

## VERORDNUNG (EG) Nr. 1459/98 DER KOMMISSION

vom 8. Juli 1998

## zur Festlegung eines Referenzverfahrens zur Bestimmung von Vanillin in Butterfett, Butter oder Rahm

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 804/68 des Rates vom 27. Juni 1968 über die gemeinsame Marktorganisation für Milch und Milcherzeugnisse <sup>(1)</sup>, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1587/96 <sup>(2)</sup>, insbesondere auf Artikel 6 Absatz 6 und Artikel 12 Absatz 3,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Verordnung (EG) Nr. 2571/97 über den Verkauf von Billigbutter und die Gewährung einer Beihilfe für Rahm, Butter und Butterfett für die Herstellung von Backwaren, Speiseeis und anderen Lebensmitteln <sup>(3)</sup> sieht vor, Rahm, Butter und Butterfett unter bestimmten Umständen zu kennzeichnen, um eine ordnungsgemäße Verwendung dieser Erzeugnisse zu gewährleisten.

Die Kennzeichnung ist für ein reibungsloses Funktionieren des Systems und die Gleichbehandlung der Wirtschaftsteilnehmer von grundlegender Bedeutung. Es ist daher angezeigt, gemeinsame Verfahren für die Bestimmung der Kennzeichnungsmittel gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2571/97 festzulegen.

Es ist jedoch schwierig, solche Referenzverfahren für alle Kennzeichnungsmittel gleichzeitig festzulegen. Die Fest-

legung eines Referenzverfahrens zur Bestimmung von Vanillin in Butterfett, Butter oder Sahne stellt daher einen weiteren Schritt in diese Richtung dar.

Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Milch und Milcherzeugnisse —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

*Artikel 1*

Das im Anhang beschriebene Analyseverfahren wird im Rahmen der Verordnung (EG) Nr. 2571/97 als Referenzverfahren zur Bestimmung von Vanillin in Butterfett, Butter oder Rahm eingesetzt.

Butterfett, Butter oder Rahm sind gemäß Artikel 6 der Verordnung (EG) Nr. 2571/97 gekennzeichnet worden, wenn die Ergebnisse die Bedingungen von Nummer 8 des Anhangs erfüllen.

*Artikel 2*

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

Sie gilt ab 1. September 1998.

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

Brüssel, den 8. Juli 1998

*Für die Kommission*

Franz FISCHLER

*Mitglied der Kommission*

<sup>(1)</sup> ABl. L 148 vom 28. 6. 1968, S. 13.

<sup>(2)</sup> ABl. L 206 vom 16. 8. 1996, S. 21.

<sup>(3)</sup> ABl. L 350 vom 20. 12. 1997, S. 3.

## ANHANG

**Bestimmung des Vanillingehalts in Butterfett, Butter oder Rahm durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie**

1. *Zweck und Anwendungsbereich*

Beschrieben wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Vanillin in Butterfett, Butter oder Sahne.

Das Verfahren ist für Proben im Rahmen der Verordnung (EG) Nr. 2571/97 zu verwenden.
2. *Prinzip*

Extraktion einer bekannten Probemenge mit Hilfe eines Isopropanol-Ethanol-Acetonitril-Gemisches (1:1:2). Abscheidung des Hauptteils des Fetts durch Kühlung bei  $-15^{\circ}\text{C}$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$  und anschließendes Zentrifugieren.

Nach Verdünnung mit Wasser Bestimmung des Vanillingehalts durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).
3. *Geräte*

Normale Laborausstattung und insbesondere:

  - 3.1. Gefrierschrank mit Kühltemperatur zwischen  $-15^{\circ}\text{C}$  und  $-20^{\circ}\text{C}$
  - 3.2. Einwegspritzen, 2 ml
  - 3.3. Membranmikrofilter (Porengröße  $0,45\ \mu\text{m}$ ), beständig gegen eine Lösung mit 5 %-Extraktionslösung (4.4)
  - 3.4. Flüssigkeitschromatographie-System, bestehend aus einer Pumpe (Durchfluß von 1,0 ml/min), einem Injektor (20  $\mu\text{l}$  Injektion, automatisch oder manuell), einem UV-Detektor (306 nm, 0,01 AU gesamter Bereich), einem Aufzeichnungsgerät oder Integrator und einem Säulenthmostat bei  $25^{\circ}\text{C}$
  - 3.5. Analysensäule (250 mm  $\times$  4,6 mm I.D.), gepackt mit LiChrospher RP 18 (Merck,  $5\ \mu\text{m}$ ) oder gleichwertigem Material
  - 3.6. Vorsäule (ca. 20 mm  $\times$  3 mm I.D.), trocken gepackt mit Perisorb RP 18 (30 bis  $40\ \mu\text{m}$ ) oder gleichwertigem Material
4. *Reagenzien*

Alle verwendeten Reagenzien müssen analysenrein sein.

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

Gemisch aus Isopropanol (4.1), Ethanol (4.2) und Acetonitril (4.3) im Verhältnis 1:1:2 (V/V)
  - 4.5. Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd)
    - 4.5.1. Vanillin-Stammlösung (= 500  $\mu\text{g/ml}$ )

Etwa 50 mg Vanillin (4.5) auf 0,1 mg (CM mg) genau in einen 100-ml-Meßkolben einwiegen, 25 ml Extraktionslösung (4.4) hinzufügen und mit Wasser auffüllen.
    - 4.5.2. Vanillin-Standardlösung (= 10  $\mu\text{g/ml}$ )

5 ml der Vanillin-Stammlösung (4.5.1) in einen 250-ml-Meßkolben pipettieren und mit Wasser auffüllen.
  - 4.6. Methanol, HPLC Qualität
  - 4.7. Eisessig
  - 4.8. Wasser, HPLC Qualität
  - 4.9. HPLC mobile Phase

300 ml Methanol (4.6) und etwa 500 ml Wasser (4.8) und 20 ml Essigsäure (4.7) in einem 1 000-ml-Meßkolben mischen, mit Wasser (4.8) auffüllen und durch den  $0,45\text{-}\mu\text{m}$ -Filter filtern.
5. *Durchführung*
  - 5.1. Vorbereitung der Probe
    - 5.1.1. Butter

Die Probe erhitzen, bis sie zu schmelzen beginnt. Ein lokales Erhitzen auf über  $40^{\circ}\text{C}$  ist zu vermeiden. Wenn die Probe ausreichend pastös ist, durch Schütteln homogenisieren. Die Butter 15 s lang rühren und anschließend eine Probe nehmen. 5 g (SM g) Butter auf 1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben einwiegen.

## 5.1.2. Butterfett

Unmittelbar vor der Probenahme den Behälter mit dem Butterfett in einen Ofen bei 40 bis 50 °C geben, bis das Butterfett komplett geschmolzen ist. Die Probe durch Schütteln oder Rühren vermischen, wobei die Bildung von Blasen durch zu starkes Rühren zu vermeiden ist. Etwa 4 g (SM g) Butterfett auf 1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben einwiegen.

## 5.1.3. Rahm

Die Probe im Wasserbad oder Wärmeschrank auf eine Temperatur von 35 bis 40 °C erhitzen. Das Fett durch Schütteln und falls notwendig durch Rühren homogen verteilen. Die Probe schnell auf  $20 \pm 2$  °C abkühlen. Die Probe sollte homogen aussehen, ansonsten ist das Verfahren zu wiederholen. Etwa 10 g (SM g) Rahm auf 1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben einwiegen.

