

I

(Veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

VERORDNUNG (EG) Nr. 213/2001 DER KOMMISSION**vom 9. Januar 2001****mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 hinsichtlich der Methoden für die Analyse und Qualitätsbewertung von Milch und Milcherzeugnissen sowie zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 2771/1999 und (EG) Nr. 2799/1999**

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

ihre Anhänge betreffend Analysemethoden in die vorliegende Verordnung aufzunehmen.

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

- (2) Zusammensetzung und Qualitätsmerkmale von Milch und Milcherzeugnissen gemäß den mit der Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 vorgesehenen Regelungen sind nachzuprüfen, um die genaue Übereinstimmung mit den festgelegten Anforderungen zu gewährleisten.

gestützt auf die Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 des Rates vom 17. Mai 1999 über die gemeinsame Marktorganisation für Milch und Milcherzeugnisse ⁽¹⁾, insbesondere auf die Artikel 10 und 15, Artikel 26 Absatz 3, Artikel 29 Absatz 1 und Artikel 31 Absatz 14,

- (3) Häufig handelt es sich bei den Referenzmethoden für solche Überprüfungen um die von internationalen Organisationen wie IDF, ISO und AOAC International veröffentlichten Methoden, die von diesen Organisationen regelmäßig auf den neuesten Stand gebracht werden. In bestimmten Fällen wird eine Referenzmethode der Gemeinschaft erlassen; in anderen Fällen enthalten die Gemeinschaftsvorschriften keine Referenzmethode. Für eine einheitliche Anwendung der Referenzmethoden empfiehlt sich, jedes Jahr eine Liste der Referenzmethoden abzufassen und vorzuschreiben, dass die anwendbare Methode in dieser Liste aufgeführt sein muss.

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Mit den Verordnungen (EWG) Nr. 1216/68, (EWG) Nr. 3942/92, (EG) Nr. 86/94, (EG) Nr. 2721/95, (EG) Nr. 1080/96, (EG) Nr. 1081/96, (EG) Nr. 1082/96, (EG) Nr. 1854/96, (EG) Nr. 880/98 und (EG) Nr. 1459/98, deren vollständige Titel in Anhang XXVI dieser Verordnung aufgeführt sind, sind Referenzmethoden und Routineverfahren für die Analyse und Qualitätsbewertung von Milch und Milcherzeugnissen sowie der Geltungsbereich und die Anwendungsvorschriften für diese Methoden festgelegt worden. Aus Gründen der Klarheit und um den Marktteilnehmern dieses Sektors ein einziges Dokument zu geben, das diese Methoden und ihre Anwendungsvorschriften enthält, sind die vorgenannten Verordnungen zu einem einzigen Verordnungstext zusammenzufassen. Mit demselben Ziel sind die Verordnung (EG) Nr. 2771/1999 der Kommission vom 16. Dezember 1999 mit Durchführungsmaßnahmen zur Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 des Rates hinsichtlich der Interventionen auf dem Markt für Butter und Rahm ⁽²⁾ und die Verordnung (EG) Nr. 2799/1999 der Kommission vom 17. Dezember 1999 mit Durchführungsmaßnahmen zur Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 des Rates hinsichtlich der Gewährung einer Beihilfe für Magermilch und Magermilchpulver für Futterzwecke und des Verkaufs dieses Magermilchpulvers ⁽³⁾ zu ändern, um

- (4) Die Verwendung von Routineverfahren sollte nicht ausgeschlossen werden; die Bedingungen ihrer Anwendung sind somit genauer anzugeben.

- (5) Um eine einheitliche Praxis für die Bewertung der Analyseergebnisse zu schaffen, sind ebenfalls gemeinsame Methoden festzulegen. Dasselbe gilt für die sensorische Prüfung der betreffenden Erzeugnisse und die Überprüfung der Ergebnisse im Falle ihrer Beanstandung.

- (6) Zur Durchführung bestimmter Analysen gibt es derzeit keine international anerkannte Referenzmethoden, die validiert worden sind. Aus diesem Grund stehen keine Informationen über die Unterschiede zwischen den Analyseergebnissen der einzelnen Laboratorien zur Verfügung. Somit sind Methoden auf Gemeinschaftsebene festzulegen, die nach international festgelegten Regeln validiert worden sind und als Referenzmethoden angewandt werden.

⁽¹⁾ ABl. L 160 vom 26.6.1999, S. 48.⁽²⁾ ABl. L 333 vom 24.12.1999, S. 11.⁽³⁾ ABl. L 340 vom 31.12.1999, S. 3.

(7) Die Verordnung (EG) Nr. 2571/97 der Kommission vom 15. Dezember 1977 über den Verkauf von Billigbutter und die Gewährung einer Beihilfe für Rahm, Butter und Butterfett für die Herstellung von Backwaren, Speiseeis und anderen Lebensmitteln⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 635/2000⁽²⁾, 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 Methoden für die Bestimmung einiger dieser Kennzeichnungsmittel festzulegen.

(8) Das Butterfett muss einer Kennzeichnung unterzogen werden, die gemäß der Verordnung (EWG) Nr. 3143/85 der Kommission vom 11. November 1985 über den Absatz von Butter zu herabgesetzten Preisen aus Beständen der Interventionsstellen für den unmittelbaren Verbrauch in Form von Butterfett⁽³⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 101/1999⁽⁴⁾, der Verordnung (EWG) Nr. 429/90 der Kommission vom 20. Februar 1990 über die Gewährung einer Beihilfe im Ausschreibungsverfahren für Butterfett zum unmittelbaren Verbrauch in der Gemeinschaft⁽⁵⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 124/1999⁽⁶⁾, und der Verordnung (EG) Nr. 2571/97 kontrolliert wird. Die genaue Einhaltung der Bedingungen für die Kennzeichnung des Butterfetts ist unerlässlich, um dem Risiko einer Zweckentfremdung vorzubeugen. Es ist daher angezeigt, eine gemeinsame Methode für die Feststellung einiger dieser Kennzeichnungsmittel festzulegen.

(9) Für die private Lagerhaltung von aus Schaf- oder Ziegenmilch hergestellten Käsesorten kann gemäß Artikel 9 der Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 eine Beihilfe gewährt werden. Für diese Erzeugnisse kann gemäß Artikel 31 derselben Verordnung außerdem eine besondere Erstattung gewährt werden. Für die Einfuhr von Käse aus Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch oder aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch aus bestimmten Drittländern in die Gemeinschaft gelten Präferenzregelungen. Aufgrund des Bestehens der vorgenannten Vorschriften muss im Wege geeigneter Kontrollen nachgewiesen werden, dass dem betreffenden Erzeugnis keine Kuhmilch zugesetzt wurde. Es empfiehlt sich daher, eine gemeinschaftliche Referenzmethode für den Kuhmilchnachweis festzulegen, die auch mit Routineverfahren durchgeführt werden kann, sofern sie bestimmte Kriterien erfüllen.

(10) Gemäß der Verordnung (EWG) Nr. 2921/90 der Kommission vom 10. Oktober 1990 über die Gewährung von Beihilfen für die zur Herstellung von Kasein und Kaseinaten bestimmte Magermilch⁽⁷⁾, zuletzt geän-

dert durch die Verordnung (EG) Nr. 2654/1999⁽⁸⁾, muss festgestellt werden, dass keine coliformen Keime vorhanden sind. Die internationale Norm IMV 73A/1985 ist weltweit als Referenzmethode für den Nachweis coliformer Keime in Milch und Milcherzeugnissen anerkannt. Sie muss jedoch abgewandelt werden, um coliforme Keime in einer bestimmten Erzeugnismenge nachzuweisen. Infolgedessen wird eine Referenzmethode der Gemeinschaft für die Untersuchung auf coliforme Keime auf der Grundlage der vorgenannten Norm erstellt.

(11) In der Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 des Rates vom 23. Juli 1987 über die zolltarifliche und statistische Nomenklatur sowie den Gemeinsamen Zolltarif⁽⁹⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 254/2000⁽¹⁰⁾, sind die Zollsätze für Mischfuttermittel der Tarifstelle 2309 nach Maßgabe ihres Gehalts an Milcherzeugnissen differenziert. Um eine einheitliche Anwendung der betreffenden Bestimmungen zu gewährleisten, ist eine für alle Mitgliedstaaten verbindliche Methode zur Bestimmung des Laktosegehalts festzulegen. Es empfiehlt sich, hierfür eine allgemein anerkannte Methode zu wählen.

(12) Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 müssen bei Butter und Magermilchpulver, die zur Intervention bestimmt sind, bzw. Magermilchpulver zur Tierfütterung bestimmte Qualitätsbedingungen eingehalten werden. Daher sind Referenzmethoden für die Überprüfung der Einhaltung dieser Bedingungen festzulegen.

(13) Die Anwendung einiger der mit dieser Verordnung eingeführten Methoden erfordert einen Anpassungszeitraum. Daher ist ihre Anwendung zu verschieben.

(14) Der Verwaltungsausschuss für Milch und Milcherzeugnisse hat nicht innerhalb der ihm von seinem Vorsitzenden gesetzten Frist Stellung genommen —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

KAPITEL I

ALLGEMEINE BESTIMMUNGEN

Artikel 1

Gegenstand und Anwendungsbereich

Mit dieser Verordnung werden Regeln für die Anwendung von Methoden für die chemische, physikalische und mikrobiologische Analyse und für die sensorische Prüfung von Milch und Milcherzeugnissen gemäß den Regelungen im Rahmen der mit der Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 festgelegten gemeinsamen Marktorganisation für Milch und Milcherzeugnisse sowie bestimmte dieser Methoden erlassen.

⁽¹⁾ ABl. L 350 vom 20.12.1997, S. 3.

⁽²⁾ ABl. L 76 vom 25.3.2000, S. 9.

⁽³⁾ ABl. L 298 vom 12.11.1985, S. 9.

⁽⁴⁾ ABl. L 11 vom 16.1.1999, S. 14.

⁽⁵⁾ ABl. L 45 vom 21.2.1990, S. 8.

⁽⁶⁾ ABl. L 16 vom 21.1.1999, S. 19.

⁽⁷⁾ ABl. L 279 vom 11.10.1990, S. 22.

⁽⁸⁾ ABl. L 325 vom 17.12.1999, S. 10.

⁽⁹⁾ ABl. L 256 vom 7.9.1987, S. 1.

⁽¹⁰⁾ ABl. L 28 vom 3.2.2000, S. 16.

*Artikel 2***Liste der Methoden**

- (1) Die Liste der Referenzmethoden für die Analysen gemäß Artikel 1 ist in Anhang I festgelegt.
- (2) Die Kommission bringt die genannte Liste mindestens einmal jährlich nach dem Verfahren des Artikels 42 der Verordnung (EG) Nr. 1255/1999 auf den neusten Stand.

*Artikel 3***Routineverfahren**

Für die gemäß den Gemeinschaftsvorschriften erforderlichen Analysen dürfen Routineverfahren verwendet werden, sofern diese nach den gleichen Maßstäben wie die Referenzmethode arbeiten und regelmäßig überprüft werden.

Das in Anhang II angegebene Verfahren kann für die Überprüfung von Ergebnissen verwendet werden, die mittels Routineverfahren erzielt wurden und sich den in der Verordnung angegebenen Grenzwerten annähern.

Im Streitfall sind die Ergebnisse der Referenzmethode entscheidend.

*Artikel 4***Validierung der Referenzmethoden**

- (1) Eine Referenzmethode ist validiert, wenn sie vorher festgelegten Präzisionsparametern hinsichtlich der Wiederhol- und Vergleichsgrenze entspricht.
- (2) Ist eine in den Verordnungen enthaltene Referenzmethode nicht validiert worden, so setzen die Mitgliedstaaten eine vorläufige Vergleichsgrenze fest.

Diese Grenze wird anhand des Verfahrens von Anhang III Buchstabe b) ermittelt. In den 18 Monaten nach Inkrafttreten dieser Verordnung können die Mitgliedstaaten jedoch ein gleichwertiges Verfahren anwenden.

Die Einhaltung des Grenzwerts wird mindestens einmal jährlich überprüft.

- (3) Zeigen die Ergebnisse der Anwendung von validierten Referenzmethoden oder Methoden mit vorläufigen Präzisionsparametern, dass ein Grenzwert überschritten wurde, so kann das Verfahren zur Bewertung von Analyseergebnissen gemäß Anhang IV zur Bestimmung der kritischen Differenz gegenüber diesem Grenzwert verwendet werden.

*Artikel 5***Zulässigkeit der Analyseergebnisse**

- (1) Die Analysen werden in Laboratorien durchgeführt, die ein internes Qualitätskontrollverfahren gemäß der Beschrei-

bung von Anhang V Buchstabe a) bzw. ein Verfahren mit gleichwertigen Anforderungen anwenden.

Eine genaue Beschreibung der angewendeten Methode muss in Laboratorium verfügbar sein.

- (2) Die Laboratorien setzen ihre internen Präzisionsnormen innerhalb eines Analysenlaufes für alle Methoden anhand
- a) des in Anhang V Buchstabe b) festgelegten Verfahrens oder
 - b) einer validierten veröffentlichten Methode fest, die eine festgestellte Wiederholpräzision beinhaltet.

Die Übereinstimmung mit der Vergleichsgrenze muss mindestens einmal jährlich nach dem in Anhang III Buchstabe a) dargestellten Verfahren überprüft werden.

Unterabsatz 2 findet keine Anwendung, wenn das Laboratorium während des Jahres an einem Leistungstest beteiligt war.

- (3) Der Laborbericht über die Ergebnisse der Analyse muss genügend Anhaltspunkte umfassen, um eine Bewertung der Ergebnisse gemäß den Anhängen IV und VIII zu ermöglichen.
- (4) Die Ergebnisse einer Analyse gelten als zulässig, wenn sie gemäß den Annehmbarkeitskriterien, die im internen Qualitätskontrollverfahren gemäß Absatz 1 beschrieben sind, und den internen Präzisionsnormen gemäß Absatz 2 erzielt worden sind.

*Artikel 6***Sensorische Prüfung**

- (1) Bei Butter werden die Methoden gemäß Anhang VI für die Überprüfung der Leistung der Prüfpersonen und der Zuverlässigkeit der Ergebnisse verwendet. Die in Anhang VII beschriebene Methode wird als Referenzmethode für die sensorische Prüfung angewendet.
- (2) Bei Milch und anderen Milcherzeugnissen als Butter wenden die Mitgliedstaaten als Referenzmethode für die sensorische Prüfung entweder die Norm IMV 99C/1997 oder andere vergleichbare Methoden an, die sie der Kommission mitteilen.

Die Methoden gemäß Anhang VI können für die Überprüfung der Leistung der Prüfpersonen und der Zuverlässigkeit der Ergebnisse verwendet werden.

*Artikel 7***Probenahme und Beanstandung der Analyseergebnisse**

- (1) Für die in der Gemeinschaftsregelung vorgesehenen Analysen sind Doppelproben zu entnehmen.
- (2) Das in Anhang VIII dargestellte Verfahren wird in Fällen verwendet, in denen die Analyseergebnisse vom Marktteilnehmer nicht akzeptiert werden.

KAPITEL II

ANALYSEMETHODEN

Artikel 8

Wassergehalt/Gehalt an Trockenmasse/Fettgehalt von Butter

(1) Die in Anhang IX beschriebene Analysemethode ist als Referenzmethode für die Bestimmung des Wassergehalts von Butter anzuwenden.

(2) Die in Anhang X beschriebene Analysemethode ist als Referenzmethode für die Bestimmung des Gehalts an fettfreier Trockenmasse von Butter anzuwenden.

(3) Die in Anhang XI beschriebene Analysemethode ist als Referenzmethode für die Bestimmung des Fettgehalts von Butter anzuwenden.

Artikel 9

Kennzeichnungsmittel

(1) Die in Anhang XII beschriebene Analysemethode wird als Referenzmethode zur Bestimmung von Vanillin in Butterfett, Butter oder Rahm angewendet.

(2) Die in Anhang XIII beschriebene Analysemethode wird als Referenzmethode zur Bestimmung des Gehalts an Beta-Apo-8'-Karatinsäure-Äthylester in Butterfett oder Butter angewendet.

(3) Die in Anhang XIV beschriebene Analysemethode wird als Referenzmethode zur Bestimmung des Stigmasteringehalts oder β -Sitosteringehalts von Butter und Butterfett angewendet.

(4) Butterfett, Butter oder Rahm ist dann ordnungsgemäß gekennzeichnet worden, wenn die Ergebnisse den Anforderungen von Nummer 8 der in den Absätzen 1, 2 und 3 genannten Anhängen genügen.

Artikel 10

Nachweis von Kuhmilchkasein

(1) Damit gewährleistet ist, dass ausschließlich aus Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch oder aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch herzustellender Käse kein Kuhmilchkasein enthält, ist für die Untersuchung die in Anhang XV beschriebene Referenzmethode anzuwenden.

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

(2) Zum Nachweis von Kuhmilchkasein in Käse der in Absatz 1 genannten Kategorien dürfen Routineverfahren verwendet werden, wenn sie folgende Bedingungen erfüllen:

- a) die Nachweisgrenze darf höchstens 0,5 % betragen,
- b) es dürfen keine falsch-positiven Befunde erzielt werden;
- c) es muss eine ausreichende Empfindlichkeit zum Nachweis von Kuhmilchkasein auch nach langer Reifezeit entsprechend den Gepflogenheiten des Handels bestehen.

Wird die Bedingung unter Buchstabe b) nicht erfüllt, so muss jede positiv reagierende Probe nochmals anhand der Referenzmethode analysiert werden.

Wird die Bedingung unter Buchstabe c) für eine bestimmte Käseart der in Absatz 1 genannten Kategorien nicht erfüllt, so muss diese Käseart anhand der Referenzmethode analysiert werden.

Artikel 11

Untersuchung auf coliforme Keime

(1) Die in Anhang XVI beschriebene Referenzmethode wird für die Untersuchung auf coliforme Keime in Butter, Magermilchpulver und Kasein/Kaseinaten verwendet.

(2) Für die Untersuchung auf coliforme Keime dürfen Routineverfahren verwendet werden, sofern sich die Ergebnisse mit den Ergebnissen vergleichen lassen, die mit der im vorgenannten Anhang beschriebenen Referenzmethode erzielt werden. Insbesondere müssen die Routineverfahren eine ausreichende Nachweisgrenze aufweisen. Es dürfen keine falsch-negativen Ergebnisse erzielt werden. Sind falsch-positive Ergebnisse nicht auszuschließen, so muss jedes positive Ergebnis anhand der Referenzmethode bestätigt werden.

Artikel 12

Laktosegehalt

Die Methode zur Bestimmung des Gehalts der unter die Position 2309 der Kombinierten Nomenklatur fallenden Erzeugnisse an Laktose ist in Anhang XVII festgelegt.

Artikel 13

Nachweis von Labmolke

(1) Die Methode zum Nachweis von Labmolke in Magermilchpulver, das für die öffentliche Lagerhaltung bestimmt ist, ist in Anhang XVIII festgelegt.

(2) Die Methode zum Nachweis von Labmolke in Magermilchpulver und Mischungen, die zur Tierernährung bestimmt sind, ist in Anhang XIX festgelegt.

Artikel 14

Nachweis von Buttermilch

Die Methode zum Nachweis von Buttermilch in Magermilchpulver ist in Anhang XX festgelegt.

Artikel 15

Rückstände von Antimikrobiotika

Die Methode zur Feststellung der Rückstände von Antibiotika und Sulfonamiden/Dapson in Magermilchpulver ist in Anhang XXI festgelegt.

Artikel 16

Gehalt an Magermilchpulver

Die Methode zur Bestimmung des Gehalts an Magermilchpulver in Mischfuttermitteln ist in Anhang XXII festgelegt.

Artikel 17

Nachweis von Stärke

Die Methode zum Nachweis von Stärke in Magermilchpulver, denaturiertem Magermilchpulver und Mischfuttermitteln ist in Anhang XXIII festgelegt.

Artikel 18

Feuchtigkeitsgehalt von saurem Buttermilchpulver

Die Methode zur Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts von saurem Buttermilchpulver, das zur Tierernährung bestimmt ist, ist in Anhang XXIV festgelegt.

Artikel 19

Nachweis von Fremdfett

Die Methode zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett ist in Anhang XXV festgelegt.

KAPITEL III

SCHLUSSBESTIMMUNGEN

Artikel 20

Änderungen der Verordnung (EG) Nr. 2771/1999

Die Verordnung (EG) Nr. 2771/1999 wird wie folgt geändert:

1. Artikel 4 Absatz 1 erster Satz erhält folgende Fassung: „Die zuständigen Behörden kontrollieren die Butterqualität anhand der gemäß Anhang IV entnommenen Proben nach den in Anhang I festgelegten Analysemethoden.“
2. In Anhang I erhält Fußnote ⁽²⁾ folgende Fassung: „Vgl. Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 213/2001“.

3. Die Anhänge II und III werden gestrichen.

4. In Anhang IV Nummer 2 vorletzte Zeile werden die Worte „Anhang III“ durch die Worte „Anhang VII der Verordnung (EG) Nr. 213/2001“ ersetzt.

Artikel 21

Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2799/1999

Die Verordnung (EG) Nr. 2799/1999 wird wie folgt geändert:

1. In Artikel 20 erhalten die Absätze 1 bis 4 folgende Fassung:

„(1) Der Magermilchpulvergehalt der Mischungen und des Mischfutters wird durch mindestens eine Doppelbestimmung nach der in Anhang XXII der Verordnung (EG) Nr. 213/2001 angegebenen Methode ermittelt und durch die Kontrollmaßnahmen gemäß Artikel 17 Absatz 3 ergänzt. Stimmen die Ergebnisse dieser Überprüfungen nicht überein, so ist das Ergebnis der Vor-Ort-Kontrollen ausschlaggebend.

(2) Der Nachweis von Labmolke erfolgt nach dem in Anhang XIX der Verordnung (EG) Nr. 213/2001 beschriebenen Verfahren.

(3) Der Stärkegehalt des Mischfutters wird durch die Kontrollmaßnahmen gemäß Artikel 17 Absatz 3 ermittelt, die durch die qualitative Analyseverfahren von Anhang XXIII der Verordnung (EG) Nr. 213/2001 ergänzt werden müssen.

(4) Die Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts von saurem Buttermilchpulver erfolgt nach der in Anhang XXIV der Verordnung (EG) Nr. 213/2001 beschriebenen Analyseverfahren.“

2. Die Anhänge III bis VI werden gestrichen.

Artikel 22

Aufgehobene Verordnungen

Die Verordnungen (EWG) Nr. 1216/68, (EWG) Nr. 3942/92, (EG) Nr. 86/94, (EG) Nr. 2721/95, (EG) Nr. 1854/96, (EG) Nr. 1080/96, (EG) Nr. 1081/96, (EG) Nr. 1082/96, (EG) Nr. 880/98 und (EG) Nr. 1459/98 werden aufgehoben.

Bezugnahmen auf die aufgehobenen Verordnungen gelten als Bezugnahmen auf die vorliegende Verordnung.

Artikel 23

Inkrafttreten

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

Die Methoden in Anhang III, Anhang IV Nummer 4 sowie den Anhängen VI und VIII gelten jedoch ab dem 18. Monat nach dem Inkrafttreten dieser Verordnung.

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

Brüssel, den 9. Januar 2001

Für die Kommission
Franz FISCHLER
Mitglied der Kommission

ANHANG I

(Artikel 2)

LISTE DER REFERENZMETHODEN

Abkürzungen:

Min. = Minimum, Max. = Maximum, Anhang = Anhang zur genannten Verordnung, FFTR = fettfreie Trockenmasse, FFS = freie Fettsäuren, IP = Peroxidzahl, A = Aussehen, G = Geschmack, K = Konsistenz, TBC = Gesamtkeimzahl, Therm. = Gehalt an thermophilen Keimen, MS = Mitgliedstaat, IMV = Internationaler Milchwirtschaftsverband, ISO = International Organisation for Standardization (Internationale Normenorganisation), IUPAC = Internationale Union für reine und angewandte Chemie, ADPI = American Dairy Products Institute, LCS = gezuckerte Kondensmilch, LCC = eingedampfte Milch oder Sahne, FFMTR = fettfreie Milchtrockenmasse

TEIL A:

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
Verordnung (EG) Nr. 2771/1999 Öffentliche Lagerhaltung (ABl. L 333 vom 24.12.1999, S. 11)	Ungesalzene Butter	Milchfett	Min. 82 %	ANHANG XI	Anmerkung 1 Anmerkung 3
		Wasser	Max. 16 %	ANHANG IX	
		FFTR	Max. 2 %	ANHANG X	
		FFS (Max.)	1,2 mmol/100 g Fett	IMV-Norm 6B:1989	
		IP (Max.)	0,3 mEq. Sauerstoff/1 000 g Fett	IMV-Norm 74A:1991 (englische Fassung)	
		Coliforme	In 1 g nicht nachweisbar	ANHANG XVII	
		Andere Fette als Milchfett	Mit Triglyceridanalyse nicht nachweisbar	ANHANG XXVI	
		Kennzeichnungsmittel: Sterole	Nicht nachweisbar	ANHANG XIV	
		Sonstige Kennzeichnungsmittel: — Vanillin	Nicht nachweisbar	ANHANG XII	
		— Karotinsäure-Äthylester	Nicht nachweisbar	ANHANG XIII	
— Önanthsäuretriglyceride	Nicht nachweisbar	IUPAC 2.301 sub 5			
Sensorische Merkmale	Mindestens 4 von 5 Punkten für A, G und K	ANHANG VII			
Wasserdispersion	Mindestens 4 Punkte	IMV-Norm 112A:1989			
Verordnung (EG) Nr. 2771/1999 Private Lagerhaltung	Ungesalzene Butter	Milchfett	Min. 82 %	ANHANG XI	Anmerkung 6
		Wasser	Max. 16 %	ANHANG IX	
Verordnung (EG) Nr. 2771/1999 Private Lagerhaltung	Gesalzene Butter	Milchfett	Min. 80 %	ANHANG XI	Anmerkung 6
		Wasser	Max. 16 %	ANHANG IX	
		Salz	Max. 2 %	IMV-Norm 12B:1988	

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
Verordnung (EG) Nr. 2571/97 (ABl. L 350 vom 20.12.1997, S. 3)	Ungesalzene Butter	Milchfett Wasser Kennzeichnungsmittel: — Sterole — Vanillin — Carotinsäure-Äthylester — Önanthsäuretriglyceride	Min. 82 % Max. 16 %	ANHANG XI ANHANG IX ANHANG XIV ANHANG XII ANHANG XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Verordnung (EG) Nr. 2571/97	Gesalzene Butter	Milchfett Wasser Salz Kennzeichnungsmittel: — Sterole — Vanillin — Carotinsäure-Äthylester — Önanthsäuretriglyceride	Min. 80 % Max. 16 % Max: 2 %	ANHANG XI ANHANG IC IMV-Norm 12B:1988 ANHANG XIV ANHANG XII ANHANG XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Verordnung (EG) Nr. 2571/97	Butterfett	Milchfett Feuchtigkeit und MTR FFS IP (Max.) Andere Fette als Milchfett Geschmack Geruch Sonstige Kennzeichnungsmittel: — Sterole — Vanillin — Carotinsäure-Äthylester — Önanthsäuretriglyceride	Min. 99,8 % Max. 0,2 % Max. 0,35 % (ausgedrückt in Ölsäure) 0,5 mEq. Sauerstoff/1 000 g Fett Keine Unverfälscht Kein Fremdgeruch Keine Neutralisierungsmittel, Anti- oxidantien und Konservierungsmittel	IMV-Norm 24:1964 IMV-Norm 23A:1988 (Feuchtigkeit) IMV-Norm 24:1964 (FFMTR) IMV-Norm 6B:1989 IMV-Norm 74A:1991 (englische Fassung) ANHANG XXV ANHANG XIV ANHANG XII ANHANG XIII IUPAC 2.301 sub 5	Anmerkung 1

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
Verordnung (EG) Nr. 2571/97	Rahm	Fett	35 %	IMV-Norm 16C:1987	
		Kennzeichnungsmittel: — Sterole — Vanillin — Carotinsäure-Äthylester — Önanthsäuretriglyceride		Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden ANHANG XII Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden IUPAC 2.301 sub 5	Anmerkung 2 Anmerkung 2
Verordnung (EG) Nr. 429/90 (ABl. L 45 vom 21.2.1990, S. 8)	Butterfett	Milchfett	Min. 96 %	Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden	Anmerkung 2
		FFTR	Max. 2 %	Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden	Anmerkung 2
		Kennzeichnungsmittel: — Stigmasterin (95 %)	15 g/100 kg Butterfett	ANHANG XIV	
		— Stigmasterin (85 %)	17 g/100 kg Butterfett	ANHANG XIV	
		— Önanthsäuretriglyceride	1,1 kg/100 kg Butterfett	IUPAC 2.301 sub 5	
		— Ethylester der Buttersäure und Stigmasterin	Siehe Anhang Nummer 1 Buchstabe c)	ANHANG XIV	
		— Lecithin (E 322)	Max. 0,5 %	Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden (Buttersäure)	Anmerkung 2
				Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden	Anmerkung 2
		NaCl	Max. 0,75 %	IMV-Norm 12B:1988	
		FFS	Max. 0,35 % (ausgedrückt in Ölsäure)	IMV-Norm 6B:1989	
		IP (Max.)	Max. 0,5 mEq. Sauerstoff/1 000 g Fett	IMV-Norm 74A:1991 (englische Fassung)	Anmerkung 1
		Geschmack	Unverfälscht		
		Geruch	Kein Fremdgeruch		
Sonstige	Keine Neutralisierungsmittel, Antioxidantien und Konservierungsmittel				
Verordnung (EWG) Nr. 2191/81 (ABl. L 213 vom 1.8.1981, S. 20)	Ungesalzene Butter	Milchfett	Min. 82 %	ANHANG XI	
		Wasser	Max. 16 %	ANHANG IX	

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
Verordnung (EWG) Nr. 2191/81	Gesalzene Butter	Milchfett Wasser Salz	Min. 80 % Max. 16 % Max. 2 %	ANHANG XI ANHANG IX IMV-Norm 12B:1988	
Artikel 9 und Titel II der Verordnung (EG) Nr. 1255/1999	Käse aus Schafsmilch und/oder Ziegenmilch	Kuhmilch	< 1 %	ANHANG XV	
Verordnung (EWG) Nr. 2921/90	Anhang I — Säurekasein	Wasser Fett Freie Säure	Max. 12,00 % Max. 1,75 % Max. 0,30 % (ausgedrückt in Milchsäure)	IMV-Norm 78C:1991 IMV 127A:1998 IMV-Norm 91:1979	
Verordnung (EWG) Nr. 2921/90	Anhang I — Labkasein	Wasser Fett Asche	Max. 12,00 % Max. 1,00 % Min. 7,50 %	IMV-Norm 78C:1991 IMV 127A:1998 IMV-Norm 91:1979	
Verordnung (EWG) Nr. 2921/90	Anhang I — Kaseinat	Wasser Milchweiß Fett und Asche	Max. 6,00 % Min. 88,00 % Max. 6,00 %	IMV-Norm 78C:1991 IMV-Norm 92:1979 FIL 127A:1988 IMV-Norm 89:1979 oder IMV-Norm 90:1979	
Verordnung (EWG) Nr. 2921/90	Anhang II — Säurekasein	Wasser Fett Freie Säure TBC (Max.) Coliforme Therm. (Max.)	Max. 10,00 % Max. 1,50 % Max. 0,20 % (ausgedrückt in Milchsäure) 30 000/1 g Keine/0,1 g 5 000/1 g	IMV-Norm 78C:1991 IMV 127A:1988 IMV-Norm 91:1979 IMV-Norm 100B:1991 ANHANG XVI IMV-Norm 100B:1991	Anmerkung 3 Anmerkung 3 Anmerkungen 3, 4
Verordnung (EWG) Nr. 2921/90	Anhang II — Labkasein	Wasser Fett Asche TBC (Max.) Coliforme Therm. (Max)	Max. 8,00 % Max. 1,00 % Min. 7,50 % 30 000/1 g Keine/0,1 g 5 000/1 g	IMV-Norm 78C:1991 IMV 127A:1988 IMV-Norm 90:1979 IMV-Norm 100B:1991 ANHANG XVI IMV-Norm 100B:1991	Anmerkung 3 Anmerkung 3 Anmerkungen 3, 4

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
Verordnung (EWG) Nr. 2921/90	Anhang II — Kaseinat	Wasser Milchweiß Fett und Asche TBC (Max.) Coliforme Therm. (Max.)	Max. 6,00 % Min. 88,00 % Max. 6,00 % 30 000/1 g Keine/0,1 g 5 000/1 g	IMV-Norm 78C:1991 IMV-Norm 92:1979 IMV 127A:1988 IMV 89:1979 oder IMV 90:1979 IMV-Norm 100B:1991 ANHANG XVI IMV-Norm 100B:1991	Anmerkung 3 Anmerkung 3 Anmerkungen 3, 4
Verordnung (EWG) Nr. 2921/90	Anhang III — Kaseinat	Wasser Milchweiß Fett Laktose Asche TBC (Max.) Coliforme Therm. (Max.)	Max. 6,00 % Min. 85,00 % Max. 1,50 % Max. 1,00 % Max. 6,50 % 30 000/1 g Keine 0,1 g 5 000/1 g	IMV-Norm 78C:1991 IMV-Norm 92:1979 IMV 127A:1988 IMV-Norm 106:1982 IMV 89:1979 oder IMV 90:1979 IMV-Norm 100B:1991 ANHANG XVI IMV-Norm 100B:1991	Anmerkung 3 Anmerkung 3 Anmerkungen 3, 4
Verordnung (EG) Nr. 2799/1999 (ABl. L 340 31.12.1999, S. 3)	Mischfuttermittel und Magermilchpulver (MMP) (zur Tierernährung)	Wasser (saurer Buttermilchpulver) Eiweiß Wasser (NMP) Fett (MMP) Labmolke (MMP) Stärke (MMP) Wasser (Mischung) Fett (Mischung) Labmolke (Mischung) MMP-Gehalt (im Endprodukt) Fett (im Endprodukt) Stärke (im Endprodukt) Kupfer (im Endprodukt)	Max. 5 % 31,4 % (min. — in der fettfreien Trockenmasse) Max. 5 % Max. 11 % Keine Keine 5 % max. in der fettfreien Trockenmasse — Keine Min. 50 % Min. 2,5 % oder 5 % Min. 2 % 25 ppm	IMV-Norm 20B:1993 IMV-Norm 26A:1993 IMV-Norm 9C:1987 ANHANG XIX ANHANG XXIII IMV-Norm 26A:1993 Richtlinie 84/4/EWG der Kommission (ABl. L 15 vom 18.1.1984, S. 28) ANHANG XIX ANHANG XXII Richtlinie 84/4/EWG der Kommission ANHANG XXII Richtlinie 78/633/EWG der Kommission (ABl. L 206 vom 26.7.1987, S. 43)	Anmerkung 7 Anmerkung 7 Anmerkung 8 Anmerkung 9

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
Verordnung (EG) Nr. 322/96 (ABl. L 45 vom 23.2.1996, S. 5)	MMP (sprühgetrocknet)	Fett	Max. 1,0 %	IMV-Norm 9C:1987	
		Eiweiß	31,4 % (min. in der fettfreien Trockenmasse)	IMV-Norm 20B:1993	
		Wasser	Max. 3,5 %	IMV-Norm 26A:1993	
		Säuregrad (N/10 NaOH)	Max. 19,5 ml	IMV-Norm 86:1981	
		Laktate	Max. 150 mg/100 g	IMV-Norm 69B:1987	
		Phosphate	Keine	ISO-Norm 3356:1975	
		Löslichkeit	Max. 0,5 ml bei 24 °C	IMV 129A:1988	
		Verbrannte Teilchen	Filter B min. (15,0 mg)	ADPI:1990	
		TBC	40 000/1 g	IMV-Norm 100B:1991	Anmerkung 3
		Coliforme	Keine/0,1 g	ANHANG XVI	Anmerkung 3
		Buttermilch	Keine	ANHANG XX	
		Labmolke	Keine	ANHANG XVIII	
		Säuremolke	Keine	Von der zuständigen Behörde zugelassene Methode	Anmerkung 2
	Antibakterielle Stoffe		ANHANG XXI		

TEIL B

Die in Teil B genannten Referenzmethoden sind zur Analyse von Produkten verwendbar, die durch eine der in der ersten Spalte aufgeführten Verordnungen erfasst werden:

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	KN-Code	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 (ABl. L 256 vom 7.9.1987, S. 1) Verordnung (EG) Nr. 2414/98 (ABl. L 299 vom 10.11.1998, S. 7) Verordnung (EG) Nr. 1374/98 (ABl. L 185 vom 30.6.1998, S. 21) Verordnung (EG) Nr. 2508/97 (ABl. L 345 vom 16.12.1997, S. 31) Verordnung (EG) Nr. 174/1999 (ABl. L 20 vom 27.1.1999, S. 8)	Milch und Rahm, weder eingedickt noch mit Zusatz von anderen Süßmitteln	0401	Fett (\leq 6 %)	Die Grenzwerte wurden der Beschreibung zum KN-Code des jeweiligen Produkts und gegebenenfalls Teil 9 der in der Verordnung (EWG) Nr. 3846/87 der Kommission (ABl. L 366 vom 24.12.1987, S. 1) enthaltenen Nomenklatur für Ausfuhrerstattungen bzw. der Verordnung (EG) Nr. 1374/98 (ABl. L 185 vom 30.6.1998, S. 21) enthalten.	IMV-Norm 1D:1996	
			Fett ($>$ 6 %)		IMV-Norm 16C:1987	

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	KN-Code	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
	Milch und Rahm, eingedickt oder mit Zusatz von Zucker oder anderen Süßmitteln	0402	Fett (flüssig) Fett (fest) Eiweiß Saccharose (normaler Gehalt) Saccharose (niedriger Gehalt) Trockenmasse (LCS) Trockenmasse (LCC) Wasser (Milch und Rahmpulver)		IMV-Norm 13C:1987 IMV-Norm 9C:1987 IMV-Norm 20B:1983 IMV-Norm 35A:1992 Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden IMV-Norm 15B:1991 IMV-Norm 21B:1987 IMV-Norm 26A:1993	Anmerkung 2
	Buttermilch, fermentierte oder gesäuerte Milch (einschließlich Rahm) auch eingedickt oder aromatisiert, auch mit Zusatz von Zucker oder anderen Süßmitteln	0403	Fett Eiweiß Saccharose (normaler Gehalt) Saccharose (niedriger Gehalt) Wasser (saurer Buttermilchpulver) Wasser (süßes Buttermilchpulver) Trockenstoff (andere Erzeugnisse)		IMV 1D:1996, FIL 9C:1987, IMV 16C:1987, FIL 22B:1987, IMV 126A:1988 IMV Norm 20B:1993 IMV-Norm 35A:1992 Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden Anhang XXIV IMV-Norm 26A: 1993 Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden	Anmerkung 2
	Molke, auch eingedickt oder mit Zusatz von Zucker oder anderen Süßmitteln; Erzeugnisse, die aus natürlichen Milchbestandteilen bestehen	0404	Fett Eiweiß Saccharose (normaler Gehalt) Saccharose (niedriger Gehalt)		IMV 9C:1987, IMV 16C:1987, IMV 22B:1987 IMV-Norm 20B:1993 IMV-Norm 35A:1992 Von der zuständigen Behörde zugelassene Methoden	Anmerkung 2
		0404 90	Eiweiß Wasser Trockenstoff (Eingedickte Erzeugnisse)		IMV-Norm 20B:1993 IMV-Norm 26A:1993 IMV-Norm 15B:1991 IMV-Norm 21B:1987	
	Butter und andere Fettstoffe aus der Milch; Milchstreichfette	0405	Fett (wenn ≤ 85 %) Wasser		ANHANG XI ANHANG IX	
		Manteiga	FFTR NaCl		ANHANG X IMV-Norm 12B:1988	
		Butteroil	Fett (wenn > 99 %) Wasser (wenn Fett < 99 %)		IMV-Norm 24:1964 IMV-Norm 23A:1988	

Verordnung der Kommission	Erzeugnis	KN-Code	Parameter	Grenzwert	Referenzmethode	Anmerkung
	Käse und Quark/Topfen	0406	Fett Trockenmasse Trockenmasse (Ricotta) NaCl Laktose		IMV-Norm 5B:1986 IMV-Norm 4A:1982 IMV-Norm 58:1970 IMV-Norm 88A:1988 IMV-Norm 79B:1991	
Verordnung (EWG) Nr. 2658/87	Mischfuttermittel	2309	Laktose		ANHANG XVII	

Anmerkungen zur Liste der EU-Referenzmethoden

Anmerkung 1: Milchfettisolierung vgl. IMV-Norm 6B:1989 (Lichtschutz).

