegnet



Figur 6

Ukorrekt integreret kromatogram af mælkefedt



For at kontrollere målebetingelserne kan der anvendes relative standardafvigelser (RSD: variationskoefficient $\times 100$), der er anført i tabel 1 for de forskellige triglycerider. De er beregnet ud fra 19 analyser efter hinanden af det samme mælkefedt.

Tabel 1

Relative standardafvigelser (RSD) for indhold af triglycerider (n=19)

Triglycerid	RSD (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Hvis RSD ligger klart over værdierne i tabel 1, er de chromatografiske betingelser ikke korrekte og septum eller bæregassens gennemstrømningshastighed skal kontrolleres. Desuden kan små septum-partikler have afsat sig på glasulden ved kolonnens indgang, eller kolonnen er blevet uegnet til brug som følge af ældning, temperaturpåvirkninger osv. (jf. fig. 3)

Bemærkning: Værdierne i tabel 1 er ikke obligatoriske og er blot en vejledning for kvalitetskontrollen. Hvis der accepteres højere RSD, skal grænserne for repeterbarhed og reproducerbarhed i punkt 11 overholdes.

8. Kvalitativ påvisning af fremmede fedtstoffer

Til påvisning af fremmede fedtstoffer er der udviklet triglyceridformler (tabel 2) med S-grænser (tabel 3) hvori S-værdierne af rent mælkefedt kan vise udsving. Hvis grænserne overskrides, kan det antages, at et fremmed fedtstof er til stede.

Den mest følsomme formel til påvisning af tilsætning af svinefedt er:

$$6,5125 \cdot C_{26} + 1,2052 \cdot C_{32} + 1,7336 \cdot C_{34} + 1,7557 \cdot C_{36} + 2,2325 \cdot C_{42} + 2,8006 \cdot C_{46} + 2,5432 \cdot C_{52} + 0,9892 \cdot C_{54} = S$$

Note: Ved anvendelse af 755 forskellige mælkefedtprøver blev der fastslået et 99 % konfidensinterval på $S = 97,96-102,04$ for rene mælkefedtprøver med en standardafvigelse for alle S-værdier på 0,39897.

Ved at gå ud fra triglyceridsammensætningen af en ukendt fedtprøve kan en sådan formel uden brug af edb gøre det muligt ganske enkelt at verificere, om summen af de her angivne triglyceridindhold med de tilsvarende faktorer falder uden for intervallet på $97,96-102,04$, og der er så højst sandsynligt tale om tilsætning af et fremmed fedtstof.

Til påvisning af forskellige fremmede fedtstoffer viser tabel 2 forskellige triglyceridformler. Til påvisning af de fremmede olier sojaolie, solsikkeolie, olivenolie, rapsolie, hørolie, hvedekimolie, majskeimolie, bomuldsfrøolie og hydrogeniseret fiskeolie og de vegetabiliske fedtstoffer kokosnød- og palmekeorneolie samt palmeolie og oksetalg kan der benyttes en fælles formel.

Eftersom der også er udsving for triglyceridsammensætningen af fremmede fedtstoffer, blev der anvendt fire forskellige, eksperimentelt målte triglyceriddata for fremmede fedtstoffer af samme type. (Med de samme typer fremmede fedtstoftyper er den mindst gunstige grænse blevet taget i betragtning (jf. tabel 4)).

Med nedenstående »totalformel« kan der opnås gode resultater for alle fremmede fedtstoffer:

$$- 2,7575 \cdot C_{26} + 6,4077 \cdot C_{28} + 5,5437 \cdot C_{30} - 15,3247 \cdot C_{32} + 6,2600 \cdot C_{34} + 8,0108 \cdot C_{40} - 5,0336 \cdot C_{42} + 0,6356 \cdot C_{44} + 6,0171 \cdot C_{46} = S$$

Udregninger til påvisning af kombinationer af fremmede fedtstoffer i mælk har vist, at skønt der f.eks. med formelen for svinefedt i tabel 2 er en lav grænse for dette fremmede fedtstof, nemlig 2,7 % kan andre fedtstoffer som kokosnødfedt, palmeolie eller palmekeorneolie med påvisningsgrænser på henholdsvis 26,8 %, 12,5 % og 19,3 % kun påvises, hvis der er blevet tilsat særdeles store mængder til mælkefedtet. Det samme gælder de øvrige formler i tabel 2.

