

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2018/150 DER KOMMISSION**vom 30. Januar 2018****zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2016/1240 der Kommission in Bezug auf die Analyse und Qualitätsbewertung von Milch und Milcherzeugnissen, die für die öffentliche Intervention und die Beihilfe für die private Lagerhaltung in Betracht kommen**

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

gestützt auf die Verordnung (EU) Nr. 1306/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Dezember 2013 über die Finanzierung, die Verwaltung und das Kontrollsystem der Gemeinsamen Agrarpolitik und zur Aufhebung der Verordnungen (EWG) Nr. 352/78, (EG) Nr. 165/94, (EG) Nr. 2799/98, (EG) Nr. 814/2000, (EG) Nr. 1290/2005 und (EG) Nr. 485/2008 des Rates ⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 62 Absatz 2 Buchstabe i,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Mit der Delegierten Verordnung (EU) 2016/1238 der Kommission ⁽²⁾ und der Durchführungsverordnung (EG) 2016/1240 der Kommission ⁽³⁾ wurden Bestimmungen über die öffentliche Intervention und die Beihilfe für die private Lagerhaltung festgelegt. In der Verordnung (EG) Nr. 273/2008 der Kommission ⁽⁴⁾ sind die Methoden festgelegt, mit denen beurteilt wird, ob Milch und Milcherzeugnisse den Förderanforderungen gemäß den Verordnungen über die öffentliche Intervention und die Beihilfe für die private Lagerhaltung entsprechen.
- (2) Angesichts der technischen Entwicklungen bei der Methodik zur Analyse und Qualitätsbewertung von Milch und Milcherzeugnissen sollten wesentliche Änderungen zur Vereinfachung und zur Aktualisierung der Verweise auf ISO-Normen vorgenommen werden. Im Interesse von Klarheit und Effizienz sollten in Anbetracht des Umfangs und des technischen Charakters der Änderungen der Bestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 273/2008 die einschlägigen Bestimmungen der genannten Verordnung in die Durchführungsverordnung (EU) 2016/1240 aufgenommen werden.
- (3) Um die einheitliche Einhaltung der neuen Normen und Verfahren in allen Mitgliedstaaten zu gewährleisten, sollte Laboratorien eine ausreichende Frist für die Überprüfung der Verfahren und Anwendung der aktualisierten Methoden eingeräumt werden.
- (4) Die Durchführungsverordnung (EU) 2016/1240 sollte daher entsprechend geändert werden.
- (5) Im Interesse der Rechtssicherheit sollte die Verordnung (EG) Nr. 273/2008 aufgehoben werden.
- (6) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses für die gemeinsame Organisation der Agrarmärkte —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Durchführungsverordnung (EU) 2016/1240 wird wie folgt geändert:

- (1) Artikel 4 wird wie folgt geändert:
 - (a) Absatz 1 wird wie folgt geändert:
 - i) Buchstabe d erhält folgende Fassung:
„d) in Anhang IV Teile I und Ia dieser Verordnung für Butter“;
 - ii) Buchstabe e erhält folgende Fassung:
„e) in Anhang V Teile I und Ia dieser Verordnung für Magermilchpulver“.

⁽¹⁾ ABl. L 347 vom 20.12.2013, S. 549.

⁽²⁾ Delegierte Verordnung (EU) 2016/1238 der Kommission vom 18. Mai 2016 zur Ergänzung der Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates in Bezug auf die öffentliche Intervention und die Beihilfe für die private Lagerhaltung (ABl. L 206 vom 30.7.2016, S. 15).

⁽³⁾ Durchführungsverordnung (EU) 2016/1240 der Kommission vom 18. Mai 2016 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates in Bezug auf die öffentliche Intervention und die Beihilfe für die private Lagerhaltung (ABl. L 206 vom 30.7.2016, S. 71).

⁽⁴⁾ Verordnung (EG) Nr. 273/2008 der Kommission vom 5. März 2008 mit Durchführungsbestimmungen zu der Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 des Rates hinsichtlich der Methoden für die Analyse und Qualitätsbewertung von Milch und Milcherzeugnissen (ABl. L 88 vom 29.3.2008, S. 1).

(b) Absatz 2 erhält folgende Fassung:

„(2) Zur Bestimmung der Qualität von Getreide, Butter und Magermilchpulver gemäß Anhang I, Anhang IV bzw. Anhang V, die für die öffentliche Intervention in Betracht kommen, sind die Methoden anzuwenden, die gegebenenfalls im Rahmen europäischer und/oder internationaler Normen festgelegt wurden; maßgeblich ist die letzte Fassung, die mindestens sechs Monate vor dem ersten Tag der öffentlichen Intervention gemäß Artikel 12 der Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 gilt.“

(2) Folgender Artikel 60a wird eingefügt:

„Artikel 60a

Spezifische Kontrollvorschrift für die öffentliche Intervention und die Beihilfe für die private Lagerhaltung von Milch und Milcherzeugnissen

(1) Die Beihilfefähigkeit von Butter, Magermilchpulver und Käse in Bezug auf die Beihilfe für die private Lagerhaltung wird im Einklang mit den Methoden gemäß den Anhängen VI, VII bzw. VIII festgelegt.

Diese Methoden werden unter Bezugnahme auf die letzten Fassungen der einschlägigen europäischen oder internationalen Normen festgelegt; maßgeblich ist die letzte Fassung, die mindestens sechs Monate vor dem ersten Tag der öffentlichen Intervention gemäß Artikel 12 der Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 gilt.

(2) Die Ergebnisse der unter Anwendung der in dieser Verordnung festgelegten Methoden durchgeführten Kontrollen werden im Einklang mit Anhang IX bewertet.“

(3) Die Anhänge werden nach Maßgabe des Anhangs dieser Verordnung geändert.

Artikel 2

Die Verordnung (EG) Nr. 273/2008 wird aufgehoben.

Artikel 3

Diese Verordnung tritt am siebten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 30. Januar 2018

Für die Kommission
Der Präsident
Jean-Claude JUNCKER

ANHANG

Die Anhänge der Durchführungsverordnung (EU) 2016/1240 werden wie folgt geändert:

(1) Anhang IV wird wie folgt geändert:

a) Teil I Nummer 2 Unterabsatz 2 erhält folgende Fassung:

„Jede Probe ist einzeln zu prüfen. Eine Wiederholung der Probenahme oder der Prüfung ist unzulässig.“

b) Der folgende Teil Ia wird eingefügt:

„TEIL IA

Analysemethoden für ungesalzene Butter zur öffentlichen Intervention

Parameter	Methode
Fettgehalt ⁽¹⁾	ISO 17189 oder ISO 3727 Teil 3
Wassergehalt	ISO 3727 Teil 1
Fettfreie Trockenmasse	ISO 3727 Teil 2
Säuregrad	ISO 1740
Peroxidzahl	ISO 3976
Fremdfett	ISO 17678
Sensorische Merkmale	ISO 22935 Teile 2 und 3 sowie nachfolgende Punktetabelle

⁽¹⁾ Die anzuwendende Methode ist von der Zahlstelle zu genehmigen.

Punktetabelle

Aussehen		Konsistenz		Geruch und Geschmack	
Punktzahl	Beschreibung	Punktzahl	Beschreibung	Punktzahl	Beschreibung
5	<i>Sehr gut</i> Idealtyp Höchste Qualität (uniform, seco)	5	<i>Sehr gut</i> Idealtyp Höchste Qualität (gut streichfähig)	5	<i>Sehr gut</i> Idealtyp Höchste Qualität (absolut rein, feinstes Aroma)
4	<i>Gut</i> (keine offensichtlichen Mängel)	4	<i>Gut</i> (keine offensichtlichen Mängel)	4	<i>Gut</i> (keine offensichtlichen Mängel)
1, 2 oder 3	Mängel	1, 2 oder 3	Mängel	1, 2 oder 3	Mängel“

(2) In Anhang V wird folgender Teil Ia eingefügt:

„TEIL IA

Analysemethoden für Magermilchpulver zur öffentlichen Intervention

Parameter	Methode
Eiweißgehalt	ISO 8968 Teil 1
Fettgehalt	ISO 1736
Wassergehalt	ISO 5537
Säuregrad	ISO 6091
Laktatgehalt	ISO 8069
Phosphataseprobe	ISO 11816 Teil 1
Löslichkeit	ISO 8156
Gehalt an verbrannten Teilchen ⁽¹⁾	ADPI
Gehalt an Mikroorganismen	ISO 4833 Teil 1
Buttermilch	Anlage I
Labmolke ⁽²⁾	Anlagen II und III
Sauermolke ⁽³⁾	ISO 8069 oder Vor-Ort-Kontrollen
Sensorische Prüfungen ⁽⁴⁾	ISO 22935 Teile 2 und 3

⁽¹⁾ Die Analyse des Gehalts an verbrannten Teilchen kann systematisch durchgeführt werden. Diese Analyse ist jedoch stets durchzuführen, wenn keine sensorischen Prüfungen vorgenommen werden.

⁽²⁾ Die anzuwendende Methode ist von der Zahlstelle zu genehmigen (eine Methode oder beide).

⁽³⁾ Die anzuwendende Methode ist von der Zahlstelle zu genehmigen.

⁽⁴⁾ Sensorische Prüfungen sind vorzunehmen, wenn diese aufgrund einer von der Zahlstelle genehmigten Risikoanalyse für erforderlich gehalten werden.

Anlage I

MAGERMILCHPULVER: BESTIMMUNG DES GEHALTS AN PHOSPHATIDYLSERIN UND PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN**Methode: Umkehrphasen-HPLC****1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH**

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) in Magermilchpulver (MMP) und ist für den Nachweis von Buttermilch-Feststoffen in Magermilchpulver geeignet.

2. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Gehalt an PS + PE: Massenfraktion der mit dieser Methode festgestellten Substanz; das Ergebnis wird in mg Phosphatidylethanolamin-Dipalmitoyl (PEDP) je 100 g Pulver ausgedrückt.

3. KURZBESCHREIBUNG

Extraktion von Aminophospholipiden aus dem rekonstituierten Milchpulver mithilfe von Methanol; Bestimmung von PS und PE als o-Phthaldialdehyd (OPA)-Derivat durch Umkehrphasen(RP)-HPLC und Fluoreszenzdetektion; Quantifizierung des PS- und PE-Gehalts in der Testprobe anhand einer Referenzstandardprobe mit einem bekannten PEDP-Gehalt.

4. REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Wasser muss destilliert oder von mindestens gleicher Reinheit sein, wenn nicht anderweitig angegeben.

4.1. Standardmaterial: PEDP, Reinheit mindestens 99 %

Anmerkung: Das Standardmaterial ist bei – 18 °C zu lagern.

4.2. Reagenzien zur Vorbereitung der Standard- und der Testproben**4.2.1. Methanol in HPLC-Qualität****4.2.2. Chloroform in HPLC-Qualität****4.2.3. Tryptaminmonohydrochlorid****4.3. Reagenzien für die Derivatisierung des o-Phthaldialdehyds****4.3.1. Natriumhydroxid, 12 M wässrige Lösung****4.3.2. Borsäure, 0,4 M wässrige Lösung, mit Natriumhydroxyd (4.3.1) auf pH 10,0 eingestellt****4.3.3. 2-Mercaptoethanol****4.3.4. o-Phthaldialdehyd (OPA)****4.4. HPLC-Elutionsmittel****4.4.1. Die Elutionsmittel müssen mit Reagenzien in HPLC-Qualität zubereitet werden.****4.4.2. Wasser in HPLC-Qualität****4.4.3. Methanol von geprüfter fluorimetrischer Reinheit****4.4.4. Tetrahydrofuran****4.4.5. Natriumdihydrogenphosphat****4.4.6. Natriumacetat****4.4.7. Essigsäure**

5. APPARATUR

- 5.1. **Analysewaage, Messgenauigkeit 1 mg, Teilung 0,1 mg**
- 5.2. **Becher, 25 und 100 ml**
- 5.3. **Pipetten, Aufgabemengen 1 und 10 ml**
- 5.4. **Magnetrührer**
- 5.5. **Messpipetten, Aufgabemengen 0,2, 0,5 und 5 ml**
- 5.6. **Messkolben, 10, 50 und 100 ml**
- 5.7. **Spritzen, 20 und 100 µl**
- 5.8. **Ultraschallbad**
- 5.9. **Zentrifuge, Zentrifugalkraft 27 000 × g**
- 5.10. **Glasfläschchen, etwa 5 ml**
- 5.11. **Messzylinder, 25 ml**
- 5.12. **pH-Messgerät, Genauigkeit 0,1 pH**
- 5.13. **HPLC-Ausrüstung**
 - 5.13.1. *Gradientenpumpe, Pumpleistung 1,0 ml/min bei 200 bar*
 - 5.13.2. *Autosampler mit Derivatisierungsfunktion*
 - 5.13.3. *Säulenheizung zur Regelung einer Säulentemperatur von 30 °C (± 1 °C)*
 - 5.13.4. *Fluoreszenz-Messgerät, Messbereich 330 nm, Emissionsbereich 440 nm*
 - 5.13.5. *Integrator oder Datenverarbeitungs-Software zur Messung von Peak-Flächen*
 - 5.13.6. *LiChrospher®-100-Säule (250 × 4,6 mm) oder gleichwertige mit Octadecylsilan (C 18) gepackte Säule, Partikelgröße 5 µm*

6. PROBENAHEME

Die Probenahme ist nach der Norm ISO 707 durchzuführen.

