

I

(Rättsakter vilkas publicering är obligatorisk)

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 213/2001

av den 9 januari 2001

om tillämpningsföreskrifter för förordning (EG) nr 1255/1999 när det gäller de metoder som skall användas för analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölkprodukter och om ändring av förordningarna (EG) nr 2771/1999 och (EG) nr 2799/1999

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR
ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

mjölk och skummjölkspulver avsedda att användas till
foder samt försäljning av sådant skummjölkspulver ⁽³⁾.

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska
gemenskapen,

- (2) Den sammansättning och de kvalitetsegenskaper hos
mjölk och mjölkprodukter som fastställs inom ramen
för de ordningar som föreskrivs i förordning (EG) nr
1255/1999 bör kontrolleras för säkerställande av att de
till fullo uppfyller de fastställda kraven.

med beaktande av rådets förordning (EG) nr 1255/1999 av den
17 maj 1999 om den gemensamma organisationen av mark-
naden för mjölk och mjölkprodukter ⁽¹⁾, särskilt artiklarna 10,
15 samt artiklarna 26.3, 29.1 och 31.14 i denna, och

- (3) Det föreskrivs ofta att referensmetoderna för sådana
kontroller skall vara metoder som offentliggörs av inter-
nationella organisationer såsom CEN, IDF, ISO och
AOAC International, och som regelbundet uppdateras av
dessa organisationer. I vissa fall finns det en referens-
metod för gemenskapen, men i andra fall specificeras
ingen referensmetod i gemenskapens regelverk. För att
skapa enhetlighet i tillämpningen av referensmetoder är
det lämpligt att varje år utarbeta en förteckning över
referensmetoder och att ange att den metod som skall
tillämpas måste finnas med i denna förteckning.

av följande skäl:

- (1) I kommissionens förordningar (EEG) nr 1216/68, (EEG)
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 och (EG) nr 1459/98 – till
vilka fullständiga hänvisningar återfinns i bilaga XXVI till
denna förordning – fastställs referens- och rutinmetoder
för analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölk-
produkter samt tillämpningsområde och -föreskrifter för
dessa metoder. För tydlighetens skull och för att ge de
verksamma inom sektorn ett enda regelverk för meto-
derna och deras tillämpningsföreskrifter, bör ovan-
nämnda förordningar omarbetas till en enda text. I
samma syfte bör följande förordningar ändras och deras
bilagor om analysmetoder föras in i denna förordning:
kommissionens förordning (EG) nr 2771/1999 av den
16 december 1999 om tillämpningsföreskrifter till
rådets förordning (EG) nr 1255/1999 när det gäller
interventionsåtgärder på marknaden för smör och
grädde ⁽²⁾ och (EG) nr 2799/1999 av den 17 december
1999 om tillämpningsföreskrifter för förordning (EG) nr
1255/1999 beträffande beviljande av stöd för skum-

- (4) Användning av rutinmetoder bör inte uteslutas. Vill-
koren för deras tillämpning bör specificeras.
- (5) Gemensamma metoder bör fastställas för att upprätta
enhetliga rutiner för utvärdering av analysresultaten.
Samma sak gäller för sensorisk bedömning av produk-
terna i fråga och för nyundersökning av resultat som
ifrågasätts.
- (6) För vissa typer av analyser finns det för närvarande inga
internationellt godkända referensmetoder som har vali-
derats. Av denna anledning finns det inte några
uppgifter om hur mycket analysresultaten varierar
mellan olika laboratorier. Således bör det fastställas
metoder i gemenskapen som har validerats enligt inter-
nationellt fastställda regler och som har använts som
referensmetoder.

⁽¹⁾ EGT L 160, 26.6.1999, s. 48.

⁽²⁾ EGT L 333, 24.12.1999, s. 11.

⁽³⁾ EGT L 340, 31.12.1999, s. 3.

- (7) I kommissionens förordning (EG) nr 2571/97 om försäljningen av smör till sänkta priser och om beviljande av stöd för grädde, smör och koncentrerat smör avsett att användas i framställningen av konditorivaror, glass och andra livsmedel⁽¹⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 635/2000⁽²⁾, föreskrivs spårning av grädde, smör och koncentrerat smör under olika förhållanden i syfte att kontrollera den slutliga användningen av dessa produkter. På grund av spårningens betydelse för att ordningen skall fungera korrekt och för att aktörer som deltar i den skall behandlas likvärdigt bör gemensamma metoder i mesta möjliga mån införas för att bestämma spårämnen.
- (8) Koncentrerat smör skall spåras under kontroll, dels i enlighet med kommissionens förordning (EEG) nr 3143/85 av den 11 november 1985 om försäljning till sänkta priser av interventionssmör avsett för direkt förbrukning i form av koncentrerat smör⁽³⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 101/1999⁽⁴⁾, dels med kommissionens förordning (EEG) nr 429/90 av den 20 februari 1990 om beviljande genom anbudsinfördran av stöd för koncentrerat smör avsett för direkt förbrukning inom gemenskapen⁽⁵⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 124/1999⁽⁶⁾, samt i enlighet med förordning (EG) nr 2571/97. För att undvika risken för omdestinering är det ett oeftergivligt krav att reglerna för märkning av koncentrerat smör följs. Följaktligen bör det fastställas en gemensam metod för att påvisa spårämnen.
- (9) Stöd för privat lagring av ost som tillverkats av mjölk från tackor får beviljas i enlighet med artikel 9 i förordning (EG) nr 1255/1999. En särskild ersättning för dessa produkter får beviljas i enlighet med artikel 31 i samma förordning. Det är tillåtet att från vissa tredje länder till gemenskapen importera ost som tillverkats av mjölk från tackor, getter eller bufflar eller av blandningar av mjölk från dessa djur i enlighet med förmånsbehandlingen. Till följd av de ovan nämnda bestämmelserna är det nödvändigt att genom lämpliga kontroller verifiera att komjölk inte ingår i produkterna i fråga. Följaktligen är det lämpligt att fastställa en referensmetod för gemenskapen för att påvisa förekomsten av komjölk, utan att detta påverkar användningen av rutinmetoder, förutsatt att de uppfyller vissa kriterier.
- (10) I kommissionens förordning (EEG) nr 2921/90 av den 10 oktober 1990 om beviljande av stöd för framställningen av kasein och kaseinater av skummjölk⁽⁷⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 2654/1999⁽⁸⁾, föreskrivs att avsaknaden av koliforma bakterier skall fast-

ställas. Den internationellt godkända referensmetoden för påvisande av koliforma bakterier i mjölk och mjölkprodukter är den internationella standarden IDF 73A: 1985. Den kan emellertid endast tillämpas i modifierad form för att spåra koliforma bakterier i en viss mängd av produkten. Därför bör det upprättas en referensmetod för gemenskapen för att spåra koliforma bakterier, vilken grundar sig på den ovannämnda standarden.

- (11) I rådets förordning (EEG) nr 2658/87 av den 23 juli 1987 om tulltaxe- och statistiknomenklaturen och om Gemensamma tulltaxan⁽⁹⁾, senast ändrad genom förordning 254/2000⁽¹⁰⁾, differentieras tullsatserna för foderblandningar med tulltaxenummer 2309, beroende på deras mjölkhalt. För att säkerställa en enhetlig tillämpning av bestämmelserna i fråga är det nödvändigt att fastställa en för alla medlemsstater obligatorisk metod för analys av laktosinnehållet och att i detta syfte behålla en allmänt erkänd metod.
- (12) I förordning (EG) nr 1255/1999 föreskrivs att vissa kvalitetsvillkor skall iakttas när det gäller smör och skummjölkpulver avsett för intervention eller skummjölkpulver som är avsett att användas som foder. Följaktligen bör referensmetoder fastställas för verifiering av dessa villkor.
- (13) Användningen av vissa metoder som införs för första gången genom denna förordning kräver en anpassningsperiod. Därför bör deras användning skjutas upp.
- (14) Förvaltningskommittén för mjölk och mjölkprodukter har inte avgivit något yttrande inom den tid som dess ordförande har bestämt.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

KAPITEL I

ALLMÄNNA BESTÄMMELSER

Artikel 1

Räckvidd och användningsområde

I denna förordning fastställs föreskrifter för tillämpningen av metoder för kemisk, fysikalisk och mikrobiologisk analys och sensorisk bedömning av mjölk och mjölkprodukter inom ramen för de ordningar som föreskrivs i den gemensamma organisationen av marknaden för mjölk och mjölkprodukter som upprättas i förordning (EG) nr 1255/1999, samt vissa av dessa metoder.

⁽⁹⁾ EGT L 256, 7.9.1987, s. 1.

⁽¹⁰⁾ EGT L 28, 3.2.2000, s. 16.

⁽¹⁾ EGT L 350, 20.12.1997, s. 3.

⁽²⁾ EGT L 76, 25.3.2000, s. 9.

⁽³⁾ EGT L 298, 12.11.1985, s. 9.

⁽⁴⁾ EGT L 11, 16.1.1999, s. 14.

⁽⁵⁾ EGT L 45, 21.2.1990, s. 8.

⁽⁶⁾ EGT L 16, 21.1.1999, s. 19.

⁽⁷⁾ EGT L 279, 11.10.1990, s. 22.

⁽⁸⁾ EGT L 325, 17.12.1999, s. 10.

*Artikel 2***Förteckning över metoder**

1. I bilaga I fastställs en förteckning över referensmetoder som är tillämpliga för de analyser som avses i artikel 1.
2. Kommissionen skall minst en gång om året uppdatera denna förteckning i enlighet med förfarandet i artikel 42 i förordning (EG) nr 1255/1999.

*Artikel 3***Rutinmetoder**

Rutinmetoder får användas för de analyser som krävs i gemenskapens regelverk, förutsatt att de är väl kalibrerade och regelbundet kontrolleras mot referensmetoden.

Det förfarande som avses i bilaga II får tillämpas vid kontroll av resultat som erhållits med rutinmetoder och som ligger nära de gränsvärden som anges i de berörda förordningarna.

Vid tvister skall de resultat som erhålls med referensmetoden vara utslagsgivande.

*Artikel 4***Validering av referensmetoder**

1. En referensmetod skall anses validerad om den uppfyller de fastställda precisionskriterierna i fråga om repeterbarhet och reproducerbarhet.
2. Om en referensmetod som fastställs i förordningarna i fråga inte har validerats skall medlemsstaterna upprätta ett provisoriskt gränsvärde för reproducerbarhet.

Detta gränsvärde skall fastställas enligt förfarandet i bilaga III.b. Under de 18 månader som följer ikraftträdandet av denna förordning får medlemsstaterna tillämpa ett likvärdigt förfarande.

Minst en gång om året skall det kontrolleras att gränsvärdet iakttas.

3. Om resultaten från tillämpningen av validerade referensmetoder eller metoder med provisoriska precisionsdata visar att ett gränsvärde har överskridits, skall den metod för bedömning av analysresultat som beskrivs i bilaga IV tillämpas vid bestämning av den kritiska differensen från detta gränsvärde.

*Artikel 5***Analysresultatens godtagbarhet**

1. Analyserna skall utföras i laboratorier där man tillämpar en intern kvalitetskontroll i enlighet med bilaga V.a eller en metod på jämförbar nivå.

En detaljerad beskrivning av den tillämpade metoden skall finnas tillgänglig på laboratoriet.

2. Laboratorierna skall fastställa sina interna precisionsstandarder i en serie för alla metoder i enlighet med
 - a) den metod som fastställs i bilaga V.b eller
 - b) en validerad, offentliggjord metod med fastställd repeterbarhet.

Minst en gång om året skall det kontrolleras att gränsvärdet för reproducerbarhet följs i enlighet med förfarandet i bilaga III.a.

Andra stycket gäller inte om laboratoriet deltar i en interkalibrering (kvalifikationsprövning) under året.

3. Laboratorierapporten rörande analysresultaten skall innehålla tillräckliga uppgifter för att möjliggöra en utvärdering av resultaten i enlighet med bilaga IV och bilaga VIII.
4. Analysresultaten skall anses godtagbara om de har erhållits dels enligt de kriterier för godtagbarhet som beskrivs i den interna kvalitetsstyrningsrutin som avses i punkt 1 och dels enligt de interna precisionsstandarder som avses i punkt 2.

*Artikel 6***Sensorisk bedömning**

1. När det gäller smör skall metoderna i bilaga VI tillämpas för kontroll av bedömarens arbete och resultatens tillförlitlighet. Den metod som beskrivs i bilaga VII skall tillämpas som referensmetod för sensorisk bedömning.
2. När det gäller mjölk och andra mjölkprodukter än smör skall medlemsstaterna som referensmetod för sensorisk bedömning använda antingen standarden IDF 99C/1997 eller andra likvärdiga metoder som de skall meddela kommissionen.

Metoderna i bilaga VI får tillämpas för kontroll av bedömarens arbete och resultatens tillförlitlighet.

*Artikel 7***Provtagning och ifrågasättande av analysresultat**

1. Dubbla prover skall tas för de analyser som föreskrivs i gemenskapslagstiftningen.
2. Förfarandet i bilaga VIII får tillämpas i fall då resultaten av en analys inte godtas av operatören.

KAPITEL II

ANALYSEMETODER

Artikel 8

Vattenhalt/torrsubstans/fetthalt i smöret

1. Den analysmetod som beskrivs i bilaga IX skall användas som referensmetod vid bestämning av vattenhalten i smör.
2. Den analysmetod som beskrivs i bilaga X skall användas som referensmetod vid bestämning av halten av fettfri torrsubstans i smör.
3. Den analysmetod som beskrivs i bilaga XI skall användas som referensmetod vid bestämning av fetthalten i smör.

Artikel 9

Spårämnen

1. Den analysmetod som beskrivs i bilaga XII skall tillämpas som referensmetod för bestämning av vanillin i koncentrerat smör, smör eller grädde.
2. Den analysmetod som beskrivs i bilaga XIII skall tillämpas som referensmetod för bestämning av kvantiteten etylester av β -apo-8'-karotinsyra i koncentrerat smör eller smör.
3. Den analysmetod som beskrivs i bilaga XIV skall tillämpas som referensmetod för bestämning av innehållet av stigmasterol eller β -sitosterol i smör och koncentrerat smör.
4. Det koncentrerade smöret, smöret eller grädden skall anses ha spårats i enlighet med gällande gemenskapslagstiftning om de erhållna resultaten motsvarar specifikationerna under punkt 8 i de bilagor som avses i punkterna 1, 2 och 3.

Artikel 10

Påvisande av kasein i komjolk

1. Den referensmetod för analys som anges i bilaga XV skall användas för att säkerställa att ost som uteslutande skall vara framställd av mjölk från tackor, getter eller bufflar eller av en blandning av mjölk från dessa djur inte innehåller komjölkskasein.

Komjölkskasein skall anses förekomma om den konstaterade halten av komjölkskasein i det prov som analyseras motsvarar eller är högre än halten i det referensprov som innehåller 1 procent komjolk och som föreskrivs i bilaga XV.

2. De rutinmetoder för att påvisa komjölkskasein i ost och som anges i punkt 1, får användas på följande villkor:

a) Detektionsgränsen skall vara högst 0,5 procent.

b) Oriktiga positiva resultat får inte förekomma.

c) Det skall vara möjligt att påvisa komjölkskasein med erforderlig noggrannhet, även efter de långa mognadsperioder som kan förekomma under vanliga handelsförhållanden.

Om villkoret i punkt b inte är uppfyllt skall varje prov som ger ett positivt resultat analyseras med hjälp av referensmetoden.

Om kravet i punkt c inte uppfylls för en viss typ av ost som anges i punkt 1 skall den osten analyseras med hjälp av referensmetoden.

Artikel 11

Påvisande av koliforma bakterier

1. Den referensmetod för analys som beskrivs i bilaga XVI skall tillämpas för att spåra koliforma bakterier i smör, skummjölkspulver och kasein/kaseinat.

2. Rutinmetoder för att spåra koliforma bakterier får användas på villkor att de resultat som uppnås är jämförbara med de resultat som uppnås genom de referensmetoder som beskrivs i bilagan. Rutinmetoder måste särskilt ha en tillräcklig detektionsgräns. Oriktiga negativa resultat får inte förekomma. Om det inte kan uteslutas att oriktiga negativa resultat förekommer, måste varje positivt resultat bekräftas med hjälp av referensmetoden.

Artikel 12

Laktoshalt

Metoden för att fastställa laktoshalten i produkter med nummer 2309 i den Kombinerade nomenklaturen fastställs i bilaga XVII.

Artikel 13

Påvisande av löpevassle

1. Metoden för att påvisa löpevassle i skummjölkspulver avsett för offentlig lagring fastställs i bilaga XVIII.

2. Metoden för att påvisa löpevassle i skummjölkspulver och i foderblandningar fastställs i bilaga XIX.

Artikel 14

Påvisande av kärnmjolk

Metoden för att påvisa kärnmjolk i skummjölkspulver fastställs i bilaga XX.

Artikel 15

Antimikrobiella rests substanser

Metoden för att påvisa rests substanser av antibiotika och sulfamid/dapson i skummjörkspulver fastställs i bilaga XXI.

Artikel 16

Halt av skummjörkspulver

Metoden för att fastställa halten av skummjörkspulver i foderblandningar fastställs i bilaga XXII.

Artikel 17

Påvisande av stärkelse

Metoden för att påvisa stärkelse i skummjörkspulver, denaturerat mjörkspulver och foderblandningar fastställs i bilaga XXIII.

Artikel 18

Vattenhalten i syrat kärnmjörkspulver

Metoden för att fastställa vattenhalten i syrat kärnmjörkspulver avsett att användas i foderblandningar fastställs i bilaga XXIV.

Artikel 19

Påvisande av främmande fett

Metoden för att påvisa främmande fetter i mjörkfett fastställs i bilaga XXV.

KAPITEL III

SLUTBESTÄMMELSER

Artikel 20

Ändringar av i förordning (EG) nr 2771/1999

Förordning (EG) nr 2771/1999 ändras på följande sätt:

1. I artikel 4.1 skall första meningen ersättas med följande: "De behöriga myndigheterna skall kontrollera smörkvaliteten enligt de metoder som anges i bilaga I och på grundval av prover som tagits enligt föreskrifterna i bilaga IV".
2. I bilaga I skall not nummer 2 fångst ned på sidan ersättas med följande: "Se bilaga I till förordning (EG) nr 213/2001".
3. Bilagorna II och III skall utgå.
4. I bilaga IV.2 näst sista meningen skall "i bilaga III" ersättas med "i bilaga VII till förordning (EG) 213/2001".

