

KOMMISSIONENS GENNEMFØRELSESFORORDNING (EU) 2018/150**af 30. januar 2018****om ændring af gennemførelsesforordning (EU) 2016/1240 for så vidt angår metoder til analyse og kvalitetsvurdering af mælk og mejeriprodukter, der er berettiget til offentlig intervention og støtte til privat oplagring**

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) Nr. 1306/2013 af 17. december 2013 om finansiering, forvaltning og overvågning af den fælles landbrugspolitik og om ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 352/78, (EF) nr. 165/94, (EF) nr. 2799/98, (EF) nr. 814/2000, (EF) nr. 1290/2005 og (EF) nr. 485/2008 ⁽¹⁾, særlig artikel 62, stk. 2, litra i), og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) I Kommissionens delegerede forordning (EU) 2016/1238 ⁽²⁾ og Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2016/1240 ⁽³⁾ er der fastsat bestemmelser om offentlig intervention og støtte til privat oplagring. I Kommissionens forordning (EF) nr. 273/2008 ⁽⁴⁾ er fastlagt de metoder, der skal anvendes ved vurderingen af, hvorvidt mælk og mejeriprodukter opfylder de krav, der er fastsat i nævnte forordninger, for at være berettiget til offentlig intervention og støtte til privat oplagring.
- (2) I lyset af den tekniske udvikling inden for den metode, der anvendes til analyse og kvalitetsvurdering af mælk og mejeriprodukter, bør der foretages væsentlige ændringer med henblik på forenkling og ajourføring af henvisningerne til ISO-standarderne. Af hensyn til klarhed og effektivitet og under hensyn til omfanget og den tekniske karakter af ændringerne af bestemmelserne i forordning (EF) nr. 273/2008 bør de relevante bestemmelser i nævnte forordning indarbejdes i gennemførelsesforordning (EU) 2016/1240.
- (3) For at sikre ensartet overholdelse af de nye standarder og metoder på tværs af medlemsstaterne bør laboratorierne have en rimelig frist til at gennemgå procedurer og anvende de ajourførte metoder.
- (4) Gennemførelsesforordning (EU) 2016/1240 bør derfor ændres.
- (5) Af hensyn til retssikkerheden bør forordning (EF) nr. 273/2008 ophæves.
- (6) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Komitéen for den Fælles Markedsordning for Landbrugsprodukter —

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

I gennemførelsesforordning (EU) 2016/1240 foretages følgende ændringer:

- 1) I artikel 4 foretages følgende ændringer:
 - a) Stk. 1 ændres således:
 - i) litra d) affattes således:

»d) for smør: i del I og Ia i bilag IV til denne forordning«
 - ii) litra e) affattes således:

»e) for skummetmælkspulver i del I og Ia i bilag V til denne forordning«

⁽¹⁾ EUT L 347 af 20.12.2013, s. 549.⁽²⁾ Kommissionens delegerede forordning (EU) 2016/1238 af 18. maj 2016 om supplerende regler til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) nr. 1308/2013 for så vidt angår offentlig intervention og støtte til privat oplagring (EUT L 206 af 30.7.2016, s. 15).⁽³⁾ om gennemførelsesbestemmelser til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) nr. 1308/2013 for så vidt angår offentlig intervention og støtte til privat oplagring (EUT L 206 af 30.7.2016, s. 71).⁽⁴⁾ Kommissionens forordning (EF) nr. 273/2008 af 5. marts 2008 om gennemførelsesbestemmelser til Rådets forordning (EF) nr. 1255/1999 for så vidt angår metoder til analyse og kvalitetsvurdering af mælk og mejeriprodukter (EUT L 88 af 29.3.2008, s. 1).

b) Stk. 2 affattes således:

»2. De metoder, der skal anvendes til at fastslå kvaliteten af korn, smør og skummetmælkspulver, der er berettiget til offentlig intervention, jf. bilag I, IV og V, er dem, der er fastsat ved de seneste udgaver af de relevante europæiske eller internationale standarder, alt efter tilfældet, der er i kraft mindst seks måneder før den første dag af tidsrummet for offentlig intervention som defineret i artikel 12 i forordning (EU) nr. 1308/2013.«

2) Følgende indsættes som artikel 60a:

»Artikel 60a

Særlige bestemmelser for kontrol vedrørende offentlig intervention og støtte til privat oplagring for mælk og mejeriprodukter

1. Hvorvidt smør, skummetmælkspulver og ost er berettiget til støtte til privat oplagring, fastlægges i overensstemmelse med de metoder, der er angivet i bilag VI, VII og VIII.

Sådanne metoder fastlægges under henvisning til de seneste udgaver af de relevante europæiske eller internationale standarder, alt efter tilfældet, der er i kraft mindst seks måneder før den første dag af tidsrummet for offentlig intervention som defineret i artikel 12 i forordning (EU) nr. 1308/2013.

2. Resultaterne af de kontroller, der er gennemført ved anvendelse af de metoder, der er fastsat i denne forordning, vurderes i overensstemmelse med bilag IX.«

3) Bilagene ændres som anført i bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Forordning (EF) nr. 273/2008 ophæves.

Artikel 3

Denne forordning træder i kraft på syvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

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

Udfærdiget i Bruxelles, den 30. januar 2018.

På Kommissionens vegne

Jean-Claude JUNCKER

Formand

BILAG

I bilagene til gennemførelsesforordning (EU) 2016/1240 foretages følgende ændringer:

1) I bilag IV foretages følgende ændringer:

a) I del I, punkt 2, affattes andet underafsnit således:

»Hver prøve bedømmes enkeltvis. Det er ikke tilladt at foretage genudtagning af prøver eller gentagen vurdering.«

b) Følgende indsættes som del Ia:

»DEL IA

Analysemetoder for usaltet smør bestemt til offentlig intervention

Parameter	Metode
Fedstof ⁽¹⁾	ISO 17189 eller ISO 3727 del 3
Vand	ISO 3727 del 1
Fedtfri tørstof	ISO 3727 del 2
Fedtsyrer	ISO 1740
Peroxidtal	ISO 3976
Andre fedtstoffer end mælkefedt	ISO 17678
Organoleptiske egenskaber	ISO 22935 del 2 og 3 og efterfølgende pointskala.

(¹) Metoden, der anvendes, skal godkendes af betalingsorganet.