Anmerkung 2: Es wurde keine Referenzmethode festgelegt.

Anmerkung 3: Vorbereitung der Probe gemäß IMV-Norm 122C:1996 oder IMV-Norm 73A:1985.

Anmerkung 4: Bebrütung 48 Stunden bei einer Temperatur von 55 °C. Das Austrocknen des Nährmediums ist zu verhindern.

Anmerkung 5: % FFTR. = % Gesamttrockenmasse – % Fett

Anmerkung 6: Die Butter muss in die in Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 2771/1999 der Kommission genannte nationale Qualitätsklasse des Erzeugermitgliedstaats eingestuft sein.

Anmerkung 7: Richtlinie Nr. 4/84/EWG der Kommission.

Anmerkung 8: Verordnung (EG) Nr. 1758/94 der Kommission (ABl. L 183 vom 19.7.1994, S. 14).

Anmerkung 9: Richtlinie 78/633/EWG der Kommission.

ANHANG II

(Artikel 3)

ÜBERPRÜFUNG VON MIT ROUTINEVERFAHREN GEWONNENEN ERGEBNISSEN, DIE SICH DEN IN DEN VERORDNUNGEN ANGEgebenEN GRENZWERTEN FÜR DIE ZUSAMMENSETZUNG UND DIE QUALITÄT ANNÄHERN

Ist m_o ein in einer Verordnung angegebener Grenzwert für die Zusammensetzung und die Qualität, so lautet die Entscheidungsgrenze (L)

$$L = m_o$$

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

R_{Rout} : Vergleichsgrenze des Routineverfahrens

R_{Ref} : Vergleichsgrenze der Referenzmethode

Ist m_o eine Obergrenze und $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} > 1$, so wird die Entscheidungsgrenze wie folgt errechnet:

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

Ist m_o unter denselben Bedingungen eine Untergrenze, so wird die Entscheidungsgrenze wie folgt errechnet:

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

dabei ist CrD_{95} : kritische Differenz der Referenzmethode, siehe Anhang IV.

Ist m_o eine Obergrenze, so ist das mit einem Routineverfahren erzielte Endergebnis, das über der Entscheidungsgrenze liegt, durch ein mit der Referenzmethode erzieltes Endergebnis zu ersetzen. Dieses Endergebnis muss auf mindestens die gleiche Anzahl Analysen/Proben wie das Endergebnis des Routineverfahrens gestützt werden.

Ist m_o eine Untergrenze, so ist das gleiche Verfahren für Endergebnisse nach dem Routineverfahren anzuwenden, wenn dieses unter der Entscheidungsgrenze liegt.

Anmerkung

Das oben beschriebene Verfahren kann verwendet werden, wenn keine nachweisbaren Matrixeffekte vorliegen.

Matrixeffekte lassen sich wie folgt nachweisen: Für jede für die Kalibrierung verwendete Probe wird der Unterschied (w) zwischen den gemäß der Referenzmethode und den gemäß dem Routineverfahren erzielten Ergebnissen bestimmt.

Die Standardabweichung wird wie folgt berechnet:

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

m : Zahl der für die Kalibrierung verwendeten Proben

Diese wird mit dem arithmetischen Mittel der Wiederholstandardabweichungen von Referenzmethode und Routineverfahren verglichen.

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

Ein Matrixeffekt kann nicht ausgeschlossen werden, wenn

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

wobei

$f = m$ (f : Anzahl Freiheitsgrade)

$\alpha =$ Irrtumswahrscheinlichkeit; $\alpha = 0,05$.

In diesem Falle sind weitere Nachforschungen notwendig, bevor eine Entscheidungsgrenze festgesetzt werden kann.

ANHANG III

(Artikel 4 und 5)

a) Verfahren für die Bestimmung der Übereinstimmung mit einer festgesetzten Vergleichsgrenze (chemische Analyse)

Die Übereinstimmung mit der Vergleichsgrenze wird durch Vergleich von Laborergebnissen mit den Ergebnissen eines erfahrenen Laboratoriums ⁽¹⁾ anhand einer identischen Probe überprüft. In beiden Laboratorien wird eine Doppelanalyse durchgeführt und werden die Ergebnisse nach folgender Formel bewertet:

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

Dabei sind:

CrD_{95} : kritische Differenz ($P = 0,95$)

\bar{y}_1 : arithmetisches Mittel von zwei in Laboratorium 1 erzielten Ergebnissen

\bar{y}_2 : arithmetisches Mittel von zwei in Laboratorium 2 erzielten Ergebnissen

R: Vergleichsgrenze: durch Interpolation zu bestimmen

r: Wiederholgrenze: falls sich die Präzision mit dem Konzentrationsniveau verändert.

Wird die kritische Differenz überschritten, so muss innerhalb der nächsten zwei Monate ein weiteres Experiment erfolgen. Wird bei diesem zweiten Experiment keine Übereinstimmung mit der Vergleichsgrenze erreicht, so treffen die zuständigen Stellen alle erforderlichen Maßnahmen.

b) Verfahren zur Bestimmung einer vorläufigen Vergleichsgrenze (chemische Analyse)

Eine vorläufige Vergleichsgrenze (R_{prov}) wird durch Verwendung folgender Gleichung erhalten:

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

Dabei sind:

\bar{y}_1 : arithmetisches Mittel von zwei in Laboratorium 1 erzielten Ergebnissen

\bar{y}_2 : arithmetisches Mittel von zwei in Laboratorium 2 erzielten Ergebnissen (siehe Anhang III Teil a)

r: Wiederholgrenze oder vorläufige Wiederholgrenze.

Anmerkungen:

1. R_{prov} kann für die Errechnung der kritischen Differenz verwendet werden (siehe Anhang IV).
2. R_{prov} wird auf $2r$ festgesetzt, falls der errechnete Wert für R_{prov} unter $2r$ liegt.
3. Ist der errechnete Wert größer als $3r$ oder der doppelte anhand der Horwitz-gleichung (*) berechnete R-Wert, dann ist R_{prov} unannehmbar hoch und kann nicht für die Berechnung der kritischen Differenz verwendet werden.
4. R_{prov} ist mindestens einmal jährlich anhand der in zwei Laboratorien erzielten Ergebnisse zu bestimmen (siehe Anhang IV).
5. Der Durchschnittswert von R_{prov} ist für die Berechnung der kritischen Differenzen zu verwenden. Die in den Nummern 2 und 3 aufgeführten Regeln gelten für den Durchschnittswert von R_{prov} .

(*) Horwitz-Gleichung:

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

Dabei sind:

RSD_R : relative Vergleichsstandardabweichung

c: Konzentration ausgedrückt als Dezimalbruch (Beispiel: 10 g/100 g = 0,1).

Literatur:

Peeler, J.T., Horwitz, W. and Albert, R.

J. Ass. Off. Anal. Chem.
72 (5), 784-806 (1989).

⁽¹⁾ Das erfahrene Laboratorium sollte möglichst ein Laboratorium sein, das erfolgreich entweder in der Validierung des Verfahrens oder an einem Leistungstest mitgewirkt hat.

Die Vergleichsgrenze (R-Wert) wird aus dem errechneten RSD_R -Wert wie folgt berechnet:

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

(\bar{x} = arithmetisches Mittel der erzielten Ergebnisse)

Einige errechnete RSD_R -Werte (Beispiele)

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

Bei einer Analytenkonzentration von 1 g/100 g erhält man folgenden Wert:

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

ANHANG IV

(Artikel 4)

BEWERTUNG DER MIT VALIDIERTEN METHODEN ERZIELTEN ANALYSEERGEBNISSE

Zeigt das Analyseergebnis, dass eine Grenze überschritten worden ist, so wird das arithmetische Mittel von zwei oder mehr Ergebnissen errechnet. Dabei wird folgendes Verfahren angewandt:

1. In Fällen, in denen das Analyseergebnis aus einem einzigen Ergebnis besteht, muss eine zweite Analyse unter Wiederholbedingungen durchgeführt werden. Können die beiden Analysen nicht unter Wiederholbedingungen durchgeführt werden, so ist eine weitere Doppelanalyse unter Wiederholbedingungen durchzuführen und mit diesen Ergebnissen die Übereinstimmung mit der kritischen Differenz zu bewerten.
2. Der absolute Wert des Unterschieds zwischen dem arithmetischen Mittel von unter Wiederholbedingungen erzielten Ergebnissen und dem Grenzwert wird bestimmt. Ist der absolute Wert des Unterschieds größer als die kritische Differenz, so erfüllt die analysierte Probe nicht die Anforderungen.

Die kritische Differenz wird nach folgender Formel bestimmt:

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

Dabei sind:

\bar{y} : arithmetisches Mittel der erzielten Ergebnisse

m_0 : Grenzwert

n : Anzahl Analysen/Probe

Schwankt die Präzision mit dem Konzentrationsniveau, so kann es notwendig sein, r und R durch Interpolation zu bestimmen.

Normalerweise hat ein für eine Probe vorgelegtes Endergebnis zu zeigen, dass ein Grenzwert eingehalten worden ist.

Endergebnisse

- innerhalb des Bereichs m_0 und $m_0 + CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, falls der Grenzwert ein Höchstwert ist,
- innerhalb des Bereichs m_0 und $m_0 - CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, falls der Grenzwert ein Mindestwert ist,

dürften sich daher nur ausnahmsweise ergeben.

Endergebnisse innerhalb der erwähnten Bereiche sind nur annehmbar, wenn sie höchstens einmal je fünf analysierter Proben pro Partie auftreten. Werden weniger als fünf Proben pro Partie analysiert, so ist ein derartiges Ergebnis innerhalb des angegebenen Bereichs annehmbar. Die Regel, dass nur ein derartiges Ergebnis je fünf analysierter Proben innerhalb der angegebenen Bereiche erzielt wird, ist jedoch einzuhalten, falls Sendungen von einem Erzeuger wiederholt angeboten werden.

3. Wird das Endergebnis x unter Verwendung einer Formel wie $x = y_1 \pm y_2$ (Beispiel: Wasser + fettfreier Trockenstoffgehalt von Butter zur Berechnung des Fettgehalts) errechnet, wobei y_1 und y_2 die Endergebnisse jeweils einer Analysenmethode darstellen, so werden die Gesamtwiederhol- und -vergleichsgrenzen r_x und R_x der Endergebnisse x wie folgt berechnet:

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

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

Dabei sind r_1 und r_2 die Wiederholgrenzen und R_1 und R_2 die Vergleichsgrenzen von y_1 bzw. y_2 .

x wird mit dem Grenzwert m_0 nach den unter den Nummern 1 und 2 angegebenen Regeln verglichen. Die kritische Differenz wird mit folgender Formel bestimmt:

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

Dabei stellt x das arithmetische Mittel der erzielten Ergebnisse x_i dar.

4. Wird das Endergebnis berechnet unter Verwendung einer Formel wie

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

(Beispiel: Fettgehalt in Trockenstoff von Käse)

wobei y_1 und y_2 die Endergebnisse jeweils einer Analysemethode sind, so können die Gesamtwiederhol- und -vergleichsgrenzen r_x und R_x wie folgt berechnet werden:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{x1}^2 + r_{x2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{x1}^2 + R_{x2}^2}$$

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

μ_1 : Grenz- oder Zielwert für y_1 (Beispiel: Fett)

μ_2 : Grenz- oder Zielwert für y_2 (Beispiel: Trockenstoff)

$$r_{x1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0.15$$

$$r_{x2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

Dabei sind:

r_1 : Wiederholgrenze y_1

r_2 : Wiederholgrenze y_2

$$R_{x1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0.15$$

$$R_{x2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

Dabei sind:

R_1 : Vergleichsgrenze y_1

R_2 : Vergleichsgrenze y_2

Die Verfahren zur Berechnung von r_x und R_x sind nur anwendbar, wenn die relativen Wiederhol- und Vergleichsgrenzen r_{x1} ; r_{x2} ; R_{x1} ; R_{x2} kleiner als oder gleich 0,15 sind.

x wird mit dem Grenzwert μ_x anhand der unter den Nummern 1 und 2 angegebenen Regeln verglichen. Die kritische Differenz wird nach folgender Formel bestimmt:

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

Dabei ist \bar{x} das arithmetische Mittel der in chronologischer Reihenfolge erzielten Ergebnisse x (*).

(*) *Anmerkung*: Werden z. B. die Ergebnisse y_{11} , y_{12} , y_{21} und y_{22} erzielt, so ist das arithmetische Mittel von y_{11}/y_{21} und y_{12}/y_{22} zu errechnen.

ANHANG V
INTERNE KONTROLLE

(Artikel 5)

a) Verfahren zur internen Qualitätskontrolle (IQK) (chemische Analyse).

Definition des Kontrollmaterials

Ein für die Zwecke der IQK verwendetes Material wird dem gleichen oder einem Teil des gleichen Verfahrens unterworfen wie die zu untersuchenden Materialien.

Kontrollmaterial kann z. B. sein:

- zertifiziertes Referenzmaterial,
- hauseigenes Referenzmaterial,
- durch Leistungstest validiertes Material,
- mit dem (den) Analyten angereichertes Material.

Verfahren für die Einführung der IQK

Das Laboratorium erstellt die IQK gemäß dem im IUPAC-Dokument über harmonisierte Richtlinien für die interne Qualitätskontrolle in Analyzelaboratorien⁽¹⁾ beschriebenen Verfahren.

Die IQK wird durch Einbeziehung von Kontrollmaterialien in die Analysensequenz oder durch Analysenwiederholung an derselben Untersuchungsprobe unternommen. Kontrollmaterialien müssen in ihrer chemischen Zusammensetzung den Untersuchungsproben ähnlich sein und während der Beobachtungszeit angemessene Stabilität aufweisen. Es ist nachzuweisen, dass sie problemlos in gleich große Analyteilmengen aufgeteilt werden können und die Konzentration des Analyten für den Beobachtungsbereich geeignet ist.

In jede Analysenserie muss mindestens einmal Kontrollmaterial einbezogen werden, wobei der erhaltene Wert in einem Kontrolldiagramm einzutragen ist, um Langzeitfehler zu messen. Das Laboratorium muss ferner in regelmäßigen Abständen die Übereinstimmung mit den Wiederholgrenzen innerhalb der Analysenserie nachweisen. Dies lässt sich durch Doppelanalyse des Kontroll- und/oder Untersuchungsmaterials erreichen. Ergebnisse dieser Analysen sind mit allen veröffentlichten Wiederholgrenzen und den bestehenden Daten über die hauseigene Präzision zu vergleichen.

Sofern Kontrollmaterialien verwendet werden, sind die für die Analyse des Kontrollmaterials zwischen den Analysenserien erzielten Werte in einem Shewhart-Diagramm (ISO 8258 (1991)) zusammen mit den entsprechenden Kontrollgrenzwerten einzutragen. Die Eingriffsgrenzen sind bei

$$x \pm 3s_t$$

festzusetzen, wobei s_t die Gesamtstandardabweichung darstellt,

die Warngrenzen bei

$$x \pm 2s_t$$

Gesamtstandardabweichung:

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

Dabei sind:

- s_b : Standardabweichung zwischen Analysenserien
- s_w : Standardabweichung innerhalb der Analysenserie
- n : Anzahl Bestimmungen

In Fällen, wo keine Kontrollmaterialien verwendet werden (z. B. wegen fehlender Stabilität), ist mindestens ein Versuchsmaterial in jedem Analysenlauf doppelt zu analysieren.

Die absoluten Unterschiede aus Doppelanalysen innerhalb einer Analysenserie (vgl. Anhang III) sind aufzuzeichnen. Die Mittellinie ist $1,128 s_w$, die Untergrenze ist 0, die Obergrenze (Eingriffsgrenze) ist $3,686 s_w$, dabei ist s_w die Standardabweichung innerhalb der Analysenserie.

Das Kontrollverfahren hat Materialien mit niedrigem und hohem Niveau einzubeziehen, wenn der Konzentrationsbereich breit ist.

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

Decken die Versuchsmaterialien einen weiten Bereich von Analytenkonzentrationen ab, so muss das Laboratorium das Verhältnis zwischen Präzision und Konzentrationsniveau herstellen. Ist die Präzision proportional zum Niveau, so muss die nachfolgende Kontrolle auf die relative Präzision (d. h. absoluter Unterschied als Prozentsatz des Mittelwerts) gestützt werden.

Ein Analysesystem ist als nicht mehr verlässlich anzusehen, falls einer der folgenden Umstände auftritt:

- A. Der derzeitige Ergebniswert liegt außerhalb der Eingriffsgrenzen,
- B. der derzeitige und der frühere Wert liegen außerhalb der Warngrenzen, aber innerhalb der Eingriffsgrenzen,
- C. bei Verwendung von Kontrollmaterialien liegen neun aufeinanderfolgende Werte auf der gleichen Seite der Mittellinie.

Das Laboratorium muss wie folgt reagieren:

- A. Einstellung der Analyse und Durchführung von Fehlersuche und Abhilfemaßnahmen,
- B. Verwerfen der Ergebnisse der Analysenreihe und neue Analyse der Untersuchungsmaterialien.

b) Verfahren für die Auswahl hauseigenen Kontrollmaterials und für die Bestimmung „hauseigener“ Präzisionsgrenzen (chemische Analyse)

Daten über die Präzision innerhalb des Laboratoriums lassen sich durch Wiederholungsanalysen der Kontrollmaterialien und/oder durch Wiederholungsanalysen der Untersuchungsproben erzielen.

Nachstehendes Vorgehen dient als Richtlinie für Laboratorien bei der Aufstellung von Präzisionsmaßstäben für Abweichungen innerhalb der Analysenserie und zwischen den Analysenserien für den anschließenden Aufbau von Kontrolldiagrammen. Laboratorien können auch andere Verfahren verwenden, sofern sie überzeugend nachweisen, dass zuverlässige Präzisionsdaten erzielt werden.

1. Auswahl der Kontrollmaterialien

Wenn ein Laboratorium Kontrollmaterial verwenden möchte, sind zunächst Daten zur Festsetzung der Grenzwerte zu sammeln. Möglichst sollten Zertifizierte Referenzmaterialien (CRM) verwendet werden. Etwaige künftige Kontrollmaterialien sind unter Wiederholbedingungen innerhalb einer Analysenserie und einschließlich geeigneter CRM und Randomisation zu analysieren. Wo ein solches Vorgehen nicht möglich ist, sollten die Laboratorien versuchen, sich an Leistungstests zu beteiligen und gemeinsame Mittelwerte (festgesetzte Werte) aufzustellen, die als vereinbarter wahrer Mittelwert, der einen Unsicherheitsfaktor beinhaltet, betrachtet werden können. Weitere Verfahren umfassen die Zuerkennung eines wahren Wertes durch Formelberechnung oder Verwendung von mit dem Analyten versetzten Kontrollmaterialien.

Handelt es sich um analyseerfahrene Laboratorien, die bereits eine statistische Kontrolle eingeführt haben, so müssen zusätzlich alle neuen Kontrollmaterialien (z. B. die wegen auslaufender Bestände erforderlichen neuen Materialien) unter Bezugnahme auf Analysen gewonnen werden, die unter Verwendung der bestehenden Materialien unter Kontrolle sind.

2. Festsetzung von Grenzwerten

Nach Auswahl des Kontrollmaterials hat das Laboratorium mit diesem Material Präzisionszahlen innerhalb von Analysenserien und zwischen Analysenserien festzusetzen.

Als Mindestvoraussetzung für die Einführung einer Präzision innerhalb der Analysenserie ist das Kontrollmaterial zwölfmal doppelt zu untersuchen. Die Doppelanalyse ist unter Wiederholbedingungen durchzuführen, d. h. gleiche Person, gleiche Reagenzien usw. Die Doppelanalyse des Kontrollmaterials ist innerhalb einer analytischen Serie zufällig anzuordnen. Jede Doppelanalyse ist über einen bestimmten Zeitraum jeweils an einem neuen Tag durchzuführen, um die Schwankungen von einer Analysenserie zur anderen wiederzugeben, und so die normalen Variationen einzubeziehen, z. B. Reagenzien, Instrumente, Neukalibrierung und gegebenenfalls verschiedene Analytiker.

Anmerkung: Es ist zu berücksichtigen, dass die Verwendung von nicht voll repräsentativen Daten über Schwankungen zwischen den Analysenserien durch Festsetzung zu enger Grenzwerte zu einer unnötigen Wiederholung von Analysen führt. Andererseits kann ein Laboratorium mit zu ungenauen Präzisionsdaten möglicherweise die vorgeschriebenen Grenzwerte der Referenzmethoden nicht erreichen und muss damit rechnen, im Vergleich mit anderen Laboratorien schlecht abzuschneiden, und Daten zu liefern, die für den vorgesehenen Zweck nicht geeignet sind.

2.1. Bestimmung der Präzision innerhalb von Analysenserien

2.1.1. Präzision innerhalb von Analysenserien bei verfügbarem Kontrollmaterial

Die Doppeldaten (mindestens 12 Doppelanalysen) sind zunächst einem Cochran-Test zu unterziehen. Dabei erfolgt ein Vergleich des Quadrates der maximalen Spannweite der Doppelanalysen mit der Summe der Spannweitenquadrate.

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

Dabei ist

$d_1 =$ Unterschied zwischen Doppelanalysen.

Der Wert von Cochrans Kriterium C wird mit den Wertetabellen (ISO 5725 (1994)) verglichen. Lässt sich ein Wert als Abweicher oder als Ausreißer einstufen, so ist nach einer Erklärung für das Ergebnis zu suchen, z. B. technischer Fehler, Rechenfehler, Fehler bei der Durchführung der Bestimmung, Analyse der falschen Probe. Ist die Erklärung des technischen Fehlers so auszulegen, dass der Ersatz des verdächtigen Ergebnisses unmöglich ist, so ist dieses als echter Ausreißer zu entfernen. Bleiben Abweicher oder Ausreißer ohne Erklärung, so sind die Abweicher als richtig zu übernehmen und die statistischen Ausreißer zu entfernen. Das Laboratorium muss sich um Ersatzwerte bemühen.

Sind die Ergebnisse nach Überzeugung des Laboratoriums frei von Ausreißern, so wird die Standardabweichung s_w innerhalb der Analysenserie wie folgt errechnet:

Für jedes Wertepaar x_{i1} , x_{i2} der p Doppelbestimmungen, werden die Summe der Duplikate

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

und die Differenz der Duplikate

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

berechnet und summiert zu:

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

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

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

Eine Schätzung der Standardabweichung innerhalb der Analysenserie ist

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

Die hauseigene Präzisionsgrenze ist $2,8 s_w$.

Wird eine Referenzmethode verwendet, so ist die hauseigene Präzisionsgrenze mit der veröffentlichten Wiederholgrenze zu vergleichen. Das Laboratorium hat die Anforderungen der Referenzmethode zu erfüllen; ist diese Bedingung nicht erfüllt, so muss nachgeforscht werden.

Die festgesetzten Grenzwerte sollten als vorläufig und überholungsfähig angesehen werden.

2.1.2. Präzision innerhalb einer Analysenserie, wenn kein Kontrollmaterial zur Verfügung steht

Das Laboratorium kann die Präzision innerhalb einer Analysenserie durch Doppelanalyse repräsentativer Versuchsproben (mindestens 12 Doppelanalysen) erstellen. In Fällen, in denen die Verwendung von Kontrollmaterialien nicht möglich ist, z. B. wegen Instabilität, sind mit diesem Verfahren Daten von Doppelanalysen zu beschaffen.

Anmerkung: Es wird davon ausgegangen, dass die Analysen einen relativ engen Bereich von Werten erfassen und daher ein einziger Wert auf alle Proben angewandt werden kann. In Fällen, in denen der Bereich der Ergebnisse breiter ist, z. B. über eine Größenordnung hinaus, und die Präzision vom Konzentrationsniveau abhängt, sollten die Laboratorien die Verwendung relativer Standardabweichungen untersuchen.

Die Daten sind dem Cochran-Test gemäß Nummer 2.1.1 zu unterziehen. Sind die Laboratorien überzeugt, dass die Daten frei von Ausreißern sind, so kann die Standardabweichung innerhalb der Analysenserie und die hauseigene Präzisionsgrenze gemäß Nummer 2.1. berechnet werden.

Die Standardabweichung s_w innerhalb der Analysenserie kann für den Aufbau von Kontrolldiagrammen (vgl. Anhang II) eingesetzt werden. Die festgesetzten Grenzen sind als vorläufig und überarbeitungsfähig anzusehen.

2.2. Bestimmung der Präzision zwischen Analysenserien

Der Mittelwert ($s_i/2$) für jedes Paar ist auszurechnen und diese sind einem Grubbs-Test (ISO 5725 (1994)) zu unterziehen. Die Kriterien für Ablehnung/Akzeptanz von Ausreißern oder Abschwefern sind diejenigen von Nummer 2.1.1. Für jedes abgelehnte Ergebnis muss sich das Laboratorium um Ersatzwerte bemühen. Ist das Laboratorium sicher, dass die Daten frei von Ausreißern sind, so wird die Standardabweichung s_b zwischen den Analysenserien wie folgt errechnet:

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

bzw. 0, falls der Ausdruck unter dem Quadratwurzelzeichen negativ ist.

Die Gesamtstandardabweichung s_i wird verwendet, um Kontrolldiagramme für den Durchschnitt von n Bestimmungen (vgl. Anhang II) zu erstellen. Die festgesetzten Grenzwerte sind als vorläufig und überarbeitungsfähig zu betrachten.

3. Überarbeitung der ursprünglichen Grenzwerte

Die Kontrollgrenzen, die wie oben beschrieben festgesetzt werden, sind als anfängliche Schätzungen zu betrachten.

Zur Überarbeitung von Grenzwerten, die auf der Grundlage annehmbarer Präzision innerhalb von Analysenserien festgesetzt worden sind (Nummer 2.1.2), sind weitere Daten von Doppelanalysen an Untersuchungsproben zu erfassen. Der Zeitraum vor der Überarbeitung hängt von der Häufigkeit der Analysen ab. Als Anhaltspunkt gilt, dass die Daten nach weiteren zehn Doppelbestimmungen überarbeitet werden sollten. Alle Daten sind dann dem Cochran-Test zu unterziehen und die Grenzwerte aufgrund der neuen Standardabweichung neu festzusetzen. Spätere Entscheidungen über die Gültigkeit der Kontrollgrenzen sind aufgrund weiterer Daten zu treffen.

Die Überarbeitung der ursprünglichen Daten über Präzision zwischen den Analysenserien hängt auch von der Häufigkeit der Analyse ab. Als Anhaltspunkt gilt, dass die ursprünglichen Annahmen über die Standardabweichung und den Mittelwert nach weiteren zehn Datenpunkten aus der Analyse des Kontrollmaterials — bei einer Häufigkeit von einer Analyse je Partie — überarbeitet werden müssen.

Alle Daten sind dem Grubbs-Test für Ausreißer zu unterziehen. Der Mittelwert und die Standardabweichung sind aufgrund der neuen Daten erneut zu berechnen.

Darüber hinaus sollte das Laboratorium auf dieser Stufe ein Cusum-Diagramm anwenden (BS 5700: (1984) und Änderung 5480 (1987)), um etwaige Probleme im Zusammenhang mit beispielsweise der Alterung der Reagenzien zu untersuchen. Jedes Einzelergebnis, das außerhalb der Grenzen der Cusum-„V-Maske“ liegt, ist zu untersuchen.

Die neuen Grenzwerte (Mittelwert und Standardabweichung) sind regelmäßiger Beobachtung nach der Cusum-Technik zu unterziehen. Jeder Hinweis, der die Gültigkeit des Kontrollmaterials in Frage stellt, ist sorgfältig zu untersuchen.

4. Angabe der Präzisionsdaten

Das Laboratorium übermittelt der zuständigen einzelstaatlichen Behörde nachstehende Informationen:

- verwendete Methode,
- Standardabweichung innerhalb der Analysenserie, s_w und hauseigene Präzisionsgrenze,
- Standardabweichung zwischen den Analysenserien s_b ,
- Gesamtstandardabweichung s_i ,
- Anzahl Analysen für die Gewinnung der Präzisionsdaten.

ANHANG VI

(Artikel 6)

BEWERTUNG DER PRÜFPERSONEN UND ZUVERLÄSSIGKEIT DER ERGEBNISSE SENSORISCHER ANALYSEN

Werden Verfahren mit Skala verwendet (IMV-Norm 99C/1997), so sind folgende Verfahren anwendbar:

a) *Bestimmung des „Wiederholindexes“*

Während eines Zeitraums von 12 Monaten werden mindestens 10 Proben als Blind-Doppelanalysen durch eine Prüfperson analysiert. Diese Analyse erfolgt gewöhnlich zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Ergebnisse für individuelle Produktmerkmale werden anhand folgender Formel bewertet:

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

Dabei sind:

- w_1 : Wiederholindex
 x_{i1} : Punktzahl für die erste Bewertung der Probe x_i
 x_{i2} : Punktzahl für die zweite Bewertung der Probe x_i
 n : Anzahl Proben

Die zu beurteilenden Proben müssen einen breiten Qualitätsbereich umfassen. w_1 darf 1,5 (5-Punkte-Skala) nicht überschreiten.

b) *Bestimmung des „Abweichungsindexes“*

Dieser Index ist zu verwenden, um nachzuprüfen, ob eine Prüfperson die gleiche Skala für Qualitätsbewertung wie eine erfahrene Prüfpersonengruppe verwendet. Die von der Prüfperson erzielten Ergebnisse werden mit dem Durchschnitt der von der Prüfpersonengruppe erzielten Ergebnisse verglichen.

Folgende Formel wird für die Bewertung der Ergebnisse verwendet:

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

Dabei sind:

- x_{i1} ; x_{i2} : siehe Buchstabe a)
 \bar{x}_{i1} ; \bar{x}_{i2} : Durchschnittspunktzahl der Prüfpersonengruppe für die erste bzw. zweite Bewertung von Probe x_i
 n : Anzahl Proben (mindestens 10 innerhalb von 12 Monaten).

Die zu bewertenden Proben müssen einen weiten Qualitätsbereich erfassen. D_1 darf 1,5 (5-Punkte-Skala) nicht überschreiten.

Die Mitgliedstaaten teilen alle Schwierigkeiten bei der Anwendung dieses Verfahrens mit.

c) *Vergleich der in verschiedenen Regionen eines Mitgliedstaats und in verschiedenen Mitgliedstaaten erzielten Ergebnisse*

Wenn durchführbar, wird mindestens einmal pro Jahr ein Versuch organisiert, um den Vergleich der Ergebnisse der Prüfpersonen verschiedener Regionen zu ermöglichen. Werden signifikante Unterschiede beobachtet, so müssen die erforderlichen Maßnahmen getroffen werden, um die Gründe zu ermitteln und zu vergleichbaren Ergebnissen zu gelangen.

Die Mitgliedstaaten können Versuche organisieren, die den Vergleich der Ergebnisse ihrer eigenen Prüfpersonen mit den Ergebnissen von Prüfpersonen der benachbarten Mitgliedstaaten ermöglichen. Signifikante Unterschiede müssen zu einer gründlichen Untersuchung mit dem Ziel führen, zu vergleichbaren Ergebnissen zu gelangen.

Die Mitgliedstaaten teilen die Ergebnisse dieser Vergleiche der Kommission mit.

ANHANG VII

(Artikel 6)

SENSORISCHE PRÜFUNG VON BUTTER**1. Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt ein Verfahren für die sensorische Prüfung von Butter, das einheitlich in allen Mitgliedstaaten angewandt werden soll.

2. Begriffe

Sensorische Prüfung (Sinnenprüfung): Beurteilung der Merkmale eines Erzeugnisses durch menschliche Sinne.

Prüfergruppe: Gruppe von ausgewählten Prüfern, bei deren Arbeit es nicht zu einem Gedankenaustausch oder einer gegenseitigen Beeinflussung kommen darf.

Bewertende Prüfung: Sensorische Prüfung durch eine Prüfergruppe anhand einer Punkteskala. Eine Terminologie zur Bezeichnung von Fehlern ist zu verwenden.

Benotende Prüfung: Qualitätseinstufung aufgrund der bewertenden Prüfung.

Prüfformulare: Formulare zur Aufzeichnung der Einzelmesswerte für jedes Merkmal und der Gesamtnote des Erzeugnisses. (Dieses Formular kann auch zur Aufzeichnung der chemischen Zusammensetzung verwendet werden.)

3. Prüfraum

3.1. Es ist dafür Sorge zu tragen, dass die Prüfer im Prüfraum nicht durch äußere Einflüsse gestört werden.

3.2. Der Prüfraum muss frei von Fremdgerüchen und einfach zu reinigen sein. Die Wände müssen hell sein.

3.3. Der Prüfraum und seine Beleuchtung müssen so beschaffen sein, dass die zu prüfenden Produktmerkmale nicht beeinflusst werden. Der Raum muss mit einer geeigneten Temperaturkontrolle ausgestattet sein.

4. Auswahl der Prüfer

Der Prüfer muss mit Buttererzeugnissen vertraut und zur sensorischen Prüfung geeignet sein. Seine Eignung ist von der zuständigen Behörde regelmäßig zu überprüfen (mindestens einmal jährlich).

5. Anforderungen an die Prüfergruppe

Die Gruppe soll sich aus einer ungeraden Zahl von Prüfern zusammensetzen und mindestens drei Prüfer umfassen. Dabei muss es sich mehrheitlich um Bedienstete der zuständigen Behörde oder um eigens dazu befugte Personen, die nicht für die Milchwirtschaft arbeiten, handeln.