Artikel 21

Ändring av i förordning (EG) nr 2799/1999

Förordning (EG) nr 2799/1999 ändras på följande sätt:

1. I artikel 20 skall punkterna 1–4 ersättas med följande:

"1. Halten skummjörkspulver i blandningar och foderblandningar skall fastställas genom analys av minst dubbelprover enligt den metod som anges i bilaga XXII i förordning (EG) nr 213/2001, och skall kompletteras med de kontrollåtgärder som anges i artikel 17.3 i denna förordning. Om resultaten av dessa kontroller inte stämmer överens, skall resultatet av kontrollen på plats vara avgörande.

2. Frånvaron av löpevasslepulver skall påvisas enligt den metod som beskrivs i bilaga XIX i förordning (EG) nr 213/2001.

3. Halten stärkelse i foderblandningar skall bestämmas genom de kontrollåtgärder som anges i artikel 17.3 i denna förordning, och dessa skall kompletteras med den analysmetod som fastställs i bilaga XXIII till förordning (EG) nr 213/2001.

4. Vattenhalten i syrat kärnmjörkspulver skall bestämmas med den analysmetod som beskrivs i bilaga XXIV till förordning (EG) nr 213/2001."

2. Bilagorna III och IV, V och VI skall utgå.

Artikel 22

Upphävanden

Förordningarna (EEG) nr 1216/68, (EEG) nr 3942/92, (EEG) 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 och (EG) nr 1459/98 upphör härmed att gälla.

Hänvisningar till de upphävda förordningarna skall tolkas som hänvisningar till den här förordningen.

Artikel 23

Ikraftträdande

Denna förordning träder i kraft den sjunde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

De metoder som föreskrivs i bilagorna III, IV.4, V, VI och VIII skall börja tillämpas 18 månader efter det att denna förordning har trätt i kraft.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 9 januari 2001.

På kommissionens vägnar

Franz FISCHLER

Ledamot av kommissionen

BILAGA I

(Artikel 2)

FÖRTECKNING ÖVER REFERENSMETODER

Förteckning:

Min. = minimum, Max. = maximum, Bilaga = bilaga till nämnd förordning, ME = medlemsstat, IDF = International Dairy Federation (Internationella mejeriförbundet), ISO = Internationella standardiseringsorganisationen, IUPAC = Internationella kemiunionen, ADPI = American Dairy Products Institute (Amerikanska institutet för mejeriprodukter), SCM = söttad kondenserad mjölk, EMC = evaporerad mjölk eller grädde.

DEL A:

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EG) nr 2771/1999: Offentlig lagring (EGT L 333, 24.12.1999, s. 11)	Osaltat smör	Mjölkfett Vatten Fettfri torrsubstans Fria fettsyror (Max.) Peroxidvärde (Max.) Koliforma bakterier Andra fetter än mjölkfetter Sterolspårämnen Andra spårämnen — vanillin — etylester av karotensyra — triglycerider av heptansyra Sensoriska egenskaper Vattendispersion	Min. 82 % Max. 16 % Max. 2 % 1,2 mmol/100 g fett 0,3 mekv. syre/1 000 g fett Ej påvisbart i 1 g Ej påvisbart genom triglyceridanalys Ej påvisbara Ej påvisbara Ej påvisbara Ej påvisbara Minst fyra poäng av fem för utseende, smak och konsistens Minst fyra poäng	Bilaga XI Bilaga IX Bilaga X Standard IDF 6B:1989 IDF 74A:1991 (engelsk version) Bilaga XVII Bilaga XXVI Bilaga XIV Bilaga XII Bilaga XIII IUPAC 2.301 sub 5 Bilaga VII IDF 112A:1989	Anmärkning 1 Anmärkning 3
Förordning (EG) nr 2771/1999, Privat lagring	Osaltat smör	Mjölkfett Vatten	Min. 82 % Max. 16 %	Bilaga XI Bilaga IX	Anmärkning 6
Förordning (EG) nr 2771/1999, privat lagring	Saltat smör	Mjölkfett Vatten Salt	Min. 80 % Max. 16 % Max. 2 %	Bilaga XI Bilaga IX IDF 12B:1988	Anmärkning 6

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EG) nr 2571/97 (EGT L 350, 20.12.97, s. 3)	Osaltat smör	Mjölfett Vatten Spårämnen: — steroler — vanillin — etylester av karotensyra — triglycerider av heptansyra	Min. 82 % Max. 16 %	Bilaga XI Bilaga IX Bilaga XIV Bilaga XII Bilaga XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Förordning (EG) nr 2571/97	Saltat smör	Mjölfett Vatten: Salt Spårämnen: — steroler — vanillin — etylester av karotensyra — triglycerider av heptansyra	Min. 80 % Max. 16 % Max. 2 %	Bilaga XI Bilaga IX IDF 12B:1988 Bilaga XIV Bilaga XII Bilaga XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Förordning (EEG) nr 2571/97	Koncentrerat smör	Mjölfett Vattenhalt och fettfria mjölktorrs- substanser Fettsyrahalt Peroxidvärde (Max.) Andra fetter än mjölkfetter Smak Lukt Övriga Spårämnen: — steroler — vanillin — etylester av karotensyra — triglycerider av heptansyra	Min. 99,8 % Max. 0,2 % Max. 0,35 % (oljesyra) 0,5 mekv. syre/1 000 g fett Finns ej Frisk Inga främmande lukter Inga neutraliseringsmedel, antioxi- danter eller konserveringsmedel	IDF 24:1964 IDF 23A:1988 (vattenhalt) IDF 24:1964 (fettfri mjölktorrs- substans) IDF 6B:1989 IDF 74A:1991 (engelsk version) Bilaga XXV Bilaga XIV Bilaga XII Bilaga XIII IUPAC 2.301 sub 5	Anmärkning 1

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EEG) nr 2571/97	Grädd	Oljor och fetter Spårämnen: — steroler — vanillin — etylester av karotensyra — triglycerider av heptansyra	35 %	IDF 16C:1987 Metoder godkända av behörig myndighet Bilaga XII Metoder godkända av behörig myndighet IUPAC 2.301 sub 5	Anmärkning 2 Anmärkning 2
Förordning (EEG) nr 429/90 (EGT L 45, 21.2.1990, s. 8)	Koncentrerat smör	Mjölkfett Fettfri torrsubstans Spårämnen: — stigmaterol (95 %) — stigmaterol (85 %) — triglycerider av heptansyra — etylester av smörsyra och stigmasterol — Lecitin (E322) NaCl Fettsyrahalt Peroxidvärde (Max.) Smak Lukt Övriga	Min. 96 % Max. 2 % 15 g/100 kg koncentrerat smör 17 g/100 kg koncentrerat smör 1,1 kg/100 kg koncentrerat smör Se bilagan, punkt 1 c Max. 0,5 % Max. 0,75 % Max. 0,35 % (oljesyra) Max. 0,5 mekv. syre/1 000 g fett Frisk Inga främmande lukter Inga neutraliseringsmedel, antioxidanter eller konserveringsmedel	Metoder godkända av behörig myndighet Metoder godkända av behörig myndighet Bilaga XIV Bilaga XIV IUPAC 2.301 sub 5 Bilaga XIV Metoder godkända av behörig myndighet Metoder godkända av behörig myndighet (smörsyra) IDF 12B:1988 IDF 6B:1989 IDF 74A:1991 (engelsk version)	Anmärkning 2 Anmärkning 2 Anmärkning 2 Anmärkning 2 Anmärkning 1
Förordning (EEG) nr 2191/81 (EGT L 213, 1.8.1981, s. 20)	Osaltat smör	Mjölkfett Vatten	Min. 82 % Max. 16 %	Bilaga XI Bilaga IX	

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EEG) nr 2191/81	Saltat smör	Mjölkfett Vatten Salt	Min. 80 % Max. 16 % Max. 2 %	Bilaga XI Bilaga IX IDF 12B:1988	
Artikel 9 och avdelning II i förordning (EG) nr 1255/1999	Ost av mjölk från tackor och/eller getter	Komjök	< 1 %	Bilaga XV	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga I – Surt kasein	Vatten Oljor och fetter Fria syror	Max. 12,00 % Max. 1,75 % Max. 0,30 % (mjölksyra)	IDF 78C:1991 IDF 127A:1988 IDF 91:1979	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga I – Löpekasein	Vatten Oljor och fetter Aska	Max. 12,00 % Max. 1,00 % Min. 7,50 %	IDF 78C:1991 IDF 127A:1998 IDF 90:1979	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga I – Kaseinat	Vatten Mjolkprotein Fett och aska	Max. 6,00 % Min. 88,00 % Max. 6,00 %	IDF 78C:1991 IDF 92:1979 IDF 127A:1988 IDF 89:1979 eller IDF 90:1979	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga II – Surt kasein	Vatten Oljor och fetter Fria syror Total bakteriehalt (Max.) Koliforma bakterier Halt av termofila bakterier (Max.)	Max. 10,00 % Max. 1,50 % Max. 0,20 % (mjölksyra) 30 000 1/g inga/0,1 g 5 000/1 g	IDF 78C:1991 IDF 127A:1988 IDF 91:1979 IDF 100B:1991 Bilaga XVI IDF 100B:1991	Anmärkning 3 Anmärkning 3 Anmärkning 3, 4
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga II – Löpekasein	Vatten Oljor och fetter Aska Total bakteriehalt (Max.) Koliforma bakterier Halt av termofila bakterier (Max.)	Max. 8,00 % Max. 1,00 % Min. 7,50 % 30 000 1/g inga/0,1 g 5 000/1 g	IDF 78C:1991 IDF 127A:1988 IDF 90:1979 IDF 100B:1991 Bilaga XVI IDF 100B:1991	Anmärkning 3 Anmärkning 3 Anmärkning 3, 4

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga II – Kaseinat	Vatten Mjolkprotein Fett och aska Total bakteriehalt (Max.) Koliforma bakterier Halt av termofila bakterier (Max.)	Max. 6,00 % Min. 88,00 % Max. 6,00 % 30 000/1 g inga/0,1 g 5 000/1 g	IDF 78C:1991 IDF 92:1979 IDF 127A:1988 IDF 89:1979 eller IDF 90:1979 IDF 100B:1991 Bilaga XVI IDF 100B:1991	Anmärkning 3 Anmärkning 3 Anmärkning 3, 4
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga III – Kaseinat	Vatten Mjolkprotein Oljor och fetter Laktos Aska Total bakteriehalt (Max.) Koliforma bakterier Halt av termofila bakterier (Max.)	Max. 6,00 % Min. 85,00 % Max. 1,50 % Max. 1,00 % Max. 6,50 % 30 000/1 g inga/0,1 g 5 000/1 g	IDF 78C:1991 IDF 92:1979 IDF 127A:1988 IDF 106:1982 IDF 89:1979 eller IDF 90:1979 IDF 100B:1991 Bilaga XVI IDF 100B:1991	Anmärkning 3 Anmärkning 3 Anmärkning 3, 4
Förordning (EEG) nr 2799/1999 (EGT L 340, 31.12.1999, s. 3)	Foderblandningar och skummjölkspulver (fodertyp)	Vatten (surt kärnmjölkspulver) Proteinprodukter Vatten (skummjölkspulver) Fett (skummjölkspulver) Löpe, vassle (skummjölkspulver) Stärkelse (skummjölkspulver) Vatten (blandning) Fett (blandning) Löpe, vassle (blandning) Halt av skummjölkspulver i slutprodukt Fett i slutprodukt Stärkelse i slutprodukt Koppar i slutprodukt	Max. 5 % 31,4 % (Min. av fettfria torrsbstansen) Max. 5 % Max. 11 % Inget Inget 5 % (Max. av fettfria torrsbstansen) — Inget Min. 50 % Min. 2,5 % eller 5 % Min. 2 % 25 ppm	IDF 20B:1993 IDF 26A:1993 IDF 9C:1987 Bilaga XIX Bilaga XXIII IDF 26A:1993 Kommissionens direktiv 84/4/EEG (EGT L 15, de 18.1.1984, s. 28) Bilaga XIX Bilaga XXII Kommissionens direktiv 84/4/EEG Bilaga XXIII Kommissionens direktiv 78/633/EEG (EGT L 206, 26.7.1987, s. 43)	Anmärkning 7 Anmärkning 7 Anmärkning 8 Anmärkning 9

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EG) nr 322/96 (EGT L 45, 23.2.1996, s. 5)	Spraytorkat skummjölkspulver	Fetter	Max. 1,0 %	IDF 9C:1987	
		Proteinprodukter	31,4 % (Min. av fettfria torrsubstansen)	IDF 20B:1993	
		Vatten	Max. 3,5 %	IDF 26A:1993	
		Surhet (N/10 NaOH)	Max. 19,5 ml	IDF 86:1981	
		Laktat	Max. 150 mg/100 g	IDF 69B:1987	
		Fosfater	Negativ	ISO 3356:1975	
		Löslighet	Max. 0,5 ml vid 24 °C	IDF 129A:1988	
		Brända partiklar	B-skiva Min. (15,0 mg)	ADPI:1990	
		Total bakteriehalt	40 000/1 g	IDF 100B:1991	Anmärkning 3
		Koliforma bakterier	Negativ/0,1 g	Bilaga XVI	Anmärkning 3
		Kärnmjolk	Negativ	Bilaga XX	
		Vassle – löpe	Negativ	Bilaga XVIII	
		Vassle – syra	Negativ	Metod godkänd av behörig myndighet	Anmärkning 2
		Antimikrobiella ämnen		Bilaga XXI	

DEL B

De referensmetoder som anges i del B skall tillämpas för analys av produkter som omfattas av en av de förordningar som anges i första kolumnen.

Kommissionens förordning	Produkt	KN-nr	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EEG) nr 2658/87 (EGT L 256, 7.9.1987, s. 1) Förordning (EG) nr 2414/98 (EGT L 299, 10.11.1998, s. 7) Förordning (EG) nr 1374/98 (EGT L 185, 30.6.1998, s. 21) Förordning (EG) nr 2508/97 (EGT L 345, 16.12.1997, s. 31) Förordning (EG) nr 174/1999 (EGT L 20, 27.1.1999, s. 8)	Mjolk och grädde, inte koncentrerade och inte försatta med socker eller annat sötningsmedel	0401	Fetter (= 6 %)	Gränsvärdena är de som anges i KN-nummerbeskrivningen för produkten i fråga, och som, i tillämpliga fall, anges i kommissionens förordning (EEG) nr 3846/87 (EGT L 366, 24.12.1987, s. 1) i del 9 i exportnomenklaturen eller i förordning (EG) nr 1374/1998 (EGT L 185, 30.6.1998, s. 21)	IDF 1D:1996	
			Fetter (> 6 %)			

Kommissionens förordning	Produkt	KN-nr	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
	Mjölk eller grädde, koncentrerade eller försatta med socker eller annat sötningsmedel	0402	Fetter i flytande form Fetter i fast form Proteinprodukter Sackaros (normal halt) Sackaros (låg halt) Torrs substans (SCM) Torrs substans (EMC) Vatten (mjölk och gräddpulver)		IDF 13C:1987 IDF 9C:1987 IDF 20B:1983 IDF 35A:1992 Metoder godkända av behörig myndighet IDF 15B:1991 IDF 21B:1987 IDF 26A:1993	Anmärkning 2
	Kärnmjölk, mjölk och grädde, jäst eller syrad koncentrerad eller inte koncentrerad, försatt med socker eller annat sötningsmedel	0403	Fetter Proteinprodukter Sackaros (normal halt) Sackaros (låg halt) Vatten (surt kärnmjölkspulver) Vatten (kärnmjölkpulver, ej surt) Torrs substans (andra produkter)		IDF 1D:1996, IDF 9C:1987 IDF 16C:1987, IDF 22B:1987 IDF 126A:1988 IDF 20B:1993 IDF 35A:1992 Metoder godkända av behörig myndighet Bilaga XXIV IDF 26A:1993 Metoder godkända av behörig myndighet	Anmärkning 2
	Vassle, även koncentrerad eller inte eller försatt med socker eller annat sötningsmedel; Produkter bestående av naturliga mjölkbeståndsdelar	0404	Fetter Proteinprodukter Sackaros (normal halt) Sackaros (låg halt)		IDF 9C:1987, IDF 16C:1987 IDF 22B:1987 IDF 20B:1993 IDF 35A:1992 Metoder godkända av behörig myndighet	Anmärkning 2
		0404 90	Proteinprodukter Vatten Torrs substans (Koncentrerade produkter)		IDF 20B:1993 IDF 26A:1993 IDF 15B:1991 IDF 21B:1987	
	Smör och andra fetter framställda av mjölk; bredbara mjölkprodukter	0405	Fetter (om ≤ 85 %) Vatten Smör Fettfri torrs substans NaCl Smörolja Fetter (om > 99 %) Vatten (om fetter < 99 %)		Bilaga XI Bilaga IX Bilaga X IDF 12B:1998 IDF 24:1964 IDF 23A:1988	

Kommissionens förordning	Produkt	KN-nr	Parameter	Gränsvärden	Referensmetod	Anmärkning
	Ost och ostmassa	0406	Fetter Torrs substans Torrs substans (Ricotta) NaCl Laktos		IDF 5B:1986 IDF 4A:1982 IDF 58:1970 IDF 88A:1998 IDF 79B:1991	
Förordning (EEG) nr 2658/87	Foderblandningar	2309	Laktos		Bilaga XVII	

Anmärkningar till förteckningen över Europeiska unionens referensmetoder

Anmärkning 1: Mjölfettisolering som beskrivs i IDF-standard 6B:1989 (skydd mot ljus).

Anmärkning 2: Ingen referensmetod har upprättats.

Anmärkning 3: Provberedning skall utföras enligt IDF-standard 122C:1996 eller enligt IDF-standard 73A:1985.

Anmärkning 4: Inkubation i 48 timmar vid 55 °C, försiktighetsåtgärder skall vidtas så att odlingsmediet inte torkar.