Pointskala

Udseende		Konsistens		Lugt og smag	
Point	Bemærkninger	Point	Bemærkninger	Point	Bemærkninger
5	Meget tilfredsstillende idealtypen højeste kvalitet (ensartet tør)	5	Meget tilfredsstillende idealtypen højeste kvalitet (godt smørbar)	5	Meget tilfredsstillende idealtypen højeste kvalitet (absolut ren, fineste lugt)
4	Tilfredsstillende (ingen åbenlyse fejl)	4	Tilfredsstillende (ingen åbenlyse fejl)	4	Tilfredsstillende (ingen åbenlyse fejl)
1, 2 eller 3	Enhver fejl	1, 2 eller 3	Enhver fejl	1, 2 eller 3	Enhver fejl«

2) I bilag V indsættes følgende som del Ia:

»DEL IA

Analysemetoder for skummetmælkspulver bestemt til offentlig intervention

Parameter	Metode
Protein	ISO 8968 del 1
Fedtstof	ISO 1736
Vand	ISO 5537
Syreindhold	ISO 6091
Laktater	ISO 8069
Phosphatasetest	ISO 11816 del 1
Uopløselighed	ISO 8156
Brændte partikler ⁽¹⁾	ADPI
Mikroorganismer	ISO 4833 del 1
Kærnemælk	Tillæg I
Løbevalle ⁽²⁾	Tillæg II og III
Sur valle ⁽³⁾	ISO 8069 eller kontrol på stedet
Organoleptisk kontrol ⁽⁴⁾	ISO 22935 del 2 og 3

⁽¹⁾ Analyser af brændte partikler kan foretages systematisk. Dog skal sådanne analyser altid foretages, hvis der ikke foretages organoleptiske bedømmelser.

⁽²⁾ Metoden, der anvendes, skal godkendes af betalingsorganet (en af eller begge metoder).

⁽³⁾ Metoden, der anvendes, skal godkendes af betalingsorganet.

⁽⁴⁾ Organoleptisk kontrol udføres, hvis det på grundlag af en risikobaseret analyse, der er godkendt af betalingsorganet, anses for nødvendigt.

Tillæg I

SKUMMETMÆLKSPULVER: BESTEMMELSE AF PHOSPHATIDYLSERIN- OG PHOSPHATIDYLETHANOLAMININDHOLD**Metode: 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. METODEPRINCIP

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 af anerkendt analysekvalitet. Der anvendes destilleret vand eller vand af mindst tilsvarende renhed, medmindre andet er angivet.

4.1. **Standardmateriale: PEDP, mindst 99 % rent**

Bemærkning: Standardmateriale skal opbevares ved – 18 °C.

4.2. **Reagenser til 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**

4.4.1. *Elueringsvæsker fremstilles ved anvendelse af reagenser af HPLC-renhed.*

4.4.2. *Vand af HPLC-renhed*

4.4.3. *Methanol af fluorimetri-testet renhed*

4.4.4. *Tetrahydrofuran*

4.4.5. *Natriumdihydrogenphosphat*

4.4.6. *Natriumacetat*

4.4.7. *Eddikesyre.*

5. APPARATUR

5.1. **Analysevægt, der kan veje med en nøjagtighed på 1 mg, og som kan aflæses med en nøjagtighed på 0,1 mg**

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 × g**

5.10. **Prøveglas på ca. 5 ml**

5.11. **Måleglas på 25 ml**

5.12. **pH-meter med en nøjagtighed på 0,1 pH-enhed**

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. *Kolonneopvarmningsenhed, som kan holde kolonnens temperatur på 30 °C ± 1 °C*

5.13.4. *Fluorescensdetektor, der kan fungere på en exciteringsbølgelængde på 330 nm og en emissionsbølgelængde på 440 nm*

5.13.5. *Integrator eller databehandlingsprogrammel, som er i stand til at måle toparealer*

5.13.6. *En LiChrospher®-100 kolonne (250 × 4,6 mm) eller en tilsvarende kolonne pakket med octadecylisan (C 18) med en partikelstørrelse på 5 µm*

6. PRØVEUDTAGNING

Prøveudtagning skal ske i overensstemmelse med ISO standard 707.

7. FREMGANGSMÅDE

7.1. **Forberedelse af den interne standardopløsning**

7.1.1. *30,0 ± 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).*

7.1.2. *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 tryptaminkoncentration.*

7.2. **Forberedelse af analyseopløsningen**

7.2.1. *1,000 ± 0,001 g af SMP-prøven i et 25 ml bægerglas (5.2). Der tilsættes 10 ml destilleret vand ved 40 °C ± 1 °C med pipette (5.3) og omrøres med magnetomrører (5.4) i 30 minutter for at opløse alle klumper.*

7.2.2. *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) og fyldes op til mærket med methanol (4.2.1). Der blandes omhyggeligt ved at vende kolben på hovedet flere gange; anbringelse i ultralydsbad (5.8) i 15 min.*

7.2.3. *Derefter centrifugeres (5.9) ved 27 000 g × g i 10 min., og supernatanten indsamles i et prøveglas (5.10).*

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

7.3. Forberedelse af den eksterne standardopløsning

- 7.3.1. 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 $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 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.
- 7.3.2. 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.

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

7.4. Forberedelse af derivateringsreagenset

25,0 ± 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).

Bemærkning: Derivateringsreagenset skal opbevares ved 4 °C i et brunt prøveglas. Det er holdbart i en uge.

7.5. Bestemmelse ved HPLC

7.5.1. Elueringsvæsker (4.4)

Væske A: 0,3 mM natriumdihydrogenphosphat- og 3 mM natriumacetatopløsning (indstillet til pH $6,5 \pm 0,1$ med eddikesyre); metanol: tetrahydrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Væske B: methanol

7.5.2. Foreslået elueringsgradient:

Tid (min.)	Væske A (%)	Væske B (%)	Gennemstrømningshastighed (ml/min.)
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

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

Kolonnetemperatur: 30 °C .

7.5.3. *Injektionsvolumen: 50 µl derivateringsreagens og 50 µl prøveopløsning.*

7.5.4. *Kolonneligevægt*

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

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

7.5.5. *Indholdet af PS + PE i analyseprøven bestemmes.*

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 beregne responsfaktoren.*

Bemærkning: 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:

$$C = 55,36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$$

hvor:

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

A₁ = topareal af PEDP i standardprøveopløsningen (7.3)

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

T₁ = topareal af tryptamin i standardprøveopløsningen (7.3)

T₂ = topareal af tryptamin i analyseprøveopløsningen (7.2).

9. METODENS NØJAGTIGHED

Bemærkning: Værdierne for repeterbarhed blev beregnet efter den internationale IDF-standard (*).