Vor der Prüfung müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden, damit die Prüfer bestmögliche Leistungen erbringen können:

- Die Prüfer dürfen an keiner Krankheit leiden, die ihre Leistungen beeinträchtigen könnte. Sollte dieser Fall eintreten, so muss ein anderer Prüfer in die Gruppe aufgenommen werden.
- Die Prüfer müssen sich pünktlich zur Prüfung einfinden und dafür sorgen, dass sie genügend Zeit für ihre Prüfung vorgesehen haben.
- Die Prüfer sollten keine stark riechenden Erzeugnisse wie Parfüm, Rasierwasser, Deodorants usw. benutzen und keine stark gewürzten Speisen gegessen haben.
- Die Prüfer dürfen während der letzten halben Stunde vor der Prüfung weder rauchen noch essen und nur Wasser trinken.

6. Bewertung der Prüfmerkmale

6.1. Die sensorische Prüfung soll sich auf die drei folgenden Merkmale beziehen: Aussehen, Konsistenz und Flavour.

Aussehen umfasst folgende Kriterien: Farbe, mit bloßem Auge sichtbare Reinheit und Schimmelwachstum. Die Wasserdispersion wird gemäß dem IDF-Standard 112A/1989 geprüft.

Konsistenz umfasst folgende Kriterien: Festigkeit und Streichfähigkeit.

Zur Messung der Butterkonsistenz können physikalische Methoden angewandt werden. Die Kommission erwägt, diese Methoden künftig zu harmonisieren.

Flavour umfasst folgende Kriterien: Geschmack und Geruch.

Bei einer deutlichen Abweichung von der empfohlenen Temperatur ist eine zuverlässige Prüfung der Konsistenz und des *Flavours* nicht möglich. Die Temperatur ist von größter Bedeutung.

- 6.2. Jedes Merkmal ist separat zu beurteilen. Die Bewertung der Merkmale erfolgt gemäß Tabelle 1.
- 6.3. Vor dem Beginn der Prüfung sollten die Prüfer eine gemeinsame Beurteilung einer oder zweier Kontrollproben auf Aussehen, Konsistenz und *Flavour* bzw. Aroma durchführen, um Übereinstimmung hinsichtlich der Kriterien zu erzielen.
- 6.4. Für die Akzeptanz erforderliche Bewertung

	Höchstpunktzahl	Mindestpunktzahl
Aussehen	5	4
Konsistenz	5	4
<i>Flavour</i>	5	4

Wird die erforderliche Mindestpunktzahl nicht erreicht, so ist der Fehler zu beschreiben. Die von den einzelnen Prüfern vergebenen Punktzahlen sind in dem Prüfformular zu vermerken. Das Erzeugnis wird aufgrund des Erscheinungsbildes akzeptiert oder verworfen. Fälle, in denen zwischen den einzelnen bewertenden Prüfungen auf die jeweiligen Merkmale größere Unterschiede auftreten, als zwischen benachbarten Punkten, sollten nicht häufig eintreten (höchstens einmal auf 20 Proben). Anderenfalls ist die Eignung der Prüfergruppe vom Prüfungsleiter zu überprüfen.

7. Überwachung

Der Prüfungsleiter, bei dem es sich um einen offiziellen Bediensteten der zuständigen Behörde handeln muss und der auch Mitglied der Prüfergruppe sein kann, muss generell für das gesamte Verfahren verantwortlich sein. Er muss die für jedes Merkmal vergebenen und in dem Prüfformular vermerkte Bewertung erfassen und bescheinigen, ob das Erzeugnis akzeptiert oder zurückgewiesen wurde.

8. Probenahme und Vorbereitung der Probe

- 8.1. — Es empfiehlt sich, die zu prüfenden Proben zu codieren, damit keine störenden Rückschlüsse auf deren Identität gezogen werden kann.
— Diese Codierung sollte vor der Prüfung vom Prüfungsleiter in Abwesenheit der anderen Prüfer vorgenommen werden.
- 8.2. Wird die sensorische Bewertung in einem Kühlhaus vorgenommen, so wird die Probe mit Hilfe eines Butterbohrers entnommen. Findet die sensorische Bewertung an einem anderen Ort statt, so sollte mindestens eine 500-g-Probe entnommen werden.
- 8.3. Während der Prüfung sollte die Butter eine Temperatur von 10 bis 12 °C aufweisen. Größere Abweichungen sind unter allen Umständen zu vermeiden.

9. Bezeichnungen

Vgl. beiliegende Tabelle 2.

Tabelle 1 — Butter-Bewertung

Aussehen			Konsistenz			Flavour		
Punkte	Nr. (1)	Bemerkungen	Punkte (Qualitätsklasse)	Nr. (1)	Bemerkungen	Punkte (Qualitätsklasse)	Nr. (1)	Bemerkungen
5		<i>Sehr gut</i> idealtypisch obere Qualität (uniforme, seco)	5		<i>sehr gut</i> idealtypisch obere Qualität (gut streichfähig)	5		<i>sehr gut</i> idealtypisch obere Qualität (absolut rein, feinstes Aroma)
4		<i>gut</i> (2) ohne wahrnehmbare Fehler	4	17 18	<i>gut</i> (2) hart weich	4		<i>gut</i> (2) ohne wahrnehmbare Fehler
3	1 2 3 4 5 6 7 8	<i>genügend (geringe Fehler)</i> wasserlässig zweifärbig (bunt) streifig geflammt, marmoriert fleckig ausgeölt überfärbt locker (nicht kompakt)	3	14 15 16 17 18	<i>genügend (geringe Fehler)</i> kurz, spröde, krümelig salbig, schmierig, teigig klebrig hart weich	3	21 22 25 27 33 34 35	<i>genügend (geringe Fehler)</i> unrein Fremdgeschmack sauer (essigsauer) Kochgeschmack, Anbrennengeschmack Futtergeschmack herb, bitter zu stark gesalzen
2	1 3 4 5 6 10 11 12	<i>ungenügend (wahrnehmbare Fehler)</i> wasserlässig streifig geflammt, marmoriert fleckig ausgeölt Fremdbestandteile Schimmel nicht aufgelöstes Salz	2	14 15 16 17 18	<i>ungenügend (wahrnehmbare Fehler)</i> kurz, spröde, krümelig salbig, schmierig, teigig klebrig hart weich	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	<i>ungenügend (wahrnehmbare Fehler)</i> unrein Fremdgeschmack Altgeschmack sauer (essigsauer) Oxydationsgeschmack, Metallgeschmack, schmirgelig Futtergeschmack herb, bitter zu stark gesalzen dumpf, muffig, faulig Chemikaliengeschmack
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	<i>schlecht (deutlich wahrnehmbare Fehler)</i> wasserlässig streifig geflammt, marmoriert fleckig ausgeölt überfärbt locker (nicht kompakt) Fremdbestandteile Schimmel (Stockflecken) nicht aufgelöstes Salz	1	14 15 16 17 18	<i>schlecht (deutlich wahrnehmbare Fehler)</i> kurz, spröde, krümelig salbig, schmierig, teigig klebrig hart weich	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	<i>schlecht (deutlich wahrnehmbare Fehler)</i> Fremdgeschmack käsig, käsigsauer sauer (essigsauer) heftig Schimmelgeschmack ranzig ölig, tranig, fischig talgig Oxydationsgeschmack, Metallgeschmack, schmirgelig herb, bitter dumpf, muffig, faulig malzig Chemikaliengeschmack

(1) Tabelle 2.

(2) Bei den unter „gut“ aufgeführten Fehlern handelt es sich um nur geringfügige Abweichungen vom Idealtyp.

Tabelle 2: Bezeichnung der Butter-Fehler*I. Aussehen*

1. Wasserlässig
2. Zweifarbig (bunt)
3. Streifig
4. Geflammt, marmoriert
5. Fleckig (Farbpunkte, Flecken von geschmolzener Butter)
6. Ölausscheidung (ausgeölt)
7. Überfärbt
8. Locker (nicht kompakt) (mit Löchern und Spalten)
9. Körnig
10. Fremdbestandteile, Schmutzpartikel
11. Schimmel (Stockflecken)
12. nicht aufgelöstes Salz

II. Konsistenz

14. Kurz, spröde, krümelig, bröckelig
15. Salbig, schmierig, teigig
16. Klebrig
17. Hart
18. Weich

III. Geruch und Geschmack

20. Aromalos, fade, leer
21. Unrein ⁽¹⁾
22. Beigeschmack, Fremdgeschmack, Nachgeschmack
23. Altgeschmack
24. Käsig, Käsig-sauer
25. Sauer (Essigsauer)
26. Heftig
27. a) Kochgeschmack
b) Anbrennengeschmack (brandig)
28. Schimmelgeschmack
29. Ranzig
30. Ölig, tranig, fischig
31. Talgig
32. a) Oxydationsgeschmack
b) Metallgeschmack, schmirgelig
33. Futtergeschmack
34. Herb, bitter
35. Zu stark gesalzen
36. Dumpf, muffig, faulig
37. Malzig (Malzgeschmack)
38. Chemikaliengeschmack

⁽¹⁾ Diese Fehlerbezeichnung soll möglichst wenig verwendet werden und nur dann, wenn der Geschmacksfehler nicht genauer umschrieben werden kann.

ANHANG VIII

(Artikel 7)

VERFAHREN ANLÄSSLICH STRITTIGER ANALYSEERGEBNISSE (CHEMISCHE ANALYSE)

1. Innerhalb von sieben Arbeitstagen nach Mitteilung der Ergebnisse der ersten Analyse wird auf Antrag des Marktteilnehmers eine weitere Analyse durchgeführt, sofern versiegelte Duplikatproben des Erzeugnisses vorliegen und bei den zuständigen Stellen unter angemessenen Bedingungen gelagert worden sind.
2. Die zuständige Stelle übersendet diese Proben auf Antrag und Kosten des Marktteilnehmers an ein zweites Laboratorium. Dieses muss zur Durchführung amtlicher Analysen ermächtigt sein und nachgewiesene Befähigung für solche Analysen besitzen. Diese Befähigung muss durch erfolgreiche Beteiligung an Gemeinschaftsversuchen, Leistungstests oder Vergleichen zwischen Laboratorien bewiesen sein. Das zweite Laboratorium muss die Referenzmethode anwenden. Die von den beiden Laboratorien erzielten Ergebnisse sind wie folgt zu bewerten:

a) *Beide Laboratorien erfüllen die Wiederholanforderung und die Vergleichsanforderung*

Das arithmetische Mittel der Versuchsergebnisse beider Laboratorien wird im Endergebnis verwendet. Das Endergebnis wird unter Berücksichtigung der kritischen Differenz anhand folgender Formel bewertet:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

Dabei sind:

\bar{y} : arithmetisches Mittel aller von beiden Laboratorien erzielten Ergebnisse

m_0 : Grenzwert

R: Vergleichsgrenze

r: Wiederholgrenze

n_1 : Zahl der in Laboratorium 1 erzielten Ergebnisse

n_2 : Zahl der in Laboratorium 2 erzielten Ergebnisse.

Anmerkung: Wird das Endergebnis unter Anwendung der folgenden Formel berechnet:

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

(vgl. Anhang IV Nummer 3 bzw. 4), so sind R^2 und r^2 in der Formel durch R_x^2 und r_x^2 zu ersetzen.

b) *Beide Laboratorien erfüllen die Wiederholanforderung, aber nicht die Vergleichsanforderung*

Die Analysepartie wird letztendlich zurückgewiesen, falls die Ergebnisse beider Laboratorien zu dieser Schlussfolgerung führen. Im gegenteiligen Falle wird die Partie angenommen.

c) *Nur ein Laboratorium erfüllt die Wiederholanforderung*

Das Endergebnis des Laboratoriums, das die Wiederholanforderung erfüllt, wird bei der Entscheidung über die Annehmbarkeit der Partie berücksichtigt.

d) *Keines der Laboratorien erfüllt die Wiederholanforderung, aber die Vergleichsanforderung wird eingehalten*

Buchstabe a) findet Anwendung.

e) *Beide Laboratorien erfüllen weder die Wiederholanforderung noch die Vergleichsanforderung*

Die Partie wird angenommen, falls die von einem Laboratorium erzielten Ergebnisse zu dieser Schlussfolgerung führen.

f) *Die Ergebnisse wurden mit Hilfe nicht validierter Verfahren erreicht*

Die Partie wird angenommen, falls die von einem Laboratorium erreichten Ergebnisse zu dieser Schlussfolgerung führen.

3. Die Ergebnisse der zweiten Analyse werden dem Wirtschaftsteilnehmer von der zuständigen Behörde so rasch wie möglich mitgeteilt. Die Kosten der zweiten Analyse werden vom Wirtschaftsbeteiligten getragen, sofern die Partie zurückgewiesen wird.
4. Erbringt der Wirtschaftsbeteiligte den Nachweis, dass die Probenahme nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde, so muss die Probenahme, falls möglich, innerhalb von fünf Arbeitstagen wiederholt werden. Ist keine neue Probenahme möglich, so wird die Partie angenommen.

ANHANG IX

(Artikel 8)

BESTIMMUNG DES WASSERGEHALTS VON BUTTER**1. Anwendungsbereich**

Diese Referenzmethode ist anwendbar für die Bestimmung des Wassergehalts von Butter.

2. Mitgeltende Normen

IDF-Standard 50C:1995 — Milch und Milcherzeugnisse — Verfahren der Probenahme.

3. Begriff

Unter dem Wassergehalt von Butter wird der Verlust an Masse nach dem Erhitzungsvorgang gemäß dem genannten Standard verstanden. Er wird in g/100 g angegeben.

4. Kurzbeschreibung

Das in der Probe enthaltene Wasser wird im Trockenofen durch Erhitzen auf 102 °C in Anwesenheit von Bimssteingranulat zum Verdampfen gebracht.

5. Geräte und Hilfsmittel

Die üblichen Laborgeräte, insbesondere:

- 5.1. Analysenwaage, Meßgenauigkeit 1 mg.
- 5.2. Exsikkator mit wirksamem Trockenmittel (z. B. frischgetrocknetes Silicagel mit Feuchtigkeitsindikator).
- 5.3. Trockenofen mit Lüfter und Thermostatsteuerung, mit einer Betriebstemperatur von 102 °C ± 2 °C im gesamten Arbeitsraum.
- 5.4. Schalen aus Glas, Porzellan oder rostfreiem Metall, Höhe ca. 20 mm, Durchmesser 60-80 mm.
- 5.5. Bimssteingranulat, gewaschen, Korngröße 0,8-10 mm.

6. Probenahme

Vgl. IDF 50 C:1995

7. Durchführung**7.1. Vorbereitung der Probe**

Die Probe wird in dem zur Hälfte bis zu zwei Dritteln gefüllten, geschlossenen Glasgefäß oder einem entsprechenden Kunststoffgefäß auf eine Temperatur erwärmt, bei der sie so geschmeidig ist, dass sie gründlich (von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät) homogen durchmischt werden kann. Im allgemeinen sollte die Rührtemperatur jedoch 35 °C nicht übersteigen. Danach wird die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Abkühlung wird das Gefäß sobald wie möglich geöffnet und die Probe vor dem Wägen kurz (höchstens 10 Sekunden) mit einem geeigneten Hilfsmittel (z. B. Löffel oder Spatel) gerührt.

7.2. Bestimmung des Wassergehalts

- 7.2.1. Es werden ca. 10 g Bimssteingranulat in die Schale gegeben (5.4).
- 7.2.2. Die mit dem Bimssteingranulat beschickte Schale wird im Trockenofen (5.3) bei 102 °C ± 2 °C mindestens eine 1 Stunde lang getrocknet.
Hinweis: Die Trockenzeit nach den Abschnitten 7.2.2, 7.2.5 und 7.2.7 beginnt, wenn die Ofentemperatur 102 °C ± 2 °C beträgt.
- 7.2.3. Anschließend wird die Schale im Exsikkator (5.2) auf die Wägeraumtemperatur abgekühlt und auf 1 mg genau gewogen.

- 7.2.4. Eine Teilmenge von 5 g der vorbereiteten Probe wird auf 1 mg genau in die Schale eingewogen.
- 7.2.5. Anschließend wird die Schale in den auf $102\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aufgeheizten Ofen gegeben und mindestens 3 Stunden stehengelassen.
- 7.2.6. Danach wird die Schale im Exsikkator auf die Wägeraumtemperatur abgekühlt und auf 1 mg genau gewogen.
- 7.2.7. Das Trocknen (1 Stunde), Abkühlen und Wägen nach Abschnitt 7.2.6 wird solange wiederholt, bis die Masse konstant bleibt (d. h. die Massendifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wägungen nicht größer ist als 1 mg).

Nimmt die Masse zu, so ist bei der Berechnung der niedrigste Massenwert zugrunde zu legen.

8. Auswertung

8.1. Berechnung

Der Wassergehalt W der Probe in g/100 g wird nach folgender Gleichung berechnet:

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

Hierbei bedeuten

m_0 = Masse der mit dem Bimssteingranulat beschickten Schale in g (7.2.3)

m_1 = Masse der Probenteilmenge und der mit dem Bimssteingranulat beschickten Schale vor dem Trocknen in g (7.2.4).

m_2 = Masse der Probenteilmenge und der mit dem Bimssteingranulat beschickten Schale nach dem Trocknen in g (7.2.7).

Das Ergebnis wird auf die erste Stelle nach dem Komma genau angegeben.

8.2. Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die von demselben Untersucher unter den gleichen Bedingungen und mit identischem Untersuchungsmaterial durchgeführt wurden, den Wert $r = 0,2\%$ nicht überschreitet.

8.3. Vergleichbarkeit

Die Vergleichbarkeit gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die mit identischem Untersuchungsmaterial von verschiedenen Untersuchern in verschiedenen Labors durchgeführt wurden, den Wert $R = 0,3\%$ nicht überschreitet.

9. Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht sind die angewandte Methode und die erzielten Ergebnisse anzugeben. Des Weiteren sind die nach diesem internationalen Standard nicht festgelegten oder fakultativen Einzelheiten sowie alle Einzelheiten zu Zwischenfällen aufzuführen, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Der Untersuchungsbericht hat alle Angaben zu enthalten, die für die vollständige Identifizierung der Probe erforderlich sind.

ANHANG X

(Artikel 8)

BESTIMMUNG DES GEHALTS AN FETTFREIER TROCKENMASSE VON BUTTER

1. Anwendungsbereich

Diese Norm beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung des Gehalts an fettfreier Trockenmasse von Butter.

2. Mitgeltende Normen

IDF-Standard 50 C: 1995 — Milch und Milcherzeugnisse — Verfahren der Probenahme.

3. Begriff

Gehalt an fettfreier Trockenmasse von Butter. Der nach dem festgelegten Verfahren bestimmte Massegehalt. Angabe in g/100 g.

4. Kurzbeschreibung

Aus einer Butterprobe bekannter Masse wird das Wasser verdampft, das Fett mit Petrolether ausgezogen und der Rückstand gewogen.

5. Chemikalien

Petrolether, Siedebereich zwischen 30 °C und 60 °C. Das Reagens darf nach dem Verdampfen von 100 ml höchstens 1 mg Rückstand hinterlassen.

6. Geräte und Hilfsmittel

- 6.1. Analysenwaage, Messgenauigkeit 1 mg.
- 6.2. Exsikkator mit wirksamem Trockenmittel (z. B. frischgetrocknetes Silicagel mit Feuchtigkeitsindikator).
- 6.3. Trockenofen mit Lüfter und Thermostatregelung sowie einer Betriebstemperatur von 102 °C ± 2 °C im gesamten Arbeitsraum.
- 6.4. Schalen aus Glas, Porzellan oder rostfreiem Metall, Ausgusshöhe ca. 20 mm, Durchmesser 60-80 mm, mit gläsernem Rührstab.
- 6.5. Filtertiegel aus Sinterglas, Wabendurchmesser 16-40 µm, mit Absaugflasche.

7. Probenahme

Vgl. IDF-Standard 50 C: 1995.

8. Durchführung**8.1. Vorbereitung der Probe**

Die Probe wird in dem zur Hälfte bis zu zwei Dritteln gefüllten, geschlossenen Glasgefäß oder einem entsprechenden Kunststoffgefäß auf eine Temperatur erwärmt, bei der sie so geschmeidig ist, dass sie gründlich (von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät) homogen durchmischt werden kann. Im allgemeinen sollte die Rührtemperatur jedoch 35 °C nicht übersteigen. Danach wird die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Abkühlung wird das Gefäß sobald wie möglich geöffnet und die Probe vor dem Wägen kurz (höchstens 10 Sekunden) mit einem geeigneten Hilfsmittel (z. B. Löffel oder Spatel) gerührt.

8.2. Bestimmung

- 8.2.1. Die Schale, der Rührstab (6.4) und das Sieb (6.5) werden eine Stunde lang im Ofen (6.3) getrocknet. Danach werden die Hilfsmittel im Exsikkator abgekühlt und anschließend zusammen (d. h. Schale, Rührstab und Sieb) (m_0) auf 1 mg genau gewogen.

Hinweis: — In der Regel sind 45 Minuten für die Abkühlung ausreichend.

— Wird mehr als eine Teilprobenmenge untersucht, so müssen für jede Teilprobenmenge einer Ofencharge unbedingt dieselbe Schale, derselbe Rührstab und derselbe Filtertiegel verwendet werden.

- 8.2.2. Der Filtertiegel wird entfernt und das Gewicht der Schale und des Rührstabs auf 1 mg (m_1) genau bestimmt.

- 8.2.3. Danach wird in die Schale eine Teilmenge von etwa 5 g der vorbereiteten Probe (8.1) auf 1 mg genau eingewogen (m_2).

- 8.2.4. Die Schale (mit dem Rührstab und der Butter) wird über Nacht in den auf $102\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aufgeheizten Ofen gegeben.
- 8.2.5. Dann wird die Schale (8.2.3) auf Raumtemperatur abgekühlt.
- 8.2.6. Anschließend wird 15 ml warmer (ca 25 °C) Petrolether in die Schale gegeben und das in der Schale anhaftende Sediment unter Verwendung des Glasstabs soweit wie möglich abgelöst. Dann wird das Lösungsmittel in den Filtertiegel übergeführt und in die Absaugflasche filtriert.
- 8.2.7. Der Vorgang nach Punkt 8.2.6 wird weitere vier Male wiederholt. Wenn sich keine Fettsuren mehr auf der Oberfläche der Schale befinden, wird bei der vierten Spülung soviel Sediment wie möglich quantitativ in den Filtertiegel gegeben. Andernfalls wird der Vorgang nach Punkt 8.2.6 so oft wiederholt, bis alle Fettsuren entfernt sind.
- 8.2.8. Das in den Filtertiegel übergeführte Sediement wird mit 25 ml warmem Petrolether gespült.
- 8.2.9. Dann werden die Schale, der Glasstab und das Sieb zusammen 30 Minuten lang im Trockenofen bei $102\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ getrocknet.
- 8.2.10. Anschließend werden die Hilfsmittel im Exsikkator auf Raumtempertur abgekühlt und auf 1 mg genau gewogen.
- 8.2.11. Die Vorgänge 8.2.9 und 8.2.10 werden so lange wiederholt, bis die Masse der Schale, des Rührstabs und des Siebs zusammen konstant bleiben (Massenveränderung höchstens 1 mg) (m_3).

9. Auswertung

9.1. Berechnung der fettfreien Trockenmasse

Die fettfreie Trockenmasse in g/100 g wird nach folgender Gleichung berechnet:

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

Hierbei bedeuten:

m_0 = Masse der leeren Schale mit Glasstab und Filtertiegel (8.2.1) in g.

m_1 = Masse der leeren Schale mit Glasstab (8.2.2) in g.

m_2 = Masse der Probe und der Schale mit Glasstab (8.2.3) in g.

m_3 = Endmasse der Schale mit Glasstab und dem das Sediment enthaltenden Filtertiegel (8.2.11).

Das Ergebnis ist auf die erste Stelle nach dem Komma genau anzugeben.

9.2. Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die von demselben Untersucher unter den gleichen Bedingungen und mit identischem Untersuchungsmaterial durchgeführt wurden, den Wert $r = 0,1\%$ nicht überschreitet.

9.3. Vergleichbarkeit

Die Vergleichbarkeit gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die mit identischem Untersuchungsmaterial von verschiedenen Untersuchern in verschiedenen Labors durchgeführt wurden, den Wert $R = 0,2\%$ nicht überschreitet.

10. Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht sind die angewandte Methode und die erzielten Ergebnisse anzugeben. Des weiteren sind die nach diesem internationalen Standard nicht festgelegten oder fakultativen Einzelheiten sowie alle Einzelheiten zu Zwischenfällen aufzuführen, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Der Untersuchungsbericht hat alle Angaben zu enthalten, die für die vollständige Identifizierung der Probe erforderlich sind.

Hinweis

Wird gesalzene Butter analysiert, so wird das hinzugefügte Salz als fettfreie Trockenmasse bestimmt. Zur Feststellung der fettfreien Milchbestandteile ist der Salzgehalt von der fettfreien Trockenmasse abzuziehen. Bei der Bestimmung der fettfreien Trockenmasse sind folgende Zuverlässigkeitsbedingungen zu erfüllen:

Wiederholbarkeit: $r = 0,104\%$.

Vergleichbarkeit: $R = 0,206\%$.

Für die Bestimmung der fettfreien Trockenmasse gelten dieselben Zuverlässigkeitsbedingungen wie für die der Bestimmung der fettfreien Milchtrockenmasse.

ANHANG XI

(Artikel 8)

BESTIMMUNG DES FETTGEHALTS VON BUTTER

Der Fettgehalt ergibt sich mittelbar durch die Bestimmung des Gehalts an Wasser und an fettfreier Trockenmasse gemäß Anhang IX bzw. Anhang X. Der Fettgehalt in g/100 g wird wie folgt berechnet:

$$100 - (W + \text{ffTM})$$

Hierbei bedeuten:

W = Wassergehalt in g/100 g.

ffTM = fettfreie Trockenmasse in g/100 g.

Für die Bestimmung des Fettgehalts gelten folgende Zuverlässigkeitsbedingungen:

Wiederholbarkeit: $r = 0,22 \%$

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

ANHANG XII

(Artikel 9)

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 Butter, Butterfett oder Rahm.

2. Prinzip

Extraktion einer bekannten Probemenge mit Hilfe eines Isopropanol-Ethanol-Acetonitril-Gemisches (1:1:2). Abscheidung des Hauptteils des Fetts durch Kühlung bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 3.2. Einwegspritzen mit einem Fassungsvermögen von 2 ml;
- 3.3. Membranmikrofilter (Porengröße $0,45\text{ }\mu\text{m}$), 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 μl Injektion, automatisch oder manuell), einem UV-Detektor (306 nm, 0,01 AU gesamter Bereich), einem Aufzeichnungsgerät oder Integrator und einem Säulenthmostat bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 3.5. Analysensäule (250 mm \times 4,6 mm ID), gepackt mit LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) oder gleichwertigem Material;
- 3.6. Vorsäule (ca. 20 mm \times 3 mm ID), trocken gepackt mit Perisorb RP 18 (30 bis 40 μm) 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-methoxy-benzaldehyd)
 - 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, CLHP-Qualität
- 4.7. Eisessigsäure
- 4.8. Wasser, CLHP-Qualität

4.9. CLHP 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 einen 0,45-µm-Filter (3.3) 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 °C ist zu vermeiden. Wenn die Probe ausreichend pastös ist, durch Schütteln homogenisieren. Die Butter 15 s lang rühren und anschließend eine Probe nehmen. Etwa 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 vollständig 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 ± 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 stehen lassen. 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 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 (5.3) 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 oder Höhen).

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 sind

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).

Bei der Untersuchung von Rahm auf Vanillin wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration als mg Kennzeichnungsmittel/kg Milchfett ausgedrückt. Dazu wird C mit 100/f multipliziert. Bei f handelt es sich um den Fettgehalt von Rahm in Prozent (m/m),

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

0,96 = 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. Vergleichbarkeit (R)

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von zwei Bestimmungen, die von Analytikern 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 für 4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd beträgt 250 g je Tonne Butterfett oder Butter. Bei der Kennzeichnung von Rahm beträgt die Beimischungsquote 250 g je Tonne Milchfett.

8.2.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95 %-Vertrauensbereich (CrD₉₅-Wert)) verglichen wird:

- 221,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote),
- 159,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 221,0 mg/kg und 159,0 mg/kg erhält.

8.3. Das Kennzeichnungsmittel wird ausschließlich aus Vanilleschoten oder deren vollständigen Auszügen gewonnen.

8.3.1. Die Beimischungsquote für 4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd beträgt 100 g je Tonne Butterfett oder Butter. Bei der Kennzeichnung von Rahm beträgt die Beimischungsquote 100 g je Tonne Milchfett.

8.3.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95 %-Vertrauensbereich (CrD₉₅-Wert)) verglichen wird:

- 79,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote),
- 54,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 79,0 mg/kg und 54,0 mg/kg erhält.

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 Butteroil 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 sowie nach Änderungen oder Reparaturen der HPLC-Geräte durch Verwendung geeigneter Verdünnungen der Standardlösung (4.5.2) geprüft werden.
-

ANHANG XIII

(Artikel 9)

BESTIMMUNG VON BETA-APO-8'-CAROTINSÄURE-ETHYLESTER IN BUTTERFETT UND BUTTER DURCH SPEKTROMETRIE**1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode beschreibt ein Verfahren für die quantitative Bestimmung von Beta-Apo-8'-Carotinsäure-Ethylester (Apo-Carotin-Ester) in Butterfett und Butter. Apo-Carotin-Ester stellt die Summe aller Stoffe in einem Extrakt von Proben dar, die unter den in der Methode dargestellten Bedingungen gewonnen werden und Licht bei 440 nm absorbieren.

2. Prinzip

Das Butterfett wird in Petroleumbenzin gelöst und die Absorption bei 440 nm gemessen. Der Apo-Carotin-Ester-Gehalt wird im Vergleich zu einem externen Standard bestimmt.

3. Geräte

- 3.1. Maßpipetten mit Fassungsvermögen von 0,25, 0,50, 0,75 und 1,0 ml.
- 3.2. Spektrophotometer — geeignet für die Verwendung bei 440 nm (und 447-449 nm), ausgestattet mit Küvetten mit optischer Weglänge von 1 cm.
- 3.3. Messkolben, 20 ml und 100 ml.
- 3.4. Analysewaage mit einer Empfindlichkeit von 0,1 mg.

4. Reagenzien

Alle Reagenzien haben anerkannte Analysenqualität aufzuweisen.

4.1. Apo-Carotin-Ester-Suspension (ungefähr 20 %).

4.1.1. Der Gehalt der Suspension ist wie folgt zu bestimmen:

Rund 400 mg genau in einen 100-ml-Messkolben einwiegen und in 20 ml Chloroform (4.4) auflösen, bis zur Marke mit Cyclohexan (4.5) auffüllen. 5 ml dieser Lösung auf 100 ml mit Cyclohexan auffüllen (Lösung A). 5 ml der Lösung A auf 100 ml mit Cyclohexan auffüllen. Die Absorption bei 447-449 nm messen (Das Maximum im Vergleich zu Cyclohexan unter Verwendung von 1-cm-Küvetten als Blindprobe messen).

$$\text{Apo-Carotin-Ester-Gehalt (\%)} = \frac{A_{\max} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{\max} = Höchstabsorption der Eichlösung

A = Gewicht der Probe (g)

2 550 = Bezugswert A (1 %, 1 cm)

Die Reinheit der Suspension beträgt P (%).

Anmerkung: Apo-Carotin-Ester-Suspension ist empfindlich gegenüber Luft, Hitze und Licht. In der ungeöffneten Originalverpackung (unter Stickstoffsiegel) und an einem kühlen Platz kann sie rund zwölf Monate aufbewahrt werden. Nach Öffnung ist der Inhalt innerhalb kurzer Zeit zu verwenden.

4.1.2. Apo-Carotin-Ester-Standardlösung, ungefähr 0,2 mg/ml

Auf 0,1 mg genau 0,100 g Apo-Carotin-Ester-Suspension (4.1.1) W(g) abwiegen, in Petroleumbenzin (4.2) auflösen, quantitativ in einen 100-ml-Messkolben geben und bis zur Marke mit Petroleumbenzin auffüllen.

Diese Lösung enthält (W.P) 10 mg/ml Apo-Carotin-Ester.

Anmerkung: Die Lösung muss kühl und dunkel aufbewahrt werden. Unverwendete Lösung nach einem Monat beseitigen.

4.2. Petroleumbenzin (40-60 °C).

4.3. Natriumsulfat, wasserfrei, Granulat, zuvor bei 102 °C zwei Stunden getrocknet.

4.4. Chloroform

4.5. Cyclohexan

5. Verfahren

5.1. Vorbereitung der Probe

5.1.1. Butterfett

Die Probe in einem Ofen bei rund 45 °C schmelzen.

5.1.2. Butter

Die Probe in einem Ofen bei rund 45 °C schmelzen und einen Teil durch einen Filter mit rund 10 g wasserfreiem Natriumsulfat (4.3) filtern; diese Vorgänge erfolgen unter Abschirmung von starkem natürlichem oder künstlichem Licht und bei ständiger Temperatur von 45 °C. Eine geeignete Menge Milchlaktose entnehmen.

5.2. Bestimmung

Auf 1 mg genau rund 1 g Butterfett oder Milchlaktose (5.1.2) (Mg) abwägen. Quantitativ in einen 20-ml V(ml)-Messkolben unter Verwendung von Petroleumbenzin (4.2) geben und bis zur Marke auffüllen, gründlich vermischen.

Eine kleine Menge dieses Gemisches in eine 1-cm-Küvette bringen und die Absorption bei 440 nm im Vergleich zur Blindprobe mit Petroleumbenzin messen. Die Konzentration des Apo-Carotin-Esters in der Lösung wird durch Vergleich mit der Eichkurve C ($\mu\text{g/ml}$) erhalten.

5.3. Eichkurve

0, 0,25, 0,5, 0,75 und 1,0 ml Apo-Carotin-ester-Standardlösung (4.1.2) in fünf 100-ml-Messkolben pipettieren. Das Volumen mit Petroleumbenzin (4.2) auffüllen und vermischen.

Die Konzentrationen der Lösungen liegen zwischen 0 bis 2 $\mu\text{g/ml}$ und werden im Vergleich mit der Konzentration der Standardlösung (4.1.2) WP(100) mg/ml genau berechnet. Die Absorption bei 440 nm im Vergleich zur Blindprobe mit Petroleumbenzin (4.2) messen.

Die Absorptionswerte auf der y-Achse und die jeweiligen Apo-Carotin-Ester-Konzentrationen auf der x-Achse eintragen.

6. Berechnung der Ergebnisse

6.1. Der Apo-Carotin-Estergehalt, ausgedrückt als mg/kg des Erzeugnisses wird durch folgende Formel wiedergegeben.

Butterfett (C.V)/M

Butter: 0,82 (C.V)M

Dabei sind:

C = Apo-Carotin-Estergehalt in $\mu\text{g/ml}$, von der Eichkurve (5.3) abzulesen

V = Volumen (ml) der Versuchslösung (5.2)

M = Masse (g) der Versuchsprobe (5.2)

0,82 = Berichtigungsfaktor für den Milchlaktosegehalt der Butter.

7. Genauigkeit der Methode

7.1. Wiederholbarkeit

7.1.1. Analyse der Butter

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier innerhalb kürzester Zeit durch denselben Analytiker unter Verwendung derselben Geräte an identischem Versuchsmaterial durchgeführten Bestimmungen darf 1,4 mg/kg nicht überschreiten.

7.1.2. Analyse des Butterfetts

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier innerhalb kürzester Zeit durch denselben Analytiker unter Verwendung derselben Geräte an identischem Versuchsmaterial durchgeführten Bestimmungen darf 1,6 mg/kg nicht überschreiten.

7.2. Vergleichbarkeit

7.2.1. Analyse der Butter

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier von Analytikern in unterschiedlichen Laboratorien unter Verwendung unterschiedlicher Geräte an identischem Versuchsmaterial durchgeführten Bestimmungen darf 4,7 mg/kg nicht überschreiten.

7.2.2. Analyse des Butterfetts

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier von Analytikern in unterschiedlichen Laboratorien unter Verwendung unterschiedlicher Geräte an identischem Versuchsmaterial durchgeführten Bestimmungen darf 5,3 mg/kg nicht überschreiten.

7.3. Quelle der Präzisionsdaten

Die Präzisionsdaten entstammen einem 1995 unter Beteiligung von elf Laboratorien und zwölf gekennzeichneten Proben (sechs Blindduplikate) für Butter und zwölf gekennzeichneten Proben (sechs Blindduplikate) für Butterfett durchgeführten Versuch.

8. Toleranzgrenzen

8.1. Zur Prüfung der richtigen Kennzeichnung des Erzeugnisses sind dem gekennzeichneten Erzeugnis drei Proben zu entnehmen.

8.2. Butter

8.2.1. Der Beimischungsanteil für Butter beträgt unter Berücksichtigung der Hintergrundabsorption 22 mg/kg.

8.2.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95%-Vertrauensbereich (CrD_{95} -Wert)) verglichen wird:

- 18,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote),
- 13,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 18,0 mg/kg und 13,0 mg/kg erhält.

8.3. Butterfett

8.3.1. Der Beimischungsanteil für Butterfett beträgt unter Berücksichtigung der Hintergrundabsorption 24 mg/kg.

8.3.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95%-Vertrauensbereich (CrD_{95} -Wert)) verglichen wird:

- 20,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote),
- 14,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 20,0 mg/kg und 14,0 mg/kg erhält.