Anmärkning 5: % fettfri torrs substans = % torrs substans – % fett.

Anmärkning 6: Smöret skall motsvara produktionsstatens nationella kvalitetsklass enligt bilaga V i kommissionens förordning (EG) 2771/1999.

Anmärkning 7: Kommissionens direktiv (EEG) nr 4/84.

Anmärkning 8: Kommissionens förordning (EG) nr 1758/94 (EGT L 183, 19.7.1994, s. 14).

Anmärkning 9: Kommissionens direktiv 78/633/EEG.

BILAGA II

(Artikel 3)

KONTROLL AV RESULTAT SOM ERHÅLLITS MED RUTINMETODER OCH SOM LIGGER NÄRA DE GRÄNSVÄRDEN FÖR SAMMANSÄTTNING OCH KVALITET SOM ANGES I FÖRORDNINGARNA

Om m_o är ett gränsvärde som anges för sammansättning och kvalitet i en förordning är beslutsgränsvärdet (L)

$$L = m_o$$

om $R_{Rut}/R_{Ref} \leq 1$

R_{Rut} : Rutinmetodens reproducerbarhetsgränsvärde

R_{Ref} : Referensmetodens reproducerbarhetsgränsvärde

Om m_o är ett övre gränsvärde och $R_{Rut}/R_{Ref} > 1$, erhålls beslutsgränsvärdet genom formeln

$$L = m_o - [(R_{Rut}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

Om under samma förhållanden m_o är ett undre gränsvärde, erhålls beslutsgränsvärdet genom

$$L = m_o + [(R_{Rut}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

CrD_{95} : Referensmetodens kritiska differens (se bilaga IV).

Om m_o är ett övre gränsvärde måste ett slutresultat erhållas med en rutinmetod och som ligger över beslutsgränsvärdet ersättas av ett slutresultat som erhållits med referensmetoden. Slutresultatet måste baseras på minst samma antal analyser/prover som slutresultatet med rutinmetoden.

Om m_o är ett undre gränsvärde skall samma förfarande tillämpas för ett slutresultat erhållas med en rutinmetod och som ligger under beslutsgränsvärdet.

Anmärkning

Det förfarande som beskrivs ovan kan tillämpas om det inte finns några påvisbara matriseffekter.

Matriseffekter kan påvisas på följande sätt: För varje prov som används för kalibrering bestäms differensen (W) mellan de resultat som erhålls med referensmetoden och de som erhålls med rutinmetoden.

Standardavvikelsen beräknad med användning av formeln

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

m: antalet prov som används för kalibrering

jämförs med det aritmetiska medelvärdet av referensmetodens och rutinmetodens standardavvikelse för repeterbarhet.

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

En matriseffekt kan inte uteslutas om

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

där

f = m (f: antal frihetsgrader)

α = felsannolikhet; $\alpha = 0,05$.

I detta fall är vidare undersökning nödvändig innan ett beslutsgränsvärde kan fastställas.

BILAGA III

(Artiklarna 4 och 5)

a) Förfarande för bestämning av överensstämmelse med ett fastställt reproducerbarhetsgränsvärde (kemisk analys)

Överensstämmelse med reproducerbarhetsgränsvärdet kontrolleras genom att jämföra laboratorieresultaten med resultat från ett rutinerat laboratorium ⁽¹⁾ erhållna med ett identiskt prov. En dubbelbestämning utförs i båda laboratorierna och resultaten bedöms med användning av formeln:

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

där

CrD₉₅: kritisk differens (P = 0,95) \bar{y}_2 : Aritmetiskt medeltal av två resultat erhållna i laboratorium 1 \bar{y}_1 : Aritmetiskt medeltal av två resultat erhållna i laboratorium 2

R: reproducerbarhetsgränsvärde: att bestämmas genom interpolation

r: repeterbarhetsgränsvärde: om precisionen varierar med nivån

Om den kritiska differensen har överskridits skall ytterligare ett experiment genomföras inom två månader. Om värdet inte överensstämmer med reproducerbarhetsgränsvärdet i detta andra försök måste de behöriga myndigheterna vidta nödvändiga åtgärder.

b) Förfarande för att erhålla ett provisoriskt reproducerbarhetsgränsvärde (kemisk analys)

Ett provisoriskt reproducerbarhetsgränsvärde (R_{prov}) erhålles genom att använda följande ekvation:

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

där

 \bar{y}_1 : medeltal av två resultat erhållna i laboratorium 1 \bar{y}_2 : medeltal av två resultat erhållna i laboratorium 2 (se del a av bilaga III).

r: repeterbarhetsgränsvärde eller provisoriskt repeterbarhetsgränsvärde.

Anmärkningar:

1. R_{prov} kan användas för att beräkna kritiska differenser (se bilaga VI).
2. R_{prov} fastställas till 2r, om det beräknade värdet för R_{prov} är mindre än 2r.
3. Om det beräknade värdet är större än 3r eller är större än två gånger det R-värde som förutsågs från Horwitz ekvation (*), är R_{prov} oacceptabelt högt och kan inte användas för att beräkna den kritiska differensen.
4. R_{prov} bör bestämmas minst en gång per år på grundval av resultat som erhållits i två laboratorier (se bilaga IV).
5. Medelvärdet av R_{prov} bör användas för beräkning av kritiska differenser. De regler som anges under 2 och 3 gäller för medelvärdet av R_{prov} .

(*) Horwitz ekvation:

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

där

RSD_R: Standardavvikelse för reproducerbarheten

C: Koncentrationen uttryckt som en decimalfraktion (t.ex.: 10 g/100 g = 0,1).

Referens:

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

⁽¹⁾ Som en allmän regel bör det rutinerade laboratoriet vara ett laboratorium som framgångsrikt har deltagit antingen i fastställandet av provmetoden eller i en kompetensprövning.

Reproducerbarhetsgränsvärdet (R-värdet) erhålls från det beräknade RSD_R -värdet som

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

(\bar{x} = de erhållna resultatens aritmetiska medelvärde)

Några beräknade RSD_R -värden (exempel)

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

För en provkoncentration på 1 g/100 g erhålls

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

BILAGA IV

(Artikel 4)

BEDÖMNING AV ANALYSRESULTAT SOM ERHÅLLITS MED HJÄLP AV VALIDERADE METODER

Om analysresultatet visar att ett gränsvärde har överskridits, beräknas det aritmetiska medelvärdet av två eller flera resultat. Följande förfarande skall tillämpas:

1. Om analysresultatet representerar ett enskilt resultat skall en andra analys utföras under repeterbara förhållanden. Om de två analyserna inte kan utföras under repeterbara förhållanden, utför ytterligare en duplikatanalys under repeterbara förhållanden och använd dessa resultat för bedömning av överensstämmelsen med kritisk differens.
2. Det absoluta värdet av differensen mellan det aritmetiska medelvärdet av de resultat som erhålls under repeterbara förhållanden och gränsvärdet bestäms. Ett absolut värde för differensen som är större än den kritiska differensen betyder att det analyserade provet inte uppfyller kraven.

Den kritiska differensen bestäms med användning av följande formel:

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

där

\bar{y} : aritmetiskt medelvärde av de erhållna resultaten

m_0 : gränsvärde

n : antal analyser/prov.

Om precisionen varierar med nivån kan det bli nödvändigt att bestämma r och R genom interpolation.

Normalt måste ett slutresultat som rapporteras för ett prov visa överensstämmelse med ett gränsvärde.

Slutresultaten omfattar

— inom området m_0 och $m_0 + CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, om gränsvärdet är ett maximum,

— inom området m_0 och $m_0 - CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, om gränsvärdet är ett minimum,

och bör därför bara förekomma undantagsvis.

Slutresultat inom nämnda områden är godtagbara endast om de förekommer högst en gång per fem analyserade prov per parti. Om mindre än fem prov analyseras per parti är 1 resultat inom nämnda område godtagbart. Regeln att endast ett resultat inom nämnda område skall erhållas per fem analyserade prov måste emellertid iakttas om partier erbjuds upprepade gånger av en producent.

3. Om slutresultatet x beräknas med användning av en formel av typen $x = y_1 \pm y_2$ (t.ex. innehåll av vatten + fettfri torrsubstans i smör för att beräkna fetthalten), där y_1 och y_2 är slutresultaten av en enda analystyp, beräknas de totala repeterbarhets- och reproducerbarhetsgränsvärdena r_x och R_x för slutresultaten x som

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

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

där r_1 och r_2 är repeterbarhetsgränsvärdena och R_1 och R_2 är reproducerbarhetsgränsvärdena för resp. y_1 och y_2 .

x jämförs med gränsvärdet m_0 enligt de regler som anges under 1 och 2. Den kritiska differensen bestäms med användning av formeln

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

där x är det aritmetiska medelvärdet av de erhållna x_1 värdena.

4. Om slutresultaten beräknas med användning av en formel av typen

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

(t.ex. fett i torrsubstans av ost),

där y_1 och y_2 är slutresultaten av en enda analystyp, beräknas de totala repeterbarhets- och reproducerbarhetsgränsvärdena r_x och R_x som

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

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

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

μ_1 : gräns- eller målvärde för y_1 (t.ex. fett)

μ_2 : gräns- eller målvärde för y_2 (t.ex. torrsubstans)

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

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

där:

r_1 : reproducerbarhetsgränsvärde, y_1

r_2 : repeterbarhetsgränsvärde, y_2

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

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

där:

R_1 : reproducerbarhetsgränsvärde, y_1

R_2 : reproducerbarhetsgränsvärde, y_2 .

Förfarandena för beräkning av r_x och R_x är tillämpliga endast om de relativa repeterbarhets- och reproducerbarhetsgränsvärdena (r_{x1}^* ; r_{x2}^* ; R_{x1} ; R_{x2}) är mindre än eller lika med 0,15.

x jämförs med gränsvärdet μ_x enligt de regler som anges under 1 och 2. Den kritiska differensen beräknas med användning av formeln

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

där \bar{x} är det aritmetiska medelvärdet av i kronologisk ordning erhållna x -värden (*).

(*) MÅRK: Om t.ex. värdena y_{11} , y_{12} , y_{21} och y_{22} erhålls måste det aritmetiska medelvärdet av y_{11}/y_{21} och y_{12}/y_{22} beräknas.

BILAGA V
INTERNKONTROLL

(Artikel 5)

a) Intern kvalitetsstyrning (IKS) (kemisk analys)

Definition av kontrollmaterial

Ett material som används för IKK och som utsätts för samma eller delvis samma förfarande som undersökt material.

Ett kontrollmaterial kan vara:

- certifierat referensmaterial,
- internt referensmaterial,
- material som validerats genom laborietest, eller
- ett tillsatt material.

Förfarande för etablerande av IKK

Laboratoriet bör etablera IKK enligt det förfarande som beskrivs i IUPAC-dokumentet "Harmoniserade riktlinjer för intern kvalitetsstyrning i analyslaboratorier" (¹).

IKK genomförs genom att kontrollmaterial tas in i analysserien eller genom upprepad analys av undersökningsprovet. Kontrollmaterial måste till sin kemiska sammansättning vara likartade med undersökningsproverna och måste vara tillräckligt stabila under den aktuella perioden. Det måste visas att de på lämpligt sätt kan uppdelas i identiska delar för analys och att de är av en provkoncentration som är lämplig för det aktuella analysområdet.

Ett kontrollmaterial skall sättas in åtminstone en gång per analysserie och det erhållna resultatet skall markeras på ett kontrolldiagram för att mäta long-term errors. Dessutom skall laboratoriet periodiskt visa att det fyller repeterbarhetskravet inom serien. Detta skall åstadkommas genom duplikatanalys av kontroll- och/eller undersökningsmaterial. Resultaten av dessa analyser bör jämföras med eventuellt publicerade repeterbarhetsgränsvärden och befintliga data över intern precision.

Om kontrollmaterial används skall de resultat som erhålls för mellanserieanalys av kontrollmaterialet markeras på ett Shewhartdiagram [ISO 8258 (1991)] styrdiagram med lämpliga kontrollgränsvärden. Aktionsgränserna skall sättas vid

$$x \pm 3s_t$$

där s_t är den totala standardavvikelsen,

H, varningsgränsvärden vid

$$x \pm 2s_t$$

Total standardavvikelse:

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

varvid

s_b : Standardavvikelse mellan serier

s_w : Standardavvikelse inom serien

n: antal bestämningar

Om kontrollmaterial inte används (t.ex. till följd av bristande stabilitet) måste duplikatanalys göras på åtminstone ett av undersökningsmaterialen i varje serie.

De absoluta differenser som erhålls vid duplikatanalys inom en serie (se bilaga 3) skall markeras. Centrumlinjen är $1.128 s_w$, undre gränsvärdet är 0 och övre gränsvärdet (aktionsgränsvärdet) är $3,686 s_w$, om s_w är standardavvikelsen inom serien.

Kontrollförfarandet bör inkludera material på hög och låg nivå när spännvidden i koncentration är stor.

(¹) M. Thompson and R. Wood: "Pure and Applied chemistry" 67 (4), 649-666 (1995).

Om undersökningsmaterialet omfattar ett brett spektrum av provkoncentrationer bör laboratoriet fastställa sambandet mellan precision och viktighetsnivå. Om precisionen är proportionell mot nivån bör senare kontroller göras på grundval av relativ precision (d.v.s. absolut differens i procent av medelvärde).

Det finns tecken på en okontrollerad situation i det analytiska systemet om

- A. det aktuella markeringsvärdet faller utanför aktionsgränserna,
- B. det aktuella resultatet och det föregående värdet faller utanför varningsgränserna men innanför aktionsgränserna,
- C. i fall då kontrollmaterial används, nio på varandra följande värden faller på samma sida av medeltalslinjen,

Laboratoriet bör reagera på en okontrollerad situation genom

- A. avbrytande av analyserna i avvaktan på diagnostiska tester och korrigerande åtgärder, och
- B. kassation av resultatserien och förnyad analys av undersökningsmaterialet.

b) Förfarande vid urval av internt kontrollmaterial och vid fastställande av interna precisionsgränsvärden (kemisk analys)

Data över precisionen inom laboratoriet kan erhållas genom upprepad analys av kontrollmaterial och/eller genom upprepad analys av kontrollprover.

Följande tillvägagångssätt tjänar som riktlinje för laboratorier som fastställer precisionsparametrar för variation inom och mellan serier för senare bruk vid upprättande av styrdiagram. Laboratorier får tillämpa alternativa metoder förutsatt att de på ett godtagbart sätt kan visa att de har producerat data med tillförlitlig precision.

1. Urval av kontrollmaterial

Om det är lämpligt för laboratoriet att använda ett kontrollmaterial, måste data först samlas för att fastställa gränsvärden. Om möjligt bör certifierat referensmaterial (CRM) användas. Tilltänkt kontrollmaterial bör analyseras under repeterbara förhållanden inom en serie som innefattar lämpligt CRM med upprepning och slumpfördelning. CRM måste vara lämpligt ifråga om både matrissammansättning och provkoncentration. Om detta tillvägagångssätt inte är möjligt bör laboratorier söka delta i kompetensprovning och etablera konsensusmedelvärden (tilldelade värden) som kan betraktas som ett konventionellt sant medelvärde som kan tilldelas en meningsfull osäkerhet. Andra metoder innefattar tilldelning av sanna värden genom formulering eller användning av "spiked" kontrollmaterial.

Om laboratoriet regelbundet utför denna typ av analys och redan har etablerat statistisk kontroll måste dessutom eventuellt nytt kontrollmaterial (som krävs t.ex. genom att lagret tagit slut) anskaffas med hänsyn till analyser som är under kontroll med användning av befintligt material.

2. Tilldelning av gränsvärden

Sedan ett kontrollmaterial utvalts skall laboratoriet fastställa precisionstal mellan och inom serier med användning av detta material.

Som ett minimikrav för fastställande av inomserieprecision bör kontrollmaterialet analyseras som duplikatprov vid 12 tillfällen. Duplikatprovanalys bör utföras under repeterbara förhållanden, d.v.s. samma operatör, samma reagens etc. Duplikatprovanalys av kontrollmaterialet bör fördelas slumpmässigt inom en analysserie. Varje duplikatanalys bör utföras en särskild dag under en tidsperiod som avspeglar en riklig variation från serie till serie med hänsyn till normala variationer med avseende på t.ex. reagens, omkalibrering av instrument och, i tillämpliga fall, olika operatörer.

Märk: Man skall vara medveten om att användningen av data som inte är fullt representativa för variationer mellan serier kan ge upphov till onödigt upprepning av analyser genom att alltför snäva gränser sätts. Omvänt kan ett laboratorium som presenterar precisionsdata som är alltför oprecisa vara ur stånd att hålla sig inom föreskrivna gränsvärden i referensmetoderna, det kan förväntas göra ett undermåligt arbete i jämförelse med andra laboratorier och det riskerar att producera data som inte duger för det avsedda ändamålet.

2.1 Bestämning av precisionen inom serien

2.1.1 Precision inom serien då ett kontrollmaterial finns tillgängligt

Duplikatdata (minst 12 duplikatprov) bör först undersökas med Cochrans maximivarianstest. Detta innefattar en jämförelse av det maximala duplikatområdets kvadrat med summan av områdenas kvadrater.

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

där

$d_1 =$ differensen mellan duplikatprov.

Värdet för Cochrans kriterium, C , jämförs med tabellerade värden [ISO 5725 (1994)]. Om ett värde kan klassificeras som en "straggler" eller avvikare bör resultatet undersökas för att finna en förklaring, t.ex. ett tekniskt fel, beräkningsfel, analysfel eller analys av fel prov. Om förklaringen av det tekniska felet är sådan att det visar sig omöjligt att ersätta det misstänkta resultatet bör det kasseras som en verklig avvikare. Om några "stragglers" eller avvikare återstår som inte kan förklaras, skall "stragglers" behållas som korrekta och de statistiska avvikarna kasseras. Laboratoriet bör söka skaffa ersättningsresultat.

Sedan laboratoriet övertygat sig om att resultaten är fria från avvikare, erhålls standardavvikelsen inom serien s_w på följande sätt:

För varje par x_{i1} , x_{i2} av de p duplikatdata sammanställs och beräknas summan av duplikatanalyserna,

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

och differensen mellan duplikatanalyserna,

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

till

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

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

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

En uppskattning av standardavvikelsen inom serien är

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

Internprecisionsgränsvärdet är $2,8 s_w$.