9.1. Repeterbarhed

Den relative standardafvigelse for repeterbarheden, som er et udtryk for variationen i uafhængige analyseresultater, der er opnået af samme person under anvendelse af samme apparatur på samme betingelser på samme analyseprøve inden for et kort tidsinterval, må ikke overstige 2 %. 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

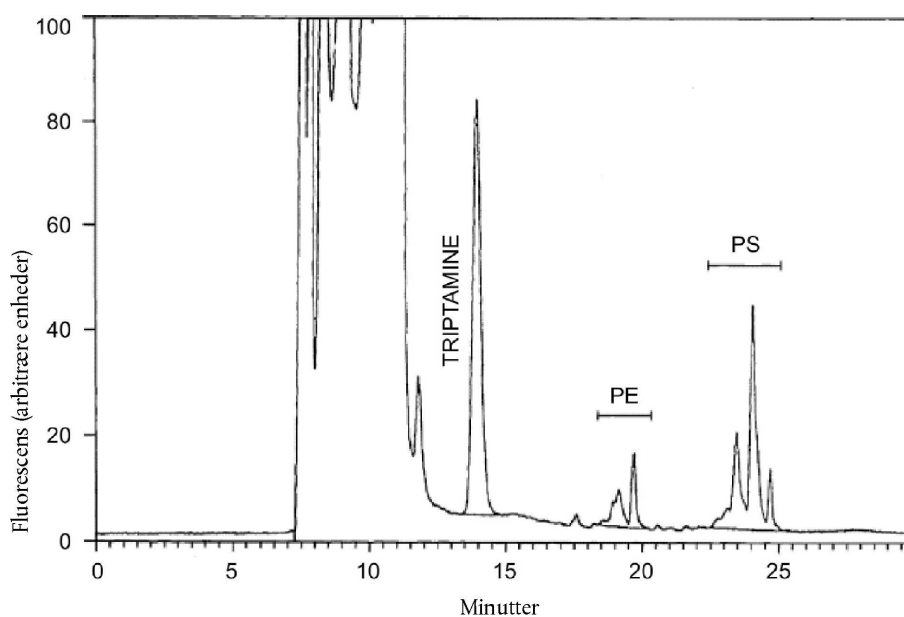
Hvis to bestemmelser foretages af laboranter i forskellige laboratorier under anvendelse af forskelligt apparatur på forskellige betingelser for analyse og samme analyseprøve, må den relative forskel mellem de to resultater ikke overstige 11 % af det aritmetiske gennemsnit af resultaterne.

10. LITTERATURHENVISNINGER

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

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.



Tillæg II

PÅVISNING AF LØBEVALLE I SKUMMETMÆLKSPULVER TIL OFFENTLIG OPLAGRING VED HJÆLP AF HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRAFISK BESTEMMELSE AF KASEINMAKROPEPTIDINDHOLDET (HPLC-METODE)

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

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

2. HENVISNING

International Standard ISO 707 — Mælk og mejeriprodukter — Vejledning i prøveudtagning.

3. DEFINITION

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

4. PRINCIP

- Opløsning af skummetmælkspulveret, fjernelse af fedtstoffer og proteiner ved hjælp af trichloreddikesyre efterfulgt af centrifugering eller filtrering
- Bestemmelse af mængden af kaseinmakropeptider (CMP) i supernatanten ved HPLCA
- 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 anerkendt analysekvalitet. Der anvendes destilleret vand eller vand af mindst tilsvarende renhed.

5.1. **Opløsning af trichloreddikesyre**

240 g trichloreddikesyre (CCl_3COOH) opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml. Opløsningen skal forblive klar og farveløs.

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.

Bemærkning: Elueringsvæskens sammensætning kan opdateres for at efterkomme standarderne eller anbefalinger fra fabrikanten af kolonnepakningsmaterialet.

Før brugen filtreres elueringsvæsken gennem et membranfilter med porestørrelse 0,45 μm .

5.3. **Opløsning til skylning af kolonnerne**

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

Bemærkning: 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 % (m/m) 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. 50 ml.**
- 6.3. **Mekanisk rysteapparat**
- 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. **Målepipetter på 10 ml (ISO 648, klasse A, eller ISO/R 835) eller et dispenseringsystem, som muliggør gennembløb af 10,0 ml på 2 min.**
- 6.9. **Dispenseringsystem, som muliggør gennembløb af 20,0 ml vand ved ca. 50 °C**
- 6.10. **Termostatstyret vandbad indstillet på 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **HPLC-udstyr bestående af:**
 - 6.11.1. *Pumpe*
 - 6.11.2. *Manuel eller automatisk injektionsenhed på 15-30 µl*
 - 6.11.3. *To serieforbundne kolonner, TSK 2 000 SW (længde 30 cm, indvendig diameter 0,75 cm) eller kolonner af tilsvarende effektivitet (f.eks. single TSK 2 000-SWxl, single Agilent Technologies Zorbax GF 250), og en forkolonne (3 cm × 0,3 cm) pakket med I 125 eller et lige så effektivt materiale*
 - 6.11.4. *Termostatstyret kolonneovn indstillet på 35 ± 1 °C*
 - 6.11.5. *UV-detektor med variabel bølgelængde, hvormed der ved 205 nm kan måles med en følsomhed på 0,008 Å*
 - 6.11.6. *Integrator, der kan integrere over de enkelte toppe*

Bemærkning: 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. 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. *Prøven 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. **Analyseprøve**

I et centrifugeglas (6.2) eller en tilproppet kolbe (50 ml) afvejes 2,000 ± 0,001 g analyseprøve.
- 8.3. **Fjernelse af fedtstoffer og proteiner**
 - 8.3.1. *Der sættes 20,0 ml 50 °C varmt vand til analyseprøven. Pulveret opløses ved omrøring i 5 min. med et rysteapparat (6.3). Reagensglasset anbringes i vandbadet (6.10), og det afventes, at der indtræder en ligevægt ved 25 °C.*

8.3.2. I løbet af 2 min. tilsættes 10,0 ml trichloredikesyreopløsning (5.1) på 25 °C under kraftig omrøring med magnetomrøreren (6.4). Reagensglasset anbringes i vandbadet (6.10), hvori det henstår i 60 minutter.

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. Kromatografisk bestemmelse

8.4.1. Af supernatanten eller filtratet (8.3.3) indsprøjtes en nøjagtigt afmålt mængde på mellem 15 og 30 µl i HPLC-apparatet (6.11) under en gennemstrømningshastighed på 1,0 ml elueringsvæske (5.2) pr. minut.

Bemærkninger: 1. Den kan anvendes en anden gennemstrømningshastighed afhængigt af de anvendte kolonnens indvendige diameter eller kolonnefabrikantens anvisninger.

Bemærkninger: 2. Hver gang kromatograferingen 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 kromatograferingen af analyseprøven [E] foreligger i form af et kromatogram, hvor hver top identificeres ved sin retentionstid, RT, nemlig:

Top II:	kromatogrammets anden top, hvis retentionstid er ca. 12,5 min.
Top III:	kromatogrammets tredje top, der svarer til CMP, og hvis retentionstid er 15,5 min.

Valg af kolonne(r) kan påvirke de forskellige toppes retentionstid betydeligt.

Integratoren (6.11.6) beregner automatisk arealet A af hver top, nemlig:

A_{II} :	arealet af top II
A_{III} :	arealet af top III

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 kromatogrammer bedømmes visuelt, før en kvantitativ tolkning påbegyndes.

I tvivlstilfælde gentages analysen.

8.5. Kalibrering

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

Der benyttes frisk fremstillede opløsninger, da CMP nedbrydes i 8 % trichloredikesyreopløsning. Indholdet heraf falder med ca. 0,2 % pr. time ved 30 °C. Indholdet heraf falder med ca. 0,2 % pr. time ved 30 °C.