ANHANG XIV

(Artikel 9)

BESTIMMUNG VON SITOSTERIN BZW. STIGMASTERIN IN BUTTERFETT ODER BUTTER DURCH KAPILLARSÄULEN-GASCHROMATOGRAPHIE**1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Sitosterin bzw. Stigmasterin in Butterfett und Butter. Sitosterin ist dabei die Summe von β -Sitosterin und 22-Dihydro- β -Sitosterin; die anderen Sitosterine sind als unbedeutend zu betrachten.

2. Prinzip

Das Butterfett bzw. die Butter wird mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseift. Die unverseifbaren Bestandteile werden mit Ether extrahiert.

Die Sterine werden zu Trimethylsilylthern derivatisiert und durch Kapillarsäulen-Gaschromatographie mit Betulin als internem Standard analysiert.

3. Geräte

- 3.1. 50-ml-Verseifungskolben mit Rückflusskühler und Schliffverbindungen
- 3.2. 500-ml-Scheidetrichter
- 3.3. 250-ml-Kolben
- 3.4. Druckausgleichstrichter (etwa 250 ml) zum Auffangen von überschüssigem Ether
- 3.5. Glassäule, 350 mm \times 20 mm, mit Sinterglasfritte
- 3.6. Wasserbad oder Heizhaube
- 3.7. Reaktionsgläser, 2 ml
- 3.8. Zur Verwendung mit einer Kapillarsäule geeigneter Gaschromatograph, ausgerüstet mit einem „Split-System“ und folgenden Bestandteilen:
 - 3.8.1. einem Säulenofen, der die gewünschte Temperatur mit einer Genauigkeit von ± 1 °C halten kann;
 - 3.8.2. einem Probeneinlasssystem mit verstellbarer Temperatur;
 - 3.8.3. einem Flammenionisationsdetektor und einem Signal-Verstärker;
 - 3.8.4. einem Aufzeichnungsgerät mit Integrator für den Signal-Verstärker (3.8.3).
- 3.9. Quarzglas (Fused Silica)-Kapillarsäule, vollständig beschichtet mit BP 1 oder einem vergleichbaren Material mit einer einheitlichen Stärke von 0,25 μ m. Die Säule muss die Trimethylsilyllderivate von Lanosterin und Sitosterin trennen können. Geeignet ist eine mit BP 1 beschichtete Säule von 12 m Länge und 0,2 mm Innendurchmesser.
- 3.10. 1- μ l-Gaschromatographie-Mikrospritze mit gehärteter Nadel.

4. Reagenzien

Alle Reagenzien müssen von anerkannter Analysenqualität sein. Es ist destilliertes Wasser oder Wasser von mindestens gleichem Reinheitsgrad zu verwenden.

- 4.1. Ethanol, Reinheitsgrad mindestens 95 %.
- 4.2. 60%ige Kaliumhydroxid-Lösung (600 g Kaliumhydroxid (mindestens 85 %) in Wasser lösen und bis zu einem Liter mit Wasser auffüllen).
- 4.3. Betulin, Reinheitsgrad mindestens 99 %.
 - 4.3.1. Interne Standardlösung: Betulin in Diethylether (4.4).
 - 4.3.1.1. Die zur Bestimmung von Sitosterin verwendete Betulinlösung muss eine Konzentration von 1,0 mg/ml aufweisen.
 - 4.3.1.2. Die zur Bestimmung von Stigmasterin verwendete Betulinlösung muss eine Konzentration von 0,4 mg/ml aufweisen.

- 4.4. Diethylether, analyserein (frei von Peroxiden oder Rückständen).
- 4.5. Natriumsulfat, wasserfrei, granular, zuvor 2 Stunden lang bei 102 °C getrocknet.
- 4.6. Silylierungsreagenz, z. B. TRI-SIL (erhältlich von Pierce Chemical Co., Kat.-Nr. 49001) oder vergleichbares Reagenz. (Achtung: TRI-SIL ist entflammbar, giftig, ätzend und ein potenzielles Kanzerogen. Das Laborpersonal muss mit den Sicherheitsdaten zu TRI-SIL vertraut sein und die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen treffen.)
- 4.7. Lanosterin.
- 4.8. Sitosterin, bekannter Reinheitsgrad mindestens 90 % (P).
Anmerkung 1: Die Reinheit der Standardstoffe für die Eichung ist durch Normalisierung zu bestimmen. Dazu wird angenommen, dass das Chromatogramm alle in der Probe vorhandenen Sterine wiedergibt, dass die Gesamtfläche der Peaks 100 % der Sterinbestandteile darstellt und dass alle Sterine ein gleich starkes Detektorsignal hervorrufen. Es ist sicherzustellen, dass das System in den interessierenden Konzentrationsbereichen linear verläuft.
- 4.8.1. Sitosterin-Standardlösung: Lösung von Sitosterin (4.8) in Diethylether (4.4) mit einer Konzentration von rund 0,5 mg/ml, auf 0,001 mg/ml genau.
- 4.9. Stigmasterin, bekannter Reinheitsgrad mindestens 90 % (P).
- 4.9.1. Stigmasterin-Standardlösung: Lösung von Stigmasterin (4.9) in Diethylether (4.4) mit einer Konzentration von rund 0,2 mg/ml, auf 0,001 mg/ml genau.
- 4.10. Testlösung für die Prüfung der Auflösung: Lösung von Lanosterin (4.7) (0,05 mg/ml) und Sitosterin (4.8) (0,5 mg/ml) in Diethylether (4.4).

5. Ausführung

- 5.1. Herstellung der Standardlösungen für die Chromatographie. Die interne Standardlösung (4.3.1) muss der entsprechenden Sterin-Standardlösung und der verseiften Probe gleichzeitig zugesetzt werden (siehe 5.2.2).
- 5.1.1. Sitosterin-Standardlösung für die Chromatographie: je 1 ml der Sitosterin-Standardlösung (4.8.1) in 2 Reaktionsgläser (3.7) überführen und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen. 1 ml der internen Standardlösung (4.3.1.1) zugeben und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen.
- 5.1.2. Stigmasterin-Standardlösung für die Chromatographie: je 1 ml der Stigmasterin-Standardlösung (4.9.1) in 2 Reaktionsgläser (3.7) überführen und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen. 1 ml der internen Standardlösung (4.3.1.2) zugeben und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen.
- 5.2. *Vorbereitung der unverseifbaren Bestandteile*
- 5.2.1. Die Butterprobe bei höchstens 35 °C schmelzen lassen. Die Probe durch Rühren gründlich durchmischen.
Ungefähr 1 g Butter (W₂) oder Butterfett (W₂) auf 1 mg genau in einen 150-ml-Kolben (3:1) einwiegen. 50 ml Ethanol (4.1) und 10 ml Kaliumhydroxid-Lösung (4.2) zugeben. Rückflusskühler anbringen und 30 Minuten auf rund 75 °C erhitzen. Kühler entfernen und den Kolben auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- 5.2.2. 1,0 ml der internen Standardlösung (4.3.1.1 bei der Bestimmung von Sitosterin bzw. 4.3.1.2 bei der Bestimmung von Stigmasterin) in den Kolben geben. Gründlich mischen. Den Inhalt des Kolbens quantitativ in einen 500-ml-Scheidetrichter (3.2) überführen, in dem man den Kolben nacheinander mit 50 ml Wasser und 250 ml Diethylether (4.4) ausspült. Den Scheidetrichter 2 Minuten kräftig schütteln und Trennung der Phasen abwarten. Die untere Wasserschicht ablaufen lassen und die Etherschicht viermal mit je 100 ml Wasser ausschütteln.
Anmerkung 2: Damit keine Emulsion entsteht, ist es wichtig, die ersten beiden Waschvorgänge mit Wasser vorsichtig auszuführen (10 Drehungen). Beim dritten Waschvorgang kann 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt werden. Sollte sich eine Emulsion bilden, so kann diese durch Zugabe von 5-10 ml Ethanol zerstört werden. Bei Zugabe von Ethanol muss unbedingt noch weiter zweimal kräftig mit Wasser ausgeschüttelt werden.
- 5.2.3. Die klare seifenfreie Etherschicht durch eine Glassäule (3.5) mit 30 g wasserfreiem Natriumsulfat (4.5) laufen lassen. Den Ether in einem 250-ml-Kolben (3.3) auffangen. Siedesteinchen zugeben und auf einem Wasserbad oder einer Heizhaube fast bis zur völligen Trockenheit eindampfen lassen; dabei die überschüssigen Lösungsmittel auffangen.
Anmerkung 3: Werden die Probenextrakte bei zu hoher Temperatur vollständig getrocknet, so können Sterine verloren gehen.

5.3. Vorbereitung der Trimethylsilylether

5.3.1. Die im Kolben verbliebene Etherlösung mit 2 ml Ether in ein 2-ml-Reaktionsglas (3.7) übertragen und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen. Den Kolben mit 2 weiteren 2-ml-Aliquoten Ether ausspülen, dabei jedes Mal den Inhalt in das Reaktionsglas umschütten und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen.

5.3.2. Die Probe durch Zugabe von 1 ml TRI-SIL (4.6) silylieren. Glas verschließen und zwecks Auflösen kräftig schütteln. Bei unvollständiger Auflösung auf 65-70 °C erwärmen. Vor der Injektion in den Gaschromatographen mindestens 5 Minuten stehen lassen. Die Standards in gleicher Weise wie die Proben silylieren. Die Mischung zur Prüfung der Auflösung (4.10) in gleicher Weise wie die Proben silylieren.

Anmerkung 4: Die Silylierung ist in wasserfreier Umgebung vorzunehmen. Die unvollständige Silylierung von Betulin wird durch einen zweiten Peak dicht neben dem von Betulin angezeigt.

Die Silylierung wird in Gegenwart von Ethanol (im Fall von ungenügendem Spülen bei der Extraktion) beeinträchtigt. In diesem Fall muss bei der Extraktion ein fünftes Mal gespült werden (30 Sekunden kräftiges Schütteln).

5.4. Gaschromatographische Analyse

5.4.1. Wahl der Arbeitsbedingungen

Den Gaschromatographen nach der Anleitung des Herstellers vorbereiten.

Als Leitlinie gelten die folgenden Arbeitsbedingungen:

- Säulentemperatur: 265 °C
- Temperatur des Injektors: 280 °C
- Temperatur des Detektors: 300 °C
- Durchflussgeschwindigkeit des Trägergases: 0,6 ml/min
- Wasserstoffdruck: 84 kPa
- Luftdruck: 155 kPa
- Splitverhältnis: 10:1 bis 50:1. Das Splitverhältnis nach der Anleitung des Herstellers optimieren und daraufhin die Linearität des Detektorsignals im interessierenden Konzentrationsbereich überprüfen.

Anmerkung 5: Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Injektionsröhre regelmäßig gereinigt wird.

- Menge der eingespritzten Substanz: 1 µl TMSE-Lösung.

Vor Beginn jeglicher Analysen warten, bis das System äquilibriert ist und ein zufriedenstellend stabiles Response-Signal liefert.

Diese Bedingungen können je nach Beschaffenheit der Säule und des Gaschromatographen abgewandelt werden, damit Chromatogramme entstehen, die den folgenden Anforderungen genügen:

- Der Sitosterin-Peak muss vom Lanosterin-Peak genügend abgesetzt sein. Abbildung 1 zeigt ein typisches Chromatogramm, wie es aus der silylierten Testlösung zur Prüfung der Auflösung erhalten werden sollte (4.10).
- Die relativen Retentionszeiten der folgenden Sterine sollten ungefähr betragen:
 - Cholesterin: 1,0
 - Stigmasterin: 1,3
 - Sitosterin: 1,5
 - Betulin: 2,5
- Die Retentionszeit für Betulin sollte rund 24 Minuten betragen.

5.4.2. Analyseverfahren:

1 µl der silylierten Standardlösung (Stigmasterin bzw. Sitosterin) einspritzen und die Parameter für die Eichung des Integrators einstellen.

Nochmals 1 µl der silylierten Standardlösung einspritzen, um die Response-Faktoren in Bezug auf Betulin zu bestimmen.

1 µl der silylierten Probelösung einspritzen und Peakflächen messen. Am Anfang und am Ende einer jeden gaschromatographischen Analysenfolge muss die Standardlösung eingespritzt werden.

Als Leitlinie sollte nach je sechs Probelösungen die Standardlösung eingespritzt werden.

Anmerkung 6: Bei der Integration des Stigmasterin-Peaks ist auch das durch die Punkte 1, 2 und 3 in Abbildung 2b markierte Tailing mit zu erfassen.

Bei der Integration des Sitosterin-Peaks ist die Fläche des Peaks von 22-Dihydro-β-Sitosterin (Stigmasterin), das unmittelbar nach Sitosterin eluiert wird, mit zu erfassen, wenn das gesamte Sitosterin berechnet werden soll.

6. Berechnung der Ergebnisse

- 6.1. Die Fläche der Sterin-Peaks und der Betulin-Peaks für die zu Beginn und am Ende eines Durchgangs eingespritzten Standardlösungen bestimmen und R_1 berechnen:

$$R_1 = \frac{\text{durchschnittliche Peakfläche von Sterin im Standard}}{\text{durchschnittliche Peakfläche von Betulin im Standard}}$$

Die Fläche des Sterin-Peaks (Stigmasterin und Sitosterin) und des Betulin-Peaks in der Probe bestimmen und R_2 berechnen:

$$R_2 = \frac{\text{Peakfläche von Sterin in der Probe}}{\text{Peakfläche von Betulin in der Probe}}$$

W_1 = Steringehalt des Standards (mg) in 1 ml Standardlösung (4.8.1 oder 4.9.1)

W_2 = Gewicht der Probe (g) (5.2.1)

P = Reinheitsgrad des Standardsterins (4.8 oder 4.9)

$$\text{Steringehalt der Probe (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

7. Genauigkeit der Methode

7.1. Butter

7.1.1. Wiederholbarkeit

7.1.1.1. Stigmasterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von demselben Analytiker mit denselben Geräten am gleichen Testmaterial so rasch wie möglich nacheinander ausgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 19,3 mg/kg voneinander abweichen.

7.1.1.2. Sitosterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von demselben Analytiker mit denselben Geräten am gleichen Testmaterial so rasch wie möglich nacheinander ausgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 23,0 mg/kg voneinander abweichen.

7.1.2. Vergleichbarkeit

7.1.2.1. Stigmasterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von Analytikern in verschiedenen Laboratorien mit verschiedenen Geräten am gleichen Testmaterial durchgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 31,9 mg/kg voneinander abweichen.

7.1.2.2. Sitosterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von Analytikern in verschiedenen Laboratorien mit verschiedenen Geräten am gleichen Testmaterial durchgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 8,7 % des Durchschnitts der Bestimmungen voneinander abweichen.

7.1.3. Quelle der Präzisionsdaten

Die Präzisionsdaten stammen aus einem 1992 durchgeführten Versuch, an dem 8 Laboratorien beteiligt waren und bei dem 6 Proben (3 Blindproben) auf Stigmasterin und 6 Proben (3 Blindproben) auf Sitosterin untersucht wurden.

7.2. Butterfett

7.2.1. Wiederholbarkeit

7.2.1.1. Stigmasterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von demselben Analytiker mit denselben Geräten am gleichen Testmaterial so rasch wie möglich nacheinander ausgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 10,2 mg/kg voneinander abweichen.

7.2.1.2. Sitosterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von demselben Analytiker mit denselben Geräten am gleichen Testmaterial so rasch wie möglich nacheinander ausgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 3,6 % des Durchschnitts der Bestimmungen voneinander abweichen.

7.2.2. Vergleichbarkeit

7.2.2.1. Stigmasterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von Analytikern in verschiedenen Laboratorien mit verschiedenen Geräten am gleichen Testmaterial durchgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 25,3 mg/kg voneinander abweichen.

7.2.2.2. Sitosterin

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von Analytikern in verschiedenen Laboratorien mit verschiedenen Geräten am gleichen Testmaterial durchgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 8,9 % des Durchschnitts der Bestimmungen voneinander abweichen.

7.2.3. Quelle der Präzisionsdaten

Die Präzisionsdaten stammen aus einem 1991 durchgeführten Versuch, an dem neun Laboratorien beteiligt waren und bei dem 6 Proben (3 Blindproben) auf Stigmasterin und 6 Proben (3 Blindproben) auf Sitosterin untersucht wurden.

8. Toleranzgrenzen

8.1. Zur Prüfung der richtigen Kennzeichnung des Erzeugnisses sind dem gekennzeichneten Erzeugnis drei Proben zu entnehmen.

8.2. Butter

8.2.1. Stigmasterin

8.2.1.1. Der Beimischungsanteil für Stigmasterin beträgt 150 g bei mindestens 95 % reinem Stigmasterin je Tonne Butter, d. h. 142,5 mg/kg, bzw. 170 g bei mindestens 85 % reinem Stigmasterin je Tonne Butter, d. h. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95%-Vertrauensbereich (CrD95-Wert)) verglichen wird:

- 116,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote bei 95 % reinem Stigmasterin),
- 118,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote bei 85 % reinem Stigmasterin),
- 81,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote bei 95 % reinem Stigmasterin),
- 82,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote bei 85 % reinem Stigmasterin).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 116,0 mg/kg und 81,0 mg/kg bzw. 118,0 mg/kg und 82,0 mg/kg erhält.

8.2.2. Sitosterin

8.2.2.1. Der Beimischungsanteil für Sitosterin beträgt 600 g bei mindestens 90 % reinem Sitosterin je Tonne Butter, d. h. 540 mg/kg.

8.2.2.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95%-Vertrauensbereich (CrD95-Wert)) verglichen wird:

- 486,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote bei 95 % reinem Sitosterol),
- 358,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote bei 90 % reinem Sitosterol).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 486,0 mg/kg und 358,0 mg/kg erhält.

8.3. Butterfett

8.3.1. Stigmasterin

8.3.1.1. Der Beimischungsanteil für Stigmasterin beträgt 150 g bei mindestens 95 % reinem Stigmasterin je Tonne Butterfett, d. h. 142,5 mg/kg, bzw. 170 g bei mindestens 85 % reinem Stigmasterin je Tonne Butterfett, d. h. 144,5 mg/kg.

8.3.1.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95%-Vertrauensbereich (CrD95-Wert)) verglichen wird:

- 120,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote bei 95 % reinem Stigmasterin),
- 122,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote bei 85 % reinem Stigmasterin),
- 84,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote bei 95 % reinem Stigmasterin),
- 86,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote bei 85 % reinem Stigmasterin).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 120,0 mg/kg und 84,0 mg/kg bzw. 122,0 mg/kg und 86,0 mg/kg erhält.

8.3.2. Sitosterin

8.3.2.1. Der Beimischungsanteil für Sitosterin beträgt 600 g bei mindestens 90 % reinem Sitosterin je Tonne Butterfett, d. h. 540 mg/kg.

8.3.2.2. Die bei der Analyse der drei Proben des Erzeugnisses erzielten Ergebnisse werden zur Kontrolle der Kennzeichnungsmittel-Beimischungsquote und der Kennzeichnungsmittelreinheit verwendet, wobei das niedrigste Ergebnis mit folgenden Grenzwerten (kritische Differenz für einen 95%-Vertrauensbereich (CrD95-Wert)) verglichen wird:

- 486,0 mg/kg (95 % der Beimischungsmindestquote bei 90 % reinem Sitosterol),
- 358,0 mg/kg (70 % der Beimischungsmindestquote bei 90 % reinem Sitosterol).

Es wird die Kennzeichnungsmittelkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis verwendet, das man durch Interpolierung zwischen 486,0 mg/kg und 358,0 mg/kg erhält.

Abbildung 1

Chromatogramm der Mischung zur Prüfung der Auflösung

Wünschenswert ist eine vollständige Auflösung, d. h. die Peaks für Lanosterin und Sitosterin sollten vollständig zur Grundlinie zurückkehren. Eine unvollständige Auflösung ist jedoch zulässig.

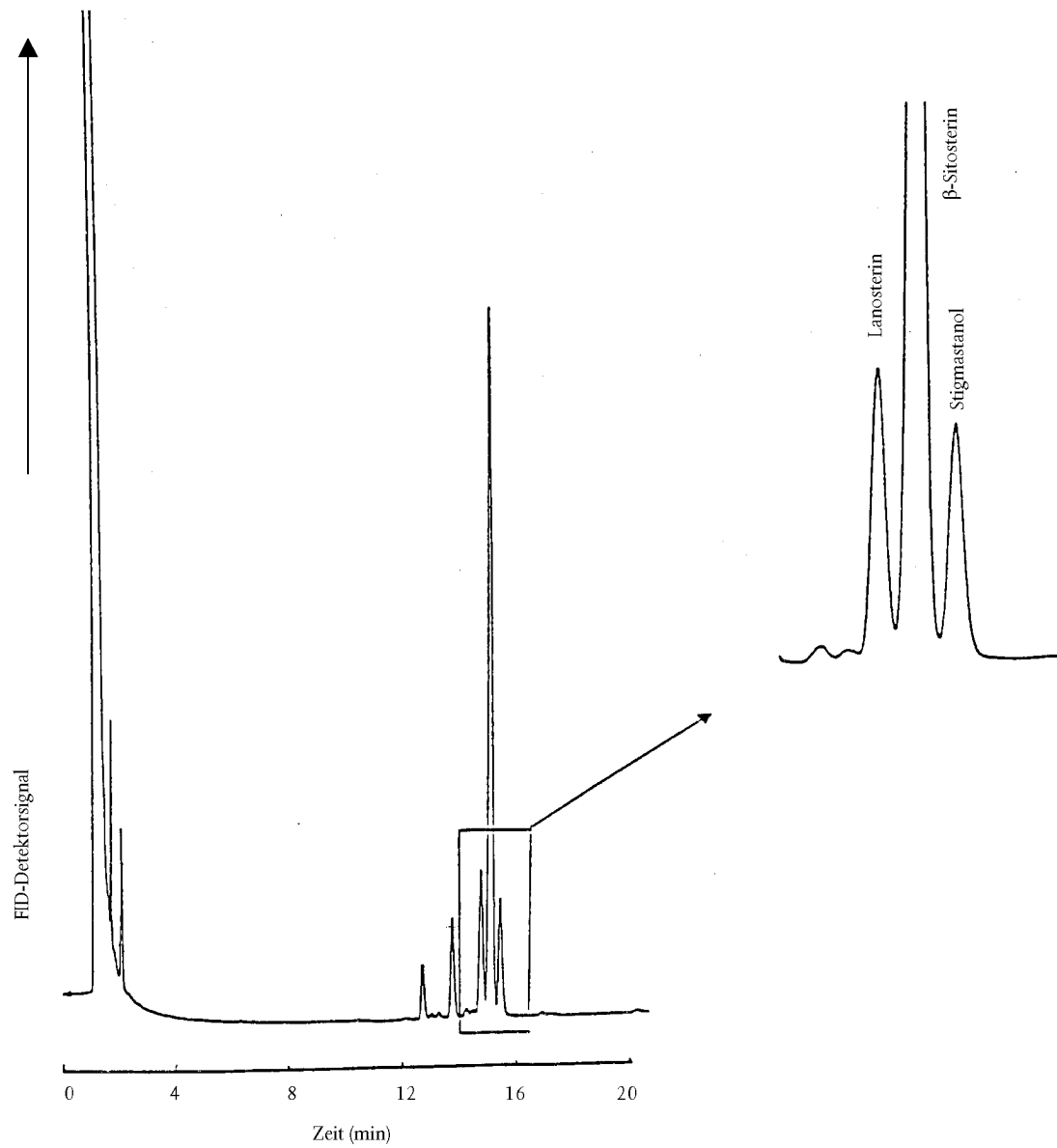


Abbildung 2a
Stigmasterin-Standard

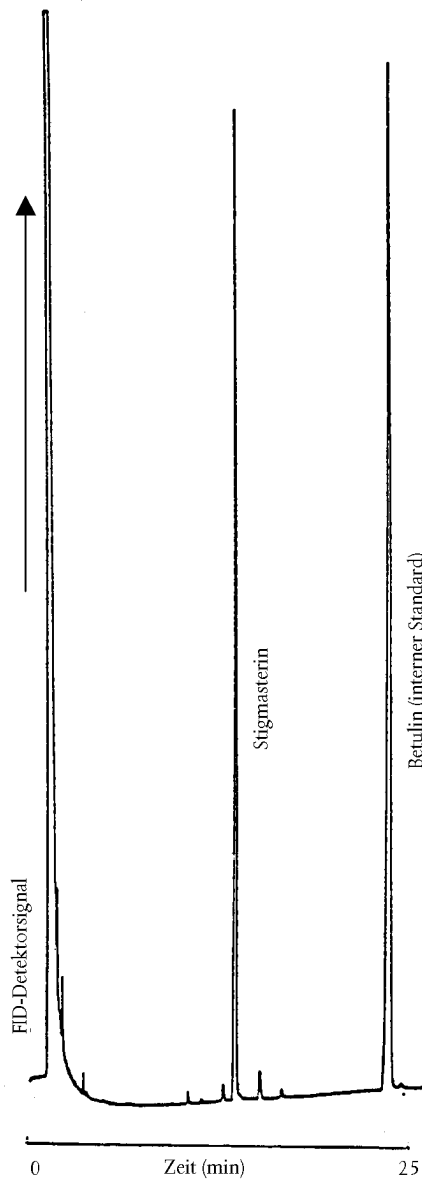
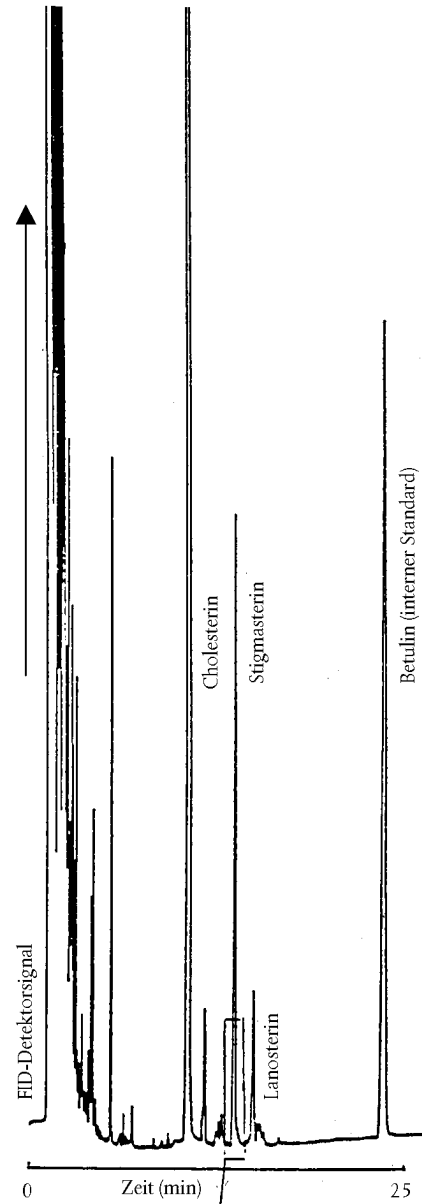


Abbildung 2b
Butterprobe,
gekennzeichnet mit Stigmasterin



Anmerkung: Bei der Integration des Stigmasterin-Peaks ist auch das von den Punkten 1, 2 und 3 markierte Tailing mit zu erfassen.

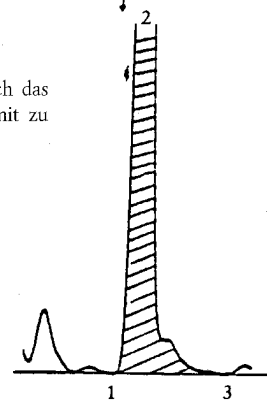


Abbildung 3a
Sitosterin-Standard

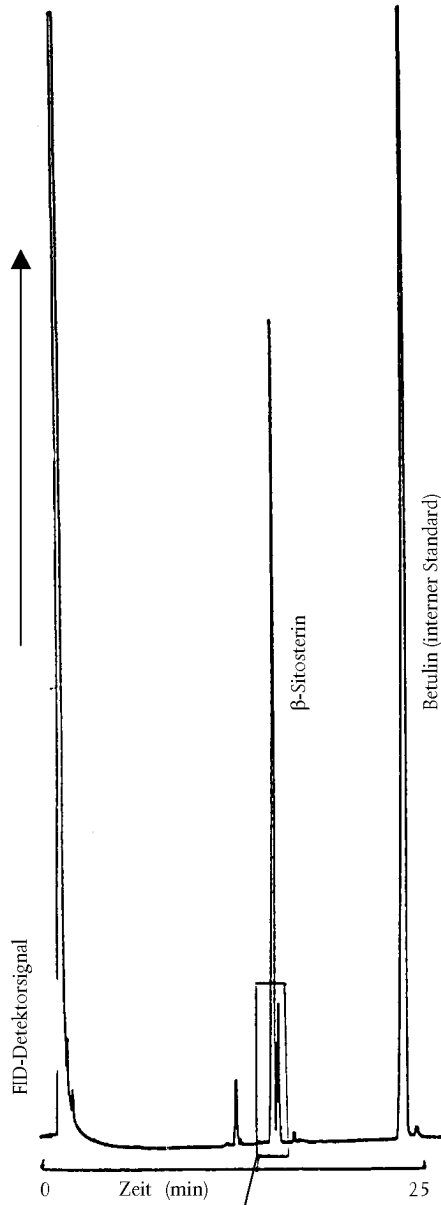
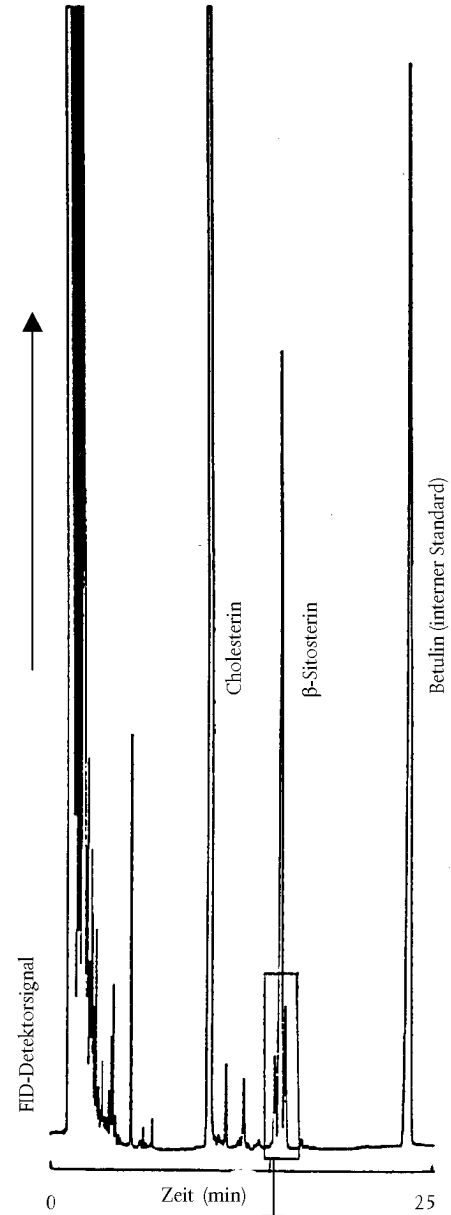
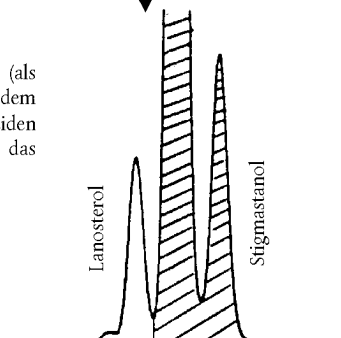
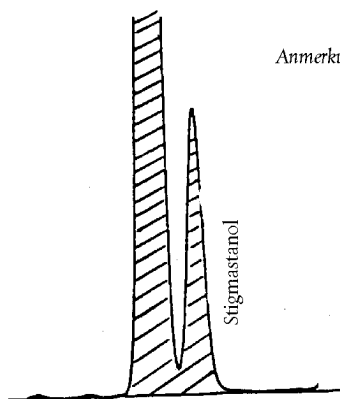


Abbildung 3b
Butterprobe,
gekennzeichnet mit β-Sitosterin



Anmerkung: β-Sitosterin enthält oft eine Verunreinigung (als Stigmastanin identifiziert), die unmittelbar nach dem β-Sitosterin eluiert wird. Die Flächen dieser beiden Peaks sollten aufsummiert werden, wenn das insgesamt vorhandene β-Sitosterin bestimmt wird.



ANHANG XV

(Artikel 10)

REFERENZMETHODE ZUM NACHWEIS VON KUHMITLCH UND KASEIN IN KÄSE AUS SCHAF-, ZIEGEN- ODER BÜFFELMITLCH ODER AUS GEMISCHEN VON SCHAF-, ZIEGEN- ODER BÜFFELMITLCH**1. Zweck**

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 mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung der γ -Kaseine nach Plasminolyse.

2. Anwendungsbereich

Dieses Verfahren dient dem empfindlichen und spezifischen Nachweis von Kuhmilch und Kasein 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 Rindermolkenkonzentrat.

3. Kurzbeschreibung

- 3.1. Isolierung des Kaseins aus Käse und Referenzproben.
- 3.2. Lösen des isolierten Kaseins und Plasminspaltung (EC.3.4.21.7).
- 3.3. Isoelektrische Fokussierung der plasminbehandelten Kaseine in Anwesenheit von Harnstoff und Anfärben der Proteine.
- 3.4. Auswertung 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 bidestilliert oder von entsprechender Reinheit sein.

Hinweis: Die folgenden Angaben gelten für im Labor hergestellte harnstoffhaltige Polyacrylamidgele im Format $265 \times 125 \times 0,25$ 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, N-Methylen-bis-acrylamid (BIS)

48,05 g Harnstoff

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

ad 100 ml H_2O lösen, auf 100 ml auffüllen, in Braunglasflaschen überführen und im Kühlschrank aufbewahren.

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

4.1.2. Gellösung

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

9,0 ml Gelstammlösung

24 mg β -Alanin

500 μ l Ampholyt pH 3,5-9,5 ⁽¹⁾

250 μ l Ampholyt pH 5-7 ⁽¹⁾

250 μ l Ampholyt pH 6-8 ⁽¹⁾.

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

Hinweis: Gellösung erst unmittelbar vor dem Gießen (siehe 6.2) ansetzen.

4.1.3. Katalysatorlösungen

4.1.3.1. TEMED: N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin

4.1.3.2. 40 % (w/v) PER: Ammoniumpersulfat

800 mg PER werden mit Wasser versetzt und auf 2 ml aufgefüllt.

Hinweis: PER-Lösung stets frisch ansetzen.

4.2. Kontaktflüssigkeit

Kerosin oder n-Decan.

4.3. Anodenflüssigkeit

5,77 g Phosphorsäure (85 % w/w) mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

4.4. Kathodenflüssigkeit

2,00 g Natriumhydroxid in Wasser lösen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

Probenvorbereitung

4.5. Reagenzien zur Proteinisolierung

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

4.5.2. Dichlormethan

4.5.3. Aceton

4.6. Protein-Lösungspuffer

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

24,03 g Harnstoff

250 mg Dithiothreitol

in destilliertem Wasser lösen und auf 50 ml auffüllen.

Hinweis: Im Kühlschrank höchstens 1 Woche haltbar.

4.7. Reagenzien für die Plasminspaltung des Kaseins

4.7.1. Ammoniumcarbonatpuffer

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.

⁽¹⁾ Derzeit haben sich die Produkte Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) und Resolyte® pH 5-7 bzw. 6-8 (BDH, Merck) zur Erzielung der angestrebten Auflösung der γ -Kaseine besonders bewährt.

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. Ansetzen 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 und einer Drehzahl von 2 500 g 20 Minuten lang zentrifugiert. Nach raschem Abkühlen des Zentrifugenbechers nebst Inhalt auf 6 bis 8 °C wird die Fettschwimmschicht restlos entfernt. Zum Ansetzen 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 % w/v) auf einen pH-Wert von 6,4 eingestellt. Die Probe wird auf 35 °C angewärmt, mit 100 µl Kälberlab versetzt (Labstärke 1:10 000; ca. 3 000 U/ml), eine Minute gerührt und in einem mit Alufolie abgedeckten Becher eine Stunde bei 35 °C bis zum Gerinnen stehen gelassen. Anschließend wird die gesamte dickgelegte Milchprobe ohne vorheriges Homogenisieren oder Abscheiden der Molke gefriergetrocknet. Nach dem Gefrieretrocknen wird das Produkt gleichmäßig vermahlen. Zum Ansetzen der 0%igen Standardprobe wird das gleiche Verfahren mit 500 ml reiner Büffelmagermilch durchgeführt. Die Standardproben sind bei -20 °C aufzubewahren.

Hinweis: Es ist ratsam, die Reinheit der Büffelmilch durch isoelektrische Fokussierung der plasminbehandelten Kaseine vor dem Ansetzen der Standardproben zu prüfen.