7. VERFAHREN

7.1. **Zubereitung der internen Standardlösung**

- 7.1.1. 30,0 mg (± 0,1 mg) Tryptamin-monohydrochlorid (4.2.3) werden in einen 100-ml-Messkolben (5.6) eingewogen und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt.
- 7.1.2. Von dieser Lösung wird 1 ml in einen 10-ml-Messkolben (5.6) eingipettiert (5.3) und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt, um eine Tryptaminkonzentration von 0,15 mM zu erhalten.

7.2. **Zubereitung der Testprobenlösung**

- 7.2.1. 1,000 g (± 0,001 g) der Magermilchpulver-Probe werden in ein 25-ml-Becherglas (5.2) eingewogen. 10 ml destilliertes Wasser mit einer Temperatur von 40 °C (± 1 °C) werden mit einer Pipette (5.3) hinzugegeben und mit einem Magnetrührer (5.4) 30 Minuten lang gerührt, um ggf. vorhandene Klumpen aufzulösen.
- 7.2.2. Danach werden 0,2 ml der rekonstituierten Milch (5.5) in einen 10-ml-Messkolben (5.6) eingipettiert und 100 µl der 0,15 mM-Tryptaminlösung (7.1) mit einer Spritze (5.7) zugegeben und mit Methanol (4.2.1) bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird durch Stürzen sorgfältig gemischt und 15 Minuten mit Ultraschall (5.8) behandelt.
- 7.2.3. Danach ist die Lösung 10 Minuten mit einer Zentrifuge (5.9) bei 27 000 g zu beschleunigen und der Überstand in einem Glasfläschchen (5.10) aufzunehmen.

Anmerkung: Die Testprobenlösung ist bis zur HPLC-Analyse bei 4 °C aufzubewahren.

7.3. Zubereitung der externen Standardlösung

- 7.3.1. 55,4 mg PEDP (4.1) werden in einen 50-ml-Messkolben (5.6) eingewogen und etwa 25 ml Chloroform (4.2.2) mit einem Messzylinder (5.11) zugegeben. Der verschlossene Kolben wird auf 50 °C (± 1 °C) erhitzt und der Inhalt sorgfältig gemischt, bis sich das PEDP aufgelöst hat. Danach wird der Kolben auf 20 °C gekühlt, mit Methanol (4.2.1) bis zur Marke aufgefüllt und durch Stürzen des Kolbens gemischt.
- 7.3.2. 1 ml dieser Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben (5.6) eingipettiert (5.3) und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt. Von dieser Lösung wird 1 ml in einen 10-ml-Messkolben (5.6) eingipettiert (5.3), mit 100 μ l (5.7) der 0,15 mM Tryptaminlösung (7.1) versetzt und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt. Die Lösung wird durch Stürzen des Kolbens gemischt.

Anmerkung: Die Standardprobenlösung ist bis zur HPLC-Analyse bei 4 °C aufzubewahren.

7.4. Vorbereitung des Derivatisierungsreagens

25,0 mg ($\pm 0,1$ mg) OPA (4.3.4) werden in einen 10-ml-Messkolben (5.6) gegeben, mit 0,5 ml (5.5) Methanol (4.2.1) versetzt und sorgfältig gemischt, bis sich das OPA gelöst hat. Danach wird bis zur Marke mit der Borsäurelösung (4.3.2) aufgefüllt; mit einer Spritze (5.7) werden 20 μ l 2-Mercaptoethanol (4.3.3) zugegeben.

Anmerkung: Das Derivatisierungsreagens kann ohne Stabilitätsverlust eine Woche bei 4 °C in einer braunen Glasflasche aufbewahrt werden.

7.5. Bestimmung durch HPLC

7.5.1. Elutionsmittel (4.4)

Lösungsmittel A: 0,3 mM Natriumdihydrogenphosphat und 3 mM Natriumacetatlösung (mit Essigsäure auf pH 6,5 ($\pm 0,1$) eingestellt): Methanol: Tetrahydrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Lösungsmittel B: Methanol

7.5.2. Empfohlener Elutionsgradient:

Zeit (min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)	Durchfluss (ml/min)
Anfänglich	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

Anmerkung: Der Elutionsgradient muss unter Umständen geringfügig verändert werden, damit die in Abbildung 1 gezeigte Auflösung erreicht wird.

Säulentemperatur: 30 °C

7.5.3. Einspritzvolumen: 50 µl Derivatisierungsmittel und 50 µl Probelösung.

7.5.4. Säulenäquilibration

Wird die Säule täglich neu gestartet, muss sie 15 Minuten lang mit Lösungsmittel B (100 %) gespült, dann bei einem Verhältnis A:B von 40:60 eingestellt und mit einem Durchfluss von 1 ml/min 15 Minuten lang äquilibriert werden. Danach wird ein Blindlauf unter Einspritzung von Methanol (4.2.1) durchgeführt.

Anmerkung: Bevor die Säule für längere Zeit gelagert wird, ist sie 30 Minuten lang mit einer Mischung von Methanol und Chloroform im Verhältnis 80:20 (v/v) zu spülen.

7.5.5. Bestimmung des PS- und des PE-Gehalts des Testprobe

7.5.6. Die chromatografischen Analysen werden in der entsprechenden Reihenfolge durchgeführt, wobei die Intervalle zwischen den Durchläufen konstant bleiben müssen, um konstante Retentionszeiten zu erhalten. Die externe Standardlösung (7.3) wird in alle 5-10 Testproben eingespritzt, damit der Kalibrierfaktor bewertet werden kann.

Anmerkung: Die Säule ist nach ungefähr 20-25 Durchläufen 30 Minuten lang mit 100 %iger Lösung B (7.5.1) zu spülen.

7.6. **Integrationsbetrieb**

7.6.1. PEDP-Peak

Das PEDP wird als einzelner Peak eluiert. Die Peak-Fläche wird durch Integration von Tal zu Tal ermittelt.

7.6.2. Tryptamin-Peak

Das Tryptamin wird als einzelner Peak (siehe Abbildung 1) eluiert. Die Peak-Fläche wird durch Integration von Tal zu Tal ermittelt.

7.6.3. PS- und PE-Peak-Gruppen

Unter den beschriebenen Bedingungen (Abbildung 1) ergibt PS zwei teilweise getrennte Haupt-Peaks, denen ein kleinerer Peak vorausgeht. PE ergibt drei teilweise getrennte Haupt-Peaks. Die Gesamtfläche des jeweiligen Peak-Bündels wird ermittelt, indem die Basislinie wie in Abbildung 1 zu sehen gezogen wird.

8. BERECHNUNG UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

Der PS- und PE-Gehalt der Testprobe wird wie folgt berechnet:

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

Dabei ist:

C = PS- oder PE-Gehalt (mg/100 g Pulver in der Testprobe)

A₁ = Peak-Fläche PEDP der Standard-Probenlösung (7.3)

A₂ = Peak-Fläche PS oder PE der Testprobenlösung (7.2)

T₁ = Peak-Fläche Tryptamin der Standard-Probenlösung (7.3)

T₂ = Peak-Fläche Tryptamin der Testprobenlösung (7.2)

9. GENAUIGKEIT DER METHODE

Anmerkung: Die Werte für die Wiederholbarkeit wurden nach der Internationalen IDF-Norm berechnet (*).

9.1. **Wiederholbarkeit**

Die relative Wiederholstandardabweichung beschreibt die Variabilität der Ergebnisse, die von dem gleichen Analytiker mit den gleichen Geräten unter den gleichen Bedingungen mit der gleichen Probe in kurzen Zeitabständen unabhängig voneinander erzielt wurden; ein Relativwert von 2 % sollte nicht überschritten werden. Werden zwei Bestimmungen unter diesen Bedingungen durchgeführt, sollte der relative Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen nicht mehr als 6 % des arithmetischen Mittels der Ergebnisse betragen.

9.2. Vergleichbarkeit

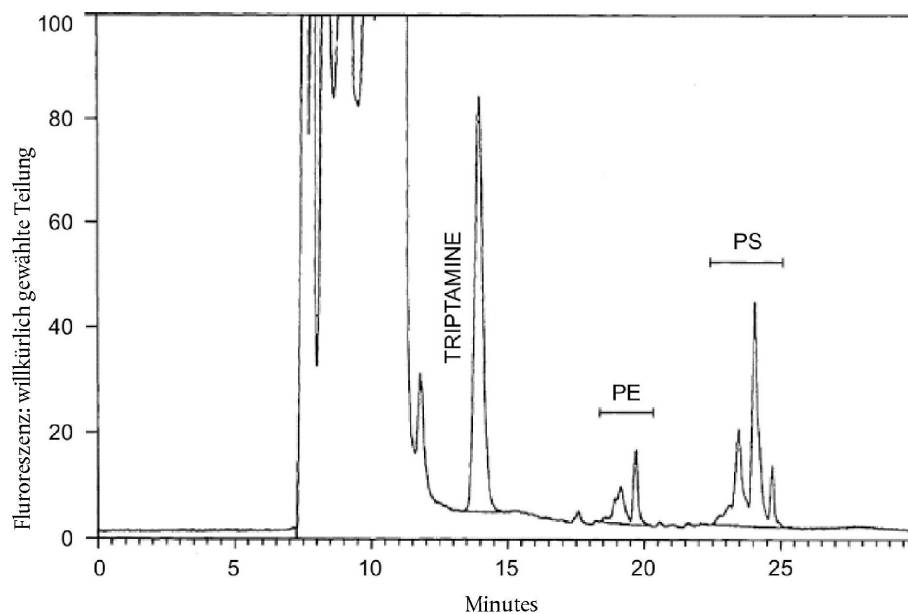
Werden zwei Bestimmungen von Analytikern in unterschiedlichen Laboratorien mit unterschiedlichen Geräten unter unterschiedlichen Bedingungen mit der gleichen Testprobe durchgeführt, sollte der relative Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen nicht mehr als 11 % des arithmetischen Mittels der Ergebnisse betragen.

10. LITERATUR

- 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).

Abbildung 1

HPLC-Ergebnis für die OPA-Derivate Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) in einem Methanol-Extrakt aus rekonstituiertem Magermilchpulver; die Integrationsform für die Peaks von PS, PE und Tryptamin (interner Standard) ist eingezeichnet



Anlage II

NACHWEIS VON LABMOLKE IN MAGERMILCHPULVER ZUR ÖFFENTLICHEN LAGERHALTUNG DURCH BESTIMMUNG VON KASEINMAKROPEPTIDEN MITTELS HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)**1. GEGENSTAND UND ANWENDUNGSBEREICH**

Durch die Bestimmung der Kaseinmakropeptide ermöglicht diese Methode den Nachweis von Labmolke in Magermilchpulver zur öffentlichen Lagerung.

2. LITERATUR

Internationale Norm ISO 707, Milch und Milcherzeugnisse – Probenahmetechniken.

3. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Unter dem Gehalt an Labmolkepulver wird der nach diesem Verfahren bestimmte Massenanteil an Kaseinmakropeptiden in Prozent verstanden.

4. KURZBESCHREIBUNG

- Rekonstitution des Magermilchpulvers in warmem Wasser, Entfernen des Fettanteils und der Proteine mit Trichloressigsäure und anschließende Zentrifugierung oder Filtrierung;
- Bestimmung der im Überstand vorhandenen Kaseinmakropeptidmenge (CMP) durch Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC);
- Beurteilung des Ergebnisses durch den Vergleich mit Standardproben aus Magermilchpulver, ohne oder mit Zusatz eines bekannten Anteils an Labmolkepulver.

5. REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Das verwendete Wasser muss destilliert sein oder einen mindestens gleichwertigen Reinheitsgrad aufweisen.

5.1. Trichloressigsäurelösung

240 g Trichloressigsäure (CCl_3COOH) werden in Wasser gelöst; anschließend wird die Lösung auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung sollte klar und farblos sein.