## 5.2. Vorbereitung der Versuchslösung

Der Probe (5.1.1, 5.1.2 oder 5.1.3) etwa 75 ml der Extraktionslösung (4.4) hinzufügen, ca. 15 Minuten lang umrühren oder stark schütteln und mit Extraktionslösung (4.4) auffüllen. Etwa 10 ml dieses Extrakts in ein Reagenzglas mit Stopfen geben. Das Reagenzglas in den Gefrierschrank (3.1) setzen und ca. 30 Minuten stehenlassen. Den kalten Extrakt 5 Minuten lang bei etwa 2 000 rpm zentrifugieren und unmittelbar abgießen. Die abgegossene Lösung auf Zimmertemperatur abkühlen lassen. 5 ml der abgegossenen Lösung in einen 100-ml-Meßkolben pipettieren und mit Wasser auffüllen. Einen aliquoten Teil durch einen Membranmikrofilter (3.3) filtern. Das Filtrat ist für die HPLC bereit.

## 5.3. Kalibrierlösung

5 ml der Vanillin-Standardlösung (4.5.2) in einen 100-ml-Meßkolben pipettieren. 5,0 ml Extraktionslösung (4.4) hinzufügen und bis zur Markierung mit Wasser auffüllen. Diese Lösung enthält 0,5 µg/ml Vanillin.

## 5.4. Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Den Chromatographen ca. 30 Minuten lang stabilisieren lassen, dann die Standardlösung einspritzen. Diesen Vorgang wiederholen, bis die Differenz der Peakflächen oder Peakhöhen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Einspritzungen weniger als 2 % beträgt. Unter den beschriebenen Bedingungen beträgt die Retentionszeit von Vanillin etwa 9 Minuten. Die Kalibrierlösung (5.3) wird doppelt analysiert, indem 20 µl eingespritzt werden. 20 µl der Versuchslösungen (5.2) einspritzen. Die Peakflächen oder -höhen für Vanillin bestimmen. Nach 10 Einspritzungen der Versuchsproben (5.2) doppelte Einspritzung der Kalibrierlösung wiederholen.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

Für jede Partie Versuchslösungen die durchschnittliche Peakfläche (oder -höhe) (AC) der Vanillin-Peaks in Zusammenhang mit den umgebenden Doppeleinspritzungen der Kalibrierlösung berechnen (insgesamt 4 Flächen).

Der Responsfaktor (R) wird folgendermaßen berechnet:

$$R = AC/CM$$

Dabei ist CM die Masse des Vanillins in mg (4.5.1).

Der Vanillin-Anteil (C) der Versuchsprobe (in mg/kg) wird wie folgt berechnet:

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

Dabei ist:

AS = die Peakfläche des Vanillin-Peaks der Versuchsprobe,

SM = die Masse der Versuchsprobe in g (5.1.1, 5.1.2 oder 5.1.3),

20 = der Faktor zur Berücksichtigung der Verdünnung der Standard- und der Versuchsprobe,

0,96 = der Korrekturfaktor für den Fettgehalt in der ersten Verdünnung der Versuchsprobe.

*Anmerkung:*

Anstelle von Peakflächen können auch Peakhöhen verwendet werden (siehe 8.3).

## 7. Genauigkeit des Verfahrens

## 7.1. Wiederholbarkeit (r)

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von zwei Bestimmungen, die innerhalb der kürzest möglichen Zeitspanne von einem Analytiker mit denselben Geräten an derselben Probe durchgeführt wurden, darf nicht höher als 16 mg/kg liegen.

## 7.2. Reproduzierbarkeit (R)

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von zwei Bestimmungen, die von Laboranten in verschiedenen Laboratorien mit verschiedenen Geräten an derselben Probe durchgeführt wurden, darf nicht höher als 27 mg/kg liegen.

## 8. *Toleranzgrenzen*

- 8.1. Dem gekennzeichneten Erzeugnis sind drei Proben zu entnehmen, um die Homogenität zu prüfen.
- 8.2. Das Kennzeichnungsmittel wird entweder aus Vanille oder aus synthetischem Vanillin gewonnen.
- 8.2.1. Die Beimischungsquote des 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyds liegt bei 250 Gramm pro Tonne.
- 8.2.2. Unter Berücksichtigung der kritischen Differenz für eine Wahrscheinlichkeitsrate von 95 % ( $CrD_{95}$ ) darf der Mittelwert der Einzelanalysen jeder der drei Proben, die zur Prüfung der Homogenität genommen wurden, nicht unter 236 mg/kg liegen.
- 8.2.3. Zusätzlich zu dem Kriterium gemäß 8.2.2 wird das niedrigste Analyseergebnis verwendet, um die Homogenität der Kennmittelverteilung zu prüfen. Dies geschieht durch einen Vergleich mit den folgenden Grenzwerten:
- 221,5 mg/kg (95 % der Mindestbeimischungsquote, Einzelprobe  $CrD_{95}$  berücksichtigt)
  - 159 mg/kg (70 % der Mindestbeimischungsquote, Einzelprobe  $CrD_{95}$  berücksichtigt).