Reagenzien zur Proteinfärbung

4.9. Fixierlösung

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

4.10. Entfärbelösung

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

Hinweis: Die Entfärbelösung ist jeden Tag frisch anzusetzen; sie kann zweckmäßigerweise aus Vorratslösungen 50 % (v/v) Methanol und 20 % (v/v) Eisessig 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 unter Verwendung eines Magnetrührers gelöst (ca. 45 Minuten); die Lösung wird durch zwei mittelschnelle Faltenfilter filtriert.

4.11.2. Färbelösung (Vorratslösung 2)

5,0 g Kupfersulfatpentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) werden in 1 000 ml 20%iger Essigsäure gelöst.

4.11.3. Färbelösung (gebrauchsfertig)

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

Hinweis: Die Färbelösung ist am Tag des Ansetzens aufzubrauchen.

5. Geräte und Hilfsmittel

5.1. Glasplatten (265 × 125 × 4 mm); Gummiroller mit Walzenbreite von 15 cm; Nivelliertisch

5.2. Gelträgerfolie (265 × 125 mm)

5.3. Gegenfolie aus Polyester (280 × 125 mm). Beide Längsseiten werden mit je einem Prägebandstreifen (280 × 6 × 0,25 mm) abgeklebt (Abbildung 1).

5.4. Elektrofokussierkammer mit Kühlplatte (z. B. 265 × 125 mm) mit geeignetem Spannungsgeber ($\geq 2,5$ kV) oder Elektrophoreseautomat

5.5. Umlaufkryostat, thermostatregelbar auf $12 \pm 0,5$ °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. Scheren, Skalpelle und Pinzetten aus Edelstahl
- 5.11. 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. Mikroliterpipetten 5–25 µl
- 5.17. Vakuumzentrifuge oder Gefrietrockner
- 5.18. Thermostatregelbares Wasserbad, einstellbar auf 35 und 40 ± 1 °C, mit Schüttelvorrichtung
- 5.19. Densitometerausrüstung, Registrierung bei λ = 634 nm

6. Verfahren

6.1. Probenvorbereitung

6.1.1. Kaseinisolierung

Die einer Trockenmasse von ca. 5 g entsprechende Menge Käse oder Standardprobe wird in ein 100-ml-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 60 ml Wasser versetzt und mit einem Stabhomogenisator (8 000–10 000 U/min⁻¹) homogenisiert. Das Homogenisat wird mit verdünnter Essigsäure (4.5.1) auf einen pH-Wert von 4,6 eingestellt und 5 Minuten bei 3 000 g zentrifugiert. 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 U/min⁻¹), mit 20 ml Dichlormethan (4.5.2) versetzt, nochmals homogenisiert und dann zentrifugiert (5 Minuten bei 3 000 g). Die zwischen wässriger und organischer Phase schwimmende Kaseinschicht 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 homogenisiert und zentrifugiert. Dieser Vorgang ist so oft 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 trocknen gelassen und in einer Reibschale fein zerrieben.

Hinweis: Trockene Kaseinisolate 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 z. B. im Ultraschallbad homogenisiert. Das Homogenisat wird auf 40 °C erwärmt, mit 10 µl Plasmin (4.7.2) versetzt, durchmischt und eine Stunde bei 40 °C unter ständigem Schütteln bebrütet. Zur Enzym-inhibierung werden 20 µl ε-Aminocaprinsäurelösung (4.7.3), danach 200 mg fester Harnstoff und 2 mg Dithiothreitol zugesetzt.

Hinweis: 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) die Gelträgerfolie (5.2) mit Hilfe einiger Tropfen Wasser aufwalzen, ausgetretenes Wasser entfernen. In gleicher Weise die mit Abstandshaltern (0,25 mm) versehene Gegenfolie (5.3) auf eine weitere Glasplatte aufwalzen. Diese dann auf einem Nivelliertisch horizontal ausrichten.

Die frisch angesetzte, 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 (Folienseite nach unten zeigend) wird 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). Gelträgerfolienplatte mit Hilfe eines dünnen Spatels vollständig aufsetzen lassen und drei weitere Glasplatten als Andruckgewichte auflegen. 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 „Gelsandwich“ wird nun in einen Folienschlauch eingeschweißt und im Kühlschrank (maximal 6 Wochen) aufbewahrt.

Hinweis: Die Gegenfolie mit den Abstandshaltern kann wiederverwendet werden. Das Polyacrylamidgel kann auf kleinere Formate zurechtgeschnitten werden, was bei kleinem Probenumfang oder bei Verwendung eines Elektrophoreseautomaten zu empfehlen ist (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 „Gelsandwich“ 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)	Strom (mA)	Leistung (W)	Volstunden (Vh)
1. Vorfokussierung	30	max. 2 500	max. 15	konst. 4	ca 300
2. Probenfokussierung ⁽¹⁾	60	max. 2 500	max. 15	konst. 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 die Probenapplikatoren (10 × 5 mm) mittel einer Pipette mit je 18 µl der Probenlösungen beschickt, im Abstand von 1 mm zueinander 5 mm von der Anode entfernt auf das Gel aufgesetzt und leicht angedrückt. Die Fokussierung wird bei vorgenannten Bedingungen durchgeführt; die Probenapplikatoren nach 60 Minuten vorsichtig entfernen.

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

6.3.2. Beispiel eines Spannungsprogramms für einen Elektrophoreseautomaten (2 Gele je 5,0 × 4,5 cm); Elektroden ohne Elektrodenstreifen direkt auf das Gel aufbringen.

Schritt	Spannung	Strom	Leistung	Temperatur	Volstunden
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

Probenapplikator aufsetzen bei Schritt 2 bei 0 Vh.

Probenapplikator abnehmen bei Schritt 2 bei 30 Vh.

6.4. Proteinanfärbung

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 überführt und 15 Minuten geschüttelt.

6.4.2. Waschen und Färben der Gelplatte

Die Fixierlösung wird restlos abgossen und die Gelplatte zweimal für je 30 Sekunden mit 100 ml Entfärbelösung (4.10) gespült. Spüllösung abgießen, 250 ml Färbelösung (4.11.3) in die Schale füllen und 45 Minuten unter gelegentlichem Schütteln färben.

6.4.3. Entfärben der Gelplatte

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

Hinweis 1: Fixieren, Waschen, Färben und Entfärben bei 20 °C durchführen: Höhere Temperaturen sind zu vermeiden.

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

7. Auswertung

Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der Proteinbandenmuster der zu beurteilenden Probe mit Referenzproben auf dem gleichen Gel. Der Nachweis von Kuhmilch in Käse aus Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch oder aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch wird vorzugsweise über die γ_2 - und γ_3 -Kaseine geführt, deren isoelektrische Punkte zwischen pH 6,5 und pH 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 ist es ratsam, die Konzentration der Proben und der Standardproben auf die gleiche Stärke der Schaf-, Ziegen- und/oder Büffel- γ_2 und - γ_3 -Kaseine einzustellen (siehe „ γ_2 S, Z, B“ und „ γ_3 S, Z, 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%- und 1%-Standardproben (Schaf, Ziege) oder laboreigenen Interims-Standardproben (Büffelmilch) bestimmt werden.

7.2. Densitometrische Messung

Nach Möglichkeit ist mit Hilfe eines Densitometers (5.19) das Peakflächenverhältnis 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-Peakflächenverhältnis der 1%igen Standardprobe (Schaf, Ziege) oder der im selben Gel laufenden laboreigenen Interims-Standardprobe (Büffel) zu vergleichen.

Hinweis: Reagiert die 1 % Kuhmilch enthaltende Standardprobe eindeutig positiv sowohl auf γ_2 - als auch auf γ_3 -Kaseine, die 0%ige Standardprobe dagegen nicht, so liefert die Methode zuverlässige Ergebnisse. Andernfalls ist das Verfahren unter genauer Beachtung der Verfahrensvorschrift zu optimieren.

Eine Stichprobe gilt als positiv, wenn die Milchkuhkaseine γ_2 und γ_3 oder die entsprechenden Peakflächenverhältnisse zumindest den Zahlen für die 1%ige Standardprobe entsprechen.

8. Literatur

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

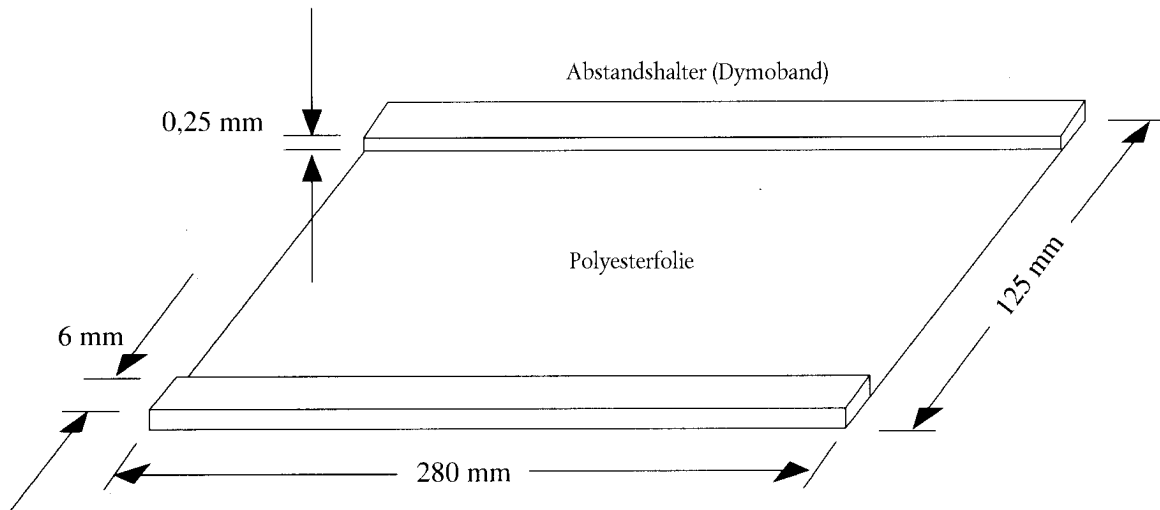


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gegenfolie Abstandshalter (Dymoband) Polyesterfolie

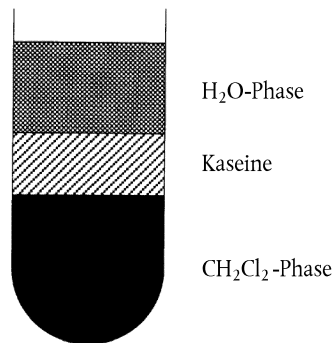


Abbildung 2: Kaseinschwimmschicht zwischen wässriger und organischer Phase nach dem Zentrifugieren H₂O-Phase Kasein CH₂Cl₂-Phase

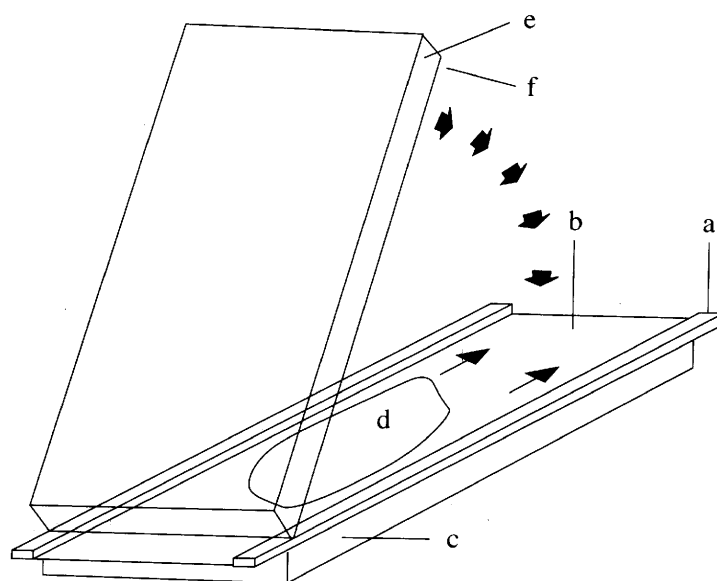


Abbildung 3: Klapptechnik zur Herstellung ultradünner Polyacrylamidgele

a = Abstandshalter (0,25 mm); b = Gegenplatte (5.3); c, e = Glasplatten (5.1); d = Gellösung (4.1.2); f = Gelträgerplatte (5.2)

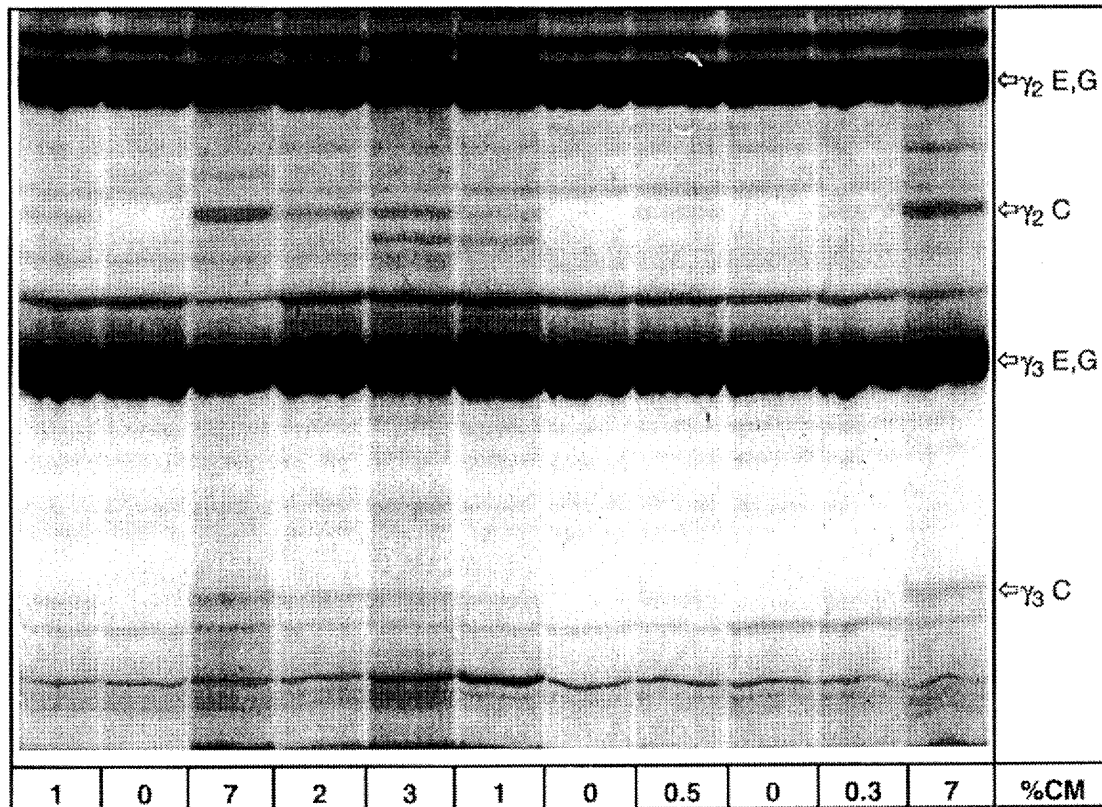


Abbildung 4a: Isoelektrische Fokussierung plasminbehandelter Kaseine von Schaf- und Ziegenmilchkäse mit unterschiedlichem Kuhmilchgehalt.

% CM = Kuhmilchgehalt C = Kuh, E = Schaf, G = Ziege.

Abgebildet ist die obere Hälfte des IEF-Gels.

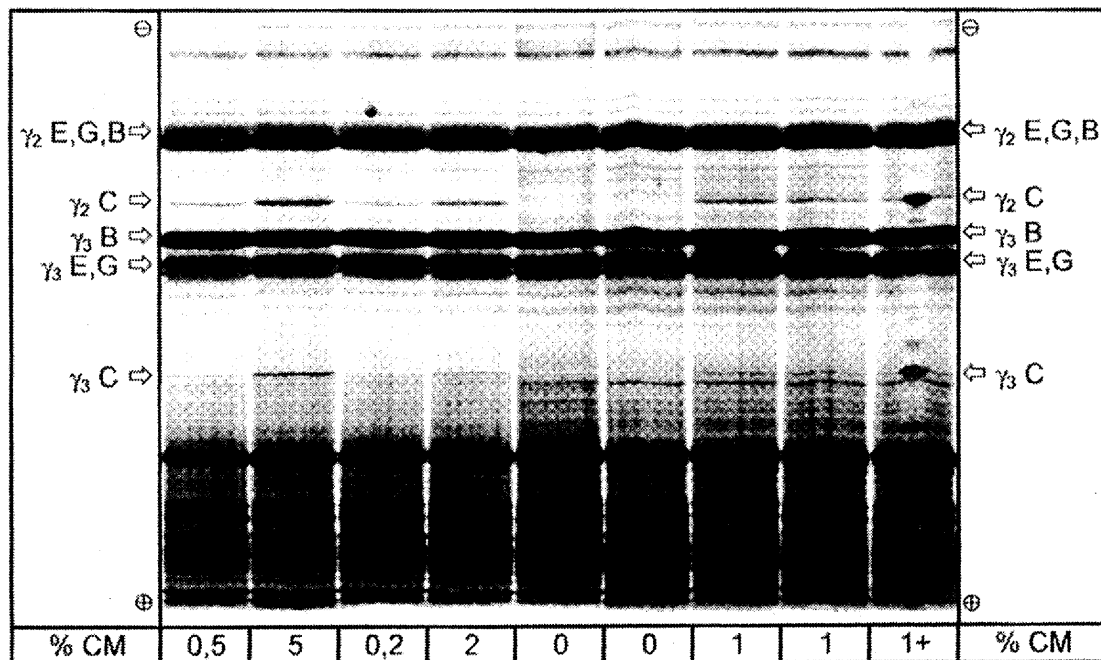


Abbildung 4b: Isoelektrische Fokussierung plasminbehandelter Kaseine von Käse, der aus Gemischen von Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch mit unterschiedlichem Kuhmilchgehalt hergestellt wurde.

% CM = Kuhmilchgehalt, 1 + = Probe mit 1 % Kuhmilchgehalt, der in der Mitte des Durchlaufs reines Rinderkasein zugesetzt wurde. C = Kuh, E = Schaf, G = Ziege, B = Büffel.

Abgebildet ist der gesamte Trennungsabstand des IEF-Gels.

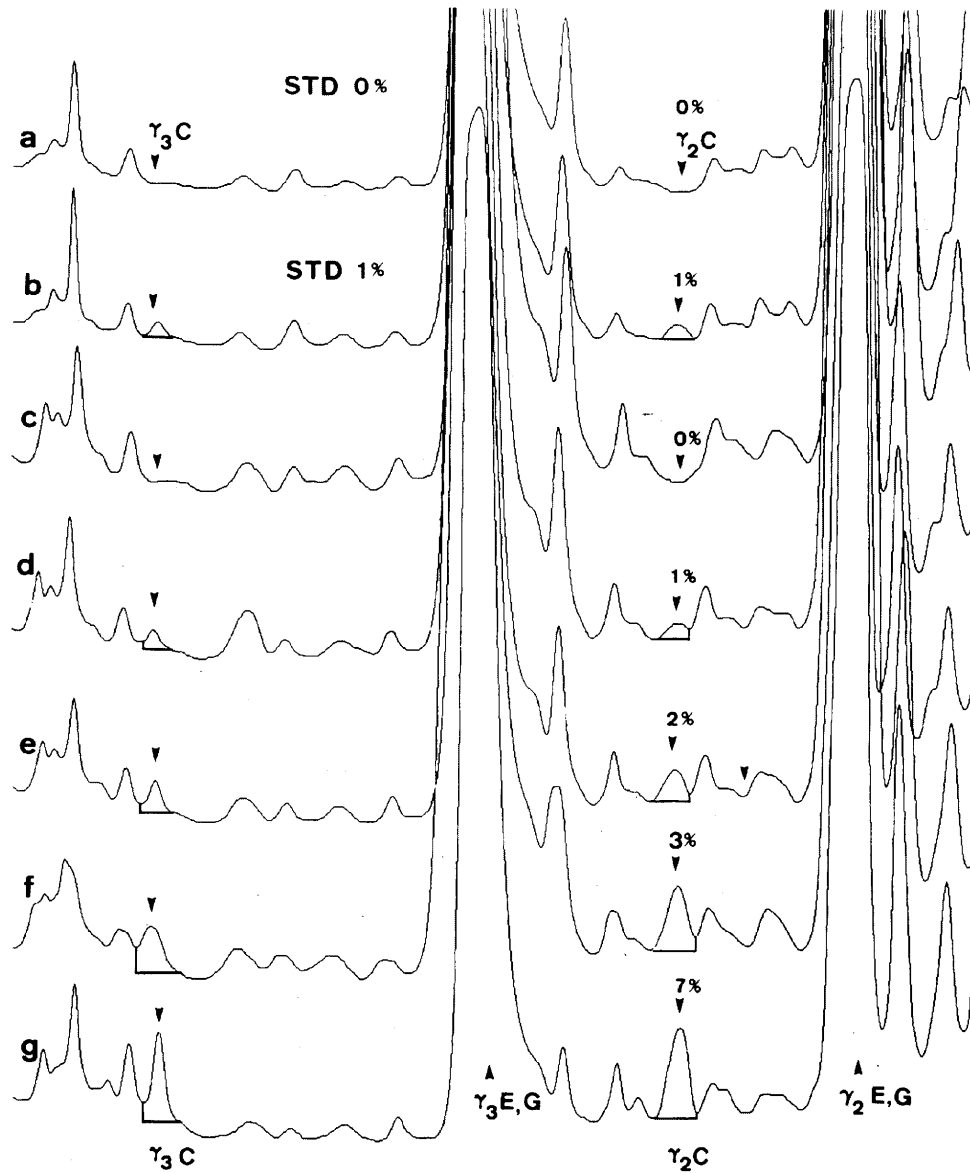


Abbildung 5: Densitogrammreihe der Standardproben und Käseproben aus Gemischen von Schaf- und Ziegenmilch nach isoelektrischer Fokussierung.

Bei a und b handelt es sich um Standardproben mit 0 bzw. 1 % Kuhmilch, bei c und g um Käseproben mit 0, 1, 2, 3 und 7 % Kuhmilch. C = Kuh, E = Schaf, G = Ziege.

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

ANHANG XVI

(Artikel 11)

REFERENZMETHODE FÜR DIE UNTERSUCHUNG AUF COLIFORME KEIME IN BUTTER, MAGERMILCHPULVER, KASEIN UND KASEINATEN

Zum Nachweis von coliformen Keimen in Butter wird das Nährmedium mit Proben von 1 g Butter beimpft.

Zum Nachweis von coliformen Keimen in Magermilchpulver, Kasein und Kaseinaten wird das Nährmedium mit Proben von 0,1 g beimpft.

Die IMV-Norm 73A:1985 Methode B wird mit folgenden Abwandlungen angewandt:

- 1) Die Proben werden gemäß der IMV-Norm 122B:1992 vorbereitet. Für Säurekasein kann alternativ das Probenvorbereitungsverfahren der IMV-Norm 73A:1985 verwendet werden.
- 2) Es werden ausschließlich Reagenzgläser bebrütet und ausgewertet, die mit Proben von 1 g (Butter) bzw. 0,1 g (Magermilchpulver, Kasein/Kaseinate) beimpft wurden. Dezimalverdünnungen werden nicht durchgeführt.

Beurteilung der Ergebnisse

Drei negative Ergebnisse:	Anforderungen erfüllt
Zwei oder drei positive Ergebnisse:	Anforderungen nicht erfüllt
Zwei negative Ergebnisse:	Analyse von zwei weiteren Proben von 1 g (Butter) und 0,1 g (Magermilchpulver, Kasein/Kaseinate). Die Anforderungen sind erfüllt, wenn die beiden letzten Ergebnisse negativ sind. Ansonsten sind die Anforderungen nicht erfüllt.

Anmerkung

Gehalt an coliformen Keimen: durchschnittlich 1 je 10 g Butter bzw. 1 je 1 g Magermilchpulver, Kasein oder Kaseinate.

Die Wahrscheinlichkeit, dass die Ergebnisse den Anforderungen entsprechen, liegt bei 93 %.

Gehalt an coliformen Keimen: durchschnittlich 1 je 1 g Butter bzw. 1 je 0,1 g Magermilchpulver, Kasein oder Kaseinate:

Die Wahrscheinlichkeit, dass die Ergebnisse nicht den Anforderungen entsprechen, liegt bei 91 %.

(Annahme: Poisson-Verteilung)

ANHANG XVII

(Artikel 12)

ANALYSEMETHODE ZUR BESTIMMUNG DES GEHALTS AN LAKTOSE IN DEN ERZEUGNISSEN DER POSITION 2309 DER KOMBINIERTEN NOMENKLATUR ⁽¹⁾

TEIL 1

1. Anwendungsbereich

Die Methode ist für einen Laktosegehalt von mehr als 0,5 % anwendbar.

2. Prinzip

Die enthaltenen Zucker werden in Wasser aufgelöst; der vergärbare Zucker wird mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) vergoren, wobei die Laktose nicht angegriffen wird. Nach Klärung und Filtration wird in der erhaltenen Lösung der Gehalt an Laktose nach Luff-Schoorl bestimmt.

3. Reagenzien

0,1 n Natriumthiosulfat

Indikator: Stärkelösung. Eine Mischung von 5 g löslicher Stärke (gegebenenfalls mit 10 mg Quecksilberjodid als Konservierungsmittel) und 30 ml Wasser wird zu 1 Liter kochendem Wasser hinzugefügt und zusammen 3 Minuten lang gekocht, dann wird abgekühlt.

Kaliumjodidlösung p.a. 30 % (g/vol)

6 n Schwefelsäure

Reagenz nach Luff-Schoorl:

a) 25 g eisenfreies Kupfersulfat p.a. ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in 100 ml Wasser auflösen;

b) 50 g Zitronensäure p.a. ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) in 50 ml Wasser auflösen;

c) 143,8 g wasserfreies Natriumcarbonat p.a. (Na_2CO_3) in ungefähr 300 ml warmem Wasser auflösen.

Unter vorsichtigem Umschwenken wird b) zu c) gegossen (abgekühlt) und dann a) hinzugefügt, zu 1 Liter aufgefüllt, während einer Nacht stehen gelassen und dann filtriert. Die Normalitäten der erhaltenen Reagenzien müssen nachgeprüft werden (0,1 n Cu, 2 n Na_2CO_3). Der pH-Wert muss etwa 9,4 betragen.

Carrez-Lösung I: 23,8 g Zn ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂·2H₂O und 3 g Eisessigsäure werden in Wasser zu 100 ml aufgelöst.

Carrez-Lösung II: 10,6 g $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ werden in Wasser zu 100 ml aufgelöst.

Bimssteinkörnchen, mit Salzsäure ausgekocht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. *Saccharomyces-cerevisiae*-Suspension: Suspension von 25 g frischer Hefe in 100 ml Wasser (nicht länger als eine Woche im Kühlschrank aufbewahren).

4. Ausführung

Etwa 1 g der Analysenprobe wird auf 1 mg genau gewogen und in einen Messkolben von 100 ml eingegeben. Man fügt 25 bis 30 ml Wasser hinzu und taucht 30 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad ein. Danach wird auf ca. 35 °C abgekühlt.

Man fügt 5 ml Hefesuspension ⁽²⁾ bei und schwenkt um. Der Kolben mit Inhalt wird zwei Stunden lang in einem Wasserbad stehen gelassen, das auf einer Temperatur von 38 bis 40 °C gehalten wird.

Nach Ablauf der Vergärung wird auf eine Temperatur von ungefähr 20 °C abgekühlt. Zunächst werden 2,5 ml Carrez-Lösung I hinzugefügt und eine halbe Minute lang geschüttelt, dann 2,5 ml Carrez-Lösung II hinzugegeben und abermals eine halbe Minute lang geschüttelt. Dann wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, gemischt und filtriert. Von dem erhaltenen Filtrat wird eine Menge von höchstens 25 ml, welche möglichst 40 bis 80 mg Laktose enthält, abpipettiert, wenn nötig mit Wasser bis zu einem Volumen von 25 ml aufgefüllt und der Gehalt an wasserfreier Laktose nach Luff-Schoorl bestimmt.

Es wird ein vollständiger Blindversuch mit der Hefe durchgeführt.

⁽¹⁾ Verordnung (EWG) Nr. 222/88.

⁽²⁾ Wenn mehr als 40 % vergärbaren Zuckers vorhanden sind, wird die Menge Hefesuspension erhöht.

TEIL II

1. Bestimmung des Laktosegehalts nach der Methode Luff-Schoorl

25 ml des Reagenzes nach Luff-Schoorl werden entnommen und in einen Erlenmeyer-Kolben von 300 ml gebracht; anschließend werden genau 25 ml geklärte Lösung hinzugefügt.

Nach Zugabe von zwei Körnchen Bimsstein wird durch Schütteln mit der Hand über einer freien Flamme von mittlerer Höhe erhitzt und die Flüssigkeit in etwa 2 Minuten zum Kochen gebracht. Anschließend wird der Erlenmeyer-Kolben auf ein Drahtnetz mit einer Asbestscheibe gestellt unter der vorher eine Flamme entzündet und so eingestellt wurde, dass der Erlenmeyer-Kolben nur unten geheizt wird; dann wird mit einem Rückflusskühler verbunden. Von diesem Augenblick an lässt man genau 10 Minuten kochen. Dann wird sofort in kaltem Wasser abgekühlt und nach etwa 5 Minuten wie folgt titriert:

Zu der Flüssigkeit werden 10 ml Kaliumjodid-Lösung hinzugefügt und anschließend sofort, aber vorsichtig (wegen der Gefahr übermäßigen Schäumens), 25 ml 6-n-Schwefelsäure hinzugegeben.

Dann wird mit Natriumthiosulfat titriert, bis eine mattgelbe Farbe erzielt ist, und gegen Ende der Titration der Stärke-Indikator hinzugefügt.

Die gleiche Titration wird in einer Mischung aus genau 25 ml des Reagenzes nach Luff-Schoorl und 25 ml Wasser durchgeführt, nachdem 10 ml Kaliumjodid-Lösung und 25 ml 6-n-Schwefelsäure zugefügt wurden; dieses Mal jedoch nicht zum Kochen bringen.

Aus der Tabelle wird diejenige Laktosemenge (in mg) ermittelt, welche der Differenz der Ergebnisse beider Titrationen entspricht (ausgedrückt in ml 0,1 n Natriumthiosulfat).

TABELLE

Tabelle für 25 ml Reagenz nach Luff-Schorrl

(vgl. Beschreibung im Text)

1. 0,1 n Natriumthiosulfat

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

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

ANHANG XVIII

(Artikel 13)

NACHWEIS VON LABMOLKE IN MAGERMILCHPULVER FÜR DIE ÖFFENTLICHE LAGERHALTUNG DURCH DIE BESTIMMUNG DER GLYKOMAKROPEPTIDE MITTELS DER HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE (HPLC)**1. Gegenstand und Anwendungsbereich**

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

2. Referenzen

Internationale Norm ISO 707 — Milch und Milcherzeugnisse — Probenahmetechniken, gemäß den Angaben im Anhang 1 Ziffer 2 Buchstabe c) letzter Unterabsatz.

3. Definition

Gehalt des Magermilchpulvers an Glykomakropeptiden: Gehalt an mit nachstehend spezifiziertem Verfahren bestimmten Substanzen, ausgedrückt in Massenprozenten.

4. Prinzip

- Rekonstitution des Magermilchpulvers in warmem Wasser, Entfernen des Fettanteils und der Proteine durch Ausfällung mit Trichloressigsäure und Zentrifugation oder Filtration.
- Bestimmung der im Filtrat über Überstand vorhandenen Glykomakropeptidmenge (GMP) durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.
- Beurteilung des Ergebnisses durch den Vergleich mit Standardproben aus Magermilchpulver, ohne oder mit Zusatz eines bekannten Anteils an Labmolkenpulver.

5. Reagenzien

Alle Reagenzien müssen eine anerkannte Analysenqualität aufweisen. Das verwendete Wasser muss destilliertes Wasser oder Wasser von mindestens gleichwertigem Reinheitsgrad sein.

5.1. Trichloressigsäurelösung

240 g Trichloressigsäure (Cl_3CCOOH) werden in Wasser aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.

5.2. Elutionsmittel, 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 ungefähr 700 ml Wasser gelöst. Falls erforderlich, ist der pH-Wert mit Phosphorsäure- oder Kaliumhydroxidlösung auf 6,0 zu berichtigen.

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

Das Elutionsmittel ist vor Gebrauch durch einen Membranfilter mit 0,45 μm Porendurchmesser zu filtrieren.

5.3. Waschlösung für die Säulen

Ein Teil Acetonitril (CH_3CN) mit 9 Teilen Wasser vermischen. Die Lösung vor Gebrauch durch einen Membranfilter von 0,45 μm Porendurchmesser filtrieren.

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 Anforderung der vorliegenden Verordnung d. h. [0].

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

6. Geräte

- 6.1. Analytische Waage.
- 6.2. Zentrifuge mit einer Zentrifugalkraft von 2 200 g, versehen mit verschließbaren Zentrifugenröhrchen mit ungefähr 25 ml Fassungsvermögen.
- 6.3. Schüttelgerät.
- 6.4. Magnetrührer.
- 6.5. Glastrichter mit ungefähr 7 cm Durchmesser.
- 6.6. Filterpapier, mittlere Filtriergeschwindigkeit, ungefähr 12,5 cm Durchmesser.
- 6.7. Filtrationsgestell aus Glas mit Membranfilter von 0,45 µm Porendurchmesser.
- 6.8. Graduierte Pipette für 10 ml, gemäß ISO 648, Klasse A oder ISO/R 835.
- 6.9. Thermostatisiertes Wasserbad, Einstellung $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. HPLC-Ausrüstung mit:
 - 6.10.1. Pumpe,
 - 6.10.2. manuellem oder automatischem Injektionsventil mit einer Probenschleife von 15 µl bis 30 µl Fassungsvermögen,
 - 6.10.3. zwei Säulen TSK 2 000 SW (30 cm Länge, 0,75 cm Innendurchmesser) in Serie geschaltet oder Säulen mit gleichwertiger Trennleistung und einer Vorsäule (3 cm × 0,3 cm), gefüllt mit I 125 oder mit einem Material von gleichwertiger Wirksamkeit,
 - 6.10.4. thermostatisiertem Säulenofen, temperiert auf 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5. UV-Detektor mit variabler Wellenlänge für Messungen bei 205 nm mit einer Empfindlichkeit von 0,008 A,
 - 6.10.6. Integrator mit der Möglichkeit der „valley-to-valley“-Integration.

Anmerkung: Es kann auch bei Raumtemperatur mit den Säulen gearbeitet werden. Ihre Trennleistung wird dadurch etwas geringer. In diesem Fall sollen die Temperaturschwankungen während ein und derselben Analysenserie unter ± 5 °C liegen.

7. Probenahme

- 7.1. Internationale Norm ISO 707 — Milch und Milcherzeugnisse — Probenahmetechniken, gemäß den Angaben im Anhang I Ziffer 2 Buchstabe c) letzter Unterabatz.
- 7.2. Die Probe ist unter Bedingungen aufzubewahren, die jeden Verderb oder Änderung der Zusammensetzung verhindern.

8. Verfahren

- 8.1. *Probenvorbereitung*

Magermilchpulver in einen Behälter geben, der ungefähr das doppelte Fassungsvermögen wie das Pulvervolumen hat und luftdicht verschlossen werden kann. Den Behälter sofort verschließen. Das Magermilchpulver durch intensives Schütteln des Behälters gut durchmischen.
- 8.2. *Probenentnahme*

Wiege $2,000 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ Probe in ein Zentrifugenröhrchen ein (6.2).
- 8.3. *Entfernen von Fett und Protein*
 - 8.3.1. 20 g warmes Wasser (50 °C) zur Probe geben. Das Pulver durch fünfminütiges Bewegen auf dem Schüttelgerät (6.3) rekonstituieren. Das Zentrifugenröhrchen auf 25 °C abkühlen.
 - 8.3.2. Innerhalb von 2 Minuten 10 ml Trichloressigsäure (5.1) unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer (6.4) hinzugeben. Das Röhrchen für 60 Minuten in das Wasserbad (6.9) stellen.
 - 8.3.3. Danach die Probe bei 2 000 g 10 Minuten zentrifugieren (6.2) oder durch Filterpapier (6.6) filtrieren. Die ersten 5 ml des Filtrats verwerfen.

8.4. *Chromatographische Bestimmung*

- 8.4.1. Ein genau abgemessenes Volumen zwischen 15 und 30 µl vom Überstand oder Filtrat (8.3.3) in das HPLC-Gerät (6.10) bei einem Fluss von 1,0 ml Elutionsmittel (5.2) pro Minute injizieren.

Anmerkung:

1. Das Elutionsmittel (5.2) sollte während der gesamten chromatographischen Analyse auf 85 °C erwärmt werden, um es gasfrei zu halten und ein Bakterienwachstum zu verhindern. Jede andere Vorkehrung mit vergleichbarer Wirkung kann durchgeführt werden.
2. Bei jeder Unterbrechung sind die Säulen mit Wasser zu spülen. Das Elutionsmittel darf niemals in den Säulen verbleiben (5.2).

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

- 8.4.2. Die Ergebnisse der chromatographischen 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 einer RT von etwa 12,5 Minuten;

Peak III: dritter Peak des Chromatogramms, entspricht GMP, mit einer RT von $15,5 \pm 1,0$ Minuten;

Peak IV: vierter Peak des Chromatogramms mit einer RT von etwa 17,5 Minuten.