5.2. Elutionslösung, pH 6,0

1,74 g Di-Kaliumphosphat (K_2HPO_4), 12,37 g Mono-Kaliumphosphat (KH_2PO_4) und 21,41 g Natriumsulfat (Na_2SO_4) werden in etwa 700 ml Wasser gelöst. Wenn erforderlich, ist der pH-Wert mit Phosphorsäure- oder Kaliumhydroxidlösung auf 6,0 zu korrigieren.

Die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt und gut durchmischt.

Anmerkung: Die Zusammensetzung des Elutionsmittels kann so geändert werden, dass die im Zertifikat der Standardlösungen vorgegebenen Anforderungen oder die Herstelleranweisungen bzw. die Anforderungen an das Packmaterial der Säule erfüllt werden.

Vor der Verwendung wird die Elutionslösung durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

5.3. Waschlösung

Ein Teil Acetonitril (CH_3CN) wird mit 9 Teilen Wasser gemischt. Vor der Verwendung wird die Lösung durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

Anmerkung: Jede andere Waschlösung mit bakterizider Wirkung, die die Trennleistung der Säulen nicht beeinträchtigt, kann verwendet werden.

5.4. Standardproben**5.4.1. Magermilchpulver gemäß den Anforderungen der vorliegenden Verordnung (d. h. [0])****5.4.2. Das gleiche Magermilchpulver, verfälscht durch Zusatz von 5 % (m/m) Labmolkepulver von durchschnittlicher Zusammensetzung (d. h. [5])**

6. APPARATUR

6.1. Analysewaage

6.2. (Fakultativ:) Zentrifuge, mit der eine Zentrifugalkraft von 2 200 g erreicht werden kann, ausgerüstet mit Zentrifugenröhrchen mit Verschlussstopfen oder -kappe und einem Fassungsvermögen von 50 ml

6.3. Mechanische Schüttelvorrichtung

6.4. Magnetrührer

6.5. Glastrichter, ca. 7 cm Durchmesser

6.6. Filterpapier, mittlere Filtriergeschwindigkeit, ca. 12,5 cm Durchmesser

6.7. Filtriervorrichtung aus Glas mit Membranfilter, 0,45 µm Porendurchmesser

6.8. Messpipetten, Nennvolumen 10 ml (ISO 648, Klasse A oder ISO/R 835) bzw. ein Pipettiersystem zur Aufgabe von 10,0 ml in 2 Minuten

6.9. Aufgabesystem zur Übertragung von 20,0 ml Wasser bei einer Temperatur von ca. 50 °C

6.10. Thermostatisierbares Wasserbad, eingestellt auf 25 °C ($\pm 0,5$ °C)

6.11. HPLC-Ausrüstung, bestehend aus

6.11.1. einer Pumpe

6.11.2. einem manuellem Injektor oder einem Autosampler mit 15 bis 30 µl Fassungsvermögen

6.11.3. 2 TSK-2 000-SW-Säulen in Reihe (Länge 30 cm, Innendurchmesser 0,75 cm) oder gleichwertige Säulen (z. B. einmal TSK-2 000-SWXL, einmal Agilent Technologies Zorbax GF 250) und einer Vorsäule (3 cm $\times$ 0,3 cm) gepackt mit I 125 oder Material mit gleichwertiger Effizienz

6.11.4. einem thermostatisierbaren Säulenofen, einstellbar auf 35 °C (± 1 °C)

6.11.5. einem UV-Detektor mit variabler Wellenlänge für Messungen bei 205 nm mit einer Empfindlichkeit von 0,008 Å

6.11.6. einem Integrator zur Messung der Peak-Höhe

Anmerkung: Die Säulen können auch bei Raumtemperatur eingesetzt werden. Allerdings ist die Trennleistung dann etwas geringer. In diesem Fall müssen die Temperaturschwankungen während einer Analysenreihe unter ± 5 °C betragen.

7. PROBENAHME

7.1. Die Probenahme erfolgt nach dem Verfahren der internationalen Norm ISO 707. Die Mitgliedstaaten können jedoch ein anderes Probenahmeverfahren anwenden, sofern es den Prinzipien der genannten Norm entspricht.

7.2. Die Probe ist so aufzubewahren, dass sie unversehrt bleibt und ihre Zusammensetzung sich nicht ändert.

8. VERFAHREN

8.1. Vorbereitung der Testprobe

Das Milchpulver wird in einen ungefähr das doppelte Volumen fassenden Behälter mit luftdichtem Verschluss gegeben und der Behälter sofort verschlossen. Das Milchpulver wird durch mehrmaliges Stürzen des Behälters vollständig durchmischt.

8.2. Probeneinwaage

2,000 g ($\pm 0,001$ g) der Probe werden in ein Zentrifugenröhrchen (6.2) oder ein geeignetes verschließbares Gefäß (50 ml) eingewogen.

8.3. Abtrennen von Fett und Eiweiß

8.3.1. Die Probeneinwaage wird mit 20,0 ml warmem Wasser (50 °C) versetzt. Zum Auflösen wird das Pulver mithilfe einer mechanischen Schüttelvorrichtung (6.3) 5 Minuten lang geschüttelt. Das Röhrchen wird in ein Wasserbad (6.10) gegeben und bei 25 °C stehen gelassen.

8.3.2. 10,0 ml Trichloressigsäurelösung (5.1) mit einer Temperatur von 25 °C werden innerhalb von 2 Minuten unter kräftigem Rühren mit dem Magnetrührer (6.4) zugesetzt. Das Röhrchen wird in ein Wasserbad (6.10) gestellt und 60 Minuten stehen gelassen.

8.3.3. Danach wird die Probe bei 2 200 g 10 Minuten zentrifugiert (6.2) oder durch Filterpapier (6.6) gefiltert. Die ersten 5 ml des Filtrats sind zu verwerfen.

8.4. Chromatografische Bestimmung

8.4.1. Ein genau abgemessenes Volumen zwischen 15 und 30 µl vom Überstand oder Filtrat (8.3.3) wird in das HPLC-Gerät (6.11) injiziert; währenddessen wird die Elutionslösung (5.2) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,0 ml pro Minute zugeführt.

Anmerkung 1: Abhängig vom Innendurchmesser der verwendeten Säulen bzw. den Anweisungen des Säulenherstellers kommen möglicherweise auch sonstige Durchflussgeschwindigkeiten in Betracht.

Anmerkung 2: Bei jeder Unterbrechung sind die Säulen mit Wasser zu spülen. Die Elutionslösung (5.2) darf niemals in den Säulen bleiben.

Vor jeder Unterbrechung von mehr als 24 Stunden sind die Säulen mit Wasser zu spülen und mindestens 3 Stunden lang bei einem Durchfluss von 0,2 ml pro Minute mit der in Nummer 5.3 genannten Lösung zu waschen.

8.4.2. Die Ergebnisse der chromatografischen Analyse der Proben [E] werden in Form eines Chromatogramms gewonnen, in dem jeder Peak durch seine Retentionszeit RT identifiziert wird, d. h.:

Peak II:	Zweiter Peak des Chromatogramms mit RT etwa 12,5 Minuten
Peak III:	Dritter Peak des Chromatogramms (entsprechend CMP) mit RT 15,5 Minuten

Die Qualität der Säulen kann die Retentionszeit der verschiedenen Peaks beeinflussen.

Der Integrator (6.11.6) berechnet automatisch die Fläche A der einzelnen Peaks, d. h.:

A _{II} :	Fläche von Peak II
A _{III} :	Fläche von Peak III

Vor der quantitativen Interpretation muss das Aussehen des Chromatogramms untersucht werden, um gegebenenfalls Anomalien infolge einer Störung des Gerätes oder der Säulen oder infolge der Art und Herkunft der analysierten Probe feststellen zu können.

Im Zweifelsfall ist die Analyse zu wiederholen.

8.5. Kalibrierung

8.5.1. Für die Standardproben (5.4) ist das unter den Punkten 8.2 bis 8.4.2 beschriebene Verfahren genau einzuhalten.

Es sind frisch zubereitete Lösungen zu verwenden, da CMP im 8 %igen Trichloressigsäure-Milieu abgebaut wird. Der Verlust wird bei 30 °C auf 0,2 % pro Stunde geschätzt.

8.5.2. Vor jeder chromatografischen Bestimmung der Proben sind die Säulen durch wiederholte Injektion der Standardprobe (5.4.2) in die in Nummer 8.5.1 genannte Lösung vorzubehandeln, bis die Fläche und die Retentionszeit des dem CMP entsprechenden Peaks konstant bleiben.

8.5.3. Die Kalibrierfaktoren R sind nach Injektion des gleichen Filtratvolumens wie bei den Proben (8.5.1) zu bestimmen.

9. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Methode und Berechnungsformel

9.1.1. Berechnung der Kalibrierfaktoren R

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

Dabei ist:

R_{II} = Kalibrierfaktoren der Peaks II

$A_{II} [0]$ = Flächen der Peaks II der gemäß Nummer 8.5.3 hergestellten Standardprobe [0]

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

Dabei ist:

- R_{III} = Kalibrierfaktor für Peak III
- $A_{III}[0]$ and $A_{III}[5]$ = Flächen von Peak III in den gemäß Nummer 8.5.3 hergestellten Standardproben [0] und [5]
- W = Menge der Labmolke in der Standardprobe [5], d. h. 5

9.1.2. Berechnung der relativen Fläche der Peaks in der Probe [E]:

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

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

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

Dabei ist:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = relative Flächen der Peaks II, III und IV in der Probe [E]
- $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = Flächen der Peaks II und III in der gemäß Nummer 8.4.2 hergestellten Probe [E]
- R_{II} , R_{III} = gemäß Nummer 9.1.1 berechnete Kalibrierfaktoren

9.1.3. Berechnung der relativen Retentionszeit für Peak III in der Probe [E]

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

Dabei ist:

- $RRT_{III}[E]$ = relative Retentionszeit von Peak III in der Probe [E]
- $RT_{III}[E]$ = Retentionszeit von Peak III in der gemäß Nummer 8.4.2 hergestellten Probe [E]
- $RT_{III}[5]$ = Retentionszeit von Peak III in der gemäß Nummer 8.5.3 hergestellten Kontrollprobe [5]

9.1.4. In Versuchen ist nachgewiesen worden, dass zwischen der relativen Retentionszeit von Peak III, d. h. $RRT_{III}[E]$, und der zugesetzten Menge an Labmolkepulver bis zu einer Konzentration von 10 % eine lineare Abhängigkeit besteht.

— $RRT_{III}[E]$ ist < 1,000, wenn der Gehalt an Labmolke > 5 % ist.

— $RRT_{III}[E]$ ist $\geq$ 1,000, wenn der Gehalt an Labmolke $\leq$ 5 % ist.

Die zulässige Toleranz für die Werte von RRT_{III} liegt bei $\pm 0,002$.

In der Regel weicht der Wert für $RRT_{III}[0]$ kaum von 1,034 ab. Je nach dem Zustand der Säulen kann sich dieser Wert 1,000 annähern, muss jedoch immer größer sein.

9.2. Berechnung des Gehalts an Labmolkepulver in der Probe

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

Dabei ist:

- W = Prozentanteil (m/m) der Labmolke in der Probe [E]
- $S_{III}[E]$ = relative Fläche von Peak III der gemäß Nummer 9.1.2 hergestellten Testprobe [E]
- 1,3 = relative durchschnittliche Fläche von Peak III in Gramm Labmolke pro 100 g ermittelt in unverfälschtem Magermilchpulver unterschiedlicher Herkunft; der Wert wurde experimentell bestimmt
- $S_{III}[0]$ = relative Fläche von Peak III; diese ist gleich $R_{III} \times A_{III}[0]$; diese Werte wurden gemäß den Nummern 9.1.1 und 8.5.3 bestimmt
- $(S_{III}[0] - 0,9)$ = an der relativen durchschnittlichen Fläche vorzunehmende Korrektur (1,3), wenn $S_{III}[0]$ nicht gleich 0,9 ist; experimentell wurde für die relative durchschnittliche Fläche von Peak III der Kontrollprobe [0] der Wert 0,9 ermittelt

9.3. Genauigkeit des Verfahrens

9.3.1. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier Untersuchungen, die mit identischem Probenmaterial unter denselben Versuchsbedingungen von demselben Bearbeiter gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander durchgeführt werden, darf 0,2 % (m/m) nicht überschreiten.

9.3.2. Vergleichbarkeit

Die Differenz zwischen zwei einzelnen unabhängigen Ergebnissen, die zwei Bearbeiter, die in verschiedenen Labors arbeiten, an identischem Probenmaterial erhalten, darf 0,4 % (m/m) nicht überschreiten.

9.4. Interpretation

- 9.4.1. Es muss darauf geschlossen werden, dass keine Labmolke enthalten ist, wenn die relative Fläche von Peak III, S_{III} [E], ausgedrückt in Gramm Labmolke pro 100 g des Erzeugnisses, $\leq 2,0 + (S_{II} [0] - 0,9)$ ist.