Om en referensmetod används bör internprecisionsgränsvärdet jämföras med det publicerade repeterbarhetsgränsvärdet. Laboratoriet bör uppfylla referensmetodens krav; i annat fall måste orsaken undersökas.

De fastställda gränsvärdena bör betraktas som provisoriska och kan ändras.

2.1.2 Precisionen inom serien om kontrollmaterial inte finns tillgängligt

Laboratoriet får välja att fastställa inomserieprecisionen genom duplikatanalys av representativa kontrollprover (minst 12 duplikatanalyser). I fall då det inte är möjligt att använda kontrollmaterial, t.ex. på grund av instabilitet, måste duplikatdata samlas genom denna metod.

Märk: Det antas att analyserna omfattar en relativt begränsad skala av värden och att ett enda värde följaktligen kan tillämpas på alla proverna. I fall då resultatskalan är vidare, t.ex. täcker en storleksordning, och precisionen är beroende av nivån, bör laboratoriet överväga användning av relativa standardavvikelser.

Data bör undersökas med Cochrans test, som i 2.1.1. Sedan laboratoriet försäkrat sig om att erhållna data är fria från avvikare, kan standardavvikelse inom serien och internprecision fastställas som i avsnitt 2.1.1.

Standardavvikelsen inom serien s_w kan användas för att konstruera styrdiagram (se bilaga 2). De fastställda gränsvärdena bör betraktas som provisoriska och kan ändras.

2.2 Bestämning av precisionen mellan serier

Sammanställ genomsnittsvärdena ($s_i/2$) för varje par och undersök dessa med Grubbs test [ISO 5725 (1994)]. Förkastande-/acceptanskriterier för avvikare eller "stragglers" finns beskrivna i 2.1.1. Laboratoriet bör söka skaffa ett ersättningsvärde för varje kasserat resultat. Sedan laboratoriet försäkrat sig om att erhållna data är fria från avvikare beräknas standardavvikelsen mellan serier s_b .

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

eller 0 om uttrycket under kvadratrotsstecknet är negativt.

Den totala standardavvikelsen s_t används för att konstruera kontrolldiagram för genomsnittet av n bestämningar (se bilaga II). De fastställda gränsvärdena bör betraktas som provisoriska och kan ändras.

3. Omprövning av provisoriska gränsvärden

Kontrollgränsvärden som fastställts enligt ovan måste betraktas som provisoriska beräkningar.

För att uppdatera de gränsvärden som har fastställts på grundval av en acceptabel precision inom serien (avsnitt 2.1.2), bör ytterligare duplikatanalyser från undersökningsprover samlas. Intervallet före granskning beror delvis på analysfrekvensen. Som ett riktvärde bör data granskas sedan ytterligare 10 duplikatanalyser har erhållits. Alla data bör då undersökas med Cochran-test och gränsvärdena bör justeras på grundval av det nya värdet för standardavvikelsen. Senare beslut om kontrollgränsvärdenas giltighet måste fattas mot bakgrund av ytterligare data.

Granskning av ursprungliga data erhållna för precisionen mellan serier beror också på analysfrekvensen. Som en riktlinje bör de ursprungliga antagandena om standardavvikelse och medelvärde omprövas sedan ytterligare 10 datapunkter erhållits från analys av ett kontrollmaterial, med en frekvens av en analys per omgång.

Alla data bör undersökas med Grubbs test på avvikare. Medelvärde och standardavvikelse bör omräknas på basis av de nya data.

Dessutom bör laboratoriet på detta stadium tillämpa ett Cusumdiagram [BS S 700: (1984) och ändring 5480 (1987)] för att undersöka eventuella problem förknippade med t.ex åldersförändringar hos reagens. Varje enskilt resultat som faller utanför Cusums "v-mask"-gränsvärden måste undersökas.

De nya gränsvärdena (medeltal och standardavvikelse) måste underkastas regelbunden kontroll med användande av Cusumtekniken. Varje tecken på att kontrollmaterialets giltighet kan ifrågasättas måste undersökas grundligt.

4. Rapportering av precisionsdata

Laboratoriet skall ställa följande information till den behöriga nationella myndighetens forfogande:

- Tillämpad metod,
- Standardavvikelse inom serien s_w , och internt precisionsgränsvärde,
- Standardavvikelse mellan serier, s_b ,
- Total standardavvikelse s_t ,
- Antal analyser från vilka precisionsdata erhållits.

BILAGA VI

(Artikel 6)

UTVÄRDERING AV BEDÖMARE OCH RESULTATENS TILLFÖRLITLIGHET I SENSORISKA ANALYSER

Följande förfarande skall tillämpas om scoringmetoder tillämpas (IDF-standard 99C/1997).

a) Bestämning av "repetierbarhetsindex"

Minst 10 prover analyseras som blindduplikat av en bedömare inom en period av 12 månader. Detta görs vanligen i flera omgångar. Resultaten för individuella produkttegenskaper bedöms med användning av följande formel:

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

där

w_1 : repeterbarhetsindex

x_{i1} : score för första bedömningen av prov x_1

x_{i2} : score för andra bedömningen av prov x_1

n : antal prov

Proven som skall bedömas bör avspegla ett brett kvalitetsområde. w_1 bör inte överskrida 1,5 (5-gradig skala).

b) Bestämning av "avvikelseindex"

Detta index bör användas för att kontrollera huruvida en bedömare använder samma skala för kvalitetsbedömning som en grupp erfarna bedömare. Scores erhållna av en bedömare jämförs med medeltalet av scores erhållna av bedömargruppen.

Följande formel används för utvärdering av resultaten:

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

där

x_{i1} , x_{i2} : jfr punkt a).

\bar{x}_{i1} , \bar{x}_{i2} : Genomsnittligt score för en bedömargrupp för den första resp. andra bedömningen av provet x_1 .

n : Antalet prov (minst 10 per 12 månader).

Proven som skall bedömas bör avspegla ett brett kvalitetsområde. D_1 bör inte överskrida 1,5 (5-gradig skala).

Medlemsstaterna skall rapportera eventuella problem vid tillämpning av detta förfarande.

c) Jämförelse av resultat erhållna i olika områden inom en medlemsstat och i olika medlemsstater

Där så är möjligt bör minst en gång om året en undersökning genomföras som möjliggör en jämförelse av resultat erhållna av bedömare från olika områden. Om påtagliga differenser noteras bör medlemsstaterna vidta nödvändiga åtgärder för att klarlägga skälen och nå jämförbara resultat.

Medlemsstaterna får organisera undersökningar som möjliggör en jämförelse av resultat erhållna av deras egna bedömare och av bedömare från angränsande medlemsstater. Påtagliga differenser bör föranleda en grundlig undersökning i syfte att nå jämförbara resultat.

Medlemsstaterna skall rapportera resultaten av dessa jämförelser till kommissionen.

BILAGA VII

(Artikel 6)

SENSORISK BEDÖMNING AV SMÖR**1. Omfattning**

Syftet med detta förfarande för sensorisk bedömning av smör är att det skall utgöra en enhetlig metod som är tillämplig i alla medlemsstater.

2. Definitioner

Med *sensorisk bedömning* avses en undersökning av en produkts egenskaper med hjälp av sinnesorganen.

Med *panel* avses en grupp av utvalda bedömare som under bedömningen arbetar utan inbördes kommunikation och utan att påverka varandra.

Med *poängsättning* avses en panels sensoriska bedömning enligt en numerisk skala. En felnomenklatur skall användas.

Med *klassning* avses en kvalitetsklassificering som utförs på grundval av poängsättningen.

Med *kontrollhandlingar* avses handlingar som används för att notera poängen för varje egenskap och den slutliga klassningen av produkten. (Denna handling får också användas för registrering av kemisk sammansättning.)

3. Testrum

3.1 Försiktighetsåtgärder skall vidtas så att bedömarna i testrummet inte påverkas av yttre faktorer.

3.2 Testrummet skall vara fritt från främmande lukter och lätt att rengöra. Väggarna skall vara ljust färgade.

3.3 Testrummet och dess belysning skall vara sådant att egenskaperna hos de produkter som skall poängsättas inte påverkas. Rummet skall vara utrustat med lämplig temperaturreglering.

4. Val av bedömare

Bedömaren skall vara bekant med smörprodukter och kompetent att utföra sensorisk klassning. Hans kompetens skall bedömas regelbundet (minst en gång per år) av den behöriga myndigheten.

5. Krav på panelen

Antalet bedömare i panelen bör vara udda, och minst tre. Majoriteten skall vara anställda vid den behöriga myndigheten eller vara behöriga personer som inte är anställda inom mjölkindustrin.

Flera faktorer skall beaktas före bedömningen för bästa resultat:

- Smakdomarna får inte lida av någon sjukdom som kan påverka deras arbete. Om så ändå är fallet skall smakdomaren i fråga ersättas med en annan smakdomare.
- Smakdomarna skall komma i tid för att delta i bedömningen och ha avsatt tillräckligt med tid för att genomföra bedömningen.
- Smakdomarna skall undvika att använda starkt doftande produkter som parfym, aftershave, deodorant samt att äta matvaror med stark smak (kryddor), osv.
- Smakdomarna får varken röka eller dricka och endast dricka vatten under en halvtimme före bedömningen.

6. Bedömning av värdet av varje egenskap

6.1 Den sensoriska bedömningen skall utföras i förhållande till följande tre egenskaper: utseende, konsistens, smak och lukt.

Utseende inbegriper följande faktorer: färg, synlig renhet, mögeltillväxt och vattendispersion. Vattendispersion testas i enlighet med IDF-Standard 112A/1989.

Konsistens inbegriper följande faktorer: fasthet och bredbarhet.

Fysiska metoder får användas för bedömning av smörkonsistens. Kommissionen räknar med att dessa metoder harmoniseras i framtiden.

Smak inbegriper följande faktorer: smak och lukt.

En betydande avvikelse från den rekommenderade temperaturen hindrar en tillförlitlig bedömning av konsistens och smak. Temperaturen är av yttersta betydelse.

- 6.2 Varje egenskap skall bedömas sensoriskt var för sig. Poängsättningen skall ske enligt tabell 1.
- 6.3 Det är önskvärt att bedömarna innan bedömningen påbörjas, tillsammans poängsätter ett eller flera referensprov med avseende på utseende, konsistens och smak, så att en enhetlighet uppnås.
- 6.4 Poängsättningen för godkännande är som följer:

	Max	Min
Utseende	5	4
Konsistens	5	4
Smak och lukt	5	4

Om den nödvändiga poängen inte uppnås, skall en beskrivning av defekten lämnas. Den poäng som varje bedömare ger för varje egenskap skall noteras i kontrollhandlingen. Produkten godkänns eller förkastas på grundval av ett majoritetsbeslut. Det bör inte förekomma ofta att skillnaderna mellan individuella poängsättningar för varje egenskap är större än angränsande poäng (inte oftare än en gång per 20 prov). I så fall skall panelledaren kontrollera panelens kompetens.

7. Kontroll

En panelledare som skall vara en tjänsteman anställd vid den behöriga myndigheten och som kan vara medlem av panelen, skall ha det övergripande ansvaret för hela förfarandet. Han skall notera de individuella poängen för varje egenskap i kontrollhandlingen och bestyrka om produkten godkänns eller förkastas.

8. Provtagning och provberedning

- 8.1 — Det är önskvärt att provernas identitet inte avslöjas under bedömningen så att eventuell partiskhet undviks.
— Detta skall ordnas av panelledaren före bedömningen utan närvaro av de andra panelmedlemmarna.
- 8.2 När den sensoriska bedömningen genomförs vid fryshuset, skall provet tas ut med hjälp av en smörprovare. Om den sensoriska bedömningen genomförs på annan plats än vid fryshuset, skall ett prov om minst 500 g tas ut.
- 8.3 Under bedömningen skall smöret ha en temperatur på 10–12 °C. Stora avvikelser bör till varje pris undvikas.

9. Nomenklatur

Se tabell 2.

Tabell 1: Poängsättning av smör

Utseende			Konsistens			Lukt/smak		
Poäng	Nr (1)	Anmärkning	Poäng	Nr (1)	Anmärkning	Poäng	Nr (1)	Anmärkning
5		Mycket bra perfekt högsta kvalitet	5		Mycket bra perfekt högsta kvalitet (lätt att breda)	5		Mycket bra perfekt högsta kvalitet (absolut ren, finaste arom)
4		Bra (2) inga påtagliga fel	4	17 18	Bra (2) hård mjuk	4		Bra (2) inga påtagliga fel
3	1 2 3 4 5 6 7 8	Varken bra eller dåligt (svaga fel) vattnigt, fria vattendroppar ej homogent, två färger strimmigt flammigt, marmorat fläckigt fri olja för kraftig färgning poröst, tydliga håligheter	3	14 15 16 17 18	Varken bra eller dåligt (svaga fel) kort, spröd, smulig salvig, oljig klibbig hård mjuk	3	21 22 25 27 33 34 35	Varken bra eller dåligt (svaga fel) saknar arom oren främmande smak syrlig kokt, bränt fodersmak skarp, besk
2	1 3 4 5 6 10 11 12	Dåligt (tydliga fel) vattnigt, fria vattendroppar strimmigt flammigt, marmorat fläckigt fri olja främmande föremål mögelväxt olöst salt (saltkristaller)	2	14 15 16 17 18	Dåligt (tydliga fel) kort, spröd, smulig salvig, oljig klibbig hård mjuk	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	Dåligt (tydliga fel) oren främmande smak gammal syrlig oxiderad, metall fodersmak skarp, besk för salt smaklös, unken kemikalie
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	Mycket dåligt (starka fel) vattnigt, fria vattendroppar strimmigt flammigt, marmorat fläckigt fri olja för kraftig färgning kornigt främmande föremål mögelväxt olöst salt (saltkristaller)	1	14 15 16 17 18	Mycket dåligt (starka fel) kort, spröd, smulig salvig, oljig klibbig hård mjuk	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	Mycket dåligt (starka fel) främmande smak ostliknande syrlig jäst möglig härsken oljig, fiskliknande talig oxiderad, metall skarp, besk smaklös, unken malt kemikalie

(1) Tabell 2.

(2) Felen bedömda som BRA innebär mycket små avvikelser från högsta kvalitet.

Tabell 2: Nomenklatur över smördefekter*I. Utseende*

1. vattnigt, fria vattendroppar
2. ej homogent, två färger
3. strimmigt
4. flammigt, marmorerat
5. fläckigt
6. fri olja
7. för kraftig färgning
8. poröst, tydliga håligheter
9. kornigt
10. främmande föremål
11. mögelväxt
12. olöst salt (saltkristaller)

II. Konsistens

14. kort, spröd, smulig
15. salvig, oljig
16. klibbig
17. hård
18. mjuk

III. Smak och lukt

20. saknar arom
21. oren ⁽¹⁾
22. främmande smak
23. gammal
24. ostliknande
25. syrlig
26. jäst
27. a) kokt
b) bränt
28. möjlig
29. härsken
30. oljig, fiskliknande
31. talgig
32. a) oxiderad
b) metall
33. fodersmak
34. skarp, besk
35. för salt
36. smaklös, unken
37. malt
38. kemikalie

⁽¹⁾ Denna beteckning bör användas så sällan som möjligt och endast när defekten inte kan beskrivas på ett noggrannare sätt.

BILAGA VIII

(Artikel 7)

FÖRFARANDE SOM SKALL TILLÄMPAS NÄR RESULTATEN AV EN ANALYS IFRÅGASÄTTS (KEMISK ANALYS)

1. En utvidgad analys får utföras på begäran av tillverkare, importör eller exportör, inom 7 arbetsdagar efter det att de första analysresultaten har meddelats, förutsatt att förseglade duplikatprov av produkten är tillgängliga och har lagrats på ett godtagbart sätt och det behöriga organet.
2. Det behöriga organet skall på begäran av tillverkare, importör eller exportör samt på dennes bekostnad skicka proverna till ett annat laboratorium. Detta laboratorium måste vara auktoriserat att utföra officiella analyser och måste ha visat sig vara kompetent att utföra de aktuella analyserna. Denna kompetens bör vara dokumenterad genom godkänt deltagande i samlingsstudier, kompetensprövningar eller jämförelser mellan laboratorier. Det andra laboratoriet måste använda referensmetoden. De resultat som erhålls av de två laboratorierna bedöms enligt följande:

a) *Om båda laboratorierna uppfyller repeterbarhetskravet och reproducerbarhetskravet*

Det aritmetiska medelvärdet av de undersökningsresultat som erhållits av de båda laboratorierna rapporteras som slutresultat. Detta slutresultat bedöms med beaktande av den kritiska differensen och med användning av följande formel:

$$CrD_{95}(\bar{y} - m_0) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

där:

\bar{y} : aritmetiska medelvärdet av alla resultat som erhållits av de båda laboratorierna,

m_0 : gränsvärde,

R: reproducerbarhet,

r: repeterbarhet,

n_1 : antal resultat erhållna av laboratorium 1,

n_2 : antal resultat erhållna av laboratorium 2.

Märk: Om slutresultatet beräknas med användning av formlerna

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

(se bilaga IV, punkt 3 och 4), måste R_x^2 och r_x^2 sättas in i formlerna i stället för R^2 och r^2 .

b) *Om båda laboratorierna uppfyller repeterbarhetskravet och reproducerbarhetskravet inte beaktas*

Om den andra analysen bekräftar den första skall den kvantitet som underkastas analys avvisas eftersom kraven inte uppfylls. I annat fall skall kvantiteten anses godkännas.

c) *Om endast ett av laboratorierna uppfyller repeterbarhetskravet*

Slutresultatet från det laboratorium som uppfyller repeterbarhetskravet användes för beslut om den analyserade kvantiteten skall godkännas.

d) *Om inget av laboratorierna uppfyller repeterbarhetskravet och reproducerbarhetskravet beaktas*

Punkt a skall tillämpas.

e) *Om inget av laboratorierna uppfyller repeterbarhetskravet och reproducerbarhetskravet inte beaktas*

Den analyserade kvantiteten godkännas, om de resultat som erhållits av det ena laboratoriet leder till denna slutsats.

f) *Om resultaten erhållits genom användning av icke validerade metoder*

Den analyserade kvantiteten godkännas, om de resultat som erhållits av det ena laboratoriet leder till denna slutsats.