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

Der Integrator (6.10.6) berechnet automatisch die Fläche A der einzelnen Peaks, d. h.:

 A_{II} : Fläche von Peak II, A_{III} : Fläche von Peak III, A_{IV} : Fläche von Peak IV.

Vor der quantitativen Interpretation ist es von großer Bedeutung, das Aussehen des Chromatogramms zu untersuchen, um Anomalien infolge einer Störung des Gerätes oder der Säulen oder infolge der Art und Herkunft der analysierten Probe zu entdecken.

Im Zweifelsfalle ist die Analyse zu wiederholen.

8.5. *Eichung*

- 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 die GMP im 8%igen Trichloressigsäure-Milieu abgebaut werden. Der Verlust wird bei 30 °C auf 0,2 % pro Stunde geschätzt.

- 8.5.2. Vor jeder chromatographischen Bestimmung der Proben sind die Säulen durch wiederholte Injektionen der Lösung (8.5.1) der Standardproben (5.4.1) zu konditionieren, bis die Fläche und die Retentionszeit des dem GMP entsprechenden Peaks konstant bleibt.

- 8.5.3. Die Eichfaktoren R werden durch Injektion des gleichen Filtratvolumens (8.5.1), wie bei den Proben verwendet wird, bestimmt.

9. Darstellung der Ergebnisse

- 9.1.
- Art der Berechnung und Formeln*

- 9.1.1. Berechnung der Eichfaktoren:

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

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

wobei

 R_{II} und R_{IV} die Eichfaktoren der Peaks II und IV sind; $A_{II}[0]$ und $A_{IV}[0]$ die Flächen der Peaks II und IV der Standardprobe [0], gewonnen gemäß 8.5.3, sind.

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

wobei

 R_{III} der Eichfaktor von Peak III ist; $A_{III}[0]$ und $A_{III}[5]$ die Flächen des Peaks III der Standardproben [0] bzw. [5], gewonnen gemäß 8.5.3, sind;

W der Gehalt an Labmolke in Standardprobe [5], d. h. 5 ist.

9.1.2. Berechnung der relativen Flächen der Peaks der Probe [E]:

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

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

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

wobei

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ die relativen Flächen der Peaks II, III und IV der Probe [E] sind;
 $A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ die Flächen der Peaks II, III und IV der Probe [E], gewonnen nach 8.4.2, sind;
 R_{II} , R_{III} , R_{IV} die Eichfaktoren, berechnet nach 9.1.1, sind.

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

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

wobei

$RRT_{III} [E]$ die relative Retentionszeit für Peak III der Probe [E] ist;
 $RT_{III} [E]$ die Retentionszeit für Peak III der Probe [E], gewonnen gemäß 8.4.2, ist;
 $RT_{III} [5]$ die Retentionszeit für Peak III der Standardprobe [5], gewonnen gemäß 8.5.3, ist.

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 Labmolkenpulver bis zu einer Konzentration von 10 % eine lineare Abhängigkeit besteht:

- Die $RRT_{III} [E]$ ist $< 1,000$, wenn der Gehalt an Labmolke $> 5 \%$ ist;
- die $RRT_{III} [E]$ 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 Labmolkenpulver in der Probe

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

wobei

W dem prozentualen Massenanteil an Labmolke in der Probe [E] entspricht;
 $S_{III} [E]$ die relative Fläche von Peak III der Probe [E], bestimmt nach 9.1.2, ist;
 1,3 der relativen durchschnittlichen Fläche von Peak III, ausgedrückt in g pro 100 g Labmolke, wie sie in unverfälschtem Magermilchpulver unterschiedlicher Herkunft gefunden wurde, entspricht. Dieser Wert wurde experimentell bestimmt;
 $S_{III} [0]$ die relative Fläche von Peak III ist; sie entspricht $R_{III} \times A_{III} [0]$. Diese Werte wurden gemäß 9.1.1 und 8.5.3 gewonnen;
 $(S_{III} [0] - 0,9)$ der Korrektur der relativen durchschnittlichen Fläche von 1,3 entspricht, falls der Wert von $S_{III} [0]$ größer oder kleiner als 0,9 ist. Die experimentell bestimmte relative durchschnittliche Fläche von Peak III der Standardprobe [0] ist 0,9.

9.3. Genauigkeit der Methode

9.3.1. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Probenmaterial mit den gleichen Geräten innerhalb einer kurzen Zeitspanne erhält, darf 0,2 % (m/m) nicht überschreiten.

9.3.2. Reproduzierbarkeit

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

9.4. Interpretation der Ergebnisse

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

wobei

2,0 der maximal erlaubte Wert für die relative Fläche von Peak III, also 1,3 unter Berücksichtigung der Unsicherheit, bedingt durch die Variationen in der Zusammensetzung von Magermilchpulver, und der Reproduzierbarkeit der Methode (9.3.2) ist;

$(S_{III} [0] - 0,9)$ der Korrektur, die vorgenommen werden muss, wenn die Fläche $S_{III} [0]$ von 0,9 verschieden ist (siehe 9.2), entspricht.

- 9.4.2. Ist die relative Fläche von Peak III, $S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ und die relative Flächen des Peaks II, $S_{II} [E] \leq 160$, muss der Labmolkegehalt gemäß Punkt 9.2 errechnet werden.

- 9.4.3. Ist die relative Fläche von Peak III, $S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ und die relative Fläche von Peak II, $S_{II} [E] > 160$, so ist der Gesamteiweißgehalt (P %) zu bestimmen; anschließend die Schaubilder 1 und 2 prüfen.

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

Die Gerade, die einen durchgezogenen Strich bildet, stellt die Gerade der linearen Regression dar, deren Koeffizienten nach dem Verfahren der kleinsten Quadrate errechnet wurden.

Die mit gestrichelter Linie dargestellte Gerade setzt die Obergrenze der relativen Oberfläche von Peak III mit einer Wahrscheinlichkeit fest, die in 90 % der Fälle nicht überschritten wird.

Die Gleichungen der Geraden in gestrichelter Linie der Schaubilder 1 und 2 lauten jeweils:

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

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

wobei

S_{III} die relative Fläche von Peak III, berechnet entweder nach dem Gesamteiweißgehalt oder nach der relativen Oberfläche von Peak $S_{III} [E]$, ist;

P % der Gesamteiweißgehalt, ausgedrückt in Gewichtsprozenten, ist;

$S_{II} [E]$ die relative Fläche der unter Punkt 9.1.2 errechneten Probe darstellt.

Die Gleichungen sind gleichwertig bei dem Wert 1,3 gemäß Punkt 9.2.

Der Abstand (T_1 und T_2) zwischen der gefundenen relativen Fläche $S_{III} [E]$ und der relativen Oberfläche S_{III} wird aus folgenden Gleichungen abgeleitet

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

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

- 9.4.3.2. Sind T_1 und/oder T_2 kleiner als oder gleich Null, so lässt sich das Vorhandensein von Labmolke nicht nachweisen.

Sind T_1 und T_2 über Null, so kann auf Anwesenheit von Labmolke geschlossen werden.

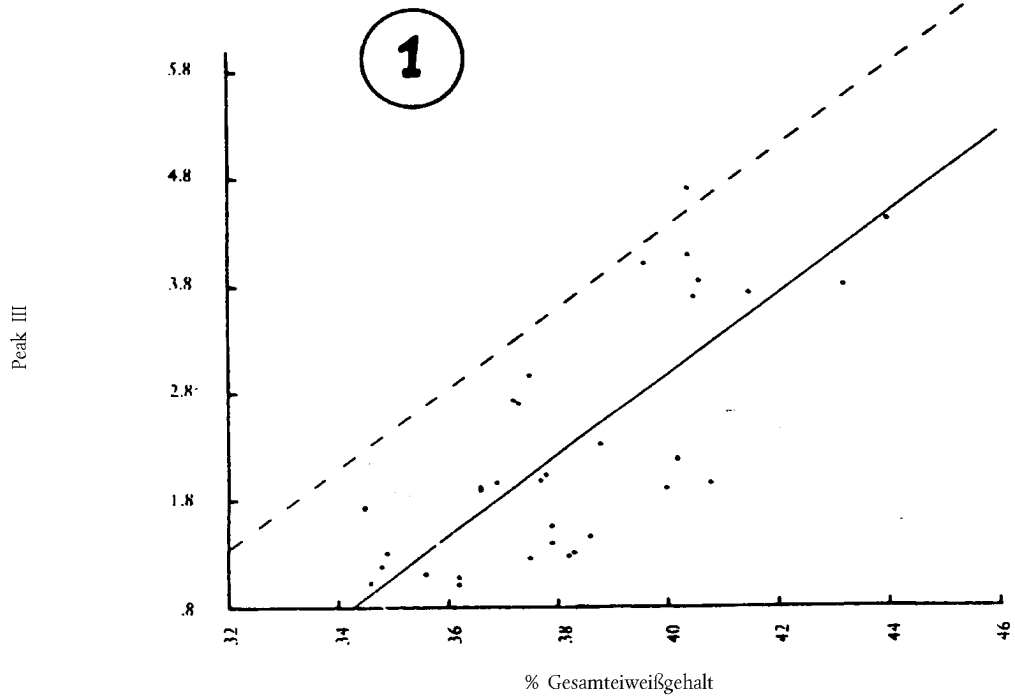
Der Gehalt an Labmolke wird nach der folgenden Formel errechnet:

$$W = T_2 + 0,91$$

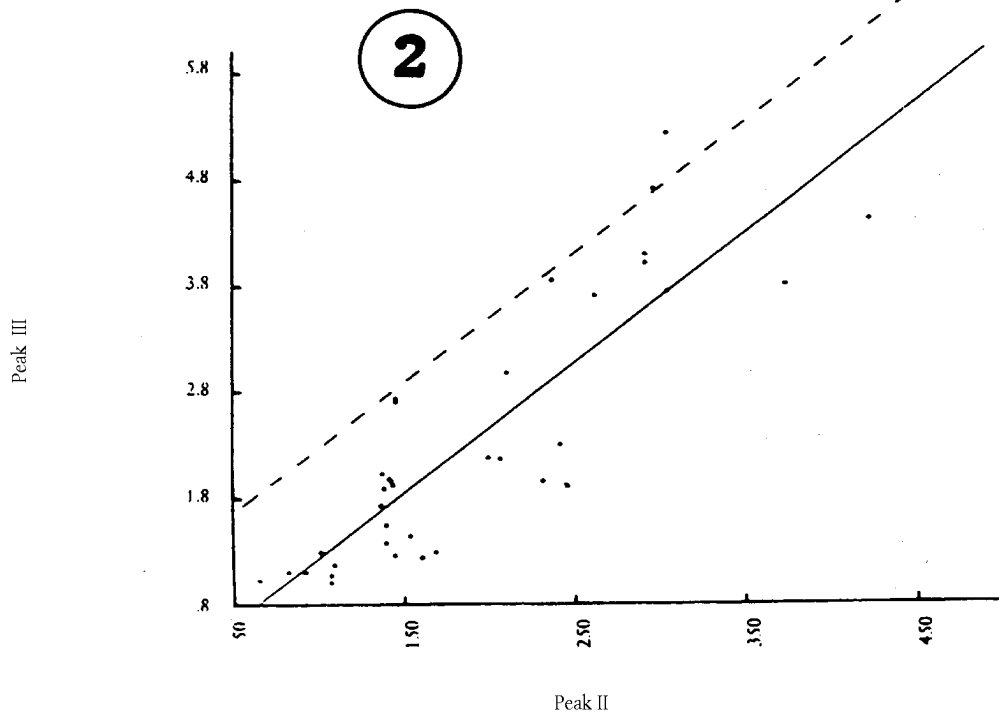
wobei

0,91 den Abstand zwischen der Geraden in durchgezogener Linie und der Geraden in gestrichelter Linie auf der vertikalen Achse bildet.

MAGERMILCHPULVER



MAGERMILCHPULVER



ANHANG XIX

(Artikel 13)

BESTIMMUNG VON LABMOLKENPULVER IN MAGERMILCHPULVER UND MISCHUNGEN IM SINNE DER VERORDNUNG (EG) Nr. 2799/1999**1. Zweck: Nachweis des Zusatzes von Labmolkenpulver zu:**

- a) Magermilchpulver im Sinne von Artikel 2 der Verordnung (EG) Nr. 2799/1999 und
- b) Mischungen im Sinne von Artikel 4 der Verordnung (EG) Nr. 2799/1999

2. Referenzverfahren: Internationale Norm ISO 707**3. Begriffsbestimmung**

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

4. Prinzip

Bestimmung des Gehalts an Glycomakropeptid A gemäß Anhang XVIII. Proben mit positivem Ergebnis werden mit dem HPLC-Verfahren (Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie) auf Glycomakropeptid A untersucht. Das Ergebnis wird im Vergleich zu Standardproben aus molkefreiem und molkehaltigem Magermilchpulver mit bekanntem Gehalt ausgewertet. Labmolkenpulver gilt als nachgewiesen, wenn das Ergebnis größer ist als 1 % Massenanteil.

5. Reagenzien

Alle Reagenzien müssen von anerkannt analysenreiner Qualität sein. Bei dem verwendeten Wasser muss es sich um destilliertes Wasser oder Wasser eines mindestens gleichwertigen Reinheitsgrads handeln. Die Reinheit von Acetonitril muss den Anforderungen der Spektroskopie bzw. der HPLC genügen.

Die für das Verfahren erforderlichen Reagenzien sind in Anhang XVIII dieser Verordnung aufgeführt.

Reagenzien für die Umkehrphasen-HPLC:

5.1. Trichloressigsäurelösung

240 g Trichloressigsäure (CCl_3CCOOH) werden in Wasser gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.

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 mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Elutionsmittel B: 550 ml Acetonitril, 20 ml Isopropanol und 1,00 ml Trifluoressigsäure (TFA) werden mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Vor der Verwendung wird die Elutionslösung durch einen Membranfilter mit 0,45 μm Porendurchmesser filtriert.

5.3. Konservierung der Säule

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

5.4. Standardproben

- 5.4.1. Magermilchpulver entsprechend den Anforderungen für die öffentliche Lagerhaltung, d. h. (0).
- 5.4.2. Dasselbe Magermilchpulver versetzt mit 5 % Massenanteil Labmolkenpulver der Standardzusammensetzung, d. h. (5).
- 5.4.3. Dasselbe Magermilchpulver versetzt mit 50 % Massenanteil Labmolkenpulver der Standardzusammensetzung, d. h. (50) ⁽¹⁾.

6. Geräte

Die für das beschriebene Verfahren erforderlichen Geräte sind in Anhang XVIII dieser Verordnung aufgeführt.

6.1.1. Analysenwaage

- 6.2. Zentrifuge zur Erzeugung einer Zentrifugalbeschleunigung von 2 200 g, ausgerüstet mit verschließbaren Röhrcchen mit ca. 50 ml Volumen

⁽¹⁾ Labmolkenpulver der Standardzusammensetzung sowie damit versetztes Magermilchpulver sind erhältlich bei: NIZO, Kernhemseweg 2, Postbus 20, NL-6710 BA Ede. Es kann jedoch auch Pulver verwendet werden, das mit dem NIZO-Pulver vergleichbare Ergebnisse gewährleistet.

- 6.3. Mechanisches Schüttelgerät zum Schütteln bei 50 °C
- 6.4. Magnetrührer
- 6.5. Glasrichter, 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. Graduierte Pipetten, Nennvolumen 10 ml (ISO 648, Klasse A oder ISO/R 835) bzw. ein Pipettiersystem zum Überführen von 10,0 ml in 2 Minuten
- 6.9. Thermostatisierbares Wasserbad, einstellbar auf 25 °C ± 0,5 °C
- 6.10. HPLC-Ausrüstung, bestehend aus:
 - 6.10.1. Pumpensystem für binäre Gradienten
 - 6.10.2. Injektionsventil, manuell oder automatisch, Nennvolumen 100 µl
 - 6.10.3. Dupont-Protein-Plus-Säule (25 × 0,46 cm Innendurchmesser) oder gleichwertige großporige Umkehrphasen-Säule auf Silicagelbasis
 - 6.10.4. Thermostatisierbarer Säulenofen, einstellbar auf 35 ± 1 °C
 - 6.10.5. UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung zur Messung bei 210 nm mit einer Empfindlichkeit von 0,02 AA (bei Bedarf kann auch eine Wellenlänge von bis zu 220 nm verwendet werden)
 - 6.10.6. Integrator zur Messung der Peak-Höhe.

Anmerkung

Die Säule kann auch bei Raumtemperatur betrieben werden, sofern diese um höchstens 1 °C schwankt; andernfalls verändert sich die Retentionszeit für GMPA zu stark.

7. Probenahme

- 7.1. Die Probenahme erfolgt nach der internationalen Norm ISO 707. Die Mitgliedstaaten können jedoch ein anderes Probenahmeverfahren anwenden, sofern es den Prinzipien der vorgenannten 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 Probe

Das Milchpulver wird in einen ungefähr das doppelte Volumen fassenden Behälter mit luftdichtem Verschluss übergeführt. Der Behälter ist sofort zu verschließen. Das Milchpulver wird durch mehrmaliges Stürzen des Behälters vollständig durchmischt.

8.2. Probeneinwaage

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

8.3. Entfernen von Fett und Eiweiß

- 8.3.1. Die Probeneinwaage wird mit 20,0 g warmem Wasser (50 °C) versetzt. Zum Auflösen wird das Pulver mit Hilfe eines mechanischen Schüttelgerätes (6.3) 5 Minuten bzw. bei saurer Buttermilch 30 Minuten gerüttelt. Das Röhrchen wird in ein Wasserbad (6.9) übergeführt und bei 25 °C stehen gelassen.
- 8.3.2. 10,0 ml Trichloressigsäurelösung von 25 °C (5.1) werden gleichmäßig innerhalb von 2 Minuten unter kräftigem Rühren mit Hilfe des Magnetrührers (6.4) zugesetzt. Das Röhrchen wird in ein Wasserbad (6.9) gestellt und 60 Minuten stehen gelassen.
- 8.3.3. 2 200 g werden 10 Minuten lang zentrifugiert (6.2) oder durch Filterpapier (6.6) filtriert, wobei die ersten 5 ml des Filtrats zu verwerfen sind.

8.4. Chromatographische Bestimmung

- 8.4.1. Eine HPLC-Analyse gemäß Anhang XVIII durchführen. Bei negativem Befund enthält die analysierte Probe keine nachweisbaren Mengen an Labmolkenpulver. Bei positivem Befund ist das nachstehend beschriebene Umkehrphasen-HPLC-Verfahren durchzuführen. Bei Anwesenheit von saurem Buttermilchpulver kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Dies ist beim Umkehrphasen-HPLC-Verfahren ausgeschlossen.

- 8.4.2. Bevor das Umkehrphasen-HPLC-Verfahren durchgeführt wird, sind die Gradientenbedingungen zu optimieren. Eine GMP_A -Retentionszeit von 26 Minuten \pm 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 labmolkenfreier Standardproben (5.4) und von Standardproben mit 50 % Labmolkeanteil.

100 μ l des Überstandes bzw. 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 chromatographische Bestimmung

Zeit (Minuten)	Fluß (ml/Minute)	% A	% B	Kurve
Start	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

Beim Vergleich beider Chromatogramme müßte die Lage des GMP_A -Peaks festzustellen sein.

Die Zusammensetzung der Ausgangslösung für den Normalgradienten (8.4.3) ergibt sich aus der nachstehenden Formel:

$$\begin{aligned} \% B &= 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{GMP_A} - 26)/6) * 30/27 \\ \% B &= 7,5 + (13,5 + (RT_{GMP_A} - 26)/6) * 11. \end{aligned}$$

Hierin bedeuten:

- RT_{GMPA}: GMP-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 GMP_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 μ l des Überstandes bzw. Filtrates (8.3.3) werden in die HPLC-Apparatur injiziert, die bei einer Flussrate des Elutionsmittels (5.2) von 1,0 ml/Minute zu betreiben ist.

Die Zusammensetzung des Elutionsmittels beim Start der Analyse ist 8.4.2 zu entnehmen. Normalerweise entspricht sie einen 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.

Hinweise:

- Die Retentionszeit für Glycomakropeptid sollte 26 Minuten \pm 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.
- Die Elutionsmittel müssen ausreichend entgast werden und in diesem Zustand gehalten werden. Dies ist für den einwandfreien Betrieb des Gradientenpumpensystems von wesentlicher Bedeutung. Die Standardabweichung der Retentionszeit für den GMP-Peak sollte kleiner sein als 0,1 Minute ($n = 10$).
- Bei jeder fünften Probe sind die Standardprobe [5] zu injizieren und ein neuer Kalibrierfaktor R (9.1.1) zu bestimmen.

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

Der Integrator (6.10.6) errechnet automatisch die Peak-Höhe H des GMP-Peaks. Die Lage der Basislinie ist bei jedem Chromatogramm zu prüfen. Bei unrichtiger Lage der Basislinie ist die Analyse bzw. die Integration erneut durchzuführen.

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 genau demselben Verfahren wie bei 8.2 bis 8.4.4 unterzogen. Dabei sind frisch angesetzte Lösungen zu verwenden, da GMP in achtprozentiger Trichloressigsäure bei Raumtemperatur abgebaut wird. Die Lösung ist bei 4 °C 24 Stunden haltbar. Bei langen Versuchsreihen empfiehlt es sich, im automatischen Aufgabensystem einen gekühlten Probenträger zu verwenden.

Hinweis:

8.4.2 kann entfallen, sofern der prozentuale Anteil von R beim Start 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 GMP_A-Peak. Es ist unbedingt für eine analoge Trennung zu sorgen.

- 8.5.2. Vor der chromatographischen Bestimmung der Proben sind 100 µl der labmolkefreien [5] (5.4.1) Standardprobe zu injizieren.

Das entsprechende Chromatogramm darf bei der Retentionszeit des GMP_A-Peaks keinen Peak zeigen.

- 8.5.3. Der Kalibrierfaktor R ist nach Injektion des gleichen Filtratvolumens wie bei den Proben (8.5.1) zu bestimmen.

9. Darstellung der Ergebnisse

9.1. Berechnungsformel

- 9.1.1. Berechnung des Kalibrierfaktors R

GMP-Peak: $R = W/H$

Hierin bedeuten

R = Kalibrierfaktor des GMP-Peaks,

H = Höhe des GMP-Peaks,

W = Labmolkegehalt der Standardprobe [5].

- 9.2. Berechnung des Labmolkenpulvergehalts der Probe in Prozent

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

Hierin bedeuten:

W[E] = prozentualer Massenanteil an Labmolkenpulver in der Probe [E],

R = Kalibrierfaktor des GMP-Peaks (9.1.1),

H[E] = Höhe des GMP-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, so enthält die Probe Labmolkenpulver.

9.3. Genauigkeit der Methode

- 9.3.1. Wiederholbarkeit:

Die Differenz der Ergebnisse zweier Untersuchungen, die mit identischem Untersuchungsmaterial unter denselben Versuchsbedingungen von demselben Untersucher gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander durchgeführt werden, darf den Wert 0,2 % Massenanteil nicht überschreiten.

9.3.2. Vergleichbarkeit

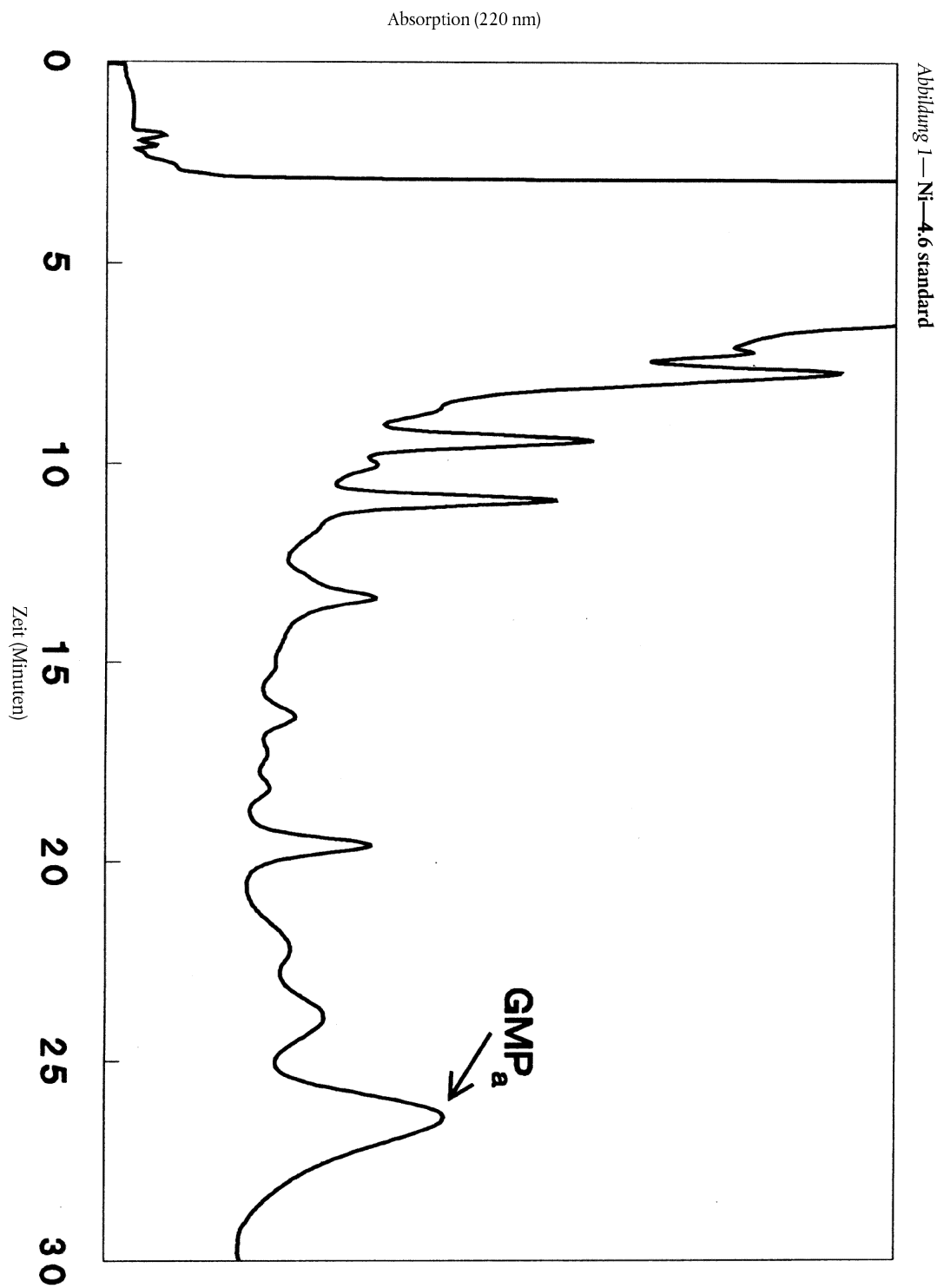
Nicht bekannt.

9.3.3. Linearität

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

9.4. Auswertung

9.4.1. Labmolke gilt als nachgewiesen, wenn man gemäß Nummer 9.2 mehr als 1 % Massenanteil findet und die Retentionszeit des GMP-Peaks um weniger als 0,2 Minuten von der der Standardprobe [5] abweicht. Die 1%-Grenze wurde gemäß den Vorschriften des Anhangs V Nummern 9.2 und 9.4.1 der Verordnung (EWG) Nr. 625/79 festgesetzt.



ANHANG XX

(Artikel 14)

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

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) in Magermilchpulver (SMP) und ist auch 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 Milligramm Phosphatidylethanolamin-Dipalmitoyl (PEDP) je 100 g Pulver ausgedrückt.

3. PRINZIP

Extraktion von Aminophospholipiden aus dem rekonstituierten Milchpulver mit Hilfe 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, sofern nichts anderes angegeben ist.

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 für HPLC

4.2.2. Chloroform für HPLC

4.2.3. Tryptamin-monohydrochlorid

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*

Die Elutionsmittel müssen mit HPLC-reinen Reagenzien zubereitet werden.

4.4.1. Wasser für HPLC

4.4.2. Methanol für die fluorimetrische Messung

4.4.3. Tetrahydrofuran

4.4.4. Natriumdihydrogenphosphat

4.4.5. Natriumacetat

4.4.6. Essigsäure

5. GERÄTE

5.1. Analysenwaage

5.2. Becher, 25 und 100 ml

5.3. Pipetten, 1 und 10 ml

5.4. Magnetrührer

- 5.5. Messpipetten, 0,2, 0,5 und 5 ml
- 5.6. Messkolben, 10, 50 und 100 ml
- 5.7. Spritzen, 20 und 100 μ l
- 5.8. Ultraschallbad
- 5.9. Zentrifuge mit $27\,000 \times g$
- 5.10. Glasfläschchen, rund 5 ml
- 5.11. Messzylinder, 25 ml
- 5.12. pH-Meter
- 5.13. HPLC-Ausrüstung
 - 5.13.1. Gradientenpumpe für 1,0 ml/min bei 200 bar
 - 5.13.2. Automatischer Probengeber mit Derivatisierungsmöglichkeit
 - 5.13.3. Säulenofen, auf 30 °C eingestellt
 - 5.13.4. Fluoreszenzdetektor mit 330 nm Anregungs- und 440 nm Emissionswellenlänge
 - 5.13.5. Integrator oder Datenverarbeitungs-Software für Peakflächenmessungen
 - 5.13.6. Lichrosphere-100-Säule (250 \times 4,6 mm) oder äquivalente mit Octadecylsilan (C18) gepackte Säule, Partikelgröße 5 μ m

6. PROBENAHME

Die Probenahme ist nach der IMV-Norm 50B.1985 durchzuführen.

7. VERFAHREN

7.1. Zubereitung der internen Standardlösung

Es werden 30,0 mg (\pm 0,1 mg) Tryptamin-monohydrochlorid (4.2.3) in einen 100-ml-Messkolben (5.6) eingewogen und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt. Von dieser Lösung wird 1 ml in einen 10-ml-Messkolben (5.6) einpipettiert (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

Es werden 1 000 g (\pm 0,001 g) der SNP-Probe in einen 25-ml-Becher (5.2) gegeben, 10 ml destilliertes Wasser bei 40 °C mit einer Pipette (5.3) zugegeben und mit einem Magnetrührer (5.4) 30 Minuten lang gemischt, um etwaige Klümpchen aufzulösen. Danach werden 0,2 ml der rekonstituierten Milch (5.5) in einen 10-ml-Messkolben (5.6) einpipettiert und 100 μ l der 0,15 mM-Tryptaminlösung (7.1) mit einer Spritze (5.7) zugegeben und mit Methanol (4.2.1) bis zur Marke aufgefüllt. Sorgfältig durch Umdrehen des Kolbens mischen und 15 Minuten ins Ultraschallbad (5.8) geben. Bei $27\,000 \times g$ 10 Minuten zentrifugieren (5.9) und den Überstand in einem Glasfläschchen (5.10) auffangen.

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

7.3. Zubereitung der externen Standardlösung

Es werden 55,4 mg PEDP (4.1) in einen 50-ml-Messkolben (5.6) eingewogen und rund 25 ml Chloroform (4.2.2) mit einem Messzylinder (5.11) zugegeben. Der verschlossene Kolben wird auf 50 °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 Umdrehen des Kolbens gemischt. 1 ml dieser Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben (5.6) einpipettiert (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) einpipettiert (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. Durch Umdrehen des Kolbens mischen.

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

7.4. Vorbereitung des Derivatisierungsreagens

Es werden 25,0 mg (\pm 0,1 mg) OPA (4.3.4) 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. Bis zur Marke mit der Borsäurelösung (4.3.2) auffüllen und mit einer Spritze (5.7) 20 μ l 2-Mercaptoethanol (4.3.3) zugeben.

Anmerkung: Das Derivatisierungsreagens bei 4 °C in einer dunklen Glasflasche aufbewahren; es bleibt eine Woche stabil.

7.5. HPLC-Bestimmung

7.5.1. Elutionslösungen (4.4)

Lösungsmittel A:

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

Lösungsmittel B:

Methanol

7.5.2. Vorschlag für Elutionsgradienten:

Zeit (min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)	Durchflussgeschwindigkeit (ml/min)
Anfang	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. Säulenäquilibrierung

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

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

7.5.5. Bestimmung des PS- + PE-Gehalts in der Testprobe

7.5.6. Die chromatographische Analyse wird 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 alle 5-10 Testproben eingespritzt, damit der Responsefaktor 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. Integration

7.6.1. PEDP-Peak

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

7.6.2. Tryptamin-Peak

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

7.6.3. PS- und PE-Peakgruppen

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

8. BERECHNUNG UND AUSDRUCK DER ERGEBNISSE

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

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

Dabei sind:

- C = PS- oder PE-Gehalt (mg/100 g Pulver in der Testprobe)
A₁ = PEDP-Peakfläche der Standard-Probenlösung (7.3)
A₂ = PS- oder PE-Peakfläche der Testprobe (7.2)
T₁ = Tryptamin-Peakfläche der Standard-Probenlösung (7.3)
T₂ = Tryptamin-Peakfläche der Testprobe (7.2).

9. GENAUIGKEIT

Anmerkung: Die Werte für die Wiederholbarkeit wurden nach der Internationalen IMV-Norm berechnet ⁽¹⁾. Die vorläufige Vergleichbarkeitsschwelle wurde gemäß Anhang III Buchstabe b) berechnet.

9.1. Wiederholbarkeit

Die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit 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, so 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, so 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.), *Détection des solides du babeurre dans le lait écrémé en poudre par dosage des aminophospholipides à la CLHP*, Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39, 395 (1988).

⁽¹⁾ International IDF-Standard 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure (Konzept für einen Ringversuch).

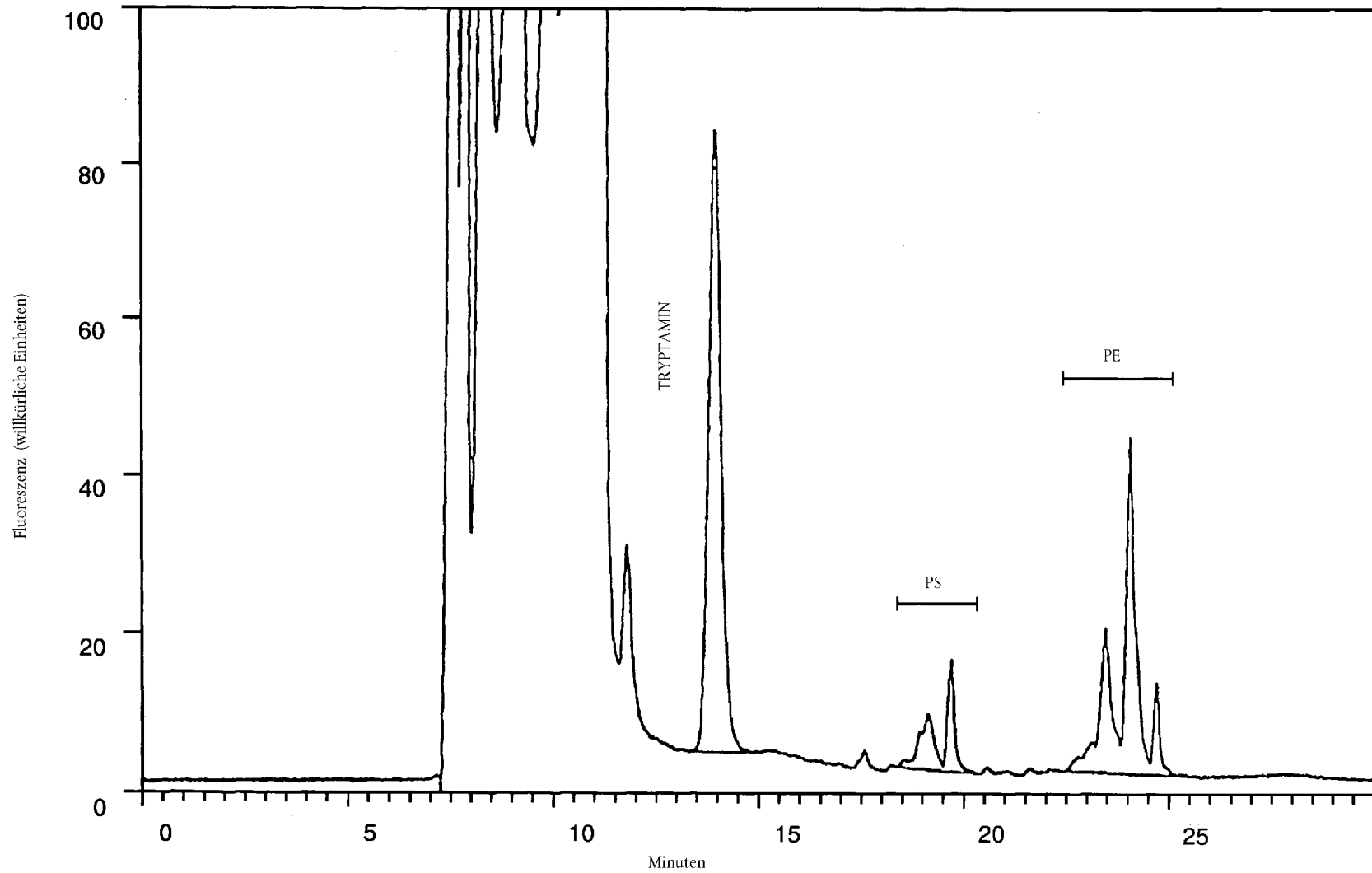


Abbildung 1: HPLC-Ergebnis für die OPA-Derivate Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) in einem Methanol-Extrakt aus rekonstituiertem Magermilchpulver. Die Integrationsform für die Peaks von PS, PE und Tryptamin (interner Standard) ist eingezeichnet.