Tabel 2

Triglyceridformler til påvisning af forskellige fremmede fedtstoffer i mælkefedt med angivelse af standardafvigelserne (SD) for S

Formel for sojaolie, solsikkeolie, olivenolie, rapsolie, hørolie, hvedekimolie, majskeimolie, bomuldsfrøolie og fiskeolie
$2,0983 \cdot C_{30} + 0,7288 \cdot C_{34} + 0,6927 \cdot C_{36} + 0,6353 \cdot C_{38} + 3,7452 \cdot C_{40} - 1,2929 \cdot C_{42} + 1,3544 \cdot C_{44} + 1,7013 \cdot C_{46} + 2,5283 \cdot C_{50} = S$; SD = 0,38157
Formel for kokosnød- og palmekeorneolie
$3,7453 \cdot C_{32} + 1,1134 \cdot C_{36} + 1,3648 \cdot C_{38} + 2,1544 \cdot C_{42} + 0,4273 \cdot C_{44} + 0,5809 \cdot C_{46} + 1,2926 \cdot C_{48} + 1,0306 \cdot C_{50} + 0,9953 \cdot C_{52} + 1,2396 \cdot C_{54} = S$; SD = 0,11323
Formel for palmeolie og oksetalg
$3,6644 \cdot C_{28} + 5,2297 \cdot C_{30} - 12,5073 \cdot C_{32} + 4,4285 \cdot C_{34} - 0,2010 \cdot C_{36} + 1,2791 \cdot C_{38} + 6,7433 \cdot C_{40} - 4,2714 \cdot C_{42} + 6,3739 \cdot C_{46} = S$; SD = 0,81094
Formel for svinefedt
$6,5125 \cdot C_{26} + 1,2052 \cdot C_{32} + 1,7336 \cdot C_{34} + 1,7557 \cdot C_{36} + 2,2325 \cdot C_{42} + 2,8006 \cdot C_{46} + 2,5432 \cdot C_{52} + 0,9892 \cdot C_{54} = S$; SD = 0,39897

Følgelig må der til kontrol af en ukendt fedtprøve benyttes samtlige formler i tabel 2 og totalformlen (2), hvis det er sandsynligt, at prøven er en blanding af mælkefedt og et af de 14 forskellige fremmede fedtstoffer eller en kombination af sådanne fremmede fedtstoffer. Hvis der ved indsættelse af triglyceriderne fra en fedtprøve, som skal analyseres, fremkommer en S-værdi, der ligger uden for intervallerne i tabel 3 for blot en af de fem formler, er det mest sandsynligt, at prøven er et modificeret mælkefedt. Påvisning af et fremmed fedtstof i mælkefedt ved benyttelse af en af de fire formler, er det mest sandsynligt, at prøven er et modificeret mælkefedt. Påvisning af et fremmed fedtstof i mælkefedt ved benyttelse af en af de fire formler i tabel 2 gør det ikke muligt at drage konklusioner med hensyn til typen af det iblandede fremmede fedtstof.

Tabel 3

S-værdier for mælkefedt

Formel til påvisning af	S-interval
Sojaolie, solsikkeolie, olivenolie, rapsolie, hørolie, hvedekimolie, majskeimolie, bomuldsfrøolie og fiskeolie	98,05 — 101,95
Kokosnød- og palmekeorneolie	99,42 — 100,58
Palmeolie og oksetalg	95,90 — 104,10
Svinefedt	97,96 — 102,04
Totalformel	95,68 — 104,32

I tabel 4 angives påvisningsgrænserne for de forskellige fremmede fedtstoffer med en konfidens på 99 %. Den første spalte viser de laveste påvisningsgrænser for de bedste mælkeformler i tabel 2. I anden spalte gengives påvisningsgrænserne for totalformlen. Skønt grænserne ligger lidt højere, kan der med denne formel påvises en ganske lille smule højere indhold af fremmede fedtstoffer. Der kan med samtlige formler også påvises blandinger af de forskellige fremmede fedtstoffer. Variationsintervallet for triglycerider af forskellige fremmede fedtstoffer af en enkelt type har ingen væsentlig indflydelse på påvisningsgrænserne.