3. Den behöriga myndigheten skall utan dröjsmål meddela tillverkare, importör eller exportör resultaten av den andra analysen. Kostnaden för den andra analysen skall belasta tillverkare, importör eller exportör om den analyserade kvantiteten avvisas.

4. Inom fem arbetsdagar efter det att proverna tagits och om tillverkare, importör eller exportör har bevis på att provtagningen inte har gjorts korrekt, skall provtagningen om möjligt upprepas. Om det inte är möjligt att genomföra en ny provtagning skall den analyserade kvantiteten godtas.

BILAGA IX

(Artikel 8)

BESTÄMNING AV VATTENHALTEN I SMÖR

1. Syfte och tillämpningsområde

Denna referensmetod används för att bestämma vattenhalten i smör.

2. Referenser

IDF-standard 50 C: 1995 – Mjök och mjökprodukter – Provtagningsmetoder.

3. Definitioner

Vattenhalten i smör: den relativa massförlusten efter upphettning enligt denna standard. Uttrycks i gram per 100 gram.

4. Princip

Avdunstning av vatten från ett prov i torkugn vid en temperatur på 102 °C och i närvaro av pimpsten.

5. Utrustning

Vanlig laboratorieutrustning, särskilt

5.1 Analysvåg med en känslighet av 1 mg.

5.2 Exsickator med ett effektivt torkmedel (t. ex. nyligen torkad kiselgel med hygroskopisk indikering).

5.3 Ventilerad, termostatreglerad torkugn som håller en jämn temperatur av 102 ± 2 °C.

5.4 Flatbottnade skålar av glas, porslin eller rostfri metall med en höjd på ca 20 mm och en diameter på 60–80 mm.

5.5 Tvättad granulerad pimpsten med diamatern 0,8–10 mm.

6. Provtagning

Se IDF-standard 50 C: 1995.

7. Utförande**7.1 Beredning av provet**

Placera provet i en sluten behållare av glas eller plast så att det upptar mellan hälften och två tredjedelar av behållaren. Upphetta provet till en temperatur där det är så mjukt att det lätt kan blandas till en homogen massa (antingen med en skakapparat eller för hand). Blandningstemperaturen bör normalt inte överstiga 35 °C. Låt provet svalna till rumstemperatur. Öppna provbehållaren så snart som möjligt efter nedkylning och rör om en kort stund (inte längre än 10 sek.) med något lämpligt redskap, till exempel en sked eller spatel, före vägning.

7.2 Bestämning

7.2.1 Lägg ungefär 10 g pimpsten i skålen (5.4).

7.2.2 Låt skålen med pimpsten torka i ugnen (5.3) vid en temperatur på 102 ± 2 °C under minst 1 timme.

Observera: De torktider som nämns i 7.2.2, 7.2.5 och 7.2.7 gäller från det att ugnen har nått en temperatur på 102 ± 2 °C.

7.2.3 Låt skålen svalna i exsickatorn (5.2) till den temperatur som råder i vågrummet. Väg skålen med en noggrannhet av 1 mg.

- 7.2.4 För över ca 5 g av provet till skålen. Väg med en noggrannhet av 1 mg.
- 7.2.5 Sätt in skålen i ugnen vid 102 ± 2 °C och låt den stå där i 3 timmar.
- 7.2.6 Låt skålen svalna i exsickatorn till den temperatur som råder i vågrummet. Väg skålen med en noggrannhet av 1 mg.
- 7.2.7 Upprepa torkningsprocessen under 1 timme i taget. För varje omgång skall provet tillåtas svalna och sedan vägas enligt 7.2.6 till dess att massan är konstant (massförändring på högst 1 mg).
- Om massan skulle öka utförs beräkningen på grundval av den lägsta massa som noterats.

8. Beräkning av resultat

8.1 Beräkningsmetod och formel

Beräkna vattenhalten W uttryckt i massprocent med hjälp av följande formel:

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

där

m_0 massan av skålen med pimpsten (7.2.3)

m_1 massan av provet, skålen och pimpstenen före torkning (7.2.4)

m_2 massan av provet, skålen och pimpstenen efter torkning (7.2.7)

Resultatet skall anges med en decimals noggrannhet.

8.2 Repeterbarhet

Den absoluta skillnaden mellan resultaten av två bestämningar som utförts samtidigt eller direkt efter varandra av samma person, under identiska förhållanden och på samma provmaterial skall vara högst 0,2 %.

8.3 Reproducerbarhet

Den absoluta skillnaden mellan resultat som erhålls från två personer i olika laboratorier men med samma provmaterial skall inte vara större än 0,3 %.

9. Analysrapport

Av analysrapporten skall framgå vilken metod som använts och vilka resultat som erhållits. Den skall också innehålla alla uppgifter av vikt som inte anges i denna internationella standard eller som är frivilliga, liksom upplysningar om eventuella missöden som kan ha påverkat resultaten. Analysrapporten skall också innehålla all information som krävs för att provet skall kunna identifieras.

BILAGA X

(Artikel 8)

BESTÄMNING AV HALTEN AV FETTFRI TORRSUBSTANS I SMÖR

1. Syfte och tillämpningsområde

Denna referensmetod används för att bestämma halten av fettfri torrsubstans i smör.

2. Referenser

IDF-standard 50 C: 1995 – Mjök och mjökprodukter – Provtagningsmetoder.

3. Definitioner

Halten av fettfri torrsubstans i smör: andelen fettfri torrsubstans vid bestämning enligt den angivna metoden. Uttrycks i gram per 100 gram.

4. Princip

Vatten får avdunsta från en känd mängd smör. Fettet extraheras med petroleumeter varefter återstoden vägs.

5. Reagens

Petroleumeter med ett kokintervall på mellan 30 °C och 60 °C. Högst 1 mg av reagenset får återstå då 100 ml avdunstat.

6. Utrustning

- 6.1 Analysvåg med en känslighet av 1 mg.
- 6.2 Exsickator med ett effektivt torkmedel (t.ex. nyligen torkad kiselgel med hygroskopisk indikering).
- 6.3 Ventilerad, termostatreglerad torkugn som håller en jämn temperatur av 102 ± 2 °C.
- 6.4 Flatbottnade skålar av glas, porslin eller rostfri metall med en höjd av ca 20 mm upp till pipen och en diameter på 60–80 mm. Glasstav för omrörning.
- 6.5 Glasfilterdegel med porstorleken 16–40 µm och sugkolv.

7. Provtagning

Se IDF-standard 50 C: 1995.

8. Utförande**8.1 Beredning av provet**

Placera provet i en sluten behållare av glas eller plast så att det upptar mellan hälften och två tredjedelar av behållaren. Upphetta provet till en temperatur där det är så mjukt att det lätt kan blandas till en homogen massa (antingen med en skakapparat eller för hand). Blandningstemperaturen bör normalt inte överstiga 35 °C. Låt provet svalna till rumstemperatur. Öppna provbehållaren så snart som möjligt efter nedkyllning och rör om en kort stund (inte längre än 10 sek.) med något lämpligt redskap, till exempel en sked eller spatel, före vägning.

8.2 Bestämning

- 8.2.1 Torka skålen tillsammans med glasstaven (6.4) och degeln (6.5) i ugnen (6.3) i 1 timme. Låt dessa föremål svalna i exsickatorn och väg dem tillsammans (dvs. skålen, glasstaven och degeln) med en noggrannhet av 1 mg (m_0).

Observera: — I regel räcker det om föremålen svalnar under 45 minuter.

— Om analysen omfattar mer än ett prov från samma provmaterial är det viktigt att samma skål, glasstav och degel används för alla proverna.

- 8.2.2 Tag bort degeln, notera den sammanlagda vikten av skålen och glasstaven med 1 mg noggrannhet (m_1).

- 8.2.3 För över ca 5 mg av provet (8.1) till skålen. Väg med en noggrannhet av 1 mg (m_2).

- 8.2.4 Ställ skålen (med glasstaven och smöret) i en ugn som är uppvärmd till 102 ± 2 °C. Låt stå över natten.
- 8.2.5 Låt skålen (8.2.3) svalna till rumstemperatur.
- 8.2.6 Häll 15 ml ljummet (ca 25 °C) petroleumeter i skålen och skrapa med hjälp av glasstaven loss så mycket som möjligt av det sediment som har fastnat på skålens insida. För över lösningsmedlet till degeln så att det filtreras ned i sugkolven.
- 8.2.7 Utför moment 8.2.6 ytterligare fyra gånger. Om det inte finns några spår av fett på skålens yta skall så mycket som möjligt av sedimentet föras över till degeln under den fjärde sköljningen. I annat fall upprepas moment 8.2.6 till dess att alla spår av fett avlägsnats.
- 8.2.8 Tvätta sedimentet i degeln med 25 ml ljummen petroleumeter.
- 8.2.9 Låt skålen, glasstaven och degeln torka tillsammans i ugnen i 30 minuter vid en temperatur av 102 ± 2 °C.
- 8.2.10 Låt svalna till rumstemperatur i exsickatorn och väg med en noggrannhet av 1 mg.
- 8.2.11 Upprepa momenten 8.2.9 och 8.2.10 till dess att den sammanlagda massan av skålen, glasstaven och degeln (m_3) är konstant (massförändring på högst 1 mg).

9. Beräkning av resultat

9.1 Beräkning av halten av fettfri torrsubstans

Beräkna halten av fettfri torrsubstans (SNF) uttryckt i massprocent med hjälp av följande formel:

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

där

m_0 massan av den tomma skålen tillsammans med glasstaven och degeln (8.2.1)

m_1 massan av den tomma skålen med glasstaven (8.2.2)

m_2 massan av provet, skålen och glasstaven (8.2.3)

m_3 den slutliga massan av skålen, glasstaven och degeln med sedimentet (8.2.11)

Resultaten skall anges med en decimal noggrannhet.

9.2 Repeterbarhet

Den absoluta skillnaden mellan resultaten av två bestämningar som utförs samtidigt eller direkt efter varandra av samma person, under identiska förhållanden och på samma provmaterial skall vara högst 0,1 %.

9.3 Reproducerbarhet

Den absoluta skillnaden mellan resultat som erhålls från två personer i olika laboratorier men med samma provmaterial skall inte vara större än 0,2 %.

10. Analysrapport

Av analysrapporten skall framgå vilken metod som använts och vilka resultat som erhållits. Den skall också innehålla alla uppgifter av vikt som inte anges i denna internationella standard eller som är frivilliga, liksom upplysningar om eventuella missöden som kan ha påverkat resultaten. Analysrapporten skall också innehålla all information som krävs för att provet skall kunna identifieras.

Observera:

Vid analys av saltat smör betraktas det tillsatta saltet som fettfri torrsubstans. Vid bestämning av mängden fettfri torrsubstans som härrör från mjölk måste mängden tillsatt salt dras av från mängden fettfri torrsubstans. De beräknade precisionstalen för bestämning av den fettfria torrsubstansen från mjölk är

Repeterbarhet $r = 0,104$ %

Reproducerbarhet: $R = 0,206$ %.

Det följer av detta att precisionstalen vid bestämning av mängden fettfri torrsubstans även gäller vid bestämning av mängden fettfri torrsubstans från mjölk.

BILAGA XI

(Artikel 8)

BESTÄMNING AV FETTHALTEN I SMÖR

Fetthalten erhålls indirekt genom bestämning av vattenhalten och halten av fettfri torrs substans i enlighet med bilaga IX respektive bilaga X. Andelen fett i massprocent blir då

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

där

W = vattenhalten i massprocent

SNF = halten av fettfri torrs substans i massprocent

De beräknade precisionstalen för bestämning av fetthalten är

Repeterbarhet $r = 0,22 \%$ Reproducerbarhet: $R = 0,36 \%$.

BILAGA XII

(Artikel 9)

BESTÄMNING AV VANILLININNEHÅLL I KONCENTRERAT SMÖR, SMÖR OCH GRÄDDE MED HPLC**1. Räckvidd och användningsområde**

Med denna metod bestäms mängden vanillin i koncentrerat smör, smör eller grädde.

2. Princip

En känd mängd av provet extraheras med en blandning av isopropanol/etanol/acetonitril (1:1:2). Utfällning av största delen fett genom avkyllning till mellan -15 och -20 °C, åtföljd av centrifugering.

Efter spädning med vatten, bestämning av vanillininnehållet med HPLC.

3. Provningsutrustning

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

- 3.1 Frys med en temperatur på mellan -15 och -20 °C.
- 3.2 Engångssprutor, 2 ml.
- 3.3 Membranmikrofilter med $0,45$ µm porstorlek som är resistent mot en lösning som innehåller 5 % extraktionslösning (4.4).
- 3.4 Vätskekromatografisystem bestående av en pump (flöde på $1,0$ ml/min), en injektor (20 µl-injektion, automatisk eller manuell), en UV-detektor (inställd på 306 nm, $0,01$ AU fullt utslag), en skrivare eller integrator och en kolonntermostat inställd på 25 °C.
- 3.5 Analyskolonn (250 mm \times $4,6$ mm innerdiameter) packad med LiChrospher RP 18 (Merck, 5 µm) eller motsvarande.
- 3.6 Förkolonn (ca 20 mm \times 3 mm innerdiameter), torrpackad med Perisorb RP 18 (30 – 40 µm) eller motsvarande.

4. Reagenser

Alla använda reagenser skall vara av godkänd analytisk kvalitet.

- 4.1 Isopropanol
- 4.2 Etanol 96 % (v/v)
- 4.3 Acetonitril

4.4 Extraktionslösning

Blanda isopropanol (4.1), etanol (4.2) och acetonitril (4.3) i förhållandet 1:1:2 (v/v).

4.5 Vanillin (4-hydroxi-3-metoxibensaldehyd)**4.5.1 Vanillin-stamlösning (= 500 µg/ml)**

Väg med $0,1$ mg noggrannhet upp ca 50 mg (CM mg) vanillin (4.5) i en 100 ml mätkolv, tillsätt 25 ml extraktionslösning (4.4) och späd till märket med vatten.

4.5.2 Vanillin-standardlösning (= 10 µg/ml)

Överför med pipett $5,00$ ml vanillin-stamlösning (4.5.1) till en mätkolv på 250 ml och späd till märket med vatten.

- 4.6 Metanol, HPLC-kvalitet
- 4.7 Isättika
- 4.8 Vatten av HPLC-kvalitet

4.9 HPLC rörlig fas

Blanda 300 ml metanol (4.6), ca 500 ml vatten (4.8) och 20,0 ml isättika (4.7) i en mätkolv på 1 000 ml och späd till märket med vatten (4.8). Filtrera genom 0,45 µm filter.

5. Förfarande

5.1 *Provberedning*

5.1.1 Smör

Värm provet tills det börjar smälta. Undvik lokal överhettning över 40 °C. När provet blir tillräckligt plastiskt, skall det homogeniseras genom skakning. Rör om smöret i 15 sekunder innan ett prov tas. Väg upp 5 g (SM g) grädde på 1 mg när och överför det till en 100 ml mätkolv.

5.1.2 Koncentrerat smör

Omedelbart före provtagningen placeras behållaren med koncentrerat smör i en ugn med 40–50 °C värme tills det har smält fullständigt. Blanda provet genom att snurra eller röra. Undvik att luftbubblor bildas på grund av alltför häftig omrörning. Väg upp 4 g (SM g) grädde på 1 mg när och överför det till en 100 ml mätkolv.

5.1.3 Grädde

Värm upp provet i ett vattenbad eller en inkubator med temperatur på 35–40 °C. Fördela fettet homogent genom att snurra och, om nödvändigt, röra. Kyl ned provet snabbt till 20 ± 2 °C. Provet bör se homogent ut, annars bör förfarandet upprepas. Väg upp 10 g (SM g) grädde på 1 mg när och överför det till en 100 ml mätkolv.

5.2 *Beredning av provlösningen*

Tillsätt ca 75 ml extraktionslösning (4.4) till provmängden (5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3), rör om eller skaka kraftigt under 15 min och späd med extraktionslösning (4.4). Överför ca 10 ml av detta extrakt till ett provrör som försetts med en propp. Placera provröret i frysen (3.1) och låt det stå ca 30 min. Centrifugera det kalla extraktet 5 min vid ca 2 000 varv/min och håll upp omedelbart. Låt den upphållna lösningen svalna till rumstemperatur. Överför med pipett 5,00 ml upphåll lösning till en 100 ml mätkolv och späd med vatten. Filtrera en aliquot genom ett membranmikrofilter (3.3). Filtratet är färdigt för bestämning genom HPLC.

5.3 *Kalibrering*

Överför med pipett 5,00 ml av vanillinstandardlösningen (4.5.2) till en 100 ml mätkolv. Tillsätt 5,0 ml extraktionslösning (4.4) och späd till märket med vatten. Denna lösning innehåller 0,5 µg/ml vanillin.

5.4 *Bestämning med HPLC*

Låt kromatografisystemet stabiliseras under ca 30 min. Injicera standardlösningen (5.3). Upprepa detta tills skillnaden i toppyta eller topphöjd mellan två på varandra följande injektioner är mindre än 2 %. Vid ovannämnda betingelser är retentionstiden för vanillin ca 9 min. Analysera standardlösningen (5.3) i duplikat genom att injicera 20 µl. Injicera 20 µl av provlösningarna (5.2). Bestäm ytan eller höjden på den erhållna vanillintoppen. Upprepa injektionen av standardlösningen (5.3) i duplikat, efter 10 injektioner av provlösningar (5.2).

6. Resultatberäkning

Beräkna den genomsnittliga toppytan (eller topphöjden) (AC) av de vanillintoppar som härrör från de duplikatinjektioner som omger varje serie av provlösningar (totalt 4 ytor).

Beräkna responsfaktorn (R):

$$R = AC/CM$$

där CM är vanillinmassan i mg (4.5.1).

Halten (mg/kg) av vanillin (C) i provet ges av:

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

där

AS: toppyta för rovets vanillintopp

SM: provets massa i gram (5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3)

Om analysen görs för att bestämma mängden vanillin i grädde, skall koncentrationen av spårämne uttryckas som mg spårämne/kg mjölkfett. Detta görs genom att multiplicera C med 100/f, där f är procentandelen fett i grädden (m/m).