ANHANG XXI

(Artikel 15)

FESTSTELLUNG DER RÜCKSTÄNDE VON ANTIBIOTIKA UND SULFONAMIDEN/DAPSON IN MAGERMILCH-PULVER

Es muss ein Hemmstoff-Screeningtest für Antibiotika mit *Bacillus stearotherophilus* var. *calidolactis* C953 als Testorganismus durchgeführt werden, der empfindlich genug ist, um 4 µg Benzylpenicillin je Liter Milch und 100 µg Sulfonamide je Liter Milch nachzuweisen. Handelsübliche Tests können verwendet werden, sofern sie für Benzylpenicillin und Sulfonamide ausreichend empfindlich sind ⁽¹⁾.

Für den Test wird rekonstituiertes Magermilchpulver verwendet (1 g Pulver + 9 ml destilliertes Wasser). Der Test wird gemäß IDF-Bulletin Nr. 258/1991, Teil 1 Kapitel 2, oder nach den Anweisungen des Testherstellers durchgeführt.

Positive Ergebnisse sind folgendermaßen zu interpretieren:

1. Der Test wird unter Zugabe von Penicillinase wiederholt:
positives Ergebnis: Hemmstoff kann mit diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden;
negatives Ergebnis: Der Hemmstoff ist ein Beta-Lactam-Antibiotikum.
2. Der Test wird unter Zugabe von p-Aminobenzoesäure wiederholt:
positives Ergebnis: Hemmstoff kann mit diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden;
negatives Ergebnis: Der Hemmstoff ist ein Sulfonamid/Dapson.
3. Der Test wird unter Zugabe von Penicillinase + p-Aminobenzoesäure wiederholt:
positives Ergebnis: Der Hemmstoff kann mit diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden;
negatives Ergebnis: Der Hemmstoff ist ein Beta-Lactam-Antibiotikum und ein Sulfonamid/Dapson.

⁽¹⁾ *Wichtiger Hinweis:* Bei der Analyse von Magermilchpulver können falsch-positive Ergebnisse auftreten. Es muss daher unbedingt sichergestellt werden, dass der Test keine falsch-positiven Ergebnisse erbringen kann.

ANHANG XXII

(Artikel 16)

BESTIMMUNG DES GEHALTS AN MAGERMILCHPULVER IN MISCHFUTTERMITTELN ÜBER PARAKASEIN NACH ENZYMATISCHER GERINNUNG**1. Ziel**

Bestimmung des Gehalts an Magermilchpulver in einem Mischfuttermittel über Parakasein nach enzymatischer Gerinnung.

2. Anwendungsbereich

Diese Methode gilt für Mischfuttermittel mit einem Anteil an Magermilchpulver von mindestens 10 %; das Vorhandensein größerer Mengen von Buttermilch und/oder bestimmter Nichtmilchproteine kann Interferenzen zur Folge haben.

3. Grundlagen der Methode

- 3.1. Lösung des im Mischfuttermittel enthaltenen Kaseins durch Extraktion mit Natriumcitrat.
- 3.2. Wiederherstellung der zur Ausfällung des Kaseins notwendigen Kalziumionenkonzentration; Umwandlung des Kaseins zu Parakasein durch Einwirkung von Lab.
- 3.3. Bestimmung des Parakaseinstickstoffs nach Aufschluss nach dem Kjeldahl-Verfahren gemäß Der IDF 20 A 1986. Berechnung des Gehalts an Milchpulver aufgrund eines Kaseingehalts von mindestens 27,5 % (vgl. Nummer 9.1).

4. Reagenzien

Die Reagenzien müssen den zu Analyse Zwecken erforderlichen Reinheitsgrad aufweisen. Als Wasser ist destilliertes Wasser oder Wasser von gleichem Reinheitsgrad zu verwenden. Mit Ausnahme des Labs (4.5) müssen alle verwendeten Reagenzien und Lösungen frei von stickstoffhaltigen Stoffen sein.

- 4.1. Trinatriumcitrat als Dihydrat (Lösung zu 1 % G/V).
- 4.2. Kalziumchlorid (2M-Lösung). 20,018 g CaCO_3 (analysenrein) in einem Porzellangefäß angemessener Größe (150 bis 200 ml) oder einem Becherglas abwägen. Mit destilliertem Wasser bedecken und in ein siedendes Wasserbad setzen. Langsam 50 bis 60 ml einer HCl-Lösung (Konzentration HCl:Wasser = 1:1) zusetzen, um das Karbonat vollkommen aufzulösen. Bis zur Trocknung von CaCl_2 im siedenden Wasserbad halten, um das HCl auszutreiben, das nicht reagiert hat. Mit destilliertem Wasser in einen Meßkolben von 100 ml überführen und bis zum Eichstrich auffüllen. Den pH-Wert kontrollieren, der nicht unter 4,0 liegen darf. Die Lösung im Kühlschrank aufbewahren.
- 4.3. Natriumhydroxid 0,1 N.
- 4.4. Salzsäure 0,1 N.
- 4.5. 1:10 000 standardisierte Lablösung (reines Kälbermagenlab); im Kühlschrank bei 4 bis 6 °C aufbewahren.
- 4.6. Reagenzien für die Stickstoffbestimmung nach dem Kjeldahl-Verfahren nach der IDF 20 A 1986.

5. Geräte

Übliche Laborgeräte, insbesondere:

- 5.1. Mörser oder Homogenisierungsgerät (Homogenisator)
- 5.2. Analysewaage
- 5.3. Tischzentrifuge (2 000 bis 3 000 Umdrehungen/Minute) mit 50-ml-Zentrifugenröhren
- 5.4. Magnetrührwerk mit Rührstäben von 10 bis 15 mm
- 5.5. Bechergläser mit 150 bis 200 ml
- 5.6. Destillierkolben 250 ml und 500 ml
- 5.7. Glastrichter, Durchmesser 60 bis 80 mm
- 5.8. Aschefreie Schnellfiltrier-Rundfilter, Durchmesser 150 mm (S.S. 589², S.S. 595 1/2)
- 5.9. Pipetten verschiedener Größe

- 5.10. Wasserbad thermostatisierbar auf 37 °C
- 5.11. pH-Meßgerät
- 5.12. Kjeldahl-Aufschluß- und Destillierkolben mit Zubehör
- 5.13. Meßbürette 25 ml zum Titrieren
- 5.14. Spritzflasche für destilliertes Wasser
- 5.15. Rührspachtel aus Edelstahl (rostfreiem Stahl)
- 5.16. Thermometer
- 5.17. Thermostatisierbarer Trockenschrank.

6. Verfahren

- 6.1. Probenvorbereitung.

10 bis 20 g Probe in einem Mörser zerkleinern oder im Homogenisiergerät (Mischer) durchführen, um eine homogene Mischung zu erhalten.
- 6.2. Milchpulver auflösen und nichtlöslichen Rückstand abtrennen.
 - 6.2.1. 1,000 ± 0,002 g gut homogenisiertes Mischfutter (6.1) direkt in ein Zentrifugierrohr von 50 ml einwiegen. 30 ml Trinatriumcitrat (4.1), das auf 45 °C erwärmt worden ist, hinzufügen. Pulver 5 Minuten durch Rühren mittels Magnetrührer auflösen.
 - 6.2.2. 10 Minuten bei 500 g (2 000 bis 3 000 Umdrehungen/Minute) zentrifugieren und den Überstand in ein Becherglas von 150 bis 200 ml abgießen. Der Verlust an Niederschlag während des Abgießens ist zu vermeiden.
 - 6.2.3. Zwei weitere Extraktionen aus dem Rückstand werden nach dem gleichen Verfahren durchgeführt; die drei wässrigen Extrakte mischen.
 - 6.2.4. Scheidet sich Fett ab, so kühle man bis zur Verfestigung der Fettphase ab und entferne diese mit einem Spachtel.
- 6.3. Gerinnung des Kaseins durch Labenzyme.
 - 6.3.1. Zum wässrigen Gesamtextrakt (rund 100 ml) tropfenweise unter Umrühren 3,4 ml gesättigte Kalziumchloridlösung (4.2) hinzufügen. pH mit verdünnter NaOH (4.3) oder HCl (4.4) auf 6,4 bis 6,5 einstellen. Lösung 15 bis 20 Minuten in einem thermostatisierbaren Wasserbad von 37 °C lassen, bis sich das Salzgleichgewicht eingestellt hat. Dies äußert sich durch ein milchiges Aussehen.
 - 6.3.2. Die Flüssigkeit in ein (oder zwei) Zentrifugenröhrchen umfüllen und 10 Minuten bei 2 000 g zentrifugieren, um die Ausfällungen zu entfernen. Den Überstand ohne Waschen des Niederschlags in ein (oder zwei) Zentrifugenröhrchen abgießen.
 - 6.3.3. Den Überstand wieder auf eine Temperatur von 37 °C bringen. Tropfenweise unter Umrühren 0,56 ml der Lablösung (4.5) hinzufügen. Die Gerinnung tritt nach 1 bis 2 Minuten ein.
 - 6.3.4. Die Probe ins Wasserbad zurückstellen und 15 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C stehen lassen. Aus dem Wasserbad nehmen und das Koagulum durch Umrühren aufbrechen. 10 Minuten bei 2 000 g zentrifugieren. Den Überstand durch ein geeignetes Filterpapier⁽¹⁾ (Whatman Nr. 541 oder ähnliches) filtern. Das Filterpapier aufbewahren. Den Niederschlag in dem Zentrifugenröhrchen mit 50 ml Wasser und bei einer Temperatur von rund 35 °C durch Umrühren waschen.

Nochmals 10 Minuten bei 2 000 g zentrifugieren. Den Überstand durch das vorher aufbewahrte Filterpapier filtern.
- 6.4. Bestimmung des Kaseinstickstoffs.
 - 6.4.1. Nach dem Waschen den Niederschlag unter Verwendung von destilliertem Wasser quantitativ auf das gemäß Nummer 6.3.4 aufbewahrte Filterpapier überführen. Das Filterpapier in den Kjeldahl-Kolben einbringen. Den Stickstoff nach dem in der IDF 20 A 1986 festgelegten Kjeldahl-Verfahren bestimmen.

7. Blindversuch

- 7.1. Ein Blindversuch mit einem aschenfreien Filter (5.8), der mit einer Mischung aus 90 ml einer Natriumcitratlösung (4.1), 1 ml einer gesättigten Kalziumchloridlösung (4.2), 0,5 ml flüssigem Lab (4.5) benetzt und vor der Mineralisierung nach dem Kjeldahl-Verfahren gemäß der IDF 20 A 1986 mit 3 × 15 ml gewaschen wird, ist systematisch durchzuführen.
- 7.2. Das für den Blindversuch erforderliche Säurevolumen (4.4) von dem zur Titration der geprüften Musterprobe verbrauchten Volumen abziehen.

⁽¹⁾ Es ist ein schnellfilterndes aschefreies Papier zu verwenden.

8. Kontrollversuch

- 8.1. Zur Kontrolle des Analyseverfahrens und der oben erwähnten Reagenzien ist eine Bestimmung mit einem Mischfutter von standardisierter Zusammensetzung durchzuführen, dessen bekannter Gehalt an Magermilchpulver über eine Ringanalyse bestimmt worden ist. Das durchschnittliche Ergebnis einer Doppelbestimmung soll um nicht mehr als 1 % von dem durch die Ringanalyse erhaltenen Ergebnis abweichen.

9. Darstellung der Ergebnisse

- 9.1. Der Gehalt an Magermilchpulver in einem Mischfuttermittel wird nach folgender Formel berechnet:

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

wobei N = Prozentsatz des Parakasein-Stickstoffes; 27,5 = Faktor zur Umrechnung des ermittelten Kaseins in Prozent Magermilchpulver; 2,81 und 0,908 die aus der Regressionsanalyse erhaltenen Berichtigungsfaktoren.

10. Genauigkeit des Verfahrens**10.1. Wiederholbarkeit**

In mindestens 95 % der untersuchten Fälle darf der Unterschied zwischen zwei einzelnen mit der gleichen Probe im gleichen Labor vom gleichen Prüfer erhaltenen Ergebnissen 2,3 g Magermilchpulver auf 100 g geprüftes Mischfutter nicht übersteigen.

10.2. Reproduzierbarkeit

In mindestens 95 % der untersuchten Fälle darf der Unterschied zwischen den von zwei Laboratorien mit einer gleichen Probe erhaltenen Ergebnissen 6,5 g Magermilchpulver auf 100 g untersuchtes Mischfutter nicht übersteigen.

11. Toleranzgrenze

Der CrD_{95} -Wert (kritische Differenz; 95 %-Vertrauensbereich) wird anhand folgender Formel berechnet (ISO 5725):

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

(R: Reproduzierbarkeit; r: Wiederholbarkeit)

Doppelbestimmung: $CrD_{95} = 4,5$ g.

Wenn die Differenz zwischen dem Ergebnis der chemischen Analyse (Doppelbestimmung) und dem deklarierten Magermilchpulvergehalt maximal 4,5 g beträgt, geht man davon aus, dass die Lieferung des Mischfuttermittels dieser Bestimmung der Verordnung entspricht.

12. Bemerkungen

- 12.1. Die Zugabe größerer Mengen bestimmter Nichtmilchproteine, insbesondere Sojaproteine, führt — wenn sie mit der Milch erwärmt worden sind — zu hohen Ergebnissen, da Copräzipitation dieser Stoffe gleichzeitig mit Milchparakasein erfolgt.
- 12.2. Die Zugabe von Buttermilch kann gegebenenfalls zu niedrigen Werten führen, da bei der Bestimmung nur der fettfreie Anteil erfasst wird. Die Zugabe bestimmter aus Sauerrahm gewonnener Buttermilcharten kann zu deutlich niedrigeren Werten führen, da sie in der Citrat-Lösung nur unvollständig gelöst werden.
- 12.3. Die Zugabe von mindestens 0,5 % Lecithin kann ebenfalls zu niedrige Ergebnisse zur Folge haben.
- 12.4. Die Einbeziehung von auf hohe Temperaturen (high-heat) erwärmtem Milchpulver kann zu hohe Werte zur Folge haben, da bestimmte Molkenproteine mit dem Parakasein der Milch ausfallen.

ANHANG XXIII

(Artikel 17)

QUALITATIVE BESTIMMUNG DER STÄRKE IN MAGERMILCHPULVER, DENATURIERTEM MILCHPULVER UND MISCHFUTTERMITTELN**1. Zweck und Geltungsbereich**

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Stärke als Kennzeichnungsmittel in denaturiertem Milchpulver.

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 0,05 g Stärke je 100 g der Probe.

2. Kurzbeschreibung

Dieses Verfahren beruht auf einer iodometrischen Reaktion:

- Fixierung des freien Iods durch die Kolloide in wässriger Lösung,
- Absorption durch die Stärke-Micellen und Farbentwicklung

3. Reagenzien**3.1. Iodlösung**

- Iod: 1 g,
- Kaliumiodid: 2 g,
- destilliertes Wasser: 100 ml.

4. Geräte und Hilfsmittel

- 4.1. Analysenwaage
- 4.2. Wasserbad
- 4.3. Reagenzgläser, 25 mm × 200 mm

5. Durchführung

1 g der Probe wird in das Reagenzglas (4.3) eingewogen.

Die Einwaage wird mit 20 ml destilliertem Wasser versetzt und durch Schütteln aufgelöst.

Das Reagenzglas wird fünf Minuten ins Wasserbad (4.2) gestellt.

Aus dem Wasserbad nehmen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen.

Zusatz von 0,5 ml Iodlösung (3.1), schütteln und Farbe beurteilen.

6. Auswertung

Eine Blaufärbung gilt als Nachweis für die Anwesenheit von Stärke in der Probe.

Enthält die Probe modifizierte Stärke, so tritt nicht unbedingt eine Blaufärbung ein.

7. Hinweis

Je nach Ursprung der nativen Stärke (z. B. Mais oder Kartoffel) und der Art der modifizierten Stärke in der Probe fallen Farbe, Farbintensität und mikroskopisches Erscheinungsbild der Stärke unterschiedlich aus.

Bei Anwesenheit von modifizierter Stärke erfolgt ein Farbumschlag nach Violett, Rot oder Braun, je nach Grad der Modifizierung der Kristallstruktur der nativen Stärke.

ANHANG XXIV

(Artikel 18)

BESTIMMUNG DES WASSERGEHALTES VON SAUREM BUTTERMILCHPULVER**1. Zweck**

Bestimmung des Wassergehaltes von saurem Buttermilchpulver, das für die Tierfütterung bestimmt ist.

2. Prinzip

Die Probe wird unter Vakuum getrocknet. Der Gewichtsverlust wird durch Wiegen ermittelt.

3. Geräte

3.1. Analysewaage.

3.2. Getrocknete Gefäße aus korrosionsbeständigem Metall oder Glas, mit luftdicht schließenden Deckeln; die Nutzfläche muß eine solche Verteilung der Probe ermöglichen, dass etwa 0,3 g auf 1 cm² kommen.

3.3. Elektrisch beheizter regulierbarer Vakuumtrockenschrank mit einer Ölpumpe, der entweder mit einer Vorrichtung für die Zufuhr warmer getrockneter Luft oder mit einem Trocknungsmittel (z. B. Calciumoxid) versehen ist.

3.4. Exsikkator mit einem wirksamen Trocknungsmittel.

3.5. Temperaturregelter Trockenschrank mit Lüftung, 102 ± 2 °C.

4. Verfahren

Ein Gefäß (3.2) wird zusammen mit dem Deckel im Trockenschrank (3.5) mindestens 1 Stunde lang erhitzt. Nach Aufsetzen des Deckels wird das Gefäß unverzüglich in einen Exsikkator (3.4) gestellt, auf Raumtemperatur abgekühlt und auf 0,5 mg genau gewogen.

Ein Gefäß (3.2) wird zusammen mit dem Deckel auf 0,5 mg genau gewogen. 5 g der Probe werden auf 1 mg genau in das tarierte Gefäß eingewogen und gleichmäßig verteilt. Das Gefäß wird nach Abnahme des Deckels (3.3) in einen auf 83 °C erhitzten Trockenschrank gestellt. Damit die Temperatur des Trockenschanks nicht zu stark abfällt, ist das Gefäß möglichst rasch hineinzustellen.

Der Druck wird auf 100 Torr (13,3 kPa) eingestellt und die Probe 4 Stunden lang bei diesem Druck entweder unter Zufuhr von heißer trockener Luft oder mittels eines Trocknungsmittels (etwa 300 g für 20 Proben) getrocknet. Im letzten Fall wird beim Erreichen des vorgeschriebenen Drucks die Verbindung zur Vakuumpumpe unterbrochen. Die Trocknungszeit wird von dem Zeitpunkt an gerechnet, an dem der Trockenschrank die Temperatur von 83 °C wieder erreicht hat. Der Trockenschrank wird vorsichtig wieder auf atmosphärischen Druck gebracht. Nach Öffnen des Trockenschanks wird das Gefäß sofort mit dem Deckel verschlossen, aus dem Schrank genommen, zum Abkühlen 30 bis 45 Minuten lang in den Exsikkator (3.4) gestellt und anschließend auf 1 mg genau gewogen. Sodann wird es weitere 30 Minuten im Vakuumtrockenschrank (3.3) bei 83 °C getrocknet und erneut gewogen. Der Unterschied zwischen den beiden Wäegergebnissen darf nicht mehr als 0,1 % Feuchtigkeit betragen.

5. Berechnung

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

Hierin bedeuten:

E = Anfangsmasse der Probe in Gramm,

m = Masse der trockenen Probe in Gramm.

6. Genauigkeit**6.1. Wiederholbarkeit**

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von derselben Person mit denselben Geräten am gleichen Testmaterial so rasch wie möglich nacheinander ausgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 0,4 g Wasser/100 g saures Buttermilchpulver voneinander abweichen.

6.2. *Vergleichbarkeit*

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die in verschiedenen Labors mit verschiedenen Geräten am gleichen Testmaterial durchgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 0,6 g Wasser/100 g saures Buttermilchpulver voneinander abweichen.

6.3. *Quelle der Präzisionsdaten*

Die Präzisionsdaten stammen aus einem 1995 durchgeführten Versuch, an dem 8 Labors beteiligt waren und bei dem 12 Proben (6 Blindproben) untersucht wurden.

ANHANG XXV

(Artikel 19)

REFERENZMETHODE FÜR DEN FREMDFETTNACHWEIS IN MILCHFETT DURCH GASCHROMATOGRAPHISCHE TRIGLYCERIDANALYSE — REVISION 3**1. Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von pflanzlichem und tierischem Fremdfett wie Talg und Schmalz im Milchfett von Milch und Milcherzeugnissen durch gaschromatographische Triglyceridanalyse.

Mit Hilfe bestimmter Triglyceridformeln werden pflanzliche und tierische Fette unabhängig von Fütterungs- oder Standortbedingungen im reinen Milchfett qualitativ und quantitativ bestimmt.

Anmerkung 1: Anhand der nur in Milchfett vorkommenden Buttersäure (C 4) können zwar geringe Milchfettgehalte in Pflanzenfett quantitativ bestimmt werden, die qualitative und quantitative Bestimmung von Fremdfettbeimischungen von bis zu mindestens 20 % (Gewichtsprozent) ist jedoch kaum möglich aufgrund der großen C 4-Schwankungen zwischen 3,5 und 4,5 % (Gewichtsprozent).

Anmerkung 2: Der quantitative Nachweis gelingt praktisch nur mit der Triglyceridanalyse, da der Sterolgehalt von Pflanzenfett je nach Herstellung und Behandlung variiert.

2. Begriff

Fremdfett in Milchfett: Für die Zwecke dieser Arbeitsvorschrift ist unter Fremdfett sämtliches pflanzliche und tierische Fett, ausgenommen Milchfett, zu verstehen.

3. Kurzbeschreibung

Nach Extraktion des Milchfetts wird eine Stammlösung angesetzt. Anhand dieser Lösung werden die Triglyceride (Gesamtzahl der Kohlenstoffatome) mit Hilfe eines Gaschromatographen mit gepackter Säule bestimmt. Durch Einsetzen der Gewichtsprozent der Fettmoleküle unterschiedlicher Größe (C24 — C54 — nur Geradzahlige) in die Triglyceridformel wird das Fremdfett entweder qualitativ oder quantitativ bestimmt.

Anmerkung: Bei Beibehaltung der beschriebenen Auswertung kann die Kapillar-Gaschromatographie verwendet werden, wenn sichergestellt ist, dass vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (¹).

4. Chemikalien

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden.

- 4.1. Trägergas: Stickstoff, Reinheit $\geq 99,996\%$.
- 4.2. Standard-Triglyceride (²), gesättigt, sowie Cholesterol zur Standardisierung eines Standard-Milchfetts gemäß Nummer 6.5.4.
- 4.3. Methanol, wasserfrei.
- 4.4. n-Hexan.
- 4.5. n-Heptan.
- 4.6. Toluol.
- 4.7. Dimethylchlorsilanlösung: 50 ml Dimethylchlorsilan werden in 283 ml Toluol gelöst.
- 4.8. Wasserstoff und synthetische Luft als Brenngase.
- 4.9. Stationäre Phase, 3 % ov-1 auf 125/150 μm (100/120 mesh) Gas ChromQ (³).
- 4.10. 10%ige Kakaobutterlösung in n-Heptan.

5. Geräte

Die übliche Laborausstattung, insbesondere folgende:

- 5.1. Hochtemperatur-Gaschromatograph, geeignet für Temperaturen von mindestens 400 bis 450 °C, mit Flammenionisationsdetektor (FID) und konstantem Masseflussregler für das Trägergas. Brenngase 30 ml/min für H₂ und 270 ml/min für synthetische Luft.

(¹) Geeignete Verfahren wurden bereits beschrieben, vgl. D. Precht und J. Molkentin: Quantitativer Triglyceridnachweis mit kurzen Kapillarsäulen, Chrompack News 4 16-17 (1993).

(²) Geeignete Produkte im Fachhandel erhältlich.

(³) Handelsmarken wie Extrelut, GasChromQ oder Chrompack sind Beispiele für geeignete Erzeugnisse des Fachhandels. Diese Information dient lediglich der einfacheren Verwendung der Arbeitsvorschrift und stellt keineswegs eine Produktvorschrift dar. Die Korngrößenangabe wurde gemäß BS 410:1988 „British Standard Specification for test sieves“ in die SI-Einheit μm umgerechnet.

Aufgrund des hohen Trägergasdurchflusses ist vorzugsweise ein FID mit besonders weiter Gasaustrittsdüse zu verwenden.

Anmerkung: Wegen der hohen Temperaturen bei der Triglyceridanalyse müssen die Glasinserts im FID oder im Injektorsystem häufig gereinigt werden.

Der Gaschromatograph muss mit hochtemperaturfesten Septa ausgerüstet sein, die häufig verwendet werden können und im allgemeinen nur sehr wenig bleeding aufweisen.

Anmerkung: Geeignet sind Chromblau(tm)-Septa (Chrompack).

Die Septa sind regelmäßig zu wechseln, z. B. nach 100 Einspritzungen oder sobald die Auflösung nachlässt (vgl. Abbildung 4).

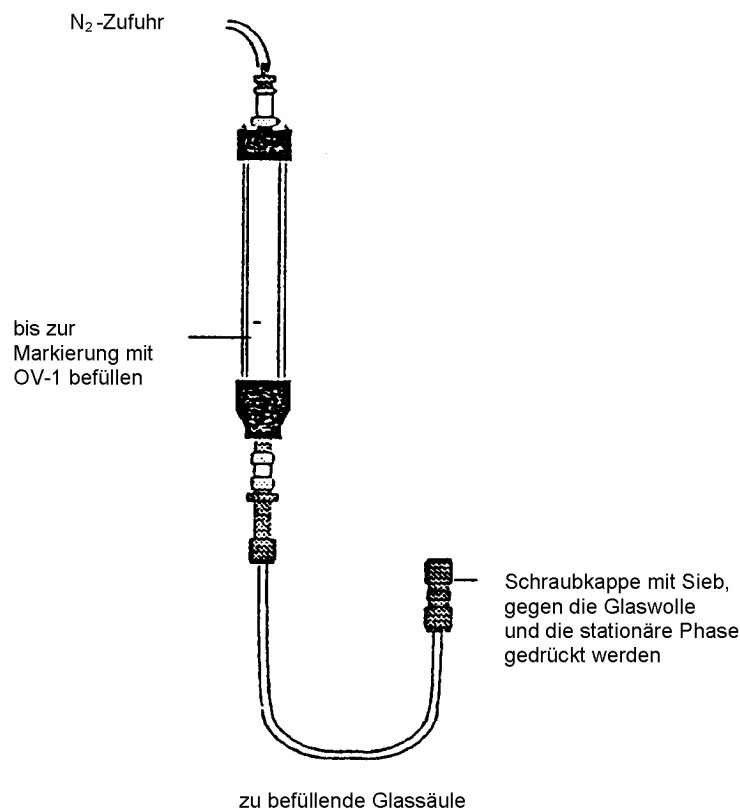
5.2. Chromatographiesäule

U-förmige Glassäule (Innendurchmesser 2 mm, Länge 500 mm), die zur Inaktivierung der Glasoberfläche zunächst gemäß Nummer 6.1 mit Dimethylchlorsilan silanisiert wird.

Anmerkung: Auch etwas längere gepackte Säulen (800-2 000 mm) sind geeignet. Mit ihnen kann eine etwas bessere Wiederholbarkeit der Ergebnisse erzielt werden. Andererseits zeigt die stationäre Phase nach dem Betrieb gelegentlich Bruchstellen, die wiederum schlechtere quantitative Ergebnisse zur Folge haben. Ferner verlöscht die FID-Flamme leicht wegen der extrem hohen Trägergasgeschwindigkeit von 75 bis 85 ml/min, wie sie hierfür erforderlich ist.

5.3. Aufbau für das Befüllen der Säule (vgl. Abbildung 1)

Abbildung 1
Befüllen der Säule



- 5.3.1. Kunststoffsäule mit Schraubkappen, versehen mit einer Markierung, bis zu der die Säule mit der stationären Phase befüllt werden soll.
- 5.3.2. Feines Sieb (Maschenweite ca. 100 µm) mit Schraubkappe, geeignet zum Verschließen der Glassäule gemäß Abbildung 1.
- 5.3.3. Inaktivierte, silanisierte Glaswolle.
- 5.3.4. Vibrator zum gleichmäßigen Befüllen mit der stationären Phase.
- 5.4. 1-3 ml Extrelut-Säule⁽¹⁾ mit Silicagel. Diese Säule kann alternativ auch zur Extraktion von Milchfett verwendet werden.

⁽¹⁾ Siehe Fußnote 3 auf S. 86.

- 5.5. Graphitdichtung 6,4 mm (1/4") mit 6 mm Bohrung.
- 5.6. Vorrichtungen für das Silanisieren der Glasfläche der Säule gemäß 6.1.
 - 5.6.1. Woulff-Flasche.
 - 5.6.2. Wasserstrahlpumpe.
- 5.7. Wasserbad, einstellbar auf $50 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 5.8. Trockenofen, einstellbar von $50 \pm 2^\circ\text{C}$ bis $100 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 5.9. Mikroliterpipette.
- 5.10. Graduierte 5-ml-Pipette zum Dosieren von 1,5 ml Methanol.
- 5.11. 50-ml-Rundkolben.
- 5.12. Erlenmeyerkolben, 50 ml Nennvolumen.
- 5.13. Trichter.
- 5.14. Feinporiges Filter.
- 5.15. Rotationsverdampfer.
- 5.16. Ampullen, 1 ml Nennvolumen, mit Aluminiumdeckel verschließbar, innen mit Trennwand.
- 5.17. Injektionsspritze; der Kolben der Spritze darf nicht bis in die Nadelspitze reichen.

Anmerkung: Mit solchen Spritzen lässt sich eine bessere Wiederholbarkeit der Ergebnisse erzielen.

Die Nadelspitze ist regelmäßig zu kontrollieren, damit das Septum nicht beschädigt wird.

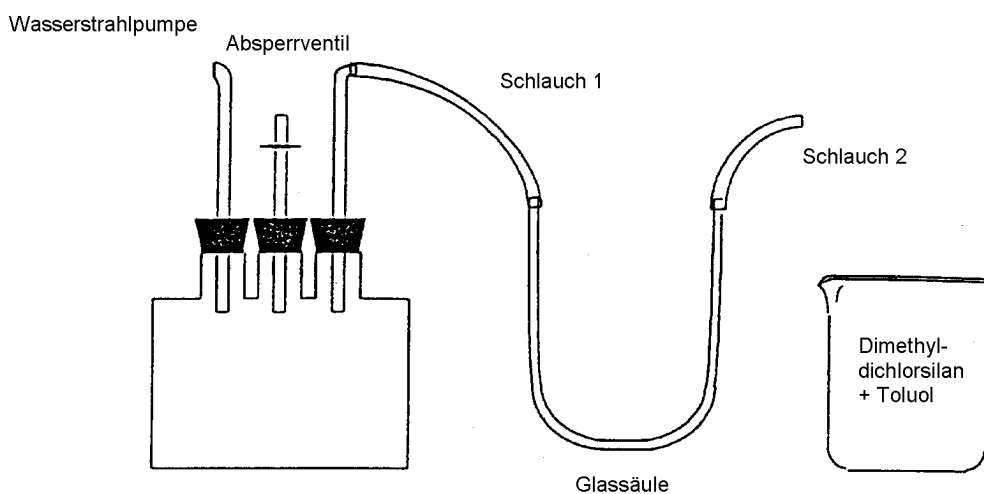
6. Verfahren

6.1. Vorbereitung der Säule (Silanisierung).

Nach Anschließen der Woulff-Flasche gemäß Abbildung 2 an die Wasserstrahlpumpe wird Schlauch 2 gemäß Nummer 4.7 in die Lösung getaucht. Die Säule wird durch Schließen des Absperrventils gefüllt. Anschließend werden die beiden Schläuche entfernt.

Abbildung 2

Aufbau für die Silanisierung



Die Säule wird auf einen Ständer montiert und mittels einer Pipette mit Dimethyldichlorsilanlösung befüllt.

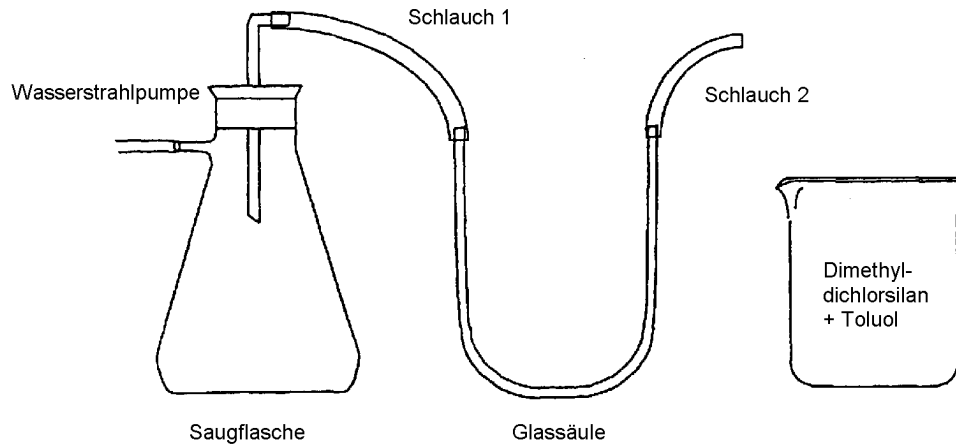
Nach 20-30 Minuten wird die Woulff-Flasche durch eine Saugflasche ersetzt und die Säule durch Anschließen der Wasserstrahlpumpe entleert (vgl. Abbildung 3).

6.2. Befüllen der Säule

Im Anschluss daran wird die Säule mit 75 ml Toluol und 50 ml Methanol gründlich gespült. Danach wird die befüllte Säule im Trockenofen bei 100 °C etwa 30 Minuten getrocknet.

Abbildung 3

Anordnung für das Spülen



Die stationäre Phase (Nummer 4.9) wird in die Kunststoffsäule bis zur Markierung eingefüllt.

Die zu befüllende Glassäule wird am unteren Ende mit einem etwa 1 cm langen Stück silanisierter Glaswolle verstößelt, die mit Hilfe eines Stahlstäbchens hineingedrückt wird. Anschließend wird das Ende der Säule mit dem Sieb gemäß Nummer 5.3.2 verschlossen.

Die Säule wird unter Druck (3 bar, mit N₂) mit der stationären Phase befüllt. Zur Erzielung einer homogenen, gleichmäßigen und festen Packung ist während des Befüllens ein Vibrator in der Säule auf- und abzuführen. Nach dem Befüllen wird das andere Ende der Säule mit einem fest zusammengedrückten Stück silanisierter Glaswolle verstößelt, wobei das überstehende Ende abgeschnitten und der Stößel mit einem Spatel einige Millimeter in die Säule hineingedrückt wird.

6.3. Ansetzen der Proben

Für das Ansetzen der Proben ist eine der drei folgenden Methoden zu verwenden:

6.3.1. Abscheidung des Milchfetts aus Butter

5 bis 10 g Butter werden in einem geeigneten Gefäß im Wasserbad gemäß Nummer 5.7 bei 50 °C aufgeschmolzen.

Ein 50-ml-Erlenmeyerkolben und ein Trichter mit eingesetztem Filter gemäß Nummer 5.14 werden im Trockenofen auf 50 °C erwärmt. Die Fettschicht der aufgeschmolzenen Butter wird über die erwärmte Vorrichtung filtriert.

Dieses Milchfett ist nahezu phospholipidfrei.

6.3.2. Extraktion der Fettfraktion nach Röse-Gottlieb

Die Extraktion wird entweder nach IDF-Norm 1C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 oder 22B: 1987 durchgeführt.

Mit einem solchen Milchfett kann aufgrund des Phospholipidgehalts ein Cholesterolpeak erzielt werden, der um etwa 0,1 % erhöht ist.

Das mit Cholesterol auf 100 normierte Triglyceridspektrum wird daher nur vernachlässigbar beeinflusst.

6.3.3. Extraktion von Milch mit Silicagelsäulen

0,7 ml einer auf 20 °C temperierten Milchprobe werden mittels einer Pipette einer 1- bis 3-ml-Extrelutsäule gemäß Nummer 5.4 aufgegeben; danach ist 5 Minuten lang zu warten, bis sich die Probe gleichmäßig über das Silicagel verteilt hat.

Zur Denaturierung des Protein-Lipid-Komplexes wird die Probe mittels einer Pipette mit 1,5 ml Methanol versetzt. Anschließend wird die Probe mit 20 ml n-Hexan extrahiert. Das n-Hexan wird langsam in kleinen Mengen aufgegeben, wobei das ablaufende Lösungsmittel in einem 50-ml-Rundkolben aufgefangen wird, der zuvor auf ein konstantes, bekanntes Gewicht getrocknet wurde.