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

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

9. ANGIVELSE AF RESULTATER

9.1. Beregningsmetode og formler

9.1.1. Beregning af responsfaktorerne R

Top II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
---------	----------------------------

hvor:

R_{II} = responsfaktoren for top II

$A_{II}[0]$ = det areal af top II for standardprøven [0], som er fremkommet under 8.5.3

Top III:	$R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$
----------	---

hvor:

- R_{III} = responsfaktoren for top III
 $A_{III}[0]$ and $A_{III}[5]$ = de arealer af top III for henholdsvis standardprøve [0] og [5], som er fremkommet under 8.5.3
 W = indholdet af valle i standardprøven [5], nemlig 5

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

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

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

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

hvor:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = de relative arealer af henholdsvis top II, III og IV for prøven [E]
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = de arealer af henholdsvis top II og III for prøven [E], som er fremkommet under 8.4.2
 R_{II} , R_{III} = de under 9.1.1 beregnede responsfaktorer

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

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$$

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 fremkommet under 8.4.2
 $RT_{III}[5]$ = retentionstiden for top III for standardprøven [5], som er fremkommet 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 et 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:**

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

hvor:

- W = indholdet af løbevalle i prøven [E], i % m/m
 $S_{III}[E]$ = det relative areal af top III for analyseprøven [E], som er fremkommet under 9.1.2
 1,3 = det relative middelareal af top III udtrykt i g løbevalle pr. 100 g bestemt i uforfalsket skummetmælkspulver af forskellig oprindelse. Denne værdi er bestemt eksperimentelt
 $S_{III}[0]$ = det relative areal af top III, som er lig med $R_{III} \times A_{III}[0]$. Disse 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 $S_{III}[0]$ ikke er 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 prøve, må ikke overstige 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproducerbarhed

Forskellen mellem to resultater, som to forskellige laboratorier er nået frem til med samme prøve, må ikke overstige 0,4 % m/m.

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 produkt er $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$,

hvor

2,0	er den højst tilladte værdi for det relative areal af top III; der er her taget hensyn til det relative gennemsnitlige areal af top III, nemlig 1,3, usikkerheden som følge af variationer i skummetmælkspulverets sammensætning og metodens reproducerbarhed (9.3.2)
$(S_{III}[0] - 0,9)$	er korrektionen, når arealet $S_{III}[0]$ afviger fra 0,9 (jf. punkt 9.2)

9.4.2. Hvis det relative areal af top III, S_{III} [E] er $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ og 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 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 prøver af uforfalsket 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:

$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7$	(figur 1)
$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93$	(figur 2)

hvor

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

P % er det samlede proteinindhold udtrykt som vægtprocent

S_{II} [E] er 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.

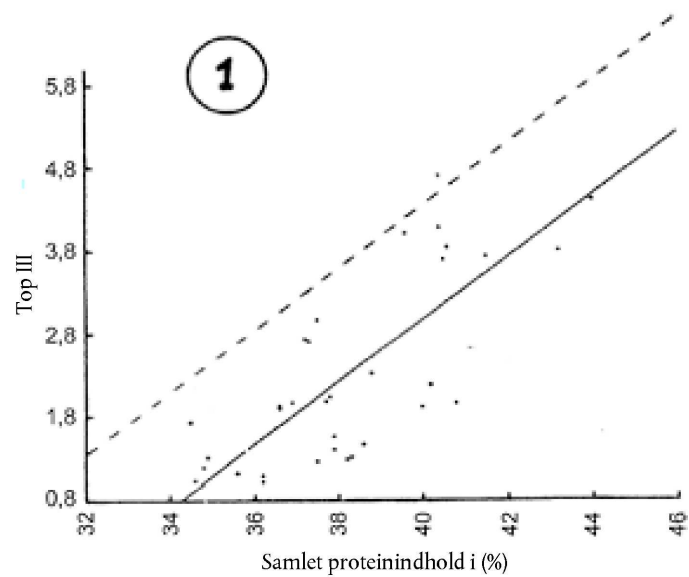
Hvis T_1 og T_2 er større end nul, kan det slutes, at der er løbevalle til stede.

Løbevalleindholdet beregnes ved hjælp af følgende formel: $W = T_2 + 0,91$

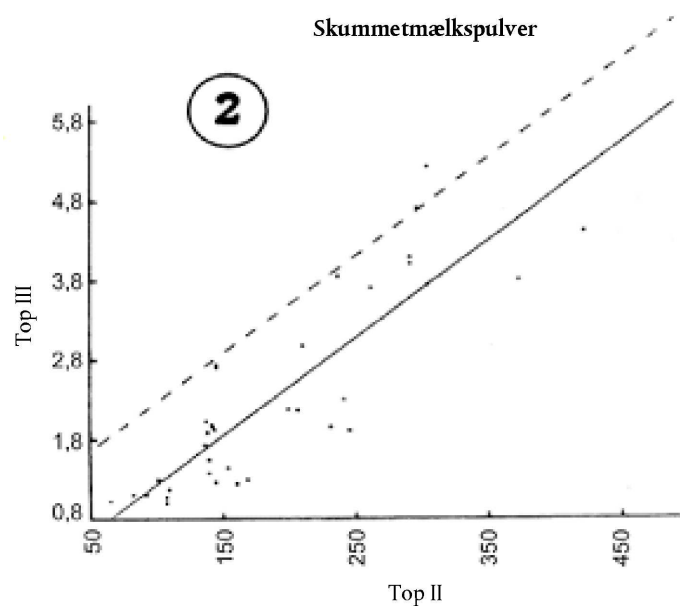
hvor:

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

Skummetmælkspulver



Skummetmælkspulver



Tillæg III

BESTEMMELSE AF LØBEVALLETØRSTOF I SKUMMETMÆLKSPULVER

1. FORMÅL: PÅVISNING AF TILSÆTNING AF LØBEVALLETØRSTOF TIL SKUMMETMÆLKSPULVER

2. REFERENCER: INTERNATIONAL STANDARD ISO 707

3. DEFINITION

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

4. PRINCIP

Prøver analyseres for kaseinmakropeptid A ved højtryksvæskerkromatografi 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 af anerkendt analysekvalitet. Der anvendes destilleret vand eller vand af mindst tilsvarende renhed. Acetonitril skal være af spektroskopisk kvalitet eller HPLC-kvalitet.

5.1. **Trichloreddikesyreopløsning**

240 g trichloreddikesyre (CCl_3COOH) opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml. Opløsningen skal forblive klar og farveløs.

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 trifluoredikesyre (TFA, CF_3COOH) blandes i en 1 000 ml målekolbe. Derefter fyldes op til 1 000 ml med vand.

Elueringsvæske B: 550 ml acetonitril, 20 ml isopropanol og 1,00 ml TFA blandes i en 1 000 ml målekolbe. Derefter fyldes op til 1 000 ml med vand. Før brugen filtreres elueringsvæsken gennem et membranfilter med porestørrelse 0,45 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 pulver tilsat 5 % (m/m) løbevallepulver med normal sammensætning, benævnt [5].