20: faktor som tar hänsyn till utspädningarna av standardlösningen och provet

0,96 = korrigeringsfaktor för fetthalten i första utspädningen av provet.

Anmärkning: I stället för toppyta kan topphöjd andeändas (se 8.3).

7. Metodens noggrannhet

7.1 Repeterbarhet (r)

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som med kortast möjliga mellanrum utförts av en kemist som använder samma utrustning på identiskt provmaterial får inte vara större än 16 mg/kg.

7.2 Reproducerbarhet (R)

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförts i olika laboratorier med hjälp av olika utrustning på identiskt provmaterial får inte vara större än 27 mg/kg.

8. Toleransnivåer

8.1 Tre prover måste tas från den spårade produkten för att homogeniteten skall kunna kontrolleras.

8.2 Spårämne som erhållits antingen från vanilj eller från syntetisk vanillin.

8.2.1 250 gram 4-hydroxi-3-metoxibensaldehyd iblandas per ton koncentrerat smör eller smör. Vid spårning i grädde skall 250 gram iblandas per ton mjölkfett.

8.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera spårämnets iblandningsgrad och homogenitet och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [CrD₉₅]):

— 221,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen).

— 159,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 221,0 mg/kg och 159,0 mg/kg.

8.3 Spårämne som erhållits enbart från vaniljbönor eller fullständiga extrakt därav

8.3.1 100 gram 4-hydroxi-3-metoxibensaldehyd iblandas per ton koncentrerat smör eller smör. Vid spårning i grädde skall 100 gram iblandas per ton mjölkfett.

8.3.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera spårämnets iblandningsgrad och homogenitet och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [CrD₉₅]):

— 79,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen).

— 54,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 79,0 mg/kg och 54,0 mg/kg.

9. Anmärkningar:

9.1 Repeterbarheten r är det värde under vilket den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial under samma förhållanden (samma apparatur, samma laboratorium och ett kort tidsintervall) kan förväntas ligga inom en angiven sannolikhet. I frånvaro av andra indikationer är sannolikheten 95 %.

- 9.2 Reproducerbarheten R är det värde under vilket den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial under olika förhållanden (olika kemister, olika apparatur, olika laboratorier och/eller olika tidsintervall) kan förväntas ligga inom en angiven sannolikhet. I frånvaro av andra indikationer är sannolikheten 95 %.
- 9.3 Utbytet av tillsatt vanillin vid en nivå av 250 mg/kg smörolja varierar mellan 97,0 och 103,8. Den påträffade genomsnittshalten var 99,9 % med en standardavvikelse på 2,7 %.
- 9.4 Standardlösningen innehåller 5 % extraktionslösning för att kompensera för den toppbreddning som orsakas av närvaro av 5 % av extraktionslösningen i proven. Detta möjliggör kvantifiering med hjälp av topphöjden.
- 9.5 Analysen bygger på en linjär kalibreringskurva med en nollskärningspunkt.

Genom användning av lämpliga utspädningar av standardlösningen (4.5.2) bör linjariteten kontrolleras första gången analysen utförs och sedan regelbundet och efter byten eller reparationer av HPLC-utrustningen.

BILAGA XIII

(Artikel 9)

BESTÄMNING GENOM SPEKTROMETRI AV ETYLESTERN AV β -APO-8'-KAROTINSYRA I KONCENTRERAT SMÖR OCH SMÖR**1. Omfattning och tillämpningsområde**

Metoden är ett förfarande för kvantitativ bestämning av etylestern av β -apo-8'-karotinsyra i koncentrerat smör och smör. Apokarotinstern är summan av alla substanser som finns i ett provextrakt som erhållits under de beskrivna förhållandena och som absorberar ljus vid 440 nm.

2. Princip

Smörfettet löses upp i lättpetroleum och absorbansen mäts vid 440 nm. Förekomsten av apokarotiner bestäms genom referens till en extern standard.

3. Apparatur

- 3.1 Graderade pipetter med kapaciteterna 0,25, 0,50, 0,75 och 1,0 ml.
- 3.2 Spektrofotometer – lämplig för användning vid 440 nm (och 447–449 nm) och utrustad med en optisk cell vars ljusspassagelängd är 1 cm.
- 3.3 Mätkolvar, t.ex. 20 ml och 100 ml.
- 3.4 Analysvåg med en känslighet av 0,1 mg.

4. Reagenser

Alla reagenser måste hålla den gängse analytiska renhetsgraden.

4.1 Suspension av apokarotiner (ca 20 %).**4.1.1 Fastställ suspensionens innehåll enligt nedanstående:**

För försiktigt över cirka 400 mg i ett provrör (100 ml), lös upp detta i 20 ml kloroform (4.4) och späd till märket med cyklohexan (4.5). Späd 5,0 ml av lösningen till 100 ml med cyklohexan (lösning A). Späd 5,0 ml av lösning A till 100 ml med cyklohexan. Mät absorbansen vid 447–449 nm (mät maximum med cyklohexan som kontrollösning och med hjälp av kvetter med bredden 1 cm).

$$\text{Halt av apokarotiner (\%)} = \frac{A_{\max} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{\max} = mätlösningens absorbans vid maximum

A = provets vikt (g)

2 550 = värdet för referens A (1 %, 1 cm)

Suspensionens renhetsgrad är P (%).

Anmärkning: Apokarotinersuspensionen är känslig för luft, värme och ljus. Den kan förvaras svalt i oöppnad, ursprunglig behållare (förseglad under kväve) upp till cirka tolv månader. Efter öppnandet bör innehållet användas inom en kort period.

4.1.2 Apokarotinerstandardlösning, cirka 0,2 mg/ml.

Väg, till närmaste 0,1 mg, cirka 0,100 g apokarotinersuspension (4.1.1) (Wg), lös upp i petroleumeter (4.2), överför kvantitativt till en 100 ml mätkolv och fyll upp till märket med petroleumeter.

Denna lösning innehåller (viktprocent) 100 mg/ml apokarotiner.

Anmärkning: Lösningen måste förvaras mörkt och svalt. Kassera oanvänd lösning efter en månad.

4.2 Petroleumeter (40–60 °C).**4.3 Natriumsulfat, vattenfritt, i granulatform och torkat vid 102 °C i två timmar.****4.4 Kloroform.****4.5 Cyklohexan.**

5. Förfarande

5.1 Förberedelse av testprovet

5.1.1 Koncentrerat smör

Smält provet i en ugn vid ca 45 °C.

5.1.2 Smör

Smält provet i en ugn vid cirka 45 °C och filtrera en del därav med ett filter innehållande cirka 10 g vattenfritt natriumsulfat (4.3) i en miljö som är skyddad från starkt naturligt och artificiellt ljus och som hålls vid en temperatur av 45 °C. Tag en lämplig mängd smörfett.

5.2 Bestämning

Väg, till närmaste 1 mg, cirka 1 g koncentrerat smör eller extraherat smörfett (5.1.2), (mg). Häll över kvantitativt till en 20 ml (Vml) mätkolv genom att använda petroleumeter (4.2). Fyll till märket och blanda väl.

Häll över en aliquot till en optisk cell med 1 cm ljusspassagelängd och mät absorbansen vid 440 nm mot ett blindprov bestående av petroleumeter. Fastställ koncentrationen av apokarotiner i lösningen med hjälp av kalibreringskurvan (C µg/ml).

5.3 Kalibreringskurva

Pipettera 0, 0,25, 0,5, 0,75 och 1,0 ml av apokarotinerstandardlösningen (4.1.2) i fem 100 ml mätkolvar. Späd till märket med petroleumeter (4.2) och blanda om.

Lösningarnas ungefärliga koncentrationer varierar från 0 till 2 µg/ml och kalkyleras exakt med hjälp av standardlösningens koncentration (4.1.2), viktprocent/10 mg/ml. Mät absorbanserna vid 440 nm mot ett blindprov bestående av petroleumeter (4.2).

Pricka in värdena i ett diagram med absorbansen längs y-axeln och apokarotinerkoncentrationen längs x-axeln.

6. Resultatberäkning

6.1 Apokarotinerinnehållet, uttryckt som mg per kg produkt, fås enligt:

Koncentrerat smör (C.V.)/M

Smör: 0,82 (C.V)M

där:

C = apokarotinerinnehållet i µg/ml, avläst från kalibreringskurvan (5.3)

V = provlösningens volym (ml) (5.2)

M = testportionens vikt (g) (5.2)

0,82 = korrektionsfaktor för smörfetthalten i smör.

7. Metodens noggrannhet

7.1 Repeterbarhet

7.1.1 Smöranalys

Differensen mellan resultaten från två bestämningar som blivit utförda inom kortast möjliga tidsintervall, av en och samma kemist som använt samma apparatur på identiska testmaterial, bör inte överstiga 1,4 mg/kg.

7.1.2 Analys av koncentrerat smör

Differensen mellan resultaten från två bestämningar som blivit utförda inom kortast möjliga tidsintervall, av en och samma kemist som använt samma apparatur på identiska testmaterial, bör inte överstiga 1,6 mg/kg.

7.2 Reproducerbarhet

7.2.1 Smöranalys

Differensen mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier med användande av olika apparatur på identiskt testmaterial bör inte överstiga 4,7 mg/kg.

7.2.2 Analys av koncentrerat smör

Differensen mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier med användande av olika apparatur på identiskt testmaterial bör inte överstiga 5,3 mg/kg.

7.3 Källa för precisionsdata

Precisionsdata erhöles från ett experiment som utfördes 1995 och som omfattade elva laboratorier och tolv spårämnesshaltiga prov (sex stycken blindduplikat) för smör och tolv spårämnesshaltiga prov (sex stycken blindduplikat) för koncentrerat smör.

8. Toleransnivåer

8.1 Tre prover skall tas från den spårade produkten för att kontrollera att produkten har spårats på rätt sätt.

8.2 Smör

8.2.1 Inblandningsgraden för smör, med beaktande av bakgrundsabsorbansen, är 22 mg/kg.

8.2.2 Analysresultaten av de tre produktprovera skall användas för att kontrollera spårämnets iblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [DCr_{95}]):

- 18,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen).
- 13,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 18,0 mg/kg och 13,0 mg/kg.

8.3 Koncentrerat smör

8.3.1 Med beaktande av bakgrundsabsorbansen är iblandningsgraden för koncentrerat smör 24 mg/kg.

8.3.2 Analysresultaten av de tre produktprovera skall användas för att kontrollera spårämnets iblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [CrD_{95}]):

- 20,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen).
- 14,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 20,0 mg/kg och 14,0 mg/kg.

BILAGA XIV

(Artikel 9)

BESTÄMNING AV SITOSTEROL ELLER STIGMASTEROL I KONCENTRERAT SMÖR ELLER SMÖR GENOM GASKROMATOGRAFI MED KAPILLÄRKOLONN**1. Räckvidd och tillämpningsområde**

Metoden utgörs av ett förfarande för kvantitativ bestämning av sitosterol eller stigmasterol i koncentrerat smör eller smör. Med sitosterol förstås summan av β -sitosterol och 22-dihydro- β -sitosterol, där andra sitosteroler anses vara utan betydelse.

2. Princip

Smöret förtvålades med kaliumhydroxid i en etanollösning och de ickefortvålningsbara beståndsdelarna extraheras med eter.

Sterolerna omvandlas till trimetylsilyleterar och analyseras genom gaskromatografi med en kapillärkolonn, med betulin som intern standard.

3. Provningsutrustning

- 3.1 En 150 ml kolv till förtvålning med återloppskylare med inslipade anslutningar.
- 3.2 500 ml separertratt.
- 3.3 250 ml kolvar.
- 3.4 Tryckutjämningskärl, 250 ml eller motsvarande, för att samla upp överbliven eter.
- 3.5 Glaskolonn, 350 mm \times 20 mm med sintrad glaspropp.
- 3.6 Vattenbad eller värmemantel.
- 3.7 Reaktionskärl, 2 ml.
- 3.8 Gaskromatograf lämplig för kapillärkolonn med split-injektionssystem, bestående av:
 - 3.8.1 Termostatstyrd kolonnugn som kan hålla den önskade temperaturen ± 1 °C.
 - 3.8.2 Injektorblock med temperaturinställning.
 - 3.8.3 Flamjoniseringsdetektor och signalomvandlingsförstärkare.
 - 3.8.4 Integrerad skrivare som kan användas tillsammans med signalomvandlingsförstärkaren (3.8.3).
- 3.9 Kapillärkolonn i kvartsglas, helt belagd med BP1 eller likvärdigt, med en enhetlig tjocklek av 0,25 μ m. Kolonnen skall kunna separera trimetylsilylderivat av lanosterol och sitosterol. En 12 m lång BP1-kolonn med en inre diameter på 0,2 mm är lämplig.
- 3.10 En 1 μ l mikrospruta för gaskromatografi med härdad nål.

4. Reagenser

Alla reagenser måste ha erkänd analytisk renhet. Vattnet skall vara destillerat eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad.

- 4.1 Etanol med en lägsta renhetsgrad av 95 %.
- 4.2 Kaliumhydroxid, 60-procentig lösning: lös 600 g kaliumhydroxid (minst 85 %) i vatten och späd med vatten till 1 liter.
- 4.3 Betulin med en lägsta renhetsgrad av 99 %.
 - 4.3.1 Betulin löst i dietyleter (4.4).
 - 4.3.1.1 Betulinlösning som används vid bestämning av sitosterol skall ha koncentrationen 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2 Betulinlösning som används vid bestämning av stigmasterol skall ha koncentrationen 0,4 mg/ml.

- 4.4 Analytiskt ren dietyleter (fri från peroxider och restsustanser).
- 4.5 Natriumsulfat, vattenfritt granulat, som torkats vid 102 °C i två timmar.
- 4.6 Silyleringsreagens, t.ex. TRI-SIL (kan beställas från Pierce Chemical Co., katalognr: 49001) eller motsvarande (Varning: TRI-SIL är lättantändligt, giftigt, frätande och möjligen cancerogent. Laboratoriepersonalen skall ha kännedom om säkerhetsbestämmelserna för TRI-SIL och vidta lämpliga försiktighetsåtgärder).
- 4.7 Lanosterol.
- 4.8 Sitosterol, med en fastställd lägsta renhetsgrad av 90 % (P).
- Anmärkning 1:* Renhetsgraden hos standardämnen för kalibrering skall bestämmas genom tillämpning av standardiseringsprincipen. Antag att alla steroler som finns i provet finns representerade på kromatogrammet, att topparnas totala area representerar 100 % av sterolbeståndsdelarna och att sterolerna ger samma detektorrespons. Systemets linjäritet skall kontrolleras för de aktuella koncentrationnivåerna.
- 4.8.1 Standardlösning av sitosterol: bered en lösning som med 0,001 mg/ml noggrannhet innehåller ca 0,5 mg/ml (W_1) sitosterol (4.8) i dietyleter (4.4).
- 4.9 Stigmasterol med en fastställd lägsta renhetsgrad av 90 % (P).
- 4.9.1 Standardlösning av stigmasterol: bered en lösning som med 0,001 mg/ml noggrannhet innehåller ca 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterol (4.9) i dietyleter (4.4).
- 4.10 Lösning för kontroll av upplösningsförmågan: bered en lösning som innehåller 0,05 mg/ml lanosterol (4.7) och 0,5 mg/ml sitosterol (4.8) i dietyleter (4.4).

5. Metod

- 5.1 Beredning av standardlösningar för kromatografi: den interna standardlösningen (4.3.1) skall tillsättas den aktuella sterolstandardlösningen, samtidigt som den tillsätts det förtvålade provet (se 5.2.2).
- 5.1.1 Sitosterolstandardlösning för kromatografi: överför 1 ml sitosterolstandardlösning (4.8.1) till vart och ett av de två reaktionskärlen (3.7) och avlägsna dietyletern med en kväveström. Tillsätt 1 ml intern standardlösning (4.3.1.1) och avlägsna dietyletern med en kväveström.
- 5.1.2 Stigmasterolstandardlösning för kromatografi: överför 1 ml stigmasterolstandardlösning (4.9.1) till vart och ett av de två reaktionskärlen (3.7) och avlägsna dietyletern med en kväveström. Tillsätt 1 ml intern standardlösning (4.3.1.2) och avlägsna dietyletern med en kväveström.
- 5.2 *Beredning av icke-förtvålbara beståndsdelar*
- 5.2.1 Smält smörprovet vid en temperatur på högst 35 °C. Blanda provet noggrant genom omrörning.
- Väg med 1 mg noggrannhet upp ca 1 g smör (W_2) eller koncentrerat smör (W_2) i en 150 ml kolv (3.1). Tillsätt 50 ml etanol (4.1) och 10 ml kaliumhydroxidlösning (4.2). Montera återloppskylaren och värm till ca 75 °C i 30 min. Avlägsna kylaren och kyl kolven till rumstemperatur.
- 5.2.2 Tillsätt 1,0 ml intern standardlösning i kolven (4.3.1.1 om det är sitosterol som skall bestämmas, eller 4.3.1.2 om det är stigmasterol). Blanda väl. Överför kolvens innehåll kvantitativt till en 500 ml separertratt (3.2), och skölj kolven med 50 ml vatten och sedan med 250 ml dietyleter (4.4). Skaka separertratten kraftigt i två minuter och låt faserna separera. Den nedre vattenhaltiga fasen tappas av och eterfasen tvättas genom att tratten skakas fyra gånger med 100 ml vatten vardera.
- Anmärkning 2:* För att undvika att en emulsion bildas är det viktigt att de två första vattentvättningarna utförs försiktigt (tratten vänds tio gånger). Vid tredje tvättningen kan tratten skakas kraftigt i 30 sekunder. Om en emulsion bildas, kan den brytas ned genom tillsats av 5–10 ml etanol. Om etanol tillsätts, är det viktigt att utföra ytterligare två grundliga tvättningar med vatten.
- 5.2.3 Den klara, tvälfria eterfasen får passera en glaskolonn (3.5) som innehåller 30 g vattenfritt natriumsulfat (4.5). Etern uppsamlas i en 250 ml kolv (3.3). Tillsätt en koksten och förånga etern nästan helt i vattenbad eller med värmemantel och samla noggrant upp resterande lösningsmedel.