Dabei ist:

2,0	der unter Berücksichtigung der relativen durchschnittlichen Fläche von Peak III (d. h. 1,3), der durch Schwankungen in der Zusammensetzung des Magermilchpulvers bedingten Unsicherheit und der Vergleichbarkeit der Methode (9.3.2) höchstens zulässige Wert für die relative Fläche von Peak III
$(S_{III} [0] - 0,9)$	die vorzunehmende Korrektur, wenn die Fläche $S_{III} [0]$ nicht gleich 0,9 ist (siehe Nummer 9.2)

- 9.4.2. Wenn die relative Fläche von Peak III, S_{III} [E], $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ und die relative Fläche von Peak II, S_{II} [E], ≤ 160 ist, muss der Labmolkeanteil wie in Nummer 9.2 beschrieben bestimmt werden.

- 9.4.3. Wenn die relative Fläche von Peak III, S_{III} [E], $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ und die relative Fläche von Peak II, S_{II} [E], ≤ 160 ist, muss der Gesamteiweißgehalt (P %) bestimmt werden; anschließend ist eine Bewertung aufgrund der Abbildungen 1 und 2 vorzunehmen.

- 9.4.3.1. Die nach Analyse von Proben von unverfälschtem Magermilchpulver gewonnenen Daten mit hohem Gesamteiweißgehalt sind in den Abbildungen 1 und 2 zusammengefasst.

Die durchgezogene Gerade ist die Gerade der linearen Regression, deren Koeffizienten nach dem Verfahren der kleinsten Quadrate errechnet wurden.

Die gestrichelte Gerade gibt die Obergrenze der relativen Oberfläche von Peak III mit einer Wahrscheinlichkeit an, die in 90 % der Fälle nicht überschritten wird.

Die Formeln der gestrichelten Geraden der Abbildungen 1 und 2 lauten jeweils:

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

Dabei ist:

S_{III} relative Fläche von Peak III berechnet entweder aufgrund des Gesamteiweißgehalts oder aufgrund der relativen Fläche von Peak S_{II} [E]

P % Gesamteiweißgehalt in Gewichtsprozent

S_{II} [E] relative Fläche der gemäß Nummer 9.1.2 berechneten Probe

Die Gleichungen entsprechen dem in Nummer 9.2 genannten Wert 1,3.

Der Abstand (T_1 und T_2) zwischen der gefundenen relativen Fläche S_{III} [E] und der relativen Fläche S_{III} ergibt sich aus folgenden Formeln: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$ $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

9.4.3.2. Sind T_1 und/oder T_2 null oder kleiner, kann ein Labmolke-Nachweis nicht geführt werden.

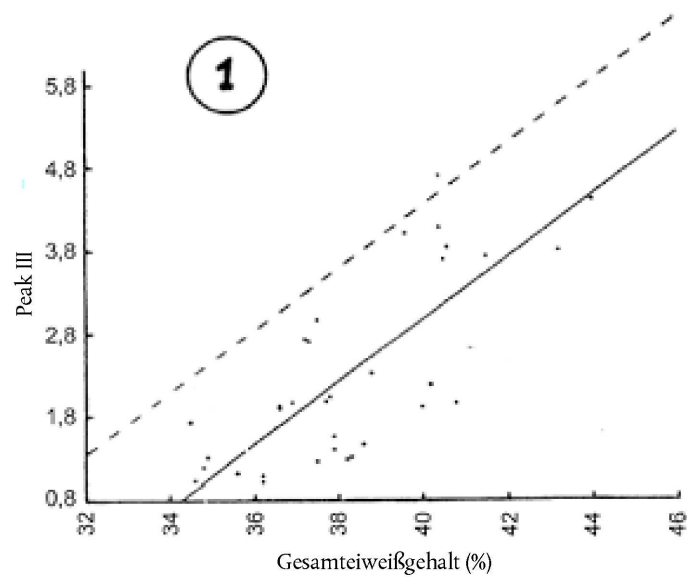
Sind T_1 und T_2 größer als null, enthält die Probe Labmolke.

Der Gehalt an Labmolke wird mit der folgenden Formel berechnet: $W = T_2 + 0,91$

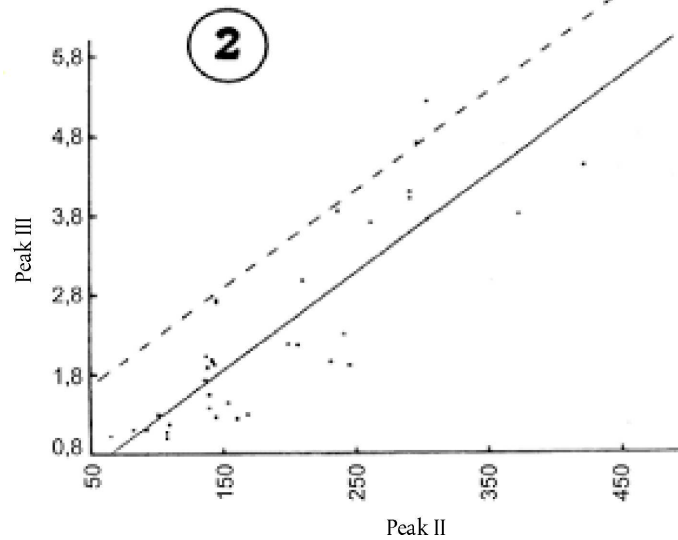
Dabei ist:

0,91 der Abstand zwischen der durchgezogenen Geraden und der gestrichelten Geraden auf der vertikalen Achse.

Magermilchpulver



Magermilchpulver



Anlage III

BESTIMMUNG VON LABMOLKEPULVER IN MAGERMILCHPULVER

1. GEGENSTAND: NACHWEIS DES ZUSATZES VON LABMOLKEPULVER IN MAGERMILCHPULVER

2. LITERATUR: INTERNATIONALE NORM ISO 707

3. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Unter dem Gehalt an Labmolkepulver wird der nach diesem Verfahren bestimmte Massenanteil an Kaseinmakropeptiden in Prozent verstanden.

4. KURZBESCHREIBUNG

Proben werden mit dem HPLC-Verfahren (Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) auf Kaseinmakropeptid A (CKPA) untersucht. Das Ergebnis wird im Vergleich zu Standardproben aus molkefreiem und molkehaltigem Magermilchpulver mit bekanntem Gehalt ausgewertet. Labmolkepulver gilt als nachgewiesen, wenn der Massenanteil größer als 1 % ist.

5. REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Das verwendete Wasser muss destilliert sein oder einen mindestens gleichwertigen Reinheitsgrad aufweisen. Die Reinheit von Acetonitril muss den Anforderungen der Spektroskopie bzw. der HPLC genügen.

5.1. **Trichloressigsäurelösung**

240 g Trichloressigsäure (CCl_3COOH) werden in Wasser gelöst; anschließend wird die Lösung auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung sollte klar und farblos sein.

5.2. **Elutionsmittel A und B**

Elutionsmittel A: 150 ml Acetonitril (CH_3CN), 20 ml Isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) und 1,00 ml Trifluoressigsäure (TFA, CF_3COOH) werden in einen 1 000-ml-Messkolben gegeben und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

Elutionsmittel B: 550 ml Acetonitril, 20 ml Isopropanol und 1,00 ml TFA werden in einen 1 000-ml-Messkolben gegeben und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Vor der Verwendung wird die Elutionslösung durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

5.3. **Aufbewahrung der Säule**

Nach den Analysen wird die Säule mit Elutionsmittel B (über einen Gradienten) und danach mit Acetonitril (30 Minuten, ebenfalls über einen Gradienten) gespült. Die Säule wird in Acetonitril aufbewahrt.

5.4. **Standardproben**

5.4.1. *Magermilchpulver gemäß den Anforderungen für die öffentliche Lagerhaltung (d. h. [0])*

5.4.2. *Das gleiche Magermilchpulver, verfälscht durch Zusatz von 5 % (m/m) Labmolkepulver von durchschnittlicher Zusammensetzung (d. h. [5])*

5.4.3. *Das gleiche Magermilchpulver, verfälscht durch Zusatz von 50 % (m/m) Labmolkepulver von durchschnittlicher Zusammensetzung (d. h. [50])*

6. APPARATUR

6.1. **Analysewaage**

6.2. **(Fakultativ:) Zentrifuge, mit der eine Zentrifugalkraft von 2 200 g erreicht werden kann, ausgerüstet mit Zentrifugenröhrchen mit Verschlussstopfen oder -kappe und einem Fassungsvermögen von 50 ml**

6.3. **Mechanische Schüttelvorrichtung**

6.4. **Magnetrührer**

6.5. **Glastrichter, ca. 7 cm Durchmesser**

- 6.6. **Filterpapier, mittlere Filtriergeschwindigkeit, ca. 12,5 cm Durchmesser**
- 6.7. **Filtriervorrichtung aus Glas mit Membranfilter, 0,45 µm Porendurchmesser**
- 6.8. **Messpipetten, Nennvolumen 10 ml (ISO 648, Klasse A oder ISO/R 835) bzw. ein Pipettiersystem zur Aufgabe von 10,0 ml in 2 Minuten**
- 6.9. **Aufgabesystem zur Übertragung von 20,0 ml Wasser bei einer Temperatur von ca. 50 °C**
- 6.10. **Thermostatisierbares Wasserbad, eingestellt auf 25°C ($\pm 0,5$ °C)**
- 6.11. **HPLC-Ausrüstung, bestehend aus**
 - 6.11.1. *einem Pumpensystem für binäre Gradienten*
 - 6.11.2. *einem manuellen Injektor oder einem Autosampler mit einem Nennvolumen 100 µl*
 - 6.11.3. *einer Säule (Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3, 25 cm $\times$ 0,46 cm (Höhe $\times$ Innendurchmesser)) oder einer gleichwertigen großporigen Umkehrphasen-Säule auf Silicagelbasis*
 - 6.11.4. *einem thermostatisierbaren Säulenofen, einstellbar auf 35 °C (± 1 °C)*
 - 6.11.5. *einem UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung zur Messung bei 210 nm mit einer Empfindlichkeit von 0,02 Å (ggf. auch Wellenlängen bis zu 220 nm)*
 - 6.11.6. *einem Integrator, mit dem eine Integration auf die allgemeine Basislinie oder von Tal zu Tal vorgenommen werden kann*

Anmerkung: Die Säule kann auch bei Raumtemperatur betrieben werden, sofern diese um höchstens 1 °C schwankt (ansonsten ändert sich die Retentionszeit für CMP_A zu stark).
7. **PROBENAHME**
 - 7.1. **Die Probenahme erfolgt nach dem Verfahren der internationalen Norm ISO 707. Die Mitgliedstaaten können jedoch ein anderes Probenahmeverfahren anwenden, sofern es den Prinzipien der genannten Norm entspricht.**
 - 7.2. **Die Probe ist so aufzubewahren, dass sie unversehrt bleibt und ihre Zusammensetzung sich nicht ändert.**
8. **VERFAHREN**
 - 8.1. **Vorbereitung der Testprobe**

Das Milchpulver wird in einen ungefähr das doppelte Volumen fassenden Behälter mit luftdichtem Verschluss gegeben und der Behälter sofort verschlossen. Das Milchpulver wird durch mehrmaliges Stürzen des Behälters vollständig durchmischt.
 - 8.2. **Probeneinwaage**

2,00 g ($\pm 0,001$ g) der Probe werden in ein Zentrifugenröhrchen (6.2) oder ein geeignetes verschließbares Gefäß (50 ml) eingewogen.

Anmerkung: Bei Gemischen ist die Testprobe in einer Menge einzuwiegen, bei der die entfettete Probeneinwaage einem Gewicht von 2,00 g entspricht.
 - 8.3. **Abtrennen von Fett und Eiweiß**
 - 8.3.1. *Die Probeneinwaage wird mit 20,0 ml warmem Wasser (50 °C) versetzt. Zum Auflösen wird das Pulver mithilfe einer mechanischen Schüttelvorrichtung (6.3) 5 Minuten lang geschüttelt. Das Röhrchen wird in ein Wasserbad (6.10) gegeben und bei 25 °C stehen gelassen.*
 - 8.3.2. *10,0 ml Trichloressigsäurelösung (5.1) mit einer Temperatur von 25 °C werden innerhalb von 2 Minuten unter kräftigem Rühren mit dem Magnetrührer (6.4) zugesetzt. Das Röhrchen wird in ein Wasserbad (6.10) gestellt und 60 Minuten stehen gelassen.*
 - 8.3.3. *Bei 2 200 g wird 10 Minuten lang zentrifugiert (6.2) oder durch Filterpapier (6.6) filtriert, wobei die ersten 5 ml des Filtrats zu verwerfen sind.*

8.4. Chromatografische Bestimmung

8.4.1. Bei der Umkehrphasen-HPLC sind falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Anteilen an saurem Buttermilchpulver ausgeschlossen.