Tabel 4

99 % påvisningsgrænser ved tilsætning af fremmed fedtstof til mælkefedt i %

	Specifik formel	Totalformel
Sojaolie	2,1	4,4
Solsikkeolie	2,3	4,8
Olivenolie	2,4	4,7
Kokosnødfedt	3,5	4,3
Palmeolie	4,4	4,7
Palmekeorneolie	4,6	5,9
Rapsolie	2,0	4,4
Hørolie	2,0	4,0
Hvedekimolie	2,7	6,4
Majskeimolie	2,2	4,5
Bomuldsfrøolie	3,3	4,4
Svinefedt	2,7	4,7
Oksetalg	5,2	5,4
Hydrogeniseret fiskeolie	5,4	6,1

Note: S-intervallene er således udregnet, at tilstedeværelsen af et fremmed fedtstof kun antages, hvis grænserne for de individuelle formler er overskredet (jf. tabel 4).

9. Kvantitativ bestemmelse af fremmede fedtstoffer

Til at få kvantitative oplysninger om koncentrationen af det fremmede fedtstof i en mælkefedtprøve benyttes følgende formel:

$$X (\%) = 100 \cdot \left| (100 - S)/(3)/(100 - S_p) \right|,$$

hvor X er mængden af et ukendt fremmed fedtstof eller blanding af fremmede fedtstoffer i et ukendt mælkefedt. S er resultatet af tilsætning af et ukendt fremmed fedtstof ved indsættelse af triglyceriderne fra det fremmede fedt/mælkefedtblanding i ovenstående totalglyceridformel. Hvis mælkefedt er tilsat et ukendt fremmed fedtstof, vælges S-middelværdien af de forskellige fremmede fedtstoffer for totalformlen som S_F . S_F -middelværdien fremkommer ved at indsætte de rene, fremmede fedtstoffers triglyceriddata i denne formel og udregne en middelværdi ($S_F = 7,46$). Der opnås også gode kvantitative resultater for tilsætninger af fremmede fedtstoffer ved at benytte formelen for palmeolie og oksetalg (tabel 2) og en S_F -middelværdi på 10,57.

For kendte fremmede fedtstoffers vedkommende skal følgende S_F -værdier indsættes i ovenstående formel, og de relevante formler for fremmede fedtstoffer i tabel 2 skal vælges.

Tabel 5

S_F-værdier af forskellige fremmede fedtstoffer

Fremmed fedtstof	S _F
Sojaolie	8,18
Solsikkeolie	9,43
Olivেনolio	12,75
Kokosnødfedt	118,13
Palmeolie	7,55
Palmekerneolie	112,32
Rapsolie	3,30
Hørolie	4,44
Hvedekimolie	27,45
Majskimolie	9,29
Bomuldsfrøolie	41,18
Svinefedt	177,55
Oksetalg	17,56
Fiskeolie	64,12

10. Anvendelsesområde for påvisningsmetoden

Den beskrevne metode anvendes på bulkmælk og er baseret på mælkefedtprøvernes repræsentativitet.

Det ville være muligt at foretage højst specifik påvisning, hvis der for et repræsentativt antal mælkefedtprøver kunne bestemmes formler for forskellige lande.

Der kunne frembringes særligt velegnede muligheder for påvisning, hvis formler som her beskrevet blev etableret i de forskellige lande for et repræsentativt antal mælkefedtstoffer. I dette tilfælde kræves det ikke, at der bruges udviklede edb-programmer, hvis triglyceridkombinationerne i tabel 2 benyttes, og faktorerne genbestemmes efter de mindste kvadraters metode.

Ved benyttelse af S-intervallerne i tabel 3 er formlerne normalt anvendelige under særlige fordringsbetingelser som f.eks. underfodring eller fodring af køer med fodergræs eller Ca-sæber. Kun under ekstreme fordringsbetingelser (f.eks. stor indtagelse af rene foderolier, stor tildeling af Ca-sæber kombineret med foderfedt osv.) angiver formelen til dels et modificeret mælkefedtstof.

Note: Fraktionerede mælkefedtstoffer anerkendes normalt som umodificeret mælkefedt, hvis der udelukkende antages en modifikation, når grænserne er overskredet. Kun i tilfælde af fraktionerede mælkefedtstoffer med usædvanlig mælkefedtsammensætning, således som f.eks. en hård fraktion, der er fremkommet ved fraktionering efter fysiske metoder ved høje temperaturer på ca. 30 °C med lave udbytter på nogle få procenter eller ved fraktionering med overkritisk CO₂, angiver formelen en modifikation.

Mælkefedtfraktionering kan imidlertid påvises efter andre metoder som f.eks. differentials scanningkalorimetri.

11. Nøjagtighed

Metodens nøjagtighed bestemmes ved brug af mælkefedt ud fra formlerne i tabel 2 og S-intervallerne i tabel 3.