Anmärkning 3: Om provextrakt förångas fullständigt vid för hög temperatur, kan sterolförlust förekomma.

5.3 Beredning av trimetylsilyletrar

5.3.1 Överför den resterande eterlösningen i kolven till ett 2 ml reaktionskärl (3.7) med 2 ml dietyleter och avlägsna etern med en kväveström. Skölj kolven ytterligare två gånger med 2 ml dietyleter. Innehållet överförs varje gång till reaktionskärlet och etern avlägsnas med kväve.

5.3.2 Provet silyleras genom tillsats av 1 ml TRI-SIL (4.6). Förslut kärlet och skaka kraftigt så att provet löses. Om det inte löses fullständigt, värm till 65–70 °C. Låt stå i minst fem minuter innan det sprutas in i gaskromatografen. Silylera standardlösningarna på samma sätt som provet. Silylera blandningen för kontroll av separationsförmågan (4.10) på samma sätt som proven.

Anmärkning 4: Silylering skall ske i vattenfri miljö. Ofullständig silylering av betulin indikeras av en andra topp intill betulinets topp.

Förekomst av etanol kommer att påverka silyleringen. Detta kan förekomma om tvättningen i extraktions-skedet är otillräcklig. Om problemet kvarstår, kan en femte tvättning göras under extraktionen varvid reaktionskärlet skakas kraftigt i 30 sekunder.

5.4 Gaskromatografisk analys

5.4.1 Kromatografiförhållanden

Installera gaskromatografen enligt bruksanvisningen.

Riktlinjerna för kromatografens utförande är följande:

- Kolonntemperatur: 265 °C.
- Injektortemperatur: 280 °C.
- Detektortemperatur: 300 °C.
- Bärgasflöde: 0,6 ml/min.
- Vätets tryck: 84 kPa.
- Lufttryck: 155 kPa.
- Splitsystemet ställs in på mellan 10:1 och 50:1 och optimeras i enlighet med bruksanvisningen, varefter detektorresponsens linjärnet kontrolleras inom de aktuella koncentrationsområdena.

Anmärkning 5: Det är särskilt viktigt att injektionssystemets linerinsats rengörs regelbundet.

- Insprutad mängd: 1 µl trimetylsilyleterlösning.

Systemet skall vara i jämvikt och responsen stabil innan analysen påbörjas.

Dessa förhållanden kan varieras, om särskilda egenskaper hos kolonnen och gaskromatografen gör det nödvändigt för att erhålla kromatogram som uppfyller följande krav:

- Sitosteroltoppen skall vara tydligt skild från lanosteroltoppen. Figur 1 visar hur ett typiskt kromatogram av en silylerad lösning för kontroll av upplösningsförmågan (4.10) skall se ut.
- Den relativa retentionstiden för följande steroler bör vara ungefär:
 - kolesterol: 1,0,
 - stigmasterol: 1,3,
 - sitosterol: 1,5,
 - betulini: 2,5.
- Retentionstiden för betulin bör vara ungefär 24 minuter.

5.4.2 Analysförfarande

Spruta in 1 µl silylerad standardlösning (stigmasterol eller sitosterol) och justera integratorns kalibreringsparametrar.

Spruta in ytterligare 1 µl silylerad standardlösning för bestämning av responsfaktorerna för betulin.

Injicera 1 µl silylerad provlösning och mät topparnas areor. Varje provserie skall inledas och avslutas med insprutning av standardlösningar.

Som regel bör en standardlösning insprutas efter varje serie om sex insprutningar av provlösning.

Anmärkning 6: Integrering av stigmasteroltoppen bör inbegripa eventuell svansning enligt definition i punkterna 1, 2 och 3 i figur 2b.

Integrering av sitosteroltoppen bör inbegripa toppen för 22-dihydro-β-sitosterol (stigmastanol) som eluerar omedelbart efter sitosterol (se figur 3b), när den totala kvantiteten sitosterol bestäms.

6. Beräkning av resultat

- 6.1 Bestäm arean för steroltopparna och betulintopparna i båda referenskromatogrammen kring en serie och beräkna R_1 på följande sätt:

$$R_1 = \frac{\text{Genomsnittlig toppareal för sterol i standardlösning}}{\text{Genomsnittlig toppareal för betulin i standardlösning}}$$

Bestäm arealen för steroltoppen (stigmasterol och sitosterol) och betulintoppen i provet och beräkna R_2 på följande sätt:

$$R_2 = \frac{\text{Toppareal för sterol i provet}}{\text{Toppareal för betulin i provet}}$$

W_1 = Mängden sterol (mg) i 1 ml standardlösning (4.8.1 eller 4.9.1).

W_2 = Provets vikt (g) (5.2.1).

P = Standardsterolens renhetsgrad (4.8 eller 4.9).

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

7. Metodens noggrannhet

7.1 Smör

7.1.1 Repeterbarhet

7.1.1.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 19,3 mg/kg.

7.1.1.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist, med användning av samma utrustning på identiskt lika prover, får inte överstiga 23,0 mg/kg.

7.1.2 Reproducerbarhet

7.1.2.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts i olika laboratorier, med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover, får inte överstiga 31,9 mg/kg.

7.1.2.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts i olika laboratorier, med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover, får inte överstiga 8,7 % av genomsnittet av resultaten.

7.1.3 Källa till precisionsdata

Precisionsdata bestämdes genom ett experiment som utfördes 1992 i åtta olika laboratorier med sex prover (tre dubbla blindtester) för stigmasterol och med sex prover (tre dubbla blindtester) för sitosterol.

7.2 Koncentrerat smör

7.2.1 Repeterbarhet

7.2.1.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist, med användning av samma utrustning på identiskt lika prover, får inte överstiga 10,2 mg/kg.

7.2.1.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist, med användning av samma utrustning på identiskt lika prover, får inte överstiga 3,6 % av genomsnittet av resultaten.

7.2.2 Reproducerbarhet

7.2.2.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts i olika laboratorier, med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover, får inte överstiga 25,3 mg/kg.

7.2.2.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts i olika laboratorier, med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover, får inte överstiga 8,9 % av genomsnittet av resultaten.

7.2.3 Källa till precisionsdata

Precisionsdata bestämdes genom ett experiment som utfördes 1991 i nio olika laboratorier med sex prover (tre dubbla blindtester) för stigmasterol och sex prover (tre dubbla blindtester) för sitosterol.

8. Toleransgränser

8.1 Tre prover skall tas från den spårade produkten för att kontrollera att produkten har spårats på rätt sätt.

8.2 Smör

8.2.1 Stigmasterol

8.2.1.1 150 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 % iblandas per ton smör, dvs. 142,5 mg/kg, eller 170 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 % per ton smör, dvs. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera spårämnetens iblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [CrD_{95}]):

— 116,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).

— 118,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).

— 81,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).

— 82,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan antingen 116,0 mg/kg och 81,0 mg/kg eller 118,0 mg/kg och 82,0 mg/kg.

8.2.2 Sitosterol

8.2.2.1 600 g sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 % iblandas per ton smör, dvs. 540 mg/kg.

8.2.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera spårämnets iblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [DCr_{95}]):

- 486,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).
- 358,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 486,0 mg/kg och 358,0 mg/kg.

8.3 Koncentrerat smör

8.3.1 Stigmasterol

8.3.1.1 150 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 % iblandas per ton smör, dvs. 142,5 mg/kg eller 170 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 % iblandas per ton smör, dvs. 144,5 mg/kg.

8.3.1.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera spårämnets iblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [DCr_{95}]):

- 120,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).
- 122,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).
- 84,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).
- 86,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan antingen 120,0 mg/kg och 84,0 mg/kg eller 122,0 mg/kg och 86,0 mg/kg.

8.3.2 Sitosterol

8.3.2.1 600 g sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 % iblandas per ton koncentrerat smör, dvs. 540 mg/kg.

8.3.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera spårämnets iblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % [DCr_{95}]):

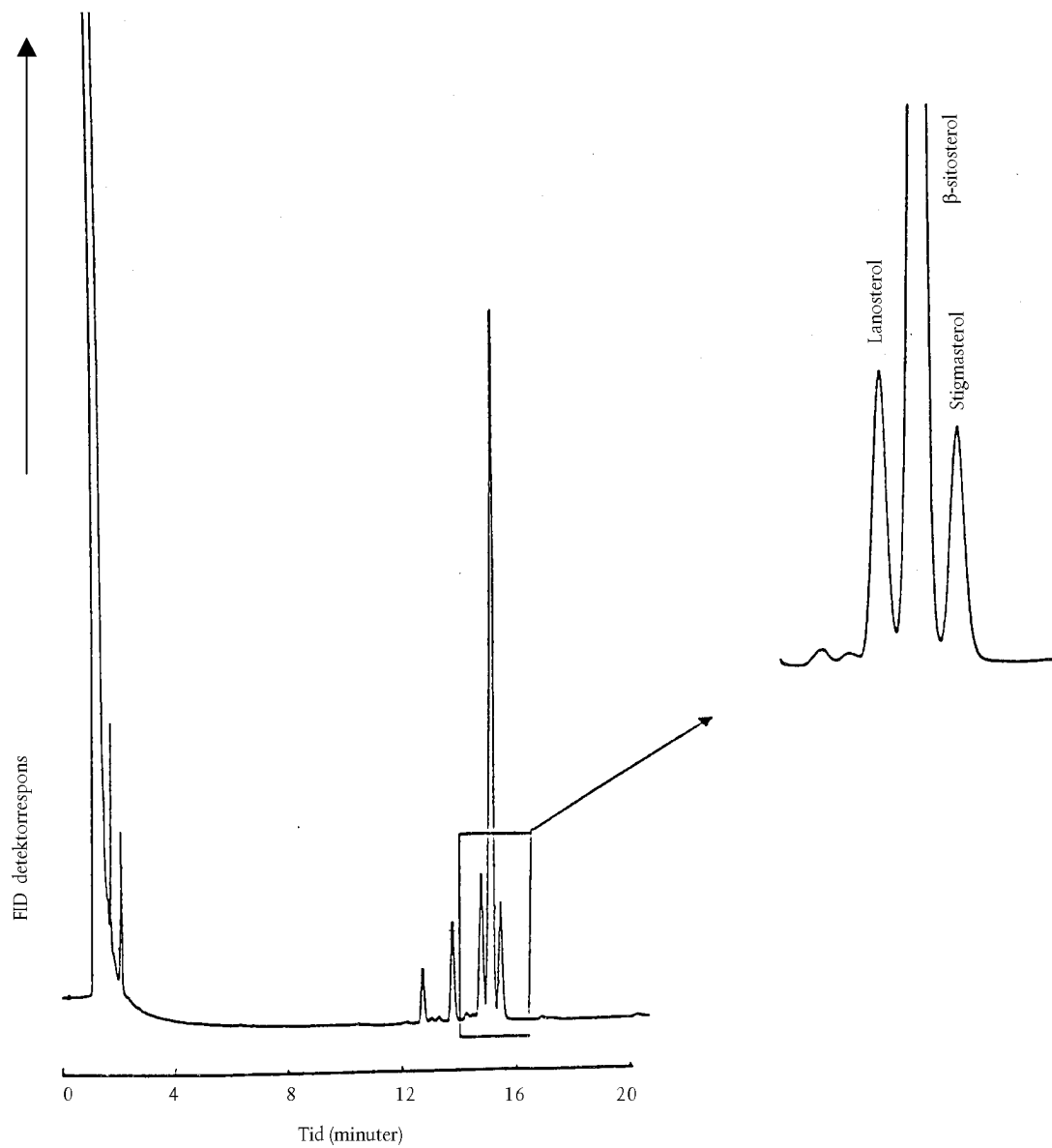
- 486,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).
- 358,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 486,0 mg/kg och 358,0 mg/kg.

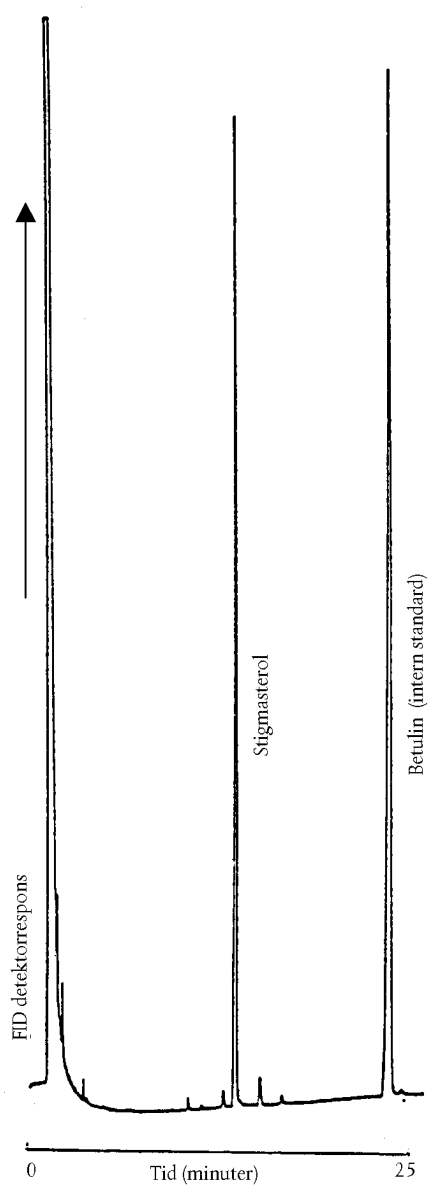
Figur 1

Kromatogram av upplösning för kontroll av upplösningförmåga

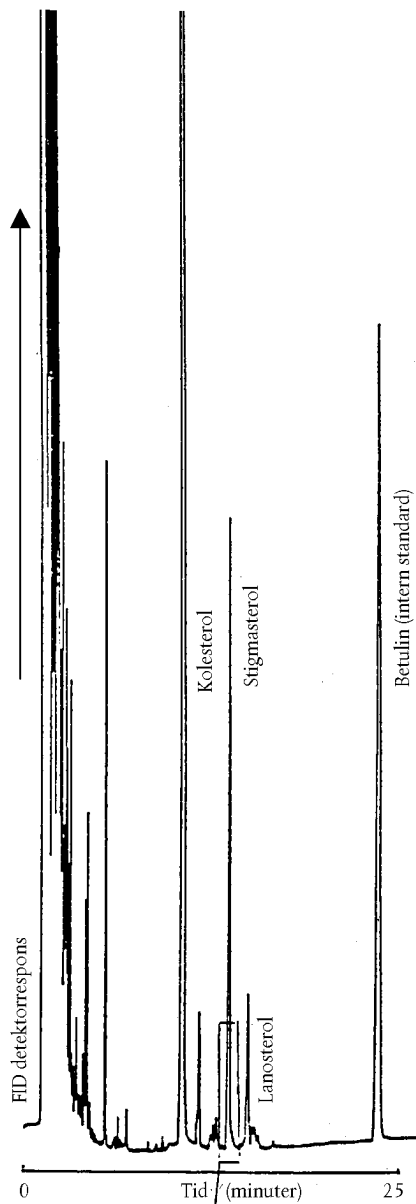
Det bästa är om topparna är helt åtskilda, dvs. Att linjen för lanosteroltoppen går ner till baslinjen innan den går upp till sitosteroltoppen. En viss ofullständighet kan tolereras.



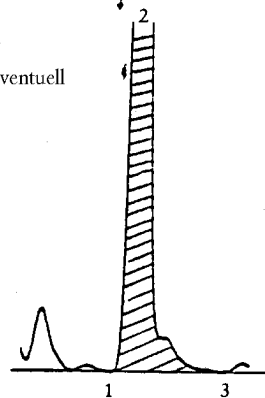
Figur 2a
Stigmasterolstandard



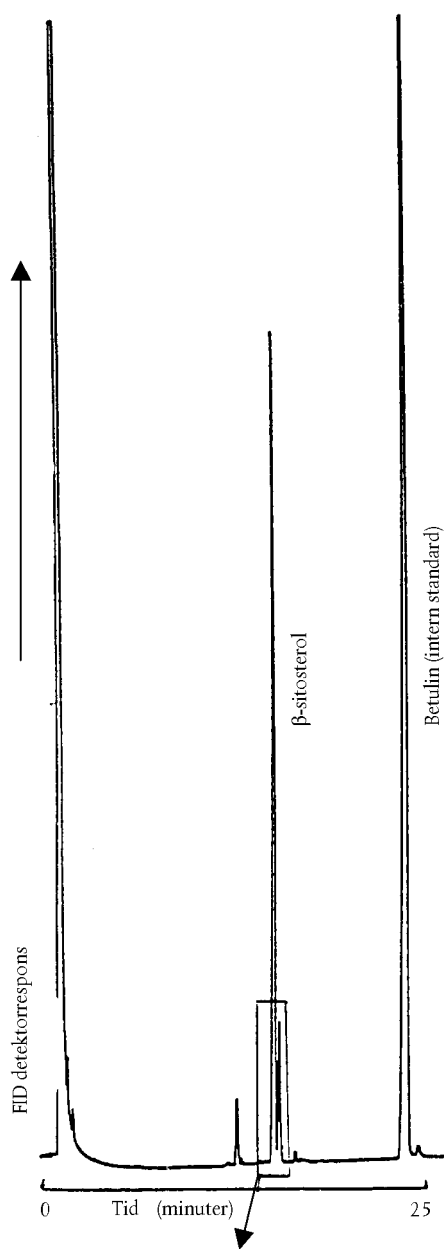
Figur 2b
Smörprov denaturerat med stigmasterol



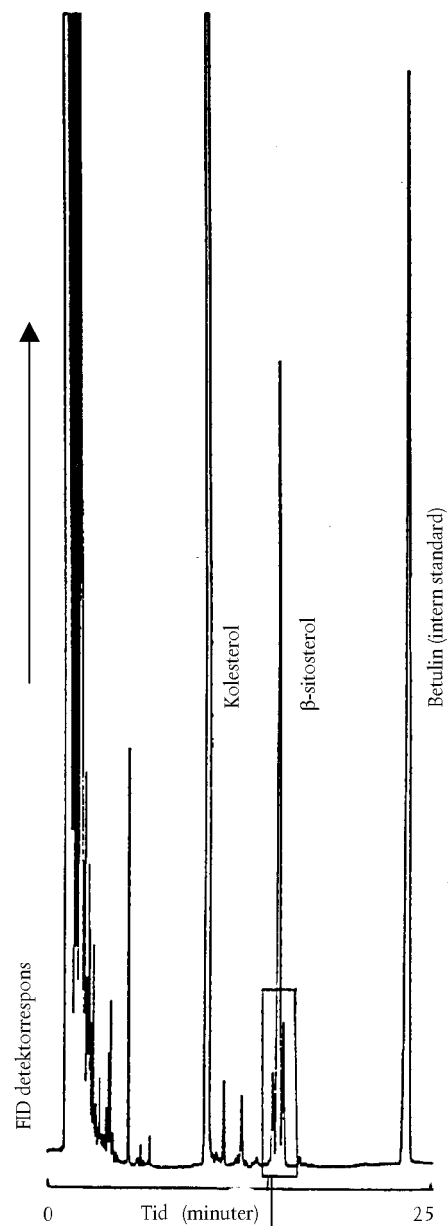
Anmärkning: Integrering av stigmasteroltoppen bör inbegripa eventuell svansning som avgränsas av punkterna 1, 2 och 3.