5.4.3. Samme pulver tilsat 50 % (m/m) løbevallepulver med normal sammensætning, benævnt [50].

6. APPARATUR

6.1. **Analysevægt**

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

6.3. **Mekanisk rysteapparat**

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. **Målepipetter på 10 ml (ISO 648, klasse A, eller ISO/R 835) eller et dispenseringsystem, som muliggør gennembløb af 10,0 ml på 2 min.**
- 6.9. **Dispenseringsystem, som muliggør gennembløb af 20,0 ml vand ved ca. 50 °C**
- 6.10. **Termostatstyret vandbad indstillet på 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **HPLC-udstyr bestående af:**
 - 6.11.1. *Binært gradientpumpesystem*
 - 6.11.2. *Manuel eller automatisk injektionsenhed på 100 µl*
 - 6.11.3. *En Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3-kolonne (længde: 25 cm, indvendig diameter: 0,46 cm) eller en tilsvarende bredporet siliciumbaseret kolonne med omvendt fase*
 - 6.11.4. *Termostatstyret kolonneovn indstillet på 35 ± 1 °C*
 - 6.11.5. *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).*
 - 6.11.6. *Integrator, der kan integrere til en fælles basislinje eller 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 CMP_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. **Prøven 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. Analyseprøve

I et centrifugeglas (6.2) eller en tilproppet kolbe (50 ml) afvejes 2,00 ± 0,001 g analyseprøve.

Bemærkning: Når det drejer sig om blandinger, afvejes en sådan mængde af analyseprøven, at den affedtede prøve svarer til 2,00 g.

8.3. Fjernelse af fedtstoffer og proteiner

- 8.3.1. *Der sættes 20,0 ml 50 °C varmt vand til analyseprøven. Pulveret opløses ved omrøring i 5 min. med et rysteapparat (6.3). Reagensglasset anbringes i vandbadet (6.10), og det afventes, at der indtræder en ligevægt ved 25 °C.*
- 8.3.2. *I løbet af 2 min. tilsættes 10,0 ml trichloreddikesyreopløsning (5.1) på 25 °C under kraftig omrøring med magnetomrøreren (6.4). Reagensglasset anbringes i vandbadet (6.10), hvori det henstår i 60 minutter.*
- 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. Kromatografisk bestemmelse

- 8.4.1. HPLC-metoden med omvendt fase udelukker muligheden for falsk positive resultater på grund af tilstedeværelsen af syret kærnemælkspulver.
- 8.4.2. Før HPLC-analysen med omvendt fase gennemføres, må gradientbetingelserne optimeres. En retentionstid på 26 minutter \pm 2 minutter for CMP_A er optimal for gradientsystemer med et dødvolumen på ca. 6 ml (volumenet fra det punkt, hvor opløsningerne blandes, til det punkt, hvor injektionssløjfen slutter). For gradientsystemer med et mindre dødvolumen (f.eks. 2 ml) bruges 22 minutter som optimal retentionstid.

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

Af supernatanten 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
Start	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lineær
32	1,0	10	90	lineær
37	1,0	10	90	lineær
42	1,0	90	10	lineær

Sammenligning af de to kromatogrammer vil vise beliggenheden af toppen af CMP_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: $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26)/6) * 30/27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26)/6) * 1,11$

hvor:

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

10: den oprindelige % B af kontrolgradienten

2,5: % B midtvejs minus % B ved begyndelsen ved anvendelse af den normale gradient

13,5: midtvejspunkt for kontrolgradienten

26: den krævede retentionstid for CMP_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 supernatanten eller filtratet (8.3.3) indsprøjtes en nøjagtigt afmålt mængde på 100 μ l i HPLC-apparatet under en gennemstrømningshastighed på 1,0 ml elueringsvæske (5.2) pr. minut.

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.

Bemærkning 1. Retentionstiden for CMP_A 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.

Bemærkning 2. Elueringsvæskerne må afgasses tilstrækkeligt og skal forblive afgassede. Dette er vigtigt for gradientpumpesystemets tilfredsstillende virkning. Standardafvigelsen for retentionstiden for CMP_A -toppen skal være på under 0,1 min. ($n = 10$).

Bemærkning 3. Efter hver femte prøve skal referenceprøven [5] indsprøjtes og benyttes til beregning af en ny responsfaktor R (9.1.1).

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

Integratoren (6.11.6) beregner automatisk CMP_A -toppens højde. Basislinjens beliggenhed skal kontrolleres for hvert kromatogram. Analysen eller integrationen skal gentages, hvis basislinjens beliggenhed ikke er korrekt.

Bemærkning: Hvis CMP_A -toppen er tilstrækkelig adskilt fra andre toppe, bør der anvendes dal-til-dal integration, ellers anvendes linjer vinkelret på en fælles basislinje, hvis startpunkt skal ligge tæt på CMP_A -toppen (dvs. ikke ved $t = 0$ min!). For standardprøven og prøverne anvendes samme integrationstype, og ved anvendelse af fælles basislinje kontrolleres det, at den er den samme for prøverne og standardprøven.

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 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 CMP nedbrydes i 8 % trichloredikesyreopløsning 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 CMP_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 CMP_A -toppen.

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

9. ANGIVELSE AF RESULTATER

9.1. Beregningsmetode og formler

- 9.1.1. *Beregning af responsfaktoren R:*

$$CMP_A\text{-toppen: } R = W/H$$

hvor:

R = responsfaktoren for CMP_A -toppen

H = højden af CMP_A -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 = responsfaktoren for CMP_A -toppen (9.1.1)

$H(E)$ = højden af CMP_A -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 prøve, må ikke overstige 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproducerbarhed

Ikke fastslået.

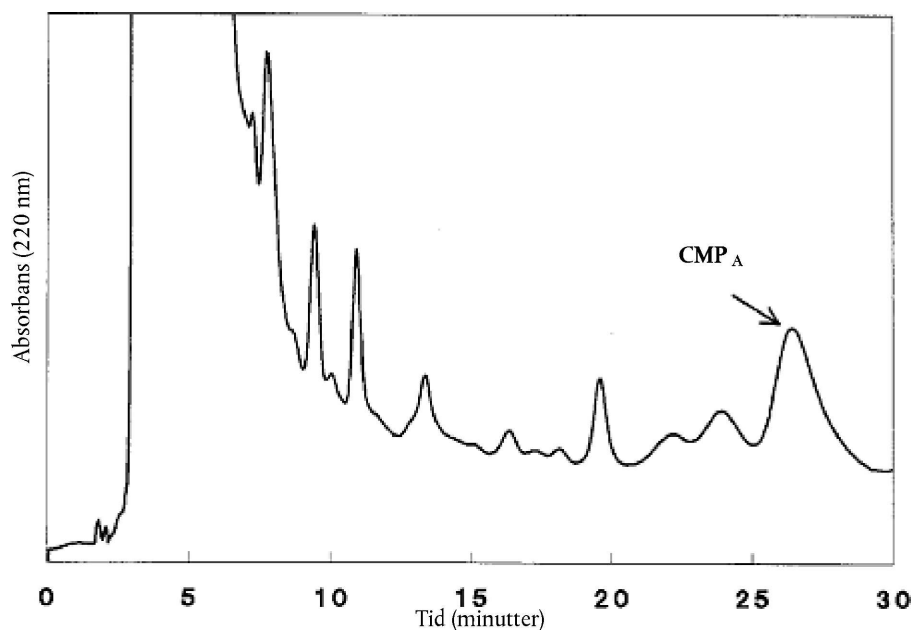
9.3.3. Linearitet

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

9.4. Fortolkning

Grænsen på 1 % omfatter usikkerheden i forbindelse med reproducerbarhed.