Die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit den niedrigsten Ergebnissen wird in Verbindung mit der Interpolation zwischen 221,5 mg/kg und 159 mg/kg verwendet.

- 8.3. Das Kennzeichnungsmittel wird ausschließlich aus Vanilleschoten oder deren vollständigen Auszügen gewonnen.
- 8.3.1. Die Beimischungsquote des 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyds liegt bei 100 Gramm pro Tonne.
- 8.3.2. Unter Berücksichtigung der kritischen Differenz für eine Wahrscheinlichkeit von 95 % ( $CrD_{95}$ ) darf der Mittelwert der Einzelanalysen jeder der drei Proben, die zur Homogenitätsprüfung genommen wurden, nicht unter 86 mg/kg liegen.
- 8.3.3. Zusätzlich zu dem Kriterium gemäß 8.3.2 wird das niedrigste Analyseergebnis verwendet, um die Homogenität der Kennmittelverteilung zu prüfen. Dies geschieht durch einen Vergleich mit den folgenden Grenzwerten:
- 79 mg/kg (95 % der Mindestbeimischungsquote, Einzelprobe  $CrD_{95}$  berücksichtigt),
  - 54 mg/kg (70 % der Mindestbeimischungsquote, Einzelprobe  $CrD_{95}$  berücksichtigt).

Die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit den niedrigsten Ergebnissen wird in Verbindung mit der Interpolation zwischen 79 mg/kg und 54 mg/kg verwendet.

## 9. *Anmerkungen*

- 9.1. Die Wiederholbarkeit  $r$  ist der Wert, unter dem der absolute Unterschied zwischen zwei einzelnen Versuchsergebnissen bei gleicher Methode und am gleichen Material unter den gleichen Bedingungen (gleiches Gerät, gleiches Laboratorium und kurzer zeitlicher Abstand) innerhalb einer gewissen Wahrscheinlichkeit liegen müßte. Liegen keine anderen Angaben vor, so beträgt die Wahrscheinlichkeit 95 %.
- 9.2. Die Vergleichbarkeit  $R$  ist der Wert, unter dem der absolute Unterschied zwischen zwei einzelnen Versuchsergebnissen bei gleicher Methode und am gleichen Material unter unterschiedlichen Bedingungen (andere Analytiker, anderes Gerät, andere Laboratorien und/oder zu anderer Zeit) innerhalb einer gewissen Wahrscheinlichkeit liegen müßte. Liegen keine anderen Angaben vor, so beträgt die Wahrscheinlichkeit 95 %.
- 9.3. Die Wiederfindung von Vanillinzusätzen liegt bei einer Menge von 250 mg/kg Butterfett zwischen 97 und 103,8 %. Durchschnittlich wurden 99,9 % mit einer Standardabweichung von 2,7 % ermittelt.
- 9.4. Die Standardlösung enthält 5 % Extraktionslösung, um die Peakerweiterung durch die in den Proben vorhandenen 5 % Extraktionslösung zu kompensieren. Dadurch wird eine Quantifizierung über die Peakhöhen möglich.
- 9.5. Die Analyse basiert auf einer linearen Kalibrierungslinie mit Nullachsenabschnitt. Die Linearität sollte bei der ersten Analyse und später in regelmäßigen Abständen und nach Änderungen oder Reparaturen der HPLC-Geräte durch Verwendung geeigneter Verdünnungen der Standardlösung (4.5.2) geprüft werden.
-