8.4.2. Bevor die Umkehrphasen-HPLC durchgeführt wird, sind die Gradientenbedingungen zu optimieren. Eine CMP_A -Retentionszeit von 26 Minuten (± 2 Minuten) ist optimal für Gradientensysteme mit einem Totvolumen von ca. 6 ml (Volumen ab der Stelle, an der die Lösungsmittel zusammentreffen, bis einschließlich Volumen der Probenschleife). Bei Gradientensystemen mit geringerem Totvolumen (z. B. 2 ml) ist eine Retentionszeit von 22 Minuten optimal.

Zu analysieren sind Lösungen labmolkefreier Standardproben (5.4) und von Standardproben mit 50 % Labmolkeanteil.

100 µl des Überstandes bzw. des Filtrates (8.3.3) werden in die HPLC-Apparatur injiziert, die unter den in Tabelle 1 genannten Bedingungen (Testgradient) betrieben wird.

Tabelle 1

Testgradientenbedingungen für eine optimale chromatografische Bestimmung

Zeit (min)	Durchfluss (ml/min)	% A	% B	Kurve
Anfänglich	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	linear
32	1,0	10	90	linear
37	1,0	10	90	linear
42	1,0	90	10	linear

Beim Vergleich beider Chromatogramme müsste die Lage des CMP_A -Peaks festzustellen sein.

Mit der folgenden Formel kann die anfängliche Zusammensetzung des für den Normalgradienten zu verwendenden Lösungsmittels (siehe Nummer 8.4.3) berechnet werden: $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) * 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) * 1,11$

Dabei ist:

RT_{CMP_A} : CMP_A -Retentionszeit im Testgradienten

10: Ausgangs-% B des Testgradienten

2,5: % B zur halben Laufzeit minus % B beim Start im Normalgradienten

13,5: halbe Laufzeit des Testgradienten

26: erforderliche Retentionszeit für CMP_A

6: Verhältnis der Steigungen von Testgradient und Normalgradient

30: % B zu Beginn minus % B nach 27 Minuten im Testgradienten

27: Laufzeit des Testgradienten

8.4.3. Analyse von Lösungen der Testproben

Genau 100 µl des Überstandes bzw. Filtrates (8.3.3) werden in die HPLC-Apparatur injiziert, in die die Elutionslösung (5.2) mit 1,0 ml/Minute geleitet wird.

Die Zusammensetzung des Elutionsmittels beim Beginn der Analyse wurde in Nummer 8.4.2 beschrieben. Normalerweise entspricht sie einem Verhältnis von A:B = 76:24 (5.2). Sofort nach der Injektion kommt es zur Ausbildung eines linearen Gradienten, der nach 27 Minuten einen um 5 % höheren prozentualen Anteil von B ergibt. Danach beginnt ein Gradient, bei dem sich die Zusammensetzung des Elutionsmittels in 5 Minuten auf 90 % B einstellt. Diese Zusammensetzung bleibt 5 Minuten konstant, um dann innerhalb von 5 Minuten mit einem linearen Gradienten wieder auf die Zusammensetzung beim Start abzufallen. Je nach Fassungsvermögen des Pumpensystems kann die nächste Injektion 15 Minuten nach Erreichen der Ausgangsbedingungen durchgeführt werden.

Anmerkung 1: Die Retentionszeit des CMP_A muss 26 Minuten (± 2 Minuten) betragen. Dies kann durch Veränderung der Ausgangs- und Endbedingungen des ersten Gradienten erreicht werden. Die prozentuale Differenz von B am Anfang und Ende des ersten Gradienten muss jedoch in jedem Fall 5 % B betragen.

Anmerkung 2: Die Elutionsmittel müssen ausreichend entgast werden und in diesem Zustand gehalten werden. Dies ist für den einwandfreien Betrieb des Gradientenpumpsystems von wesentlicher Bedeutung. Die Standardabweichung der Retentionszeit für den CMP_A -Peak sollte $< 0,1$ Minute ($n = 10$) sein.

Anmerkung 3: Bei jeder fünften Probe ist die Standardprobe [5] zu injizieren und erneut der Kalibrierfaktor R (9.1.1) zu berechnen.

8.4.4. *Im Chromatogramm der Testprobe [E] hat der CMP_A -Peak eine Retentionszeit von ca. 26 Minuten.*

Der Integrator (6.11.6) errechnet automatisch die Höhe H des CMP_A -Peaks. Die Lage der Basislinie ist bei jedem Chromatogramm zu prüfen. Bei unrichtiger Lage der Basislinie ist die Analyse bzw. die Integration erneut durchzuführen.

Anmerkung: Wenn der CMP_A -Peak hinreichend von anderen Peaks abgegrenzt ist, sollte eine Zuordnung gemäß der Basislinie von Tal zu Tal erfolgen; ansonsten sind Senkrechten auf einer gemeinsamen Basislinie einzuziehen, die in der Nähe des CMP_A -Peak (und somit nicht bei $t = 0$ min!) beginnen sollte. Für die Standardlösung und die Probenlösungen ist derselbe Integrationstyp zu verwenden; bei gemeinsamer Basislinie muss die Konsistenz für die einzelnen Proben und für die Standardlösung geprüft werden.

Vor der quantitativen Bestimmung sind die Chromatogramme unbedingt auf Unregelmäßigkeiten zu überprüfen, die sich durch Betriebsstörungen der Apparatur bzw. der Säule oder aufgrund von Herkunft oder Art der analysierten Probe ergeben können. Im Zweifelsfall ist die Analyse zu wiederholen.

8.5. Kalibrierung

8.5.1. *Die Standardproben (5.4.1 und 5.4.2) werden dem in den Absätzen 8.2 bis 8.4.4 beschriebenen Verfahren unterzogen. Dabei sind frisch zubereitete Lösungen zu verwenden, da CMP im 8 %igen Trichloressigsäure-Milieu bei Raumtemperatur abgebaut wird. Die Lösung ist bei 4 °C 24 Stunden haltbar. Bei langen Versuchsreihen ist die Verwendung einer gekühlten Probenschale im Autosampler zu empfehlen.*

Anmerkung: 8.4.2 kann entfallen, sofern der prozentuale Anteil von B beim Beginn der Analyse aus vorangehenden Analysen bekannt ist.

Das Chromatogramm der Referenzprobe [5] sollte wie in Abbildung 1 aussehen. Diese Abbildung zeigt zwei kleine Peaks vor dem CMP_A -Peak. Es ist unbedingt für eine analoge Trennung zu sorgen.

8.5.2. *Vor der chromatografischen Bestimmung der Proben sind 100 µl der labmolkefreien Standardprobe [0] (5.4.1) zu injizieren.*

Das entsprechende Chromatogramm darf bei der Retentionszeit des CMP_A -Peaks keinen Peak aufweisen.

8.5.3. *Die Kalibrierfaktoren R sind nach Injektion des gleichen Filtratvolumens wie bei den Proben (8.5.1) zu bestimmen.*

9. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Methode und Berechnungsformel

9.1.1. *Berechnung des Kalibrierfaktors R*

$$\text{CMP}_A\text{-Peak: } R = W/H$$

Dabei ist:

R = Kalibrierfaktor des CMP_A -Peaks

H = Höhe des CMP_A -Peaks

W = Labmolkegehalt der Standardprobe [5]

9.2. Berechnung des Labmolkepulvergehalts der Probe in Prozent

$$W(E) = R \times H(E)$$

Dabei ist:

$W(E)$ = Prozentanteil (m/m) der Labmolke in der Probe [E]

R = Kalibrierfaktor des CMP_A -Peaks (9.1.1)

$H(E)$ = Höhe des CMP_A -Peaks der Probe (E)

Ist $W(E)$ größer als 1 % und ist die Differenz zwischen der entsprechenden Retentionszeit und der der Standardprobe [5] kleiner als 0,2 Minuten, enthält die Probe Labmolkepulver.

9.3. Genauigkeit des Verfahrens

9.3.1. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier Untersuchungen, die mit identischem Probenmaterial unter denselben Versuchsbedingungen von demselben Bearbeiter gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander durchgeführt werden, darf 0,2 % (m/m) nicht überschreiten.

9.3.2. Vergleichbarkeit

Nicht bestimmt

9.3.3. Linearität

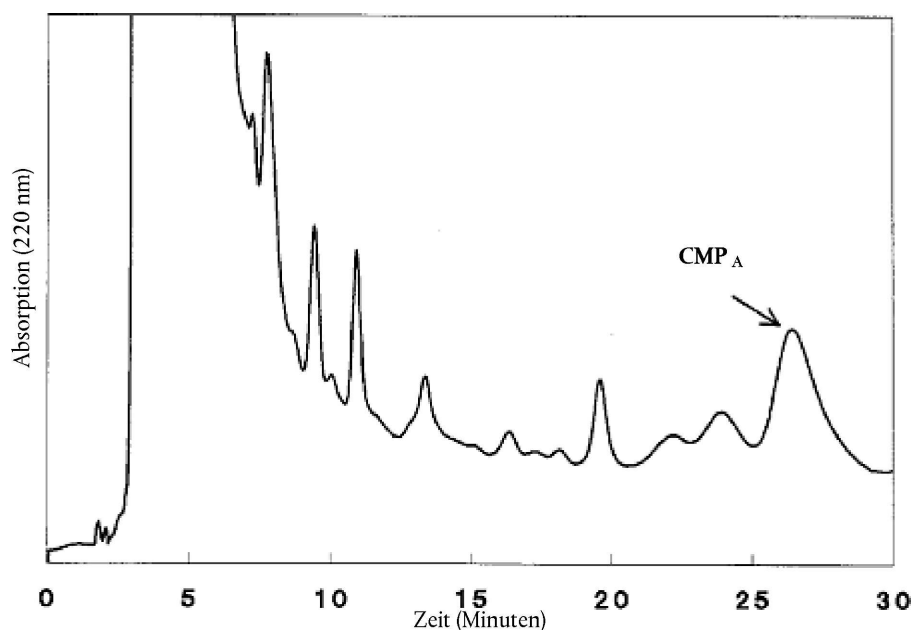
Im Bereich von 0 bis 16 % Labmolkepulveranteil muss Linearität bei einem Korrelationskoeffizienten von $> 0,99$ gegeben sein.

9.4. Interpretation

Die 1-%-Grenze beinhaltet die durch die Vergleichbarkeit bedingte Unsicherheit.

Abbildung 1

Ni—4.6 standard



(*) Internationale IDF-Norm 135B/1991: Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure.“

(3) Die folgenden Anhänge werden eingefügt:

„ANHANG VI

Analysemethoden für Butter in privater Lagerhaltung

Parameter	Methode
Fettgehalt ⁽¹⁾	ISO 17189 oder ISO 3727 Teil 3
Wassergehalt	ISO 3727 Teil 1
Fettfreie Trockenmasse (ohne Salz)	ISO 3727 Teil 2
Salz	ISO 15648
⁽¹⁾ Die anzuwendende Methode ist von der Zahlstelle zu genehmigen.	

ANHANG VII

Analysemethoden für Magermilchpulver in privater Lagerhaltung

Parameter	Methode
Fettgehalt	ISO 1736
Eiweißgehalt	ISO 8968 Teil 1
Wassergehalt	ISO 5537

ANHANG VIII

Analysemethoden für Käse in privater Lagerhaltung

1. Die in der Anlage beschriebene Analysemethode ist anzuwenden, damit gewährleistet ist, dass ausschließlich aus Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch oder aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch herzustellender Käse kein Kuhmilchkasein enthält.

Kuhmilchkasein gilt als nachgewiesen, wenn der festgestellte Kuhmilchkaseingehalt der Analyseprobe gleich dem Gehalt der in der Anlage beschriebenen 1 % Kuhmilch enthaltenden Referenzprobe oder größer ist.

2. Zum Nachweis von Kuhmilchkasein in Käse der in Absatz 1 genannten Kategorien dürfen Methoden angewendet werden, die folgende Bedingungen erfüllen:
 - a) Die Nachweisgrenze beträgt maximal 0,5 %;
 - b) falsch-positive Ergebnisse sind ausgeschlossen;
 - c) auch nach im Handel üblichen längeren Reifezeiten ist eine ausreichende Empfindlichkeit zum Nachweis von Kuhmilchkasein gegeben.

Ist eine dieser Bedingungen nicht erfüllt, sind die in der Anlage beschriebenen Methoden anzuwenden.