Figur 1
Ni—4.6 standard



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

3) Følgende bilag tilføjes:

»BILAG VI

Analysemetoder for smør i privat oplagring

Parameter	Metode
Fedtstof ⁽¹⁾	ISO 17189 eller ISO 3727 del 3
Vand	ISO 3727 del 1
Fedtfri tørstof, (ekskl. salt)	ISO 3727 del 2
Salt	ISO 15648

⁽¹⁾ Metoden, der anvendes, skal godkendes af betalingsorganet.

BILAG VII

Analysemetoder for skummetmælkspulver i privat oplagring

Parameter	Metode
Fedtstof	ISO 1736
Protein	ISO 8968 del 1
Vand	ISO 5537

BILAG VIII

Analysemetoder for ost i privat oplagring

1. Den i tillægget fastsatte referenceanalysemetode skal benyttes for at sikre, at ost udelukkende fremstillet af fåre-, gede- eller bøffelmælk eller af blandinger af fåre-, gede- og bøffelmælk ikke indeholder komælkskasein.

Komælkskasein anses for at være til stede, hvis indholdet af komælkskasein i den analyserede prøve er lig med eller overstiger indholdet i referenceprøven med 1 % komælk, jf. tillægget.

2. Til påvisning af komælkskasein i de i stk 1 omhandlede ostetyper kan bestemte metoder anvendes, forudsat at:
 - a) påvisningsgrænsen højst er 0,5 %
 - b) der ikke forekommer falsk positive resultater
 - c) komælkskaseinet er påviseligt med den fornødne følsomhed selv efter lange modningsperioder, som det kan være tilfældet under almindelige handelsforhold.

Hvis et af ovenstående krav ikke er opfyldt, anvendes de metoder, der er fastsat i tillægget.

Tillæg

**METODE TIL PÅVISNING AF KOMÆLK OG KOMÆLKSKEINAT I OST FREMSTILLET AF FÅRE-, GEDE-
ELLER BØFFELMÆLK ELLER AF BLANDINGER AF FÅRE-, GEDE- OG BØFFELMÆLK**

1. FORMÅL

Påvisning af komælk og komælkskaseinat 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. ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden er egnet til følsom og specifik påvisning af rå og varmebehandlet komælk og komælkskaseinat 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. METODEPRINCIP

3.1. Isolering af kaseiner fra ost og referenceopløsninger

3.2. Opløsning af isolerede kaseiner, som derefter underkastes plasminspaltning (EC.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.

Bemærkning: Nedenstående detaljer gælder for laboratoriefremstillede polyacrylamidgeler, der indeholder urea, af størrelsen 265 × 125 × 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.

Bemærkning: En forblandet acrylamid/BIS-opløsning, der fås i handelen, kan anvendes i stedet for de anførte afvejede mængder 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

250 μ l amfolyt pH 5-7

250 μ l amfolyt pH 6-8.

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

Bemærkning: Gelopløsningen laves straks før ophældningen (6.2).

4.1.3. *Katalysatoropløsninger*

4.1.3.1. N, 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.

Bemærkning: 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.

Forberedelse 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. *Dichlormethan*

4.5.3. *Acetone.*

4.6. **Proteinopløsende buffer**

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

24,03 g urea

250 mg dithiothreitol

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

Bemærkning: Opbevares i køleskab — holdbarhed 1 uge.

4.7. Reagenser til plasminspaltning af kaseiner

4.7.1. Ammoniumcarbonatbuffer

En 0,2 mol/l ammoniumhydrogencarbonatopløsning (1,58 g/100 ml vand) med 0,05 mol/l ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA, 1,46 g/100 ml) titreres med en 0,2 mol/l ammoniumcarbonatopløsning (1,92 g/100 ml vand) med 0,05 mol/l EDTA til pH 8.

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

4.7.3. ϵ -Aminocaprønsyre til enzymhæmning

2,624 g ϵ -aminocaprønsyre (6-amino-n-heksanonisyre) opløses i 100 ml 40 % (v/v) ethanol.

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.

Skummetælken 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 μ l 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 vollen. 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.

Bemærkning: Det kan tilrådes at kontrollere bøffelmælkenes renhed ved isoelektrisk fokusering af de plasminbehandlede kaseiner, inden standardopløsningerne fremstilles.

Reagenser til proteinfarvning

4.9. Fikservæske

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

4.10. Affarvningsopløsning

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

Bemærkning: 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) methanol ved hjælp af en magnetisk omrører (ca. 45 minutter) og filtreres gennem to middelhastigheds-foldefiltre.

4.11.2. Farvningsopløsning (stamopløsning 2)

5,0 g kobbersulfatpentahydrat 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.

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

5. APPARATUR
- 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 ($\geq 2,5$ kV) eller automatisk elektroforeseapparat**
- 5.5. **Cirkulationskryostat, termostatstyret ved $12 \pm 0,5$ °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. **Farvnings- og affarvningskåle (f.eks. 280 × 150 mm instrumentbakker) af rustfrit stål eller glas**
- 5.12. **Justerbar stanghomogenisator (10 mm diameter), skala 8 000-20 000 rpm**
- 5.13. **Magnetomrører**
- 5.14. **Ultralydsbad**
- 5.15. **Filmsvejser**
- 5.16. **25 µl mikropipetter**
- 5.17. **Vakuumpkoncentrator eller frysetørret**
- 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. FREMGANGSMÅDE

6.1. Forberedelse 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 vallen 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 dichlormethan (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 dichlormethan (4.5.2), 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-foldefilterpapir. 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.

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

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

25 mg isoleret kasein (6.1.1) opslæmmes i 0,5 ml ammoniumcarbonatbuffer (4.7.1) og homogeniseres i 20 minutter, f.eks. ved ultralydsbehandling. 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 ditionitrol.

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

6.2. Fremstilling af polyacrylamidgeler, der indeholder 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. 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). Gelbærepladen 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. Bærefoliens bagside rengøres omhyggeligt for at fjerne gelrester og urea. Gelsandwichen svejses til et filmglas og opbevares i køleskab (højest 6 uger).

Bemærkning: 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), tilskæres 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 (min.)	Spænding (V)	Strøm (mA)	Effekt (W)	Volttimer (Vh)
1. Præfokusering	30	maksimum 2 500	maksimum 15	konstant 4	ca. 300
2. Prøvefokusering ⁽¹⁾	60	maksimum 2 500	maksimum 15	konstant 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. 3 000

⁽¹⁾ Prøveapplikation: Efter præfokusering (første trin), afpipetteres 18 µl af prøven og standardopløsningerne over på prøveapplikatorerne (10 × 5 mm), der anbringes 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.