11.1. Repeterbarhed

Som differens af S-værdierne ved to bestemmelser foretaget med kortest mulige mellemrum af en kromatografier, der benytter samme metode og identisk prøvemateriale under samme betingelser (samme person, samme instrument/samme opstilling, samme laboratorium):

Tabel 6

Repeterbarhedsgrænser (r) for de forskellige formler

Formel til påvisning	r
af sojaolie, solsikkeolie, olivenolie, rapsolie, hørolie, hvedekimolie, majs-kimolie, bomuldsfrøolie og fiskeolie	0,67
af koskøsnød- og palmekerneolie	0,12
af palmeolie og oksetalg	1,20
af svinefedt	0,58
af totalformel	1,49

11.2. *Reproducerbarhed*

Som differens af S-værdierne ved to bestemmelser foretaget af analytikere på forskellige laboratorier med benyttelse af identisk prøvemateriale under forskellige betingelser (anden person, andre instrumenter) på forskellige tidspunkter.

Tabel 7

Reproducerbarhedsgrænser (R) for de forskellige formler

Formel til påvisning	R
af sojaolie, solsikkeolie, olivenolie, rapsolie, hørolie, hvedekimolie, majs-kimolie, bomuldsfrøolie og fiskeolie	1,08
af koskøsnød- og palmekerneolie	0,40
af palmeolie og oksetalg	1,81
af svinefedt	0,60
af totalformel	2,07

11.3. *Kritisk differens*

Med repeterbarhedsgrænserne (r) og reproducerbarhedsgrænserne (R) kan de kritiske differenser for samtlige S-intervaller i tabel 3 udregnes (dobbelanalyser). De respektive værdier er gengivet i tabel 8.

Tabel 8

Kritiske differenser for samtlige triglyceridformler

Formel til påvisning	Interval
af sojaolie, solsikkeolie, olivenolie, rapsolie, hørolie, hvedekimolie, majs-kimolie, bomuldsfrøolie og fiskeolie	97,43 — 102,57
af kokosnød- og palmekerneolie	99,14 — 100,86
af palmeolie og oksetalg	94,91 — 105,09
af svinefedt	97,65 — 102,35
totalformel	94,58 — 105,42

11.4. *Godkendelse af resultaterne*

Alle med afrunding til to decimaler beregnede triglyceridindhold af C24, C26, C28 til C54 samt kolesterol skal sættes til præcis 100.

Resultaterne af dobbeltanalysen bruges som kontrol af repeterbarheden. Hvis den absolutte differens mellem to S-resultater for samtlige fem triglyceridformler ikke overskrider repeterbarhedsgrænserne (r) i tabel 6, er kravene til repeterbarhed opfyldt.

Til kontrol af optimale gaskromatografiske betingelser og især af kolonnens kvalitet bør det sikres, at differensen mellem største og mindste S-værdier af samtlige fem triglyceridformler ved gentagelse med ti kørsler ikke overskrider intervallet, $x \cdot r$ hvor $x = 1,58$ (for ti kørsler, jf. litteraturhenvisning 16), og r er repeterbarhedsgrænserne for de forskellige formler i tabel 6.

12. **Nævnte standardmetoder**

DIN 10 336: 1994	Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse
IDF Standard 1C: 1987	Milk. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
IDF-Standard 16C: 1987	Cream. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
IDF Standard 116A: 1987	Milk-Based Edible Ices and Ice Mixes. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
IDF Standard 22B: 1987	Skimmed Milk, Whey & Buttermilk. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method.

13. **Litteraturhenvisninger**

1. Kommissionen for De Europæiske Fællesskaber: Detection of foreign fats in milk fat by means of gas chromatographic triglyceride analysis; dok. nr. VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Kommissionen for De Europæiske Fællesskaber: Control of butter fat purity of 100 different samples of different feeding periods from 11 EEC countries; dok. nr. VI/4577/93.
3. Kommissionen for De Europæiske Fællesskaber: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; dok. nr. VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/53178/92, VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. Dairy Research 47 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 20-35 (1987).
7. Precht, D.: Bestimmung von Pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchfett. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143-157 (1989).
8. Precht D.: Schnelle Extraktion von Milchfett. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchfett. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992).
13. Precht, D.: Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns i CRC Handbook of Chromatography: Analysis of lipids, blz. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkentin, J.: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme, Springer-Verlag, Berlin, blz. 378 (1970).