Anlage

METHODE ZUM NACHWEIS VON KUHMITCH UND -KASEIN IN KÄSE AUS SCHAF-, ZIEGEN- ODER BÜFFELMITCH ODER AUS GEMISCHEN VON SCHAF-, ZIEGEN- ODER BÜFFELMITCH

1. ANWENDUNGSBEREICH

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch und -kasein in Käse aus Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch oder aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch mithilfe der isoelektrischen Fokussierung der γ -Kaseine nach Plasminolyse.

2. ANWENDBARKEIT

Dieses Verfahren dient dem empfindlichen und spezifischen Nachweis von Kuhmilch und -kasein (jeweils mit und ohne Wärmebehandlung) in frischem und gereiftem Käse aus Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch oder aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch. Es ist ungeeignet für den Nachweis von Milch- und Käsefälschung durch hitzebehandeltes Rindermolkekonzentrat.

3. KURZBESCHREIBUNG

3.1. Das Kasein wird aus Käse und Referenzproben isoliert.

3.2. Das isolierte Kasein wird gelöst; anschließend wird eine Plasminspaltung vorgenommen (EC.3.4.21.7).

3.3. Die plasminbehandelten Kaseine werden in Anwesenheit von Harnstoff und unter Anfärben der Proteine isoelektrisch fokussiert.

3.4. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der gefärbten γ_3 - und γ_2 -Kaseinbanden (Kuhmilchnachweis) zwischen der zu bestimmenden Probe und der im selben Gel laufenden, 0 % und 1 % Kuhmilch enthaltenden Referenzproben.

4. REAGENZIEN

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Reagenzien zu verwenden. Das Wasser muss zweimal destilliert oder von entsprechender Reinheit sein.

Anmerkung: Die folgenden Angaben gelten für im Labor hergestellte harnstoffhaltige Polyacrylamidgele im Format 265 × 125 × 0,25 mm. Bei Verwendung anderer Gelrezepturen und -formate müssen die Elektrophoresebedingungen gegebenenfalls angepasst werden.

Isoelektrische Fokussierung

4.1. Reagenzien zur Herstellung der harnstoffhaltigen Polyacrylamidgele

4.1.1. Gelstammlösung

4,85 g Acrylamid,

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

48,05 g Harnstoff und

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

werden in Wasser gelöst; anschließend wird die Lösung auf 100 ml aufgefüllt, in Braunglasflaschen gegeben und im Kühlschrank aufbewahrt.

Anmerkung: Statt der angegebenen Festeinwaagen der neurotoxischen Acrylamide kann vorzugsweise eine der handelsüblichen Acrylamid-Fertiglösungen verwendet werden. Bei einer solchen Lösung mit 30 % (m/v) Acrylamid und 0,8 % (m/v) BIS müssen anstelle der Festeinwaagen 16,2 ml für die genannte Rezeptur eingesetzt werden. Die Haltbarkeit der Gelstammlösung beträgt maximal 10 Tage. Beträgt die Leitfähigkeit mehr als 5 μ S, wird die Lösung mit 2 g Amberlite MB-3 versetzt, unter Rühren 30 Minuten lang entionisiert und dann membranfiltriert (0,45 μ m).

4.1.2. Gellösung

Aus der Gelstammlösung (siehe 4.1.1) wird durch Versetzen mit verschiedenen Additiven und Ampholyten (*) eine Gellösung hergestellt:

9,0 ml Gelstammlösung,

24 mg β -Alanin,

500 μ l Ampholyt pH 3,5-9,5,

250 μ l Ampholyt pH 5-7,

250 μ l Ampholyt pH 6-8.

Die Gellösung wird durchmischt und 2 bis 3 Minuten im Ultraschallbad oder im Vakuum entgast.

Anmerkung: Die Gellösung darf erst unmittelbar vor dem Gießen (siehe 6.2) zubereitet werden.

4.1.3. Katalysatorlösungen

4.1.3.1 N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)

4.1.3.2 40 % (m/v) Ammoniumpersulfat (PER):

800 mg PER werden in Wasser gelöst und auf 2 ml aufgefüllt.

Anmerkung: Es ist stets eine frisch zubereitete PER-Lösung zu verwenden.

4.2. **Kontaktflüssigkeit**

Kerosin oder n-Decan.

4.3. **Anodenlösung**

5,77 g Phosphorsäure (85 % m/m) werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

4.4. **Kathodenlösung**

2,00 g Natriumhydroxid werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Probenvorbereitung

4.5. **Reagenzien zur Proteinisolierung**

4.5.1. Verdünnte Essigsäure (25,0 ml Eisessigsäure werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt)

4.5.2. Dichlormethan

4.5.3. Aceton

4.6. **Protein-Lösungspuffer**

5,75 g Glycerin (87 % m/m),

24,03 g Harnstoff und

250 mg Dithiothreitol

werden in Wasser gelöst und auf 50 ml aufgefüllt.

Anmerkung: Die Lösung ist im Kühlschrank aufzubewahren und höchstens 1 Woche haltbar.

4.7. Reagenzien für die Plasminspaltung des Kaseins**4.7.1. Ammoniumcarbonat-Pufferlösung**

0,2 mol/l NH_4HCO_3 -Lösung (1,58 g/100 ml Wasser), die mit 0,05 mol/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA 1,46 g/100 ml) versetzt wurde, wird mit 0,2 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung (1,92 g/100 ml Wasser), die mit 0,05 mol/l EDTA versetzt wurde, auf pH 8 titriert.

4.7.2. Bovines Plasmin (EC. 3.4.21.7), Aktivität mindestens 5 U/ml**4.7.3. ϵ -Aminocaprinsäure zur Enzyminaktivierung**

2,624 g ϵ -Aminocaprinsäure (6-Amino-n-Hexansäure) werden in 100 ml 40 %igem Ethanol (v/v) gelöst.

4.8. Standardproben**4.8.1. Zertifizierte Standardproben eines Gemisches von mit Lab versetztem Schaf- und Ziegen-Magermilchpulver, das jeweils 0 % und 1 % Kuhmilch enthält, sind erhältlich beim Kommissionsinstitut für Referenzmaterialien und Messwesen, B-2440 Geel, Belgien.****4.8.2. Herstellung der Interim-Standardproben von labversetzter Büffelmilch mit 0 % bzw. 1 % Kuhmilch**

Zur Gewinnung von Magermilch wird eine rohe Büffel- bzw. Kuhsammelmilch bei einer Temperatur von 37 °C mit 2 500 g 20 Minuten lang zentrifugiert. Nach raschem Abkühlen des Zentrifugenbechers nebst Inhalt auf 6 bis 8 °C wird die Fettschwimmschicht restlos entfernt. Zur Herstellung der 1 %igen Standardprobe werden 495 ml Büffelmagermilch in einem 1-l-Becherglas mit 5,00 ml Kuhmagermilch versetzt und durch Zusetzen verdünnter Milchsäure (10 % m/v) auf einen pH-Wert von 6,4 eingestellt. Die Temperatur wird auf 35 °C eingestellt; anschließend werden 100 µl Kälberlab (Labstärke 1: 10 000, ca. 3 000 U/ml) hinzugegeben. 1 Minute lang wird gerührt; danach wird das Becherglas mit einer Aluminiumfolie abgedeckt 1 Stunde bei einer Temperatur von 35 °C stehen gelassen, damit sich der Quark/Topfen bilden kann. Anschließend wird die gesamte dickgelegte Milchprobe ohne vorheriges Homogenisieren oder Abscheiden der Molke gefriergetrocknet. Nach dem Gefrieretrocknen wird das Produkt gleichmäßig und homogen vermahlen. Zur Herstellung der 0 %igen Standardprobe wird das gleiche Verfahren mit reiner Büffelmagermilch durchgeführt. Die Standardproben sind bei – 20 °C aufzubewahren.

Anmerkung: Es empfiehlt sich, die Reinheit der Büffelmilch durch isoelektrische Fokussierung der plasminbehandelten Kaseine vor der Herstellung der Standardproben zu prüfen.

Reagenzien zur Proteinfärbung**4.9. Fixierlösung**

150 g Trichloressigsäure werden in Wasser gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.

4.10. Entfärbelösung

500 ml Methanol und 200 ml Eisessigsäure werden mit destilliertem Wasser auf 2 000 ml aufgefüllt.

Anmerkung: Die Entfärbelösung ist jeden Tag frisch zuzubereiten; sie kann zweckmäßigerweise aus Vorratslösungen (50 %iges Methanol (v/v) und 20 %ige Eisessigsäure (v/v)) durch Mischen gleicher Volumina zubereitet werden.

4.11. Färbelösungen**4.11.1. Färbelösungen (Vorratslösung 1)**

3,0 g Coomassie Brilliant Blau G-250 (C.I. 42655) werden in 1 000 ml 90 %igem Methanol (v/v) mit einem Magnetrührer (etwa 45 Minuten lang) verrührt und anschließend durch zwei mittelschnelle Faltenfilter gefiltert.

4.11.2. Färbelösung (Vorratslösung 2)

5,0 g Kupfersulfatpentahydrat werden in 1 000 ml 20 %iger Essigsäure (v/v) gelöst.

4.11.3. Färbelösung (gebrauchsfertig)

Unmittelbar vor dem Färben werden jeweils 125 ml der Vorratslösungen (4.11.1 und 4.11.2) miteinander vermischt.

Anmerkung: Die Färbelösung ist am Tag des Gebrauchs zuzubereiten.

5. AUSRÜSTUNG
 - 5.1. **Glasplatten (265 × 125 × 4 mm); Gummiroller (Walzenbreite 15 cm); Nivelliertisch**
 - 5.2. **Gelträgerfolie (265 × 125 mm)**
 - 5.3. **Gegenfolie (280 × 125 mm); beide Längsseiten werden mit je einem Klebestreifen (280 × 6 × 0,25 mm) abgeklebt (Abbildung 1)**
 - 5.4. **Elektrofokussierkammer mit Kühlplatte (z. B. 265 × 125 mm) mit geeignetem Spannungsgeber (≥ 2,5 kV) oder Elektrophoreseautomat**
 - 5.5. **Umlaufkryostat, thermostatregelbar auf 12 °C (± 0,5 °C)**
 - 5.6. **Zentrifuge, einstellbar auf 3 000 g**
 - 5.7. **Elektrodenstreifen (≥ 265 mm lang)**
 - 5.8. **Tropfflaschen aus Kunststoff, für Anoden- und Kathodenlösung**
 - 5.9. **Probenapplikatoren 10 × 5 mm (Viskose oder Filterpapier mit geringer Proteinadsorption)**
 - 5.10. **Färbe- und Entfärbeschalen aus Edelstahl oder Glas (z. B. Instrumentenschalen 280 × 150 mm)**
 - 5.12. **Regelbarer Homogenisierstab (Schaftdurchmesser 10 mm), Drehzahlbereich 8 000-20 000 min⁻¹**
 - 5.13. **Magnetrührer**
 - 5.14. **Ultraschallbad**
 - 5.15. **Folienschweißgerät**
 - 5.16. **25-µl-Mikropipetten**
 - 5.17. **Vakuumzentrifuge oder Gefriertrockner**
 - 5.18. **Thermostatregelbares Wasserbad, einstellbar auf 35 °C und 40 °C (± 1 °C), mit Schüttelvorrichtung**
 - 5.19. **Densitometerausrüstung, Registrierung bei λ = 634 nm**
6. VERFAHREN
 - 6.1. **Probenvorbereitung**
 - 6.1.1. *Kaseinisolierung*

Eine 5 g Trockenmasse entsprechende Menge Käse oder die Referenzstandardproben werden in ein 100-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben; 60 ml destilliertes Wasser werden hinzugegeben; anschließend wird die Probe mit einem Homogenisierstab (8 000 bis 10 000 min⁻¹) homogenisiert. Mit verdünnter Essigsäure (4.5.1) wird der pH-Wert 4,6 eingestellt; dann wird die Probe zentrifugiert (5 Minuten lang, 3 000 g). Fette und Molke werden dekantiert und der Rückstand in 40 ml destilliertem Wasser, das mit verdünnter Essigsäure (4.5.1) auf einen pH-Wert von 4-5 eingestellt wurde, homogenisiert (20 000 min⁻¹), mit 20 ml Dichlormethan (4.5.2) versetzt, nochmals homogenisiert und dann zentrifugiert (5 Minuten lang, 3 000 g). Die zwischen wässriger und organischer Phase schwimmende Kaseinschicht (siehe Abbildung 2) wird mit einem Spatel angehoben, damit beide Phasen dekantiert werden können. Das Kasein wird nochmals in 40 ml destilliertem Wasser (siehe oben) und 20 ml Dichlormethan (4.5.2) homogenisiert und zentrifugiert. Dieser Vorgang ist zu wiederholen, bis beide Extraktionsphasen farblos sind (zwei- bis dreimal). Der Proteinrückstand wird mit 50 ml Aceton (4.5.3) homogenisiert und über ein mittelschnelles Faltenpapierfilter abfiltriert. Das Filterretentat wird zweimal mit je 25 ml Aceton gewaschen, an der Luft oder im Stickstoffstrom getrocknet und in einer Reibschale fein zerrieben.