Bemærkning: Hvis gelens tykkelse eller bredde ændres, skal strøm og effekt justeres herefter (f.eks. fordobles elstrøm og effekt, 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	Effekt	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 0 Vh.

Prøveapplikatoren fjernes på andet trin ved 30 Vh.

6.4. **Proteinfarvning**

6.4.1. *Proteinfiksering*

Elektrodestrimlerne aftages, så snart der er slukket for strømmen, og gelen kommes 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).

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

Bemærkning 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 bøffel-mælk eller af blandinger af fåre-, gede- og bøffel-mælk 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 indholdet af komælk kan det tilrådes at justere koncentrationerne af prøve- og standardkoncentrationerne, så der fremkommer samme intensitet af fåre-, gede- 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 ko-, fåre-, gede- 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.

Bemærkning: Metoden fungerer tilfredsstillende, hvis der er et klart, positivt tegn på ko- 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 ko- γ_2 - og γ_3 -kaseinerne eller de tilsvarende toparealforhold er lig med eller højere end niveauet for 1 %-standardopløsningen.

8. LITTERATURHENVISNINGER

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 and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, s. 708-711 (1990).

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, s. 83-85 (1995).

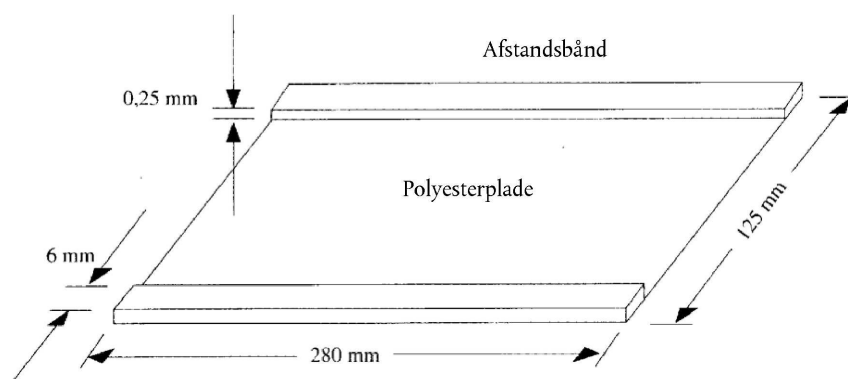
Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) s. 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, s. 195-199 (1982).

Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, s. 43-56 (1980).

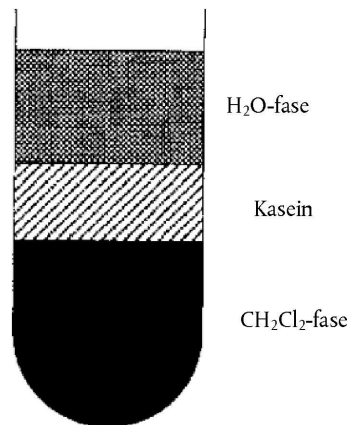
Figur 1

Skematisk tegning af dækfolie



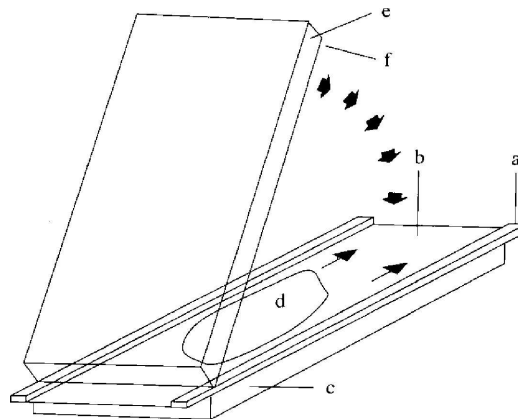
Figur 2

Kaseinlaget, der flyder mellem den vandige og den organiske fase efter centrifugering



Figur 3

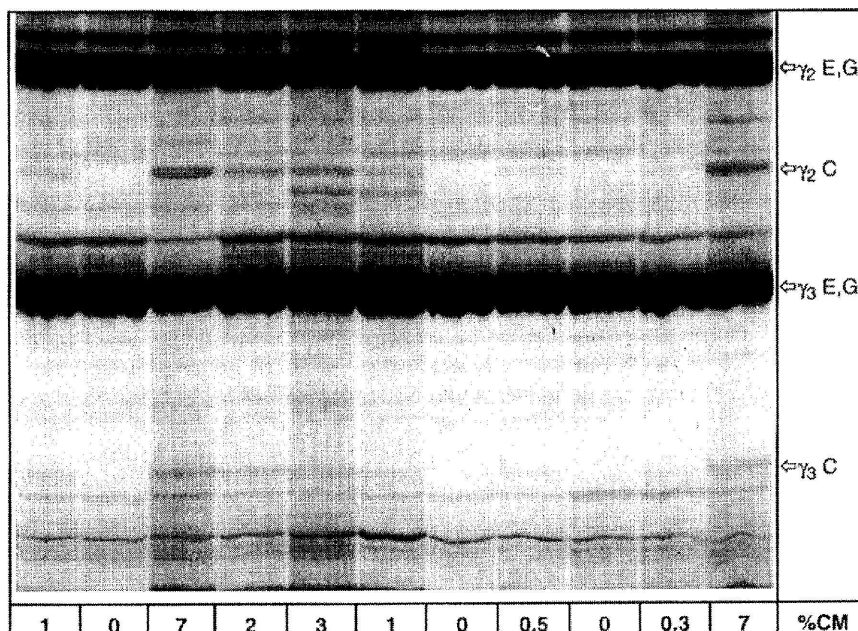
Viftemetode til støbning af ultratynde polyacrylamidgeler



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

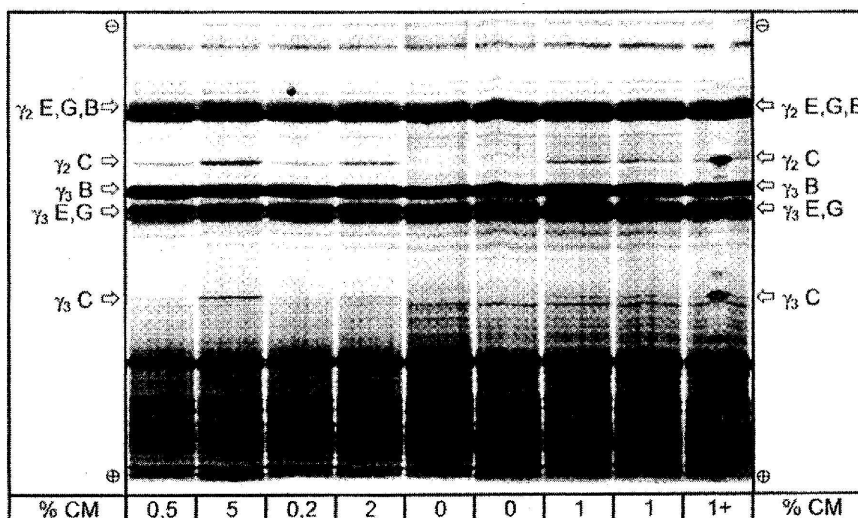


% CM = procent komælk; C = ko; E = får; G = ged.