BILAG XXVI

LISTE OVER FORORDNINGER SOM OMHANDLET I FØRSTE BETRAGTNING

- Kommissionens forordning (EØF) nr. 1216/68 af 9. august 1968 om metoden til bestemmelse af lactoseindholdet i foderblandinger indført fra tredjelande ⁽¹⁾, ændret ved Kommissionens forordning (EØF) nr. 222/88 af 22. december 1987 om ændring af visse retsakter vedrørende anvendelsen af den fælles markedsordning i sektoren for mælk og mælkeprodukter som følge af indførelsen af Den Kombinerede Nomenklatur ⁽²⁾
- Kommissionens forordning (EØF) nr. 3942/92 af 22. december 1992 om fastlæggelse af en referencemetode til bestemmelse af sitosterol og stigmasterol i butteroil ⁽³⁾, senest ændret ved Kommissionens forordning (EF) nr. 175/1999 om ændring af forordning (EØF) nr. 3942/92, (EF) nr. 86/94, (EF) nr. 1082/96 og (EF) nr. 1459/98 om fastlæggelse af referencemetoder til bestemmelse af visse røbestoffer i smør, butteroil og fløde ⁽⁴⁾
- Kommissionens forordning (EF) nr. 86/94 af 19. januar 1994 om fastlæggelse af en referencemetode til bestemmelse af sitosterol og stigmasterol i smør ⁽⁵⁾, ændret ved forordning (EF) nr. 175/1999
- Kommissionens forordning (EF) nr. 2721/95 af 24. november 1995 om opstilling af regler for anvendelsen af reference- og rutinemetoder til analyse og kvalitetsvurdering af mælk og mejeriprodukter henhørende under den fælles markedsordning ⁽⁶⁾
- Kommissionens forordning (EF) nr. 1080/96 af 14. juni 1996 om en referencemetode til påvisning af coliforme bakterier i smør, skummetmælkspulver og kasein/kaseinat ⁽⁷⁾
- Kommissionens forordning (EF) nr. 1081/96 af 14. juni 1996 om en referencemetode til påvisning af komælk og — kaseinat i ost fremstillet af fåre-, gede- eller bøffelmælk eller blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk og om ophævelse af forordning (EØF) nr. 690/92 ⁽⁸⁾
- Kommissionens forordning (EF) nr. 1082/96 af 14. juni 1996 om en referencemetode til bestemmelse af ethylester af β -apo-8'-karotinsyre i smør og koncentreret smør ⁽⁹⁾, ændret ved forordning (EF) nr. 175/1999
- Kommissionens forordning (EF) nr. 1854/96 af 26. september 1996 om opstilling af en liste over referencemetoder til analyse og kvalitetsvurdering af mælk og mejeriprodukter henhørende under den fælles markedsordning ⁽¹⁰⁾, ændret ved forordning (EF) nr. 881/1999 ⁽¹¹⁾
- Kommissionens forordning (EF) nr. 880/98 af 24. april 1998 om fastsættelse af referencemetoder for bestemmelse af indholdet af vand, fedtfrit tørstof og fedt i smør ⁽¹²⁾
- Kommissionens forordning (EF) nr. 1459/98 af 8. juli 1998 om referencemetoder til bestemmelse af vanillin i koncentreret smør, smør og fløde ⁽¹³⁾, ændret ved forordning (EF) nr. 175/1999.

⁽¹⁾ EFT L 198 af 10.8.1968, s. 13.

⁽²⁾ EFT L 28 af 1.2.1988, s. 1.

⁽³⁾ EFT L 399 af 31.12.1992, s. 29.

⁽⁴⁾ EFT L 20 af 27.1.1999, s. 22.

⁽⁵⁾ EFT L 17 af 20.1.1994, s. 7.

⁽⁶⁾ EFT L 283 af 25.11.1995, s. 7.

⁽⁷⁾ EFT L 142 af 15.6.1996, s. 13.

⁽⁸⁾ EFT L 142 af 15.6.1996, s. 15.

⁽⁹⁾ EFT L 142 af 15.6.1996, s. 26.

⁽¹⁰⁾ EFT L 246 af 27.9.1996, s. 5.

⁽¹¹⁾ EFT L 111 af 29.4.1999, s. 24.

⁽¹²⁾ EFT L 124 af 25.4.1998, s. 16.

⁽¹³⁾ EFT L 193 af 9.7.1998, s. 16.