Anmerkung: Trockene Kaseinisolat sind bei – 20 °C aufzubewahren.

- 6.1.2. *Plasminspaltung der β-Kaseine zur Anreicherung der γ-Kasein-Konzentration*

25 mg Kaseinisolat (6.1.1) werden in 0,5 ml Ammoniumcarbonatpufferlösung (4.7.1) suspendiert und 20 Minuten lang z. B. im Ultraschallbad homogenisiert. Das Homogenisat wird auf 40 °C erwärmt, mit 10 µl Plasmin (4.7.2) versetzt, durchmischt und 1 Stunde lang bei 40 °C unter ständigem Schütteln bebrütet. Zur Enzyminhibierung werden 20 µl ε-Aminocaprinsäurelösung (4.7.3), danach 200 mg fester Harnstoff und schließlich 2 mg Dithiothreitol zugesetzt.

Anmerkung: Zur Verbesserung der Symmetrie der fokussierten Kaseinbanden empfiehlt es sich, die Lösung nach Zusatz von ε-Aminocaprinsäure gefrierzutrocknen und den Probenrückstand in 0,5 ml Harnstoffpufferlösung (4.6) zu lösen.

6.2. Herstellen der harnstoffhaltigen Polyacrylamidgele

Auf eine Glasplatte (5.1) wird die Gelträgerfolie (5.2) mithilfe einiger Tropfen Wasser aufgewalzt; ausgetretenes Wasser ist mit einem Papiertuch aufzunehmen. In gleicher Weise wird die mit Abstandshaltern (0,25 mm) versehene Gegenfolie (5.3) auf eine weitere Glasplatte aufgewalzt. Diese wird dann horizontal auf einem Nivelliertisch ausgerichtet.

Die frisch zubereitete, entgaste Gellösung (4.1.2) wird mit je 10 µl der Katalysatorlösungen Temed und PER (4.1.3.1) versetzt, kurz durchmischt und gleichmäßig auf die Mitte der Gegenfolie ausgegossen. Die Gelträgerplatte wird (mit der Folie nach unten) mit einer Kante auf die nivellierte Gegenfolienplatte aufgesetzt und so langsam abgesenkt, dass sich zwischen den Folien ein Gelfilm bilden und sich gleichmäßig und blasenfrei ausbreiten kann (Abbildung 3). Die Gelträgerfolienplatte wird mithilfe eines dünnen Spatels vollständig aufgesetzt; drei weitere Glasplatten werden als Andruckgewichte aufgelegt. Nach vollständiger Polymerisierung (ca. 60 Minuten) wird das auf der Gelträgerfolie anpolymerisierte Gel mitsamt Gegenfolie durch Verkanten der Glasplatten herausgelöst. Die Rückseite der Trägerfolie wird sorgfältig von Gelresten und Harnstoff gesäubert. Das „Gel-Sandwich“ wird nun in einen Folienschlauch eingeschweißt und im Kühlschrank (maximal 6 Wochen) aufbewahrt.

Anmerkung: Die Gegenfolie mit den Abstandshaltern kann wiederverwendet werden. Das Polyacrylamidgel kann auf kleinere Formate zugeschnitten werden; dies ist bei kleinem Probenumfang oder bei Verwendung eines Elektrophoreseautomaten zu empfehlen (2 Gele im Format 4,5 × 5 cm).

6.3. Isoelektrische Fokussierung

Der Kühlthermostat wird auf 12°C eingestellt. Nach Abwischen der Gelträgerfolienrückseite mit Kerosin (4.2) werden einige Tropfen Kerosin auf die Mitte des Kühlblocks aufgebracht. Das „Gel-Sandwich“ wird mit der Trägerseite nach unten blasenfrei aufgewalzt. Ausgetretenes Kerosin wird abgewischt und die Gegenfolie abgezogen. Die Elektrodenstreifen werden mit den entsprechenden Elektrodenlösungen (4.3, 4.4) getränkt, auf die Gellänge zugeschnitten und auf die dafür vorgesehenen Stellen gelegt (Elektrodenabstand 9,5 cm).

Die Fokussierung ist unter folgenden Bedingungen durchzuführen:

6.3.1. Gelformat 265 × 125 × 0,25 mm

Schritt	Zeit (min)	Spannung (V)	Stromstärke (mA)	Leistung (W)	Volstunden (Vh)
1. Vorfokussierung	30	max. 2 500	max. 15	konstant 4	ca. 300
2. Probenfokussierung ⁽¹⁾	60	max. 2 500	max. 15	konstant 4	ca. 1 000
3. Endfokussierung	60	max. 2 500	max. 5	max. 20	ca. 3 000
	40	max. 2 500	max. 6	max. 20	ca. 3 000
	30	max. 2 500	max. 7	max. 25	ca. 3 000

⁽¹⁾ Probenauftrag: Nach der Vorfokussierung (Schritt 1) werden 18 µl der Probe und der Standardlösungen auf die Probenapplikatoren (10 × 5 mm) pipettiert und in Abständen von 1 mm voneinander sowie von 5 mm in Längsrichtung von der Anode auf das Gel gebracht und leicht angedrückt. Die Fokussierung erfolgt unter den beschriebenen Bedingungen; nach der 60-minütigen Probenfokussierung sind die Probenapplikatoren vorsichtig abzunehmen.

Anmerkung: Bei Änderung der Stärke oder Breite der Gele sind Strom und Leistung entsprechend anzupassen (z. B. Verdopplung von Stromstärke und Leistung bei Verwendung eines 0,5 mm starken Gels im Format 265 × 125 × 0,5 mm).

- 6.3.2. *Beispiel eines Spannungsprogramms für einen Elektrophoreseautomaten (2 Gele je 5,0 × 4,5 cm); direkte Aufbringung der Elektroden auf das Gel (ohne Elektrodenstreifen)*

Schritt	Spannung	Stromstärke	Leistung	Temp.	Voltstunden
1. Vorfokussierung	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Probenfokussierung	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokussierung	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokussierung	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

In Schritt 2 wird der Probenapplikator bei 0 Vh aufgesetzt.

In Schritt 2 wird der Probenapplikator bei 30 Vh abgenommen.

6.4. **Proteinfärbung**

6.4.1. *Fixieren der Proteine*

Unmittelbar nach Abschalten des Stroms werden die Elektrodenstreifen entfernt. Das Gel wird sofort in eine mit 200 ml Fixierlösung (4.9) gefüllte Färb- und Entfärbeschale gegeben und 15 Minuten lang geschüttelt.

6.4.2. *Waschen und Färben der Gelplatte*

Die Fixierlösung wird restlos abgegossen und die Gelplatte zweimal je 30 Sekunden mit 100 ml Entfärbelösung (4.10) gespült. Die Entfärbelösung wird abgegossen und die Schale mit 250 ml Färbelösung (4.11.3) gefüllt; die Färbelösung wird 45 Minuten leicht geschwenkt, um die Lösung einwirken zu lassen.

6.4.3. *Entfärben der Gelplatte*

Die Färbelösung wird abgegossen, die Gelplatte zweimal mit je 100 ml Entfärbelösung (4.10) gespült und anschließend 15 Minuten lang in 200 ml Entfärbelösung geschwenkt; der Entfärbeschritt ist mindestens zwei- oder dreimal zu wiederholen, bis der Hintergrund klar und farblos ist. Die Gelplatte wird dann mit destilliertem Wasser (zweimal 2 Minuten) gespült und an der Luft (2 bis 3 Stunden) oder mit dem Fön (ca. 10 bis 15 Minuten) getrocknet.

Anmerkung 1: Fixierung, Färben und Entfärben erfolgen bei einer Temperatur von 20 °C. Bei höheren Temperaturen dürfen diese Schritte nicht ausgeführt werden.

Anmerkung 2: Wird einer empfindlicheren Silberfärbelösung (z. B. Silberfärbelösungs-Kit, Protein Pharmacia Biotech, Code Nr. 17-1150-01) der Vorzug gegeben, sind die plasminbehandelten Kaseinproben auf 5 mg/ml zu verdünnen.

7. BEWERTUNG

Die Bewertung erfolgt durch Vergleich der Proteinbandenmuster der unbekannten Probe mit den Referenzstandardproben auf demselben Gel. Der Nachweis von Kuhmilch in Käsen aus Schaf, Ziegen- oder Büffelmilch und in Gemischen aus Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch erfolgt aufgrund der γ_3 - und der γ_2 -Kaseine, bei denen die isoelektrischen Punkte im pH-Wert-Bereich 6,5 bis 7,5 liegen (Abbildungen 4a, 4b und 5). Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt unter 0,5 %.

7.1. **Visuelle Bestimmung**

Zur visuellen Bestimmung des Kuhmilchanteils empfiehlt es sich, die Konzentration der Proben und der Standardproben auf die Stärke der Schaf-, Ziegen- und/oder Büffel- γ_2 - und - γ_3 -Kaseine einzustellen (siehe „ γ_2 E,G, B“ und „ γ_3 E,G,B“ in den Abbildungen 4a, 4b und 5). Nur dann kann der Kuhmilchgehalt (kleiner, gleich oder größer als 1 %) in der zu beurteilenden Probe durch direkten Vergleich der Stärken der Rinder- γ_2 - und - γ_3 -Kaseinzonen (siehe „ γ_3 C“ und „ γ_2 C“ in den Abbildungen 4a, 4b und 5) mit denen der 0 %igen und 1 %igen Standardproben (Schaf, Ziege) oder laboreigenen Interims-Standardproben (Büffelmilch) bestimmt werden.

7.2. Densitometrische Bestimmung

Nach Möglichkeit ist mit Hilfe eines Densitometers (5.19) das Peak-Flächen-Verhältnis der γ_2 - und γ_3 -Kaseine (siehe Abbildung 5) zwischen Rind und Schaf, Ziege und/oder Büffel zu ermitteln. Dieser Wert ist mit dem γ_2 - und γ_3 -Kasein-Peak-Flächen-Verhältnis der 1 %igen Standardprobe (Schaf, Ziege) oder der im selben Gel laufenden laboreigenen Interims-Standardprobe (Büffel) zu vergleichen.

Anmerkung: Reagiert die 1 %ige Standardprobe eindeutig positiv auf Rinder- γ_2 - und - γ_3 -Kaseine, die 0 %ige Standardprobe dagegen nicht, liefert die Methode zuverlässige Ergebnisse. Ansonsten ist das Verfahren unter genauer Beachtung der Verfahrensvorschrift zu optimieren.

Eine Stichprobe gilt als positiv, wenn die Rinder- γ_2 - und - γ_3 -Kaseine oder die entsprechenden Peak-Flächen-Verhältnisse zumindest den Zahlen für die 1 %ige Standardprobe entsprechen.