Nach der Extraktion wird die Säule leerlaufen gelassen.

Die Lösungsmittel werden aus dem Eluat im Rotationsverdampfer auf dem Wasserbad bei einer Temperatur von 40-50 °C abdestilliert.

Der Kolben wird getrocknet und der Fettrückstand gewogen.

Anmerkung: Fettextraktionsverfahren gemäß Gerber, Weibull-Berntrop, Schmid-Bondzynski-Ratzlaff oder die Abscheidung des MilCHFetts durch Fettde detergentien (BDI-Methode) eignen sich nicht zur Triglyceridanalyse, da es bei diesen Methoden zum Übertritt mehr oder weniger großer Mengen an Partialglyceriden oder an Phospholipiden in die Fettphase kommt.

6.4. Ansetzen der Probelösung

Für die Gaschromatographie wird eine 5%ige Lösung des gemäß 6.3 gewonnenen Fetts in n-Heptan verwendet. Zum Ansetzen dieser Probelösung werden entsprechende Mengen des gemäß 6.3.1 und 6.3.2 gewonnenen Probematerials gewogen und in entsprechenden Mengen n-Heptan gelöst.

Beim Ansetzen der Probe gemäß 6.3.3 wird die zur Probe in dem Kolben zuzugebende n-Heptan-Menge auf der Grundlage der Einwaage berechnet und der Rest darin gelöst.

Etwa 1 ml Probelösung wird gemäß 5.16 in einen Glaskolben übergeführt.

6.5. Chromatographische Triglyceridanalyse

Bei hohen Temperaturen von bis zu 350 °C für das Eluieren der langkettigen C52-56-Triglyceride kommt es leicht zu einem Anstieg der Basislinie, vor allem wenn die Säulen zuvor nicht in geeigneter Weise vorbehandelt wurden. Dieser Anstieg der Basislinie bei hohen Temperaturen kann entweder durch Verwendung von zwei Säulen oder durch Basisliniensubtraktion völlig vermieden werden.

Beim Kompensationsbetrieb oder Einzelsäulenbetrieb sowie für die Glaseinsätze im Injektor und im Detektor sind die Graphitdichtungen gemäß 5.5 zu verwenden.

6.5.1. Basislinienkorrektur

Zur Verhinderung des Anstiegs der Basislinie ist eine der vier folgenden Methoden zu verwenden:

6.5.1.1. Mehrsäulenbetrieb

Zwei gepackte Säulen werden im Kompensationsbetrieb eingesetzt.

6.5.1.2. Basislinienkorrektur durch den Gaschromatographen

Mit einem Gaschromatographiedurchlauf ohne Aufgabe einer Fettlösung und anschließender Subtraktion der aufgezeichneten Basislinie kann ein Basislinienanstieg vermieden werden.

6.5.1.3. Basislinienkorrektur durch Software-Integration

Mit einem Durchlauf des Integrationssystems ohne Aufgabe einer Fettlösung und anschließender Subtraktion der aufgezeichneten Basislinie kann ein Basislinienanstieg vermieden werden.

6.5.1.4. Basislinienkorrektur durch geeignete Vorbehandlung

Durch geeignete Vorbehandlung der Säule und etwa 20 Einspritzungen von MilCHFettlösung ist der Basislinienanstieg bei hohen Temperaturen oftmals so gering, dass auf eine Basislinienkorrektur verzichtet werden kann.

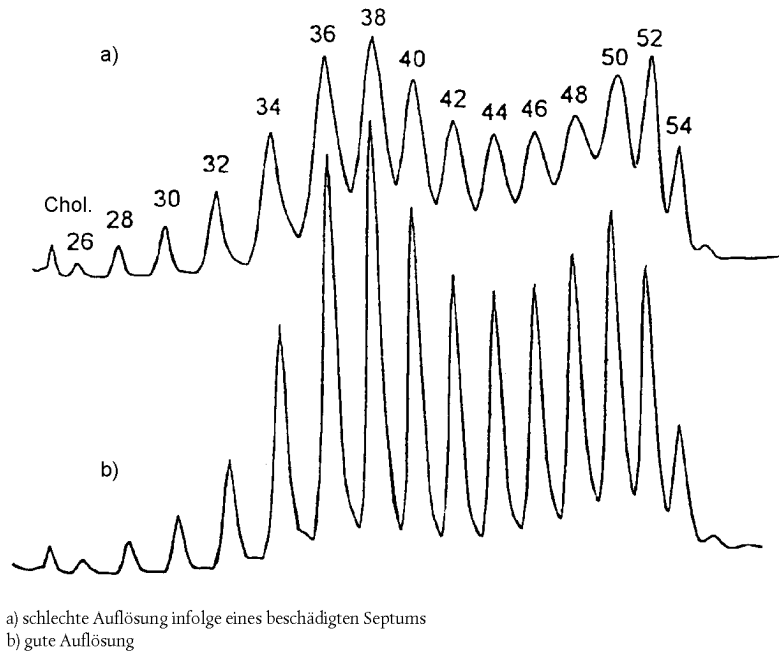
6.5.2. Einspritztechnik

Zur Vermeidung von Diskriminierungseffekten und Erzielung besserer quantitativer Ergebnisse mit den hochsiedenden Triglyceridkomponenten wird die „Heißeinspritztechnik“ verwendet. Dabei wird die Fettlösung auf die Spritze aufgezogen und die kalte Injektionsnadel vor dem Einspritzen etwa 3 Sekunden im Einspritzblock vorerhitzt. Anschließend wird der Spritzeninhalt rasch eingespritzt.

Anmerkung: Bei dieser Injektionstechnik verringert sich die Gefahr der Fraktionierung in der Spritze oder im Einspritzblock. Es wird keine „on column“-Direkteinspritzung im oberen, erweiterten Teil der Säule durchgeführt, da die sich hier ansammelnden Septumfragmente und Kontaminanten bei der verwendeten Technik durch regelmäßiges Auswechseln eines Injektoreinsatzes ohne Demontieren der Säule leicht entfernt werden können.

Ein Verbiegen der Nadelspitze durch Berühren des Becherglasbodens (auch wenn kaum mit dem bloßen Auge erkennbar) ist unter allem Umständen zu vermeiden, damit das Septum nicht beschädigt wird.

Abbildung 4
Triglyceridchromatogramm einer Milchfettprobe



6.5.3. Vorbehandlung einer gepackten Säule

Während der Schritte a) bis c) wird das obere Ende der Säule nicht an den Detektor angeschlossen, um eine Kontamination zu verhindern.

Die gemäß 6.2 befüllten Säulen werden in folgender Weise vorbehandelt:

- 15 min N_2 -Strom 40 ml/min bei 50 °C,
- Erhitzung um 1 K/min auf 355 °C bei einem N_2 -Strom von 10 ml/min,
- 12- bis 15-stündige Haltephase bei 355 °C,
- 2 Einspritzungen von je 1 μ l Kakaobutterlösung gemäß 4.10 und entsprechendes Temperaturprogramm,
- 20 Einspritzungen von je 0,5 μ l Milchfettlösung verteilt über 2 bis 3 Tage gemäß 6.4.

Anmerkung: Kakaobutter besteht nahezu ausschließlich aus hochsiedenden C50- bis C56-Triglyceriden. Das Einspritzen von Kakaobutter dient dem Zweck der speziellen Vorbehandlung in diesem langkettigen Bereich. Bei den hochsiedenden C50- bis C56-Triglyceriden können teilweise Response-Faktoren von bis zu 1,2 auftreten. Normalerweise ist bei wiederholtem Einspritzen einer Milchfettlösung eine Verringerung der anfänglich hohen Response-Faktoren für C50- bis C54-Triglyceride zu erwarten. Bei Triglyceriden mit geringer Acyl-C-Zahl liegt der Faktor bei 1.

Es werden jeweils drei Paare der gemäß 6.2 vorbehandelten Säulen vorbereitet. Die vorbehandelten Säulen werden jeweils routinemäßig mit einer Milchfettanalyse kontrolliert. Das Paar mit den besten quantitativen Ergebnissen (Response-Faktor gegen 1) wird für die nachfolgenden Zwecke weiterverwendet. Säulen mit Response-Faktoren > 1,20 werden nicht verwendet.

6.5.4. Kalibrierung

Zur Kalibrierung sollten mit den Triglyceridstandards (mindestens die gesättigten Triglyceride C24, C30, C42, C48 und C54 sowie Cholesterin; besser noch zusätzlich C50 und C52) die Response-Faktoren der entsprechenden Triglyceride sowie des Cholesterols von einem Milchfett (Standardfett) bestimmt werden. Die Response-Faktoren der dazwischen liegenden Triglyceride können durch mathematische Interpolation berechnet werden. Mit dem Standardfett sind jeden Tag 2 bis 3 Kalibrierläufe durchzuführen.

Bei nahezu identischen Ergebnissen dürften bei der Triglyceridanalyse der Proben gut wiederholbare quantitative Ergebnisse erzielt werden.

Das standardisierte Milchfett ist bei einer Lagertemperatur von höchstens -18 °C mehrere Monate lang haltbar und kann daher als Standard verwendet werden.

Anmerkung: Der Response-Faktor jedes Bestandteils kann auch unter Verwendung eines Referenzfetts bestimmt werden, dessen Triglyceridzusammensetzung gewährleistet ist, wie CRM 519 (wasserfreies Milchfett), das vom „Institut de Matériaux de Référence et de Mesures“ in Geel (Belgien) erworben werden kann.

6.5.5. Temperaturprogramm, Trägergas und andere Bedingungen für die Triglyceridanalyse

Temperaturprogramm: Anfangstemperatur der Säule: eine Minute lang 210 °C, anschließend mit einer Aufheizrate von 6 °C/min auf 350 °C erhitzen und 5 Minuten lang auf der Endtemperatur halten.

Detektor- und Injektortemperatur jeweils 370 °C

Anmerkung: Detektor-, Injektor- und Ofentemperatur (Anfangstemperatur) sollten (auch über Nacht, an Wochenenden sowie während der Feriertage) konstant gehalten werden.

Trägergas: Stickstoff, Durchsatz 40 ml/min.

Anmerkung: Bei Verwendung von 80-cm-Säulen muss der N₂-Durchsatz mindestens 75 ml/min betragen. Der Trägergasstrom muss so exakt eingestellt werden, dass unabhängig von der Säulenlänge C54 bei 341 °C eluiert wird.

Dauer der Analyse: 29,3 min.

Einspritzvolumen: 0,5 µl.

Anmerkung: Die Spritze ist nach jedem Einspritzen mehrfach mit reinem Heptan zu spülen.

FID-Bedingungen gemäß 5.1.

Anmerkung: Der Flammenionisationsdetektor ist zu Beginn jedes Arbeitstags zu zünden.

7. Integration, Auswertung und Kontrolle der Messbedingungen

Triglyceride mit ungerader Acyl-c-Zahl (2n+1) werden mit den Triglyceriden mit der jeweils nächstkleineren geraden Acyl-c-Zahl (2n) kombiniert. Die weniger gut wiederholbaren geringen C56-Gehalte werden nicht berücksichtigt. Die verbleibenden Triglyceride (Peakfläche) im Chromatogramm, einschließlich Cholesterol (Peak bei C24), werden mit den jeweiligen Response-Faktoren des Standardfetts (letzte Kalibrierung) multipliziert und zusammen auf 100 normiert. Außer dem freien Cholesterol werden daher die Triglyceride C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 und C54 ausgewertet. Die Ergebnisse werden in Gewichtsprozenten (g/100 g) ausgedrückt.

Die Auswertung der Chromatogrammpeaks sollte mit Hilfe eines Integrators erfolgen, bei dem die Basislinie aufgezeichnet werden kann. Eine Reintegration mit optimierten Integrationsparametern sollte möglich sein.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen zwei Beispiele von Triglyceridchromatogrammen. Abbildung 5 zeigt ein gut auszuwertendes Chromatogramm, Abbildung 6 dagegen weist einen sporadischen Fehler im Bereich C50 und C54 auf, weil die Basislinie im Vergleich zu Abbildung 5 nicht korrekt verläuft. Nur mit Hilfe eines Integrators, mit dem die Basislinie aufgezeichnet werden kann, können solche Fehler mit hoher Gewissheit erkannt und vermieden werden.

Abbildung 5

Leicht auswertbares Triglyceridchromatogramm eines Milchfetts mit eingezeichneter Basislinie

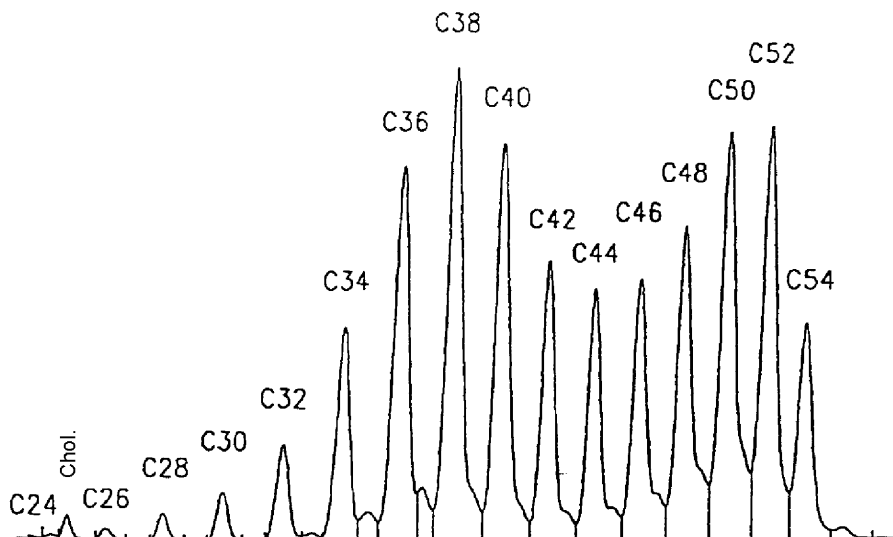
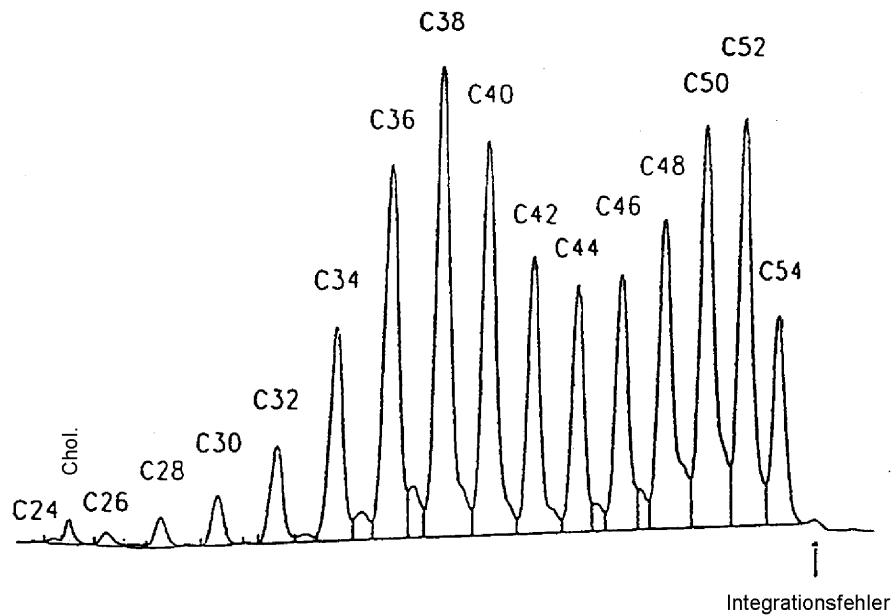


Abbildung 6

Schlecht integriertes MilCHFettchromatogramm



Zur Kontrolle der Messbedingungen können die in Tabelle 1 aufgeführten relativen Standardabweichungen (relative Standardabweichung: Variationskoeffizient \times 100) für die verschiedenen Triglyceride verwendet werden. Sie sind aus 19 aufeinanderfolgenden Analysen desselben MilCHFetts berechnet worden.

Tabelle 1

Relative Standardabweichungen der Triglyceridgehalte (n=19)

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

Bei größerer relativer Standardabweichung als in Tabelle 1 angegeben sind die Chromatogramme nicht akzeptabel, und die Septa oder der Gasstrom müssen überprüft werden. Auch können sich kleine Septumkomponenten auf der Glaswolle am Säuleneintritt abgelagert haben, oder die Säule ist durch Abnutzung, Temperatureinfluss usw. unbrauchbar geworden (vgl. Abbildung 4).

Anmerkung: Die Werte in Tabelle 1 sind nicht obligatorisch und geben nur einen Anhalt für die Qualitätskontrolle. Lässt man größere relative Standardabweichungen zu, so müssen trotzdem die in Nummer 11 aufgeführten Grenzwerte für Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit eingehalten werden.

8. Qualitativer Fremdfettnachweis

Für den Fremdfett-Triglyceridnachweis wurden Formeln (Tabelle 2) mit Konfidenzgrenzen S (Tabelle 3) entwickelt, in denen die S-Werte von reinem MilCHFett fluktuieren können. Werden diese Grenzen überschritten, so ist vermutlich Fremdfett enthalten.

Die empfindlichste Formel für den Nachweis von Schmalzzusatz lautet z. B.:

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$$

Anmerkung: Mit 755 verschiedenen MilCHFettproben wurde für MilCHFettproben mit einer Standardabweichung für alle S-Werte $SD = 0,39897$ ein Konfidenzintervall von $S = 97,96-102,04$ ermittelt.

Ausgehend von der Triglyceridzusammensetzung einer unbekannteten Fettprobe gestattet diese Formel ohne Verwendung eines Computers zu prüfen, ob die Summe der hier auf diese Weise mit den entsprechenden Faktoren versehenen Triglyceridgehalts außerhalb des Bereichs 97,96-102,4 fällt und ob höchstwahrscheinlich ein Fremdfettzusatz vorliegt.

Tabelle 2 enthält andere Triglyceridformeln, mit denen verschiedene Fremdfette nachgewiesen werden können. Für den Nachweis von Sojaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Rapsöl, Leinöl, Weizenkeimöl, Maiskeimöl, Baumwollöl und hydrogenisiertem Fischöl, Kokosnuss- und Palmkernfett sowie für Palmöl und Rindertalg kann jeweils eine gemeinsame Formel verwendet werden.

Da die Triglyceridzusammensetzung von Fremdfett ebenfalls Schwankungen unterworfen ist, wurden bis zu vier verschiedene, experimentell gemessene Fremdfett-Triglyceriddaten desselben Typs verwendet. (Mit denselben Fremdfett-Typen wurde jeweils der unvorteilhafteste Grenzwert verwendet (vgl. Tabelle 4).)

Mit der folgenden „Gesamtformel“ wurden für alle Fremdfette gleichgute Ergebnisse erzielt:

$$- 2,7575 \cdot C26 + 6,4077 \cdot C28 + 5,5437 \cdot C30 - 15,3247 \cdot C32 + 6,2600 \cdot C34 + 8,0108 \cdot C40 - 5,0336 \cdot C42 + 0,6356 \cdot C44 + 6,0171 \cdot C46 = S$$

Berechnungen für den Nachweis beliebiger Fremdfettgemische in MilCHFett haben gezeigt, dass z. B. trotz des mit der in Tabelle 2 genannten Formel für Schmalz erzielten niedrigen Grenzwerts für dieses Fremdfett von 2,7 % andere Fette wie Kokosfett, Palmöl oder Palmkernöl mit Grenzwerten von 26,8, 12,5 bzw. 19,3 % anhand dieser Formel nur nachgewiesen werden können, wenn dem MilCHFett extrem hohe Mengen davon beigemischt wurden. Dies gilt auch für die anderen Formeln in Tabelle 2.

Tabelle 2

Triglyceridformeln für den Nachweis von Fremdfett in MilCHFett mit Angabe der Standardabweichungen SD für S

Formeln für Sojaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Rapsöl, Leinöl, Weizenkeimöl, Maiskeimöl, Baumwollöl und Fischöl
$2,0983 \cdot C30 + 0,7288 \cdot C34 + 0,6927 \cdot C36 + 0,6353 \cdot C38 + 3,7452 \cdot C40 - 1,2929 \cdot C42 + 1,3544 \cdot C44 + 1,7013 \cdot C46 + 2,5283 \cdot C50 = S$; $SD = 0,38157$
Formel für Kokosnuss- und Palmkernfett
$3,7453 \cdot C32 + 1,1134 \cdot C36 + 1,3648 \cdot C38 + 2,1544 \cdot C42 + 0,4273 \cdot C44 + 0,5809 \cdot C46 + 1,2926 \cdot C48 + 1,0306 \cdot C50 + 0,9953 \cdot C52 + 1,2396 \cdot C54 = S$; $SD = 0,11323$
Formel für Palmöl und Rindertalg
$3,6644 \cdot C28 + 5,2297 \cdot C30 - 12,5073 \cdot C32 + 4,4285 \cdot C34 - 0,2010 \cdot C36 + 1,2791 \cdot C38 + 6,7433 \cdot C40 - 4,2714 \cdot C42 + 6,3739 \cdot C46 = S$; $SD = 0,81094$
Formel für Schmalz
$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$; $SD = 0,39897$

Deshalb sind bei der Untersuchung einer unbekannteten Fettprobe sämtliche Formeln der Tabelle 2 und die Gesamtformel 2 zu verwenden, wenn es sich bei der Probe um ein Gemisch aus MilCHFett und einem der 14 verschiedenen Fremdfette oder einer Kombination dieser verschiedenen Fette handelt. Erhält man beim Einsetzen der Triglyceride einer zu analysierenden Fettprobe einen S-Wert, der bei auch nur einer einzigen der fünf Formeln außerhalb des Wertebereichs der Tabelle 3 zu liegen kommt, so handelt es sich bei der Probe höchstwahrscheinlich um ein modifiziertes MilCHFett. Der Fremdfettnachweis in Milch anhand einer einzigen der vier Formeln gemäß Tabelle 2 erlaubt keine Schlussfolgerungen hinsichtlich der Art des Fremdfettgemischs.

Tabelle 3

Bereiche S für Milchfette

Formel für den Nachweis von	S-Wertebereich
Sojaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Rapsöl, Leinöl, Weizenkeimöl, Maiskeimöl, Baumwollöl, Fischöl	98,05-101,95
Kokos- und Plankernfett	99,42-100,58
Palmöl und Rindertalg	95,90-104,10
Schmalz	97,96-102,04
Gesamtformel	95,68-104,32

Tabelle 4 enthält die Nachweisgrenzen für die verschiedenen Fremdfette mit einer Konfidenzgrenze von 99 %. Die erste Spalte zeigt die Mindestnachweisgrenzen für die besten Milchfettformeln der Tabelle 2. Die zweite Spalte zeigt die Nachweisgrenzen für die Gesamtformel. Obwohl die Grenzwerte etwas höher liegen, reicht diese Formel für etwas höher liegende Fremdfettgehalte aus. Unter Verwendung aller Formeln können auch Kombinationen der verschiedenen Fremdfette nachgewiesen werden. Die Schwankungsbreiten der Triglyceride der verschiedenen Fremdfette eines Typs haben keinen größeren Einfluss auf die Nachweisgrenzen.

Tabelle 4

99%ige Nachweisgrenzen durch Zusatz von Fremdfett zu Milch in %

	Einzelformel	Gesamtformel
Sojaöl	2,1	4,4
Sonnenblumenöl	2,3	4,8
Olivenöl	2,4	4,7
Kokosfett	3,5	4,3
Palmöl	4,4	4,7
Palmkernfett	4,6	5,9
Rapsöl	2,0	4,4
Leinöl	2,0	4,0
Weizenkeimöl	2,7	6,4
Maiskeimöl	2,2	4,5
Baumwollöl	3,3	4,4
Schmalz	2,7	4,7
Rindertalg	5,2	5,4
Hydrogenisiertes Fischöl	5,4	6,1

Anwendung: Die S-Wertebereiche werden derart berechnet, dass Fremdfettgehalt nur angenommen wird, wenn die Grenzwerte für die einzelnen Formeln überschritten werden (vgl. Tabelle 4).

9. Quantitative Fremdfettbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des Fremdfettgehalts eines Milchfetts ist folgende Formel zu verwenden:

$$X (\%) = 100 \cdot | (100 - S) | / | (100 - S_F) | \quad (3)$$

Hierin bedeutet X die Menge eines unbekanntes Fremdfetts oder Fremdfettgemischs in einem unbekanntes Milchfett. S wird als Ergebnis der Addition eines unbekanntes Fremdfetts durch Einsetzen der Triglyceride des Fremdfett-Milchfett-Gemischs in die vorstehende Triglyceridformel berechnet. Wurde dem Milchfett ein unbekanntes Fremdfett zugesetzt, so wird für S_F der mittlere S-Wert der verschiedenen Fremdfette in die Gesamtformel eingesetzt; dieser Mittelwert S wird errechnet durch Einsetzen der Triglyceriddaten der reinen Fremdfette in diese Formel und Ermittlung des Durchschnittswerts ($S_F = 7,46$). Gute quantitative Ergebnisse für Fremdfett werden auch anhand der Palmöl-Rindertalg-Formel (Tabelle 2) und einem Mittelwert für S_F von 10,57 erzielt.

Bei bekannten Fremdfett-Typen sind folgende S_F -Werte in die vorstehende Formel (3) einzusetzen, wobei die entsprechende Fremdfettformel gemäß S Tabelle 2 zu verwenden ist:

Tabelle 5

S_F-Werte für verschiedene Fremdfette

Fremdfett	S _F
Sojaöl	8,18
Sonnenblumenöl	9,43
Olivenöl	12,75
Kokosfett	118,13
Palmöl	7,55
Palmkernfett	112,32
Rapsöl	3,30
Leinöl	4,44
Weizenkeimöl	27,45
Maiskeimöl	9,29
Baumwollöl	41,18
Schmalz	177,55
Rindertalg	17,56
Fischöl	64,12

10. Anwendungsbereich der Nachweismethode

Die beschriebene Methode ist anwendbar bei Sammelmilch und basiert auf der Repräsentativität der Milchfettproben.

Ein sehr spezifischer Nachweis wäre möglich, wenn für eine repräsentative Anzahl von Milchfetten Formeln wie die vorstehenden für verschiedene Länder abgeleitet würden.

Es könnten besonders geeignete Nachweismöglichkeiten erzielt werden, wenn in den einzelnen Ländern solche Formeln auf der Grundlage einer repräsentativen Zahl von Milchfetten aufgestellt würden. In diesem Fall benötigt man keine komplizierten Computerprogramme, wenn die Triglyceridkombinationen gemäß Tabelle 2 angewandt werden und die Faktoren unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate Neubestimmt werden.

Durch Anwendung der S-Bereiche gemäß Tabelle 3 sind die Formeln bei Vorliegen bestimmter Fütterungsbedingungen wie Unterfütterung oder Verfütterung von Futterhefe oder Ca-Seifen an Kühe allgemein anwendbar. Nur im Fall extremer Fütterungsbedingungen (z. B. hohe Aufnahme von reinen Ölsaaten, Verfütterung großer Mengen von Ca-Seifen zusammen mit Futterfett usw.) ergibt sich aus der Formel teilweise ein modifiziertes Milchfett.

Anmerkung: Fraktionierte Milchfette werden allgemein als unmodifiziertes Fett erkannt, wenn eine Modifizierung bei Überschreiten der Grenzwerte angenommen wird. Nur bei fraktioniertem Milchfett mit außergewöhnlicher Milchfettzusammensetzung, wie beispielsweise im Fall einer durch Fraktionierung mit physikalischen Methoden bei hoher Temperatur von ungefähr 30 °C und mit geringer Ausbeute von einigen Prozent oder mit überkritischen CO₂ erhaltenen harten Fraktion zeigt die Formel ein modifiziertes Milchfett an.

Milchfettfraktionierung kann jedoch durch andere Verfahren, z. B. Differential-Scanning-Kalorimetrie nachgewiesen werden.

11. Genauigkeit

Ermittelt unter Verwendung von Milchfetten auf der Grundlage der Formeln aus Tabelle 2 und der S-Bereiche aus Tabelle 3.

11.1. Wiederholbarkeit

Differenz der S-Werte zweier Untersuchungen, die nach demselben Verfahren mit identischem Untersuchungsmaterial unter denselben Bedingungen (derselbe Untersucher, dieselben Geräte, dasselbe Labor) unmittelbar nacheinander durchgeführt werden.

Tabelle 6

Wiederholbarkeitsgrenzwerte (r) für die verschiedenen Formeln

Formel für den Nachweis von	r
Sojaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Rapsöl, Leinöl, Weizenkeimöl, Maiskeimöl, Baumwollöl, Fischöl	0,67
Kokos- und Palmkernfett	0,12
Palmöl und Rindertalg	1,20
Schmalz	0,58
Gesamtformel	1,49

11.2. *Vergleichbarkeit*

Differenz der S-Werte zweier Untersuchungen, die nach demselben Verfahren mit identischem Untersuchungsmaterial unter verschiedenen Bedingungen (verschiedene Untersucher, verschiedene Geräte, verschiedene Labors) zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden.

Tabelle 7

Vergleichbarkeitsgrenzwert (R) für die verschiedenen Formeln

Formel für den Nachweis von	R
Sojaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Rapsöl, Leinöl, Weizenkeimöl, Maiskeimöl, Baumwollöl, Fischöl	1,08
Kokos- und Palmkernfett	0,40
Palmöl und Rindertalg	1,81
Schmalz	0,60
Gesamtformel	2,07

11.3. *Kritische Differenz*

Anhand der Wiederholbarkeits- (r) und der Vergleichbarkeitsgrenzwerte (R) können die kritischen Differenzen für alle S-Werte der Tabelle 3 errechnet werden (Doppelanalysen). Die betreffenden Werte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8

Kritische Differenzen für alle Triglyceridformeln

Formel für den Nachweis von	Bereich
Sojaöl, Sonnenblumenöl, Olienöl, Rapsöl, Leinöl, Weizenkeimöl, Maiskeimöl, Baumwollöl, Fischöl	97,43-102,57
Kokos- und Palmkernfett	99,14-100,86
Palmöl und Rindertalg	94,91-105,09
Schmalz	97,65-102,35
Gesamtformel	94,58-105,42

11.4. Zuverlässigkeitsbedingungen

Alle geeichten, auf zwei Stellen hinter dem Komma gerundeten C24-, C26- und C28- bis C30-Triglyceridgehalte sowie Cholesterolgehalte sind exakt auf 100 zu normieren.

Die Ergebnisse der Doppelanalyse werden zur Überprüfung der Wiederholbarkeit verwendet. Die Wiederholbarkeit gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz der S-Werte zweier Untersuchungen für alle 5 Triglyceridformeln die Wiederholbarkeitsgrenzwerte r gemäß Tabelle 6 nicht überschreitet.

Zur Kontrolle der optimalen Gaschromatographiebedingungen und insbesondere der Säulengüte sollte sichergestellt sein, dass bei zehn Durchlaufwiederholungen die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten S-Wert aller 5 Triglyceride innerhalb des Bereichs $x \cdot r$ liegt; hierin sind $x = 1,58$ (für 10 Durchläufe vgl. Literatur (16)) und r die Wiederholbarkeitsgrenzwerte für die verschiedenen Formeln gemäß Tabelle 6.

12. Zitierte Normen

DIN 10 336: 1994	Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse
IDF Standard 1C: 1 987	Milk Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
IDF Standard 16C: 1 987	Cream Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
IDF Standard 116A: 1987	Mild-Based Edible Ices and Ice Mixtures. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
IDF Standard 22B: 1987	Skimmed Milk, Whey & Buttermilk Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method

13. Literatur

1. Kommission der Europäischen Gemeinschaften: *Nachweis von Fremdfett in Milchfett durch gaschromatographische Triglyceridanalyse*, Dok. Nr. VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Kommission der Europäischen Gemeinschaften: *Kontrolle der Reinheit von Butterfett anhand von 100 verschiedenen Proben aus verschiedenen Fütterungszeiträumen aus 11 EG-Staaten*, Dok. Nr. VI/4577/93.
3. Kommission der Europäischen Gemeinschaften: *Auswertung der Ergebnisse des ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften und sechsten EG-Ringversuchs: Nachweis von Triglyceriden in Milchfett*, Dok. Nr. VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: *Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats*. Dairy Research 47 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heiner, K.: *Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen* 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: *Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse*. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 20-35 (1987).
7. Precht, D.: *Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143-157 (1989).
8. Precht, D.: *Schnelle Extraktion von Milchfett*, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: *Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: *Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: *Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis*. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: *Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8 u. 194 107-114 (1992).
13. Precht, D.: *Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns* in CRC Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids, p. 123-138, Ed. K. D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkenin, J.: *Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns*, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molkenin, J., Precht, D.: *Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat*. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: *Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme*, Springer-Verlag, Berlin, P. 378 (1970).

ANHANG XXVI

LISTE DER IM ERSTEN ERWÄGUNGSGRUND GENANNTEN VERORDNUNGEN

- Verordnung (EWG) Nr. 1216/68 der Kommission vom 9. August 1968 über die Methode zur Bestimmung des Gehalts an Laktose in den aus dritten Ländern eingeführten Mischfuttermitteln ⁽¹⁾, geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 222/88 der Kommission vom 22. Dezember 1987 zur Änderung verschiedener Rechtsakte im Sektor Milch und Milcherzeugnisse infolge der Einführung der Kombinierten Nomenklatur ⁽²⁾;
- Verordnung (EWG) Nr. 3942/92 der Kommission vom 22. Dezember 1992 zur Erstellung einer Referenzmethode für die Bestimmung von Sitosterin und Stigmasterin in Butterfett ⁽³⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 175/1999 der Kommission zur Änderung der Verordnungen (EWG) Nr. 3942/92, (EG) Nr. 86/94, (EG) Nr. 1082/96 und (EG) Nr. 1459/98 zur Festlegung von Referenzmethoden für die Bestimmung bestimmter Kennzeichnungstoffe in Butter, Butterfett und Rahm ⁽⁴⁾;
- Verordnung (EG) Nr. 86/94 der Kommission vom 19. Januar 1994 zur Erstellung einer Referenzmethode für die Bestimmung von Sitosterin und Stigmasterin in Butter ⁽⁵⁾, geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 175/1999;
- Verordnung (EG) Nr. 2721/95 der Kommission vom 24. November 1995 zur Einführung von Regeln für die Anwendung von Referenz- und Routineverfahren für die Analyse und die Qualitätsbewertung von Milch und Milcherzeugnissen der gemeinsamen Marktorganisation ⁽⁶⁾;
- Verordnung (EG) Nr. 1080/96 der Kommission vom 14. Juni 1996 zur Erstellung einer Referenzmethode für die Untersuchung auf coliforme Keime in Butter, Magermilchpulver und Kasein/Kaseinaten ⁽⁷⁾;
- Verordnung (EG) Nr. 1081/96 der Kommission vom 14. Juni 1996 zur Festlegung einer Referenzmethode für den Nachweis von Kuhmilch und Kasein in Käse aus Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch oder Mischungen von Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch sowie zu Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 690/92 ⁽⁸⁾;
- Verordnung (EG) Nr. 1082/96 der Kommission vom 14. Juni 1996 zur Festsetzung einer Referenzmethode für die Bestimmung von Beta-Apo-8'-Karotinsäure-Äthylester in Butterfett und Butter ⁽⁹⁾, geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 175/1999;
- Verordnung (EG) Nr. 1854/96 der Kommission vom 26. September 1996 zur Aufstellung einer Liste von Referenzmethoden für die Analyse und Qualitätsbewertung von Milch und Milcherzeugnissen der gemeinsamen Marktorganisation ⁽¹⁰⁾, geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 881/1999 ⁽¹¹⁾;
- Verordnung (EG) Nr. 880/98 der Kommission vom 24. April 1998 zur Festlegung der Referenzmethoden für die Bestimmung des Gehalts an Wasser, fettfreier Trockenmasse und Fett von Butter ⁽¹²⁾;
- Verordnung (EG) Nr. 1459/98 der Kommission vom 8. Juli 1998 zur Festlegung eines Referenzverfahrens zur Bestimmung von Vanillin in Butterfett, Butter oder Rahm ⁽¹³⁾, geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 175/1999.

⁽¹⁾ ABl. L 198 vom 10.8.1968, S. 13.
⁽²⁾ ABl. L 28 vom 1.2.1988, S. 1.
⁽³⁾ ABl. L 399 vom 31.12.1992, S. 29.
⁽⁴⁾ ABl. L 20 vom 27.1.1999, S. 22.
⁽⁵⁾ ABl. L 17 vom 20.1.1994, S. 7.
⁽⁶⁾ ABl. L 283 vom 25.11.1995, S. 7.
⁽⁷⁾ ABl. L 142 vom 15.6.1996, S. 13.
⁽⁸⁾ ABl. L 142 vom 15.6.1996, S. 15.
⁽⁹⁾ ABl. L 142 vom 15.6.1996, S. 26.
⁽¹⁰⁾ ABl. L 246 vom 27.9.1996, S. 5.
⁽¹¹⁾ ABl. L 111 vom 29.4.1999, S. 24.
⁽¹²⁾ ABl. L 124 vom 25.4.1998, S. 16.
⁽¹³⁾ ABl. L 193 vom 9.7.1998, S. 16.