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

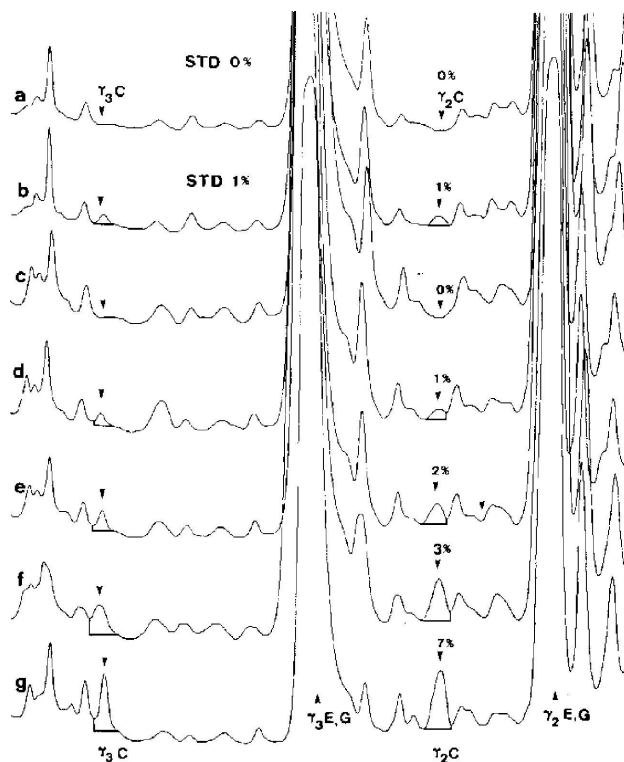


% CM = procent komælk; 1 + = prøve indeholdende 1 % komælk og tilsat rent komælkskasein midt på sporet. C = ko; E = får; G = ged; B = bøffel.

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 IX

Vurdering af analyserne**1. Kvalitetssikring**

Analyser skal foretages i laboratorier, der er udpeget i overensstemmelse med artikel 12 i forordning (EF) nr. 882/2004 (**), eller som er udpeget af medlemsstatens kompetente myndigheder.

2. Prøveudtagning og bestridelse af analyseresultater

1. Prøveudtagning foretages i overensstemmelse med den relevante forskrift for det pågældende produkt. Hvis der ikke udtrykkeligt henvises til bestemmelser om prøveudtagning, anvendes bestemmelserne i ISO 707, Mælk og mælkeprodukter. Vejledning om prøveudtagning.
2. Laboratorierapporterne om analyseresultaterne skal indeholde tilstrækkelige oplysninger til at muliggøre en evaluering af resultaterne i overensstemmelse med tillægget.
3. Med henblik på de analyser, der foreskrives i Unionens lovgivning, skal der udtages dobbelte prøver.
4. I tilfælde af uenighed om resultaterne gentager betalingsorganet den nødvendige analyse af det pågældende produkt, og omkostningerne herved afholdes af den tabende part.

Ovennævnte analyse udføres, forudsat at forseglede dobbeltprøver af produktet er til rådighed og har været opbevaret korrekt hos den kompetente myndighed. Producenten fremsender en anmodning til udbetalingsorganet om at foretage analysen inden for 7 arbejdsdage efter meddelelsen af resultaterne af den første analyse. Analysen gennemføres af betalingsorganet senest 21 arbejdsdage efter modtagelsen af anmodningen.

5. Resultatet af denne analyse er endeligt.
 6. Hvis producenten senest fem arbejdsdage efter prøveudtagningen kan dokumentere, at prøveudtagningsproceduren ikke er korrekt udført, skal prøveudtagningen om muligt gentages. Hvis en ny prøveudtagning ikke er mulig, accepteres sendingen.
-

Tillæg

Vurdering af, om en sending overholder den forskriftsmæssige grænse**1. Princip**

Hvis lovgivningen om offentlig intervention og privat oplagring omfatter detaljerede prøveudtagningsprocedurer, følges disse procedurer. I alle andre tilfælde anvendes der en prøve bestående af mindst 3 prøveenheder udtaget tilfældigt af den sending, der forevises til kontrol. En blandingsprøve kan forberedes. Resultatet sammenlignes med de forskriftsmæssige grænser ved beregning af et konfidensinterval på 95 % som to gange standardafvigelsen, hvor den relevante standardafvigelse afhænger af, 1) om metoden er valideret ved internationalt samarbejde med værdier for σ_r og σ_R , eller 2) om der ved intern validering er beregnet en intern reproducerbarhed. Konfidensintervallet er da det samme som resultatets måleusikkerhed.

2. Metode valideret ved internationalt samarbejde

I dette tilfælde er standardafvigelsen for repeterbarhed σ_r og standardafvigelsen for reproducerbarhed σ_R blevet fastlagt, og laboratoriet kan dokumentere overholdelse af karakteristika for den validerede metodes ydeevne.

Det aritmetiske gennemsnit \bar{x} af de n gentagne målinger beregnes.

Den ekspanderede måleusikkerhed ($k = 2$) af \bar{x} som

$$U = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n} \sigma_r^2}$$

Hvis det endelige måleresultat x beregnes med en formel af typen $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ eller $x = y_1/y_2$, følges de sædvanlige procedurer til kombineret af standardafvigelser i sådanne tilfælde.

Sendingen anses for ikke at overholde den øvre forskriftsmæssige grænse UL, hvis

$$\bar{x} - U > UL;$$

ellers anses den for at overholde UL.

Sendingen anses for ikke at overholde den nedre forskriftsmæssige grænse LL, hvis

$$\bar{x} + U < LL;$$

ellers anses den for at overholde LL.

3. Intern validering med beregning af den interne standardafvigelse for reproducerbarhed

Hvis der anvendes metoder, der ikke er angivet i denne forordning, og der ikke er fastlagt præcisionsmålinger, skal der foretages en intern validering. Den interne standardafvigelse for repeterbarhed s_r og den interne standardafvigelse for reproducerbarhed s_{iR} skal anvendes i stedet for henholdsvis σ_r og σ_R i formlen til beregning af den ekspanderede usikkerhed U .

De bestemmelser, der skal følges med henblik på at fastslå overholdelsen af den forskriftsmæssige grænse, er fastsat i punkt 1. Hvis sendingen imidlertid bedømmes til ikke at overholde den forskriftsmæssige grænse, gentages målingerne ved anvendelse af den metode, der er angivet i denne forordning, og det resultat, der er vurderet i overensstemmelse med punkt 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.
- (**) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 882/2004 af 29. april 2004 om offentlig kontrol med henblik på verifikation af, at foderstof- og fødevarerlovgivningen samt dyresundheds- og dyrevelfærdsbestemmelserne overholdes (EUT L 165 af 30.4.2004, s. 1).«
-