8. LITERATUR

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. In: *Milchwissenschaft* 45, 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. In: *Milchwissenschaft* 50, 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 (Radola B.J., Hrsg.), 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

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

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

Abbildung 1

Schematische Darstellung der Gegenfolie

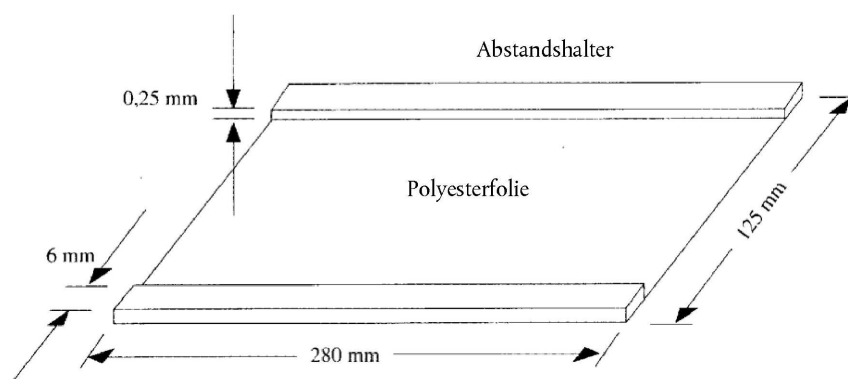


Abbildung 2

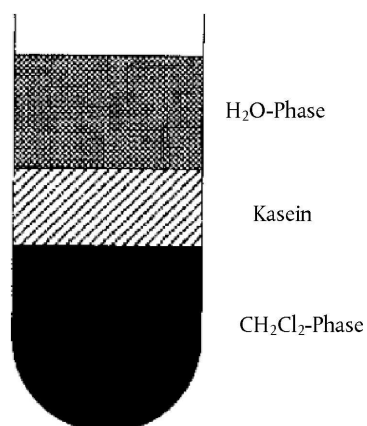
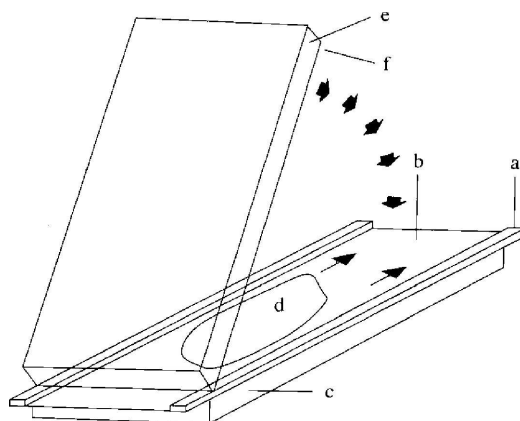
Kaseinschwimmschicht zwischen wässriger und organischer Phase nach dem Zentrifugieren

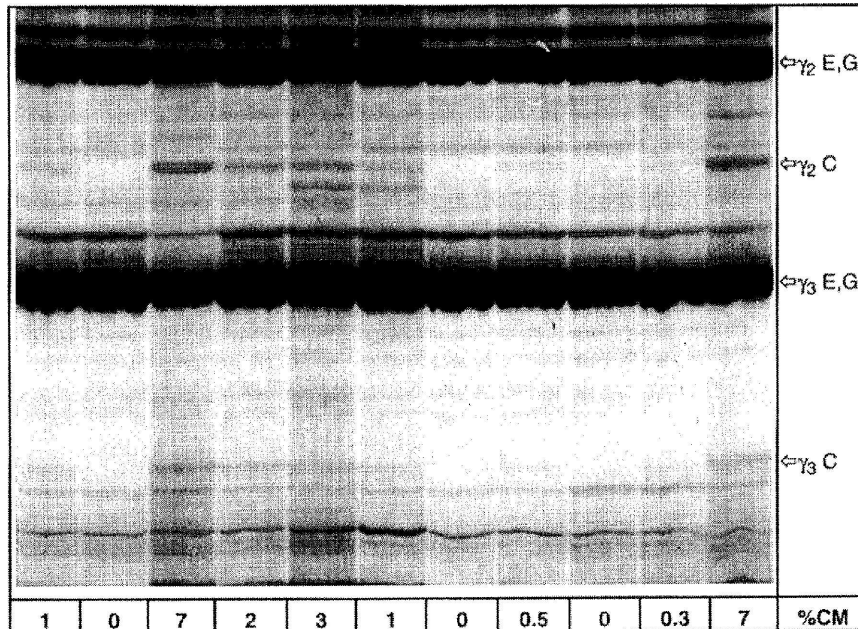
Abbildung 3

Klapptechnik zur Herstellung ultradünner Polyacrylamidgele

a = Abstandshalter (0,25 mm); b = Gegenplatte (5.3); c, e = Glasplatten (5.1); d = Gellösung (4.1.2); Gelträgerfolie (5,2)

Abbildung 4a

Isoelektrische Fokussierung plasminbehandelter Kaseine von Schaf- und Ziegenmilchkäse mit unterschiedlichem Kuhmilchgehalt

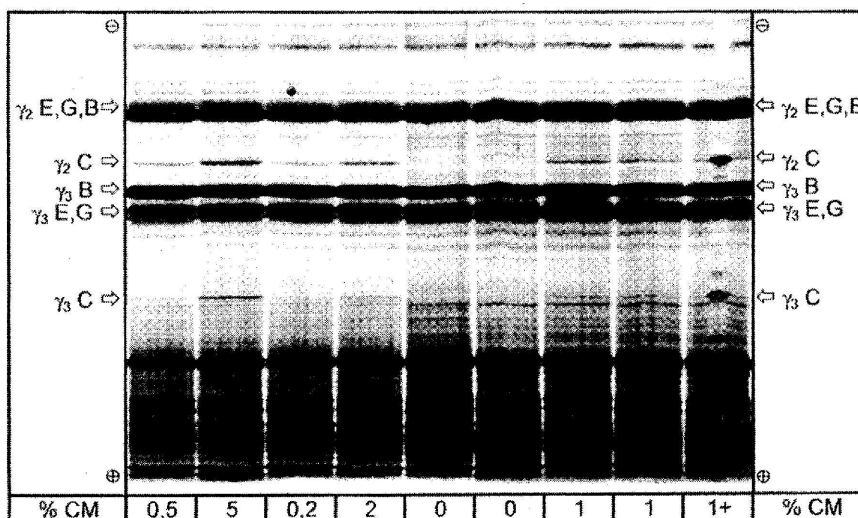


% CM = Kuhmilchgehalt; C = Kuh; E = Schaf; G = Ziege

Abgebildet ist die obere Hälfte des IEF-Gels.

Abbildung 4b

Isoelektrische Fokussierung plasminbehandelter Kaseine von Käse, der aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch mit unterschiedlichem Kuhmilchgehalt hergestellt wurde

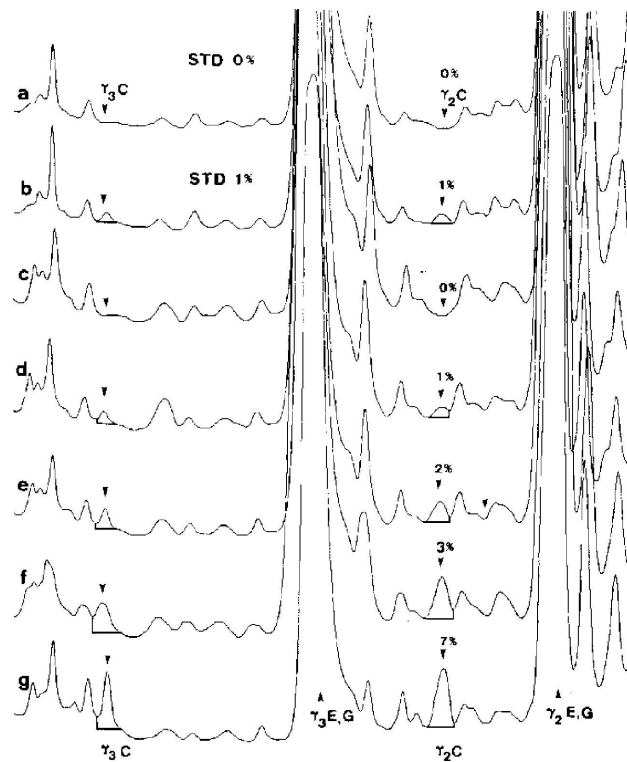


% CM = Kuhmilchgehalt; 1+ = Probe mit 1 % Kuhmilch, versetzt mit reinem Kuhmilchkasein in der Mitte des Durchlaufs; C = Kuh; E = Schaf; G = Ziege; B = Büffel

Abgebildet ist der gesamte Trennungsabstand des IEF-Gels.

Abbildung 5

Densitogrammreihe der Standardproben (STD) und Käseproben aus Gemischen von Schaf- und Ziegenmilch nach isoelektrischer Fokussierung



a, b = Standardproben mit 0 und 1 % Kuhmilch; c-g = Käseproben mit 0, 1, 2, 3 und 7 % Kuhmilch; C = Kuh; E = Schaf; G = Ziege

Die obere Hälfte des IEF-Gels wurde bei $\lambda = 634 \text{ nm}$ analysiert.

ANHANG IX

Bewertung der Analysen**1. Qualitätssicherung**

Analysen sind von Laboratorien durchzuführen, die gemäß Artikel 12 der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 (**) von den Mitgliedstaaten benannt oder von zuständigen Behörden des Mitgliedstaats benannt werden.

2. Probenahme und Beanstandung der Analyseergebnisse

1. Die Probenahme erfolgt gemäß den Bestimmungen der für das jeweilige Erzeugnis geltenden Verordnung. Sind keine Bestimmungen für die Probenahme vorgesehen, so sind die Bestimmungen in ISO 707, Milch und Milcherzeugnisse – Probenahmetechniken anzuwenden.
2. Laborberichte über die Ergebnisse der Analyse müssen genügend Informationen für eine Bewertung der Ergebnisse gemäß der Anlage beinhalten.
3. Für die nach den Unionsvorschriften erforderlichen Analysen sind Doppelproben zu entnehmen.
4. Werden die Ergebnisse beanstandet, führt die Zahlstelle die erforderliche Analyse des betreffenden Erzeugnisses erneut durch; die Kosten sind von der unterliegenden Partei zu tragen.

Die oben genannte Analyse wird durchgeführt, sofern versiegelte Doppelproben des Erzeugnisses verfügbar sind und bei der zuständigen Behörde in geeigneter Form gelagert wurden. Der Hersteller übermittelt der Zahlstelle einen Antrag auf Durchführung der Analyse innerhalb von 7 Arbeitstagen nach Unterrichtung über die Ergebnisse der ersten Analyse. Die Analyse wird von der Zahlstelle innerhalb von 21 Arbeitstagen nach Eingang des Antrags durchgeführt.

5. Das Ergebnis des Einspruchs ist endgültig.
 6. Erbringt der Erzeuger innerhalb von 5 Arbeitstagen nach der Probenahme den Nachweis, dass diese nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde, muss die Probenahme möglichst wiederholt werden. Ist eine erneute Probenahme nicht möglich, wird die Partie angenommen.
-

Anlage

Bewertung der Konformität einer Partie mit den gesetzlichen Grenzwerten**1. Kurzbeschreibung**

Sind in den Rechtsvorschriften für die öffentliche Intervention und die private Lagerhaltung ausführliche Verfahren für die Probenahme festgelegt, so sind diese Verfahren anzuwenden. Ansonsten ist aus einer zur Kontrolle vorgelegten Partie grundsätzlich eine aus mindestens drei Probeneinheiten bestehende Stichprobe zu nehmen. Es kann eine Sammelprobe hergestellt werden. Das ermittelte Ergebnis wird mit den gesetzlichen Grenzwerten verglichen, indem ein Konfidenzintervall von 95 % (zweifache Standardabweichung) berechnet wird; die jeweilige Standardabweichung hängt davon ab, ob 1) die betreffende Methode im Wege einer internationalen Zusammenarbeit durch Werte für σ_r und σ_R validiert wurde oder 2) – bei interner Validierung – ein Wert für die interne Wiederholbarkeit berechnet wurde. Dieses Konfidenzintervall gibt dann Aufschluss über die Messunsicherheit des Ergebnisses.

2. Validierung der methode im wege internationaler zusammenarbeit

In diesem Fall wurden die Wiederholstandardabweichung σ_r und die Vergleichsstandardabweichung σ_R ermittelt, und das Laboratorium kann die Konformität mit den Leistungsmerkmalen der validierten Methode nachweisen.

Das arithmetische Mittel $\bar{x}$ der n wiederholten Messungen wird verglichen.

Die erweiterte Messunsicherheit ($k = 2$) von $\bar{x}$ wird mit folgender Formel berechnet:

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

Wenn das Endergebnis x der Messung mit einer Gleichung der Form $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$, $x = y_1 - y_2$ oder $x = y_1 / y_2$ berechnet wird, sind die in diesen Fällen üblichen Verfahren zur Kombination von Standardabweichungen anzuwenden.

Die Partie wird als nicht konform mit dem oberen gesetzlichen Grenzwert UL eingestuft, wenn gilt:

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

ansonsten wird die Konformität der Partie mit UL festgestellt.

Die Partie wird als nicht konform mit dem unteren gesetzlichen Grenzwert LL eingestuft, wenn

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

ansonsten wird die Konformität der Partie mit LL festgestellt.

3. Interne validierung mit berechnung der internen vergleichsstandardabweichung

Wenn in dieser Verordnung nicht genannte Methoden angewendet werden und keine Präzisionsmessungen durchgeführt wurden, ist eine interne Validierung vorzunehmen. Die interne Wiederholstandardabweichung s_{ir} und die interne Vergleichsstandardabweichung s_{iR} sind anstelle von σ_r bzw. σ_R in der Formel zur Berechnung der erweiterten Messunsicherheit U zu verwenden.

Die Vorschriften für die Feststellung der Konformität mit den gesetzlichen Grenzwerten sind Nummer 1 zu entnehmen. Wird die Partie jedoch als nicht konform mit den gesetzlichen Grenzwerten eingestuft, müssen die Messungen mit der in dieser Verordnung genannten Methode wiederholt werden, und das Ergebnis muss gemäß Nummer 1 bewertet werden.

(*) Die Produkte Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) und Resolyte® pH 5-7 und pH 6-8 (BDH, Merck) haben sich als besonders geeignet für die erforderliche Trennung der γ -Kaseine erwiesen.

(**) Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz (ABl. L 165 vom 30.4.2004, S. 1).“