Figur 3a
 β -Sitosterolstandard

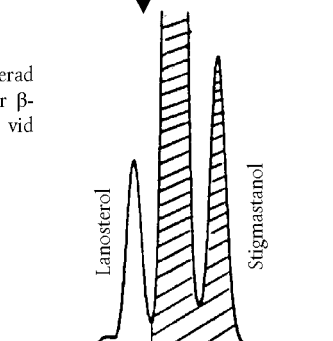
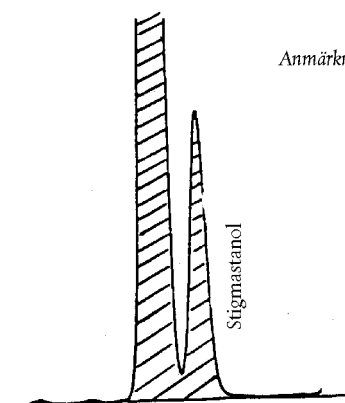


Figur 3b
 Smörprov denaturerat
 med β -sitosterol



Anmärkning:

β -sitosterol innehåller ofta en orenhet (identifierad som stigmastanol) som eluerar omedelbart efter β -sitosterol. Dessa två toppars arealer bör adderas vid bestämning av det totala innehållet β -sitosterol.



BILAGA XV

(Artikel 10)

REFERENSMETOD FÖR PÅVISANDE AV KOMJÖLK OCH KASEIN I OST SOM ÄR TILLVERKAD AV MJÖLK FRÅN TACKOR, GETTER ELLER BUFLAR ELLER AV BLANDNINGAR AV MJÖLK FRÅN TACKOR, GETTER OCH BUFLAR**1. Syfte**

Påvisande av komjolk och kasein i ost som är tillverkad av mjölk från tackor, getter eller bufflar eller av blandningar av mjölk från dessa djur, genom isoelektrisk fokusering av γ -kaseiner efter plasminolys.

2. Tillämpningsområde

Metoden är lämplig för känsligt och specifikt påvisande av rå och värmebehandlad komjolk och kasein i färsk och mogen ost som tillverkats av mjölk från tackor, getter och bufflar eller blandningar av mjölk från dessa djur. Den är inte lämplig för att påvisa tillsatser av värmebehandlat koncentrat av protein från kolöpe i mjölk och ost.

3. Metodens princip

- 3.1 Isolering av kaseiner från ost och standardlösning.
- 3.2 Upplösning av isolerade kaseiner som därefter underkastas plasminspjälkning (E.C.3.4.21.7).
- 3.3 Isoelektrisk isolering av de plasminbehandlade kaseinerna i närvaro av urea och färgning av proteinerna.
- 3.4 Värdering av de färgade γ_3 - och γ_2 -kaseinmönstren (tecken på komjolk) genom jämförelse av provets mönster med mönster i samma gel från standardlösningar som innehåller 0 % och 1 % komjolk.

4. Reagenser

Om inte annat anges skall kemikalier av p.a. kvalitet användas. Vattnet måste vara dubbeldestillerat eller av motsvarande enhetsgrad.

Anmärkning: Följande uppgifter gäller för laboratorietillverkade polyakrylamidgeler med måtten $265 \times 125 \times 0,25$ mm som innehåller urea. Om gel av annan storlek eller typ används kan separationsbetingelserna behöva anpassas.

Isoelektrisk fokusering

- 4.1 *Reagenser för framställning av polyakrylamidgeler som innehåller urea.*

4.1.1 Stamlösning

Lös

4,85 g akrylamid

0,15 g NN'-metylen-bis-akrylamid (BIS)

48,05 g urea

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

i vatten och späd till 100 ml. Förvara lösningen i brun glasflaska i kylskåp.

Anmärkning: Använd gärna en färdigblandad akrylamid/BIS-lösning, som kan fås i handeln, i stället för de angivna bestämda vikterna av de neurotoxiska akrylamiderna. Om en sådan lösning innehåller 30 % w/v akrylamid och 0,8 % w/v BIS skall en volym på 16,2 ml användas i formuleringen i stället för de angivna vikterna. Stamlösningen är hållbar i högst 10 dagar. Om dess ledningsförmåga överstiger 5 μ S, avjoniseras den genom omrörning med 2 g Amberlite MB-3 i 30 minuter och filtreras därefter genom ett 0,45 μ g-membranfilter.

4.1.2 Gellösning

Bered en gellösning genom att blanda tillsatser och amfolyter med stamlösningen (se 4.1.1).

9,0 ml stamlösning

24 mg β -alanin

500 μ l amfolyt pH 3,5–9,5 ⁽¹⁾

250 μ l amfolyt pH 5–7 ⁽¹⁾

250 μ l amfolyt pH 6–8 ⁽¹⁾.

Blanda gellösningen och avgasa den i 2–3 minuter i ett ultraljudsbad eller i vakuum.

Anmärkning: Bered gellösningen omedelbart före upphällningen (se artikel 6.2).

4.1.3 Katalyslösningar

4.1.3.1 N,N,N'-tetrametyletylen-diamin (TEMED).

4.1.3.2 40 % w/v ammoniumpersulfat (PER):

Lös 800 mg PER i vatten och späd med vatten till 2 ml.

Anmärkning: Använd alltid nyblandad PER-lösning.

4.2 Kontaktvätska

Fotogen eller flytande paraffin.

4.3 Anodlösning

Lös upp 5,77 g fosforsyra (85 % w/w) i vatten och späd till 100 ml.

4.4 Katodlösning

Lös 2,0 g natriumhydroxid i vatten och späd med vatten till 100 ml.

Beredning av prov

4.5 Proteinisoleringsreagenser

4.5.1 Späd ättiksyra (25,0 ml isättiksyra späds med vatten till 100 ml).

4.5.2 Diklormetan.

4.5.3 Aceton.

4.6 Proteinupplösande buffert

Lös

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

24,03 g urea

250 mg ditiotritol

i destillerat vatten och späd till 50 ml.

Anmärkning Förvaras i kylskåp, hållbar i högst en vecka.

4.7 Reagenser till plasminspjälkning av kaseiner

4.7.1 Ammoniumkarbonatbuffer

Titra en 0,2 mol/l ammoniumhydrogenkarbonatlösning (1,58 g/100 ml vatten) som innehåller 0,05 mol/l erylendiamintetraättiksyra (EDTA, 1,46 g/100 ml) med en 0,2 mol/l ammoniumkarbonatlösning (192 g/100 ml vatten) som innehåller 0,05 mol/l EDTA till pH 8.

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

4.7.3 Enzyminhibitionslösning

Lös 2,624 g ϵ -aminokapronsyra (6 amino-n hexanonsyra) i 100 ml 40 % (v/v) etanol.

⁽¹⁾ Produkterna Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) och Resolyte® pH 5–7 och pH 6–8 (BDH, Merck) har visat sig särskilt lämpliga för att uppnå den önskade γ -kaseinseparation.

4.8 Standarder

4.8.1 Certifierade referensstandarder av en blandning av skummjolk från tackor och getter vilken behandlats med löpe och som innehåller 0 % och 1 % komjolk är tillgängliga från kommissionens institut för referensmaterial och mätningar, B-2440 Geel, Belgien.

4.8.2 Beredning av standardlösningar av skummad fårmjolk som behandlas med löpe och som innehåller 0 % och 1 % komjolk

Skummjölken bereds genom att obehandlad och opaketerad mjolk från antingen bufflar eller kor centrifugeras vid 37 °C, 2 500 g i 20 minuter. Röret med innehåll kyls snabbt till 6–8 °C och det översta fettlagret avlägsnas fullständigt. 1 %-standardlösningen bereds genom att 5,00 ml skummad komjolk tillsätts till 495 ml skummad buffelmjolk i en 1-litersbägare och pH-värdet justeras till 6,4 genom att utspädd mjölksyra tillsätts (10 % w/v). Ställ in temperaturen på 35 °C, tillsätt 100 µl kalvlöpe (löpeaktivitet 1:10 000, ca 3 000 U/ml) och rör om i 1 minut. Täck sedan bägaren med aluminiumfolie och låt den stå i 35 °C under 1 timme, så att ostmassan bildas. När ostmassan har bildats, frystockas all den löpebehandlade mjölken utan föregående homogenisering eller avrinning av vasslan. Efter frystorkningen mals produkten fint till ett homogent pulver. Använd samma förfarande för att bereda 0 %-standardlösningen av ren skummad buffelmjolk. Standarden måste lagras vid –20 °C.

Anmärkning: Det lämpligt att kontrollera buffelmjölakens renhet genom isoelektrisk fokusering av de plasmin-behandlade kasererna före framställningen av standardlösningarna.

Reagenser för proteinfärgning

4.9 Fixeringsvätska

Lös 150 g triklorättiksyra i vatten och späd till 1 000 ml.

4.10 Avfärgningslösning

Späd 500 ml metanol och 200 ml isättiksyra till 2 000 ml med destillerat vatten.

Anmärkning: Blanda till ny avfärgningslösning varje dag. Utgå gärna från stamlösningar av 50 % (v/v) metanol och 20 % (v/v) isättiksyra som blandas i lika stora mängder.

4.11 Färgningslösning

4.11.1 Färgningslösning (stamlösning 1)

Lös 3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) i 1 000 ml 90 % (v/v) metanol med hjälp av en magnetisk blandare (ca 45 minuter) och filtrera därefter lösningen genom två vikta filter för medelsnabb filtrering.

4.11.2 Färgningslösning (stamlösning 2)

Lös 5,0 g kopparsulfatpentahydrat i 1 000 ml 20 % (v/v) ättiksyra.

4.11.3 Färglösning (arbetslösning)

Blanda 125 ml av vardera stamlösningen (4.11.1, 4.11.2) med varandra omedelbart före färgningen.

Anmärkning: Färglösningen bör endast användas samma dag som den beretts.

5. Utrustning

5.1 Glasplattor (265 × 125 × 4 mm), gummirulle (15 cm bred) och vågrätt underlag.

5.2 Gelbärfolie (265 × 125 mm).

5.3 Täckfolie (280 × 125 mm). Fäst en tejprensa (280 × 6 × 0,25 mm) efter vardera långsidan (se figur 1).

5.4 Elektrofokuseringskammare med kylplatta (t.ex. 265 × 125 mm) med lämplig spänningskälla (≥ 2,5 kV) eller automatisk elektroforesapparat.

5.5 Cirkulationskryostat, termostatstyrd vid 12 ± 0,5 °C.

5.6 Centrifug, justerbar till 3 000 g.

5.7 Elektrodremсор (≥ 265 mm långa).

- 5.8 Droppflaskor av plast till anod- och katodlösningarna.
- 5.9 Provapplikatorer (10 × 5 mm, viskosfilterpapper eller filterpapper för låg proteinabsorption).
- 5.10 Sax, skalpell och pinceller av rostfritt stål.
- 5.11 Färgningsskålar och avfärgningsskålar av rostfritt stål eller glas (t.ex. 280 × 150 mm instrumentbrickor).
- 5.12 Justerbar homogeniseringsblandare med stång (10 mm diameter), rpm-skala 8 000–20 000 rpm.
- 5.13 Magnetisk blandare.
- 5.14 Ultraljudsbad.
- 5.15 Foliesvets.
- 5.16 5–25 µl mikropipetter.
- 5.17 Vakuumindestare eller frystork.
- 5.18 Termostatstyrt vattenbad inställt på 35 och 40 ± 1 °C med skakare.
- 5.19 Densitometerutrustning med avläsning vid $\lambda = 634$ nm.

6. Utförande

6.1 Beredning av prov

6.1.1 Isolering av kaseiner

Väg upp en mängd som motsvarar 5 g torr ost eller standardlösning använd om möjligt den omogna mittdelen av vit mjukost i ett 100 ml centrifugeringsrör, tillsätt 60 ml destillerat vatten och homogenisera med en homogeniseringsblandare med stång (8 000–10 000 rpm). Justera pH-värdet till 4,6 med utspädd ättiksyra (4.5.1) och centrifugera (5 minuter, 3 000 g). Avlägsna fett och vaslan. Homogenisera återstoden vid 20 000 rpm i 40 ml destillerat vatten som justerats till pH 4–5 med utspädd ättiksyra (4.5.1), tillsätt 20 ml diklormetan (4.5.2) samt homogenisera och centrifugera igen (5 minuter, 3 000 g). Avlägsna det kaseinlager som finns mellan vattenfasen och den organiska fasen (se figur 2) med en spatel och dekantera av båda faserna. Homogenisera kaseinet igen i 40 ml destillerat vatten (se ovan) och 20 ml diklormetan (4.5.2) samt centrifugera. Upprepa detta förfarande tills båda extraktionsfaserna är färglösa (två eller tre gånger). Homogenisera proteinresterna med 50 ml torr aceton (4.5.3) och filtrera dem genom ett vikt filter för medelsnabb filtrering. Tvätta resterna på filtret med två olika omgångar av 25 ml aceton, låt torka i luft eller i en kväveström och pulverisera dem sedan fint i mortel.

Anmärkning: Torra kaseinisolat skall förvaras vid – 20 °C.

6.1.2 Plasminspjälkning av β -kaseiner för att intensifiera γ -kaseiner

Slamma upp 25 mg isolerad kasein (6.1.1) i 0,5 ml ammoniumkarbonatbuffer (4.7.1) och homogenisera under 20 minuter genom exempelvis ultraljudsbehandling. Värm till 40 °C och tillsätt 10 µl plasmin (4.7.2), blanda och inkubera under en timme vid 40 °C under ständig skakning. Inhibera enzymet genom att tillsätta 20 µl ϵ -aminokapronsyra (4.7.3), tillsätt sedan 200 mg fast urea och 2 mg ditiotreitol.

Anmärkning: För att få de fokuserade kaseinbanden mer symmetriska rekommenderas att lösningen frystorkas efter tillsättning av ϵ -aminokapronsyran och att resterna löses i 0,5 ml ureabuffer (4.6).

6.2 Beredning av akrylamidgeler som innehåller urea

Rulla ut gelbärfolien (5.2) med hjälp av ett par droppar vatten på en glasplatta (5.1) och avlägsna eventuellt överflödigt vatten med pappershandduk eller hushållspapper. Rulla på samma sätt ut täckfolien (5.3) med avståndsmärken med 0,25 mm mellanrum på en annan glasplatta. Placera plattan plant på ett vågrätt underlag.

Tillsätt 10 µl av vardera katalyslösningarna TEMED (4.1.3.1) och PER (4.1.3.2) till den förbehandlade och avgasade gellösningen (4.1.2), blanda en kort stund och häll ut ett jämt lager på mitten av täckfolien. Placera ena sidan av gelbärfolien (med bärsidan nedåt) på täckfolieplattan och sänk ner den långsamt så att ett gellager mellan folierna bildas och sprids ut jämt utan bubblor (figur 3). När polymeriseringen är avslutad (efter ca 60 minuter), överför den polymeriserade gelen till gelbärfolien tillsammans med täckfolien genom att vicka på glasplattorna. Rengör baksidan av gelbärfolien försiktigt från gelrester och urea. Svetsa "gelsandwichen" till ett folierör, som förvaras i kylskåp (högst 6 veckor).

Anmärkning: Täckfolien med avståndsmärken kan återanvändas. Polyakrylamidgelen kan skäras i mindre bitar, vilket är lämpligt då antalet prov är få eller då en automatisk elektroforesapparat används (2 geler, storlek 4,5 × 5 cm).

6.3 Isoelektronisk fokusering

Ställ in kyltermostaten på 12 °C. Torka av baksidan på gelbärfolien med petroleum och droppa sedan några droppar petroleum (4.2) på mitten av kylblocket. Rulla därefter ut gelsandwichen (med bärsidan nedåt) på den och se till att det inte blidas några bubblor. Torka av eventuellt överflödigt petroleum och ta bort täckfolien. Dränk in elektrodremsorna med elektrodlösningarna (4.3 och 4.4), skär till dem i gelens längd och placera dem på de givna platserna (elektroдавstånd 9,5 cm).

Fokuseringen sker under följande betingelser:

6.3.1 Gelstorlek 265 × 125 × 0,25 mm

Steg	Tid (minuter)	Spänning (V)	Strömstyrka (A)	Kraft (W)	Voltmeter (Vh)
1. Förfokusering	30	max. 2 500	max. 15	konst. 4	± 300
2. Provfokusering ⁽¹⁾	60	max. 2 500	max. 15	konst. 4	± 1 000
3. Slutfokusering	60	max. 2 500	max. 5	max. 20	± 3 000
	40	max. 2 500	max. 6	max. 20	± 3 000
	30	max. 2 500	max. 7	max. 25	± 2 500

⁽¹⁾ Provapplikation: Efter förfokuseringen (steg 1) pipetteras 18 µl av vardera provlösningen till provapplikatorerna (10 mm × 5 mm), som placeras på gelen på ett avstånd av 1 mm från varandra och 5 mm från anoden och trycks lätt ned. Genomför fokuseringen enligt ovanstående betingelser och avlägsna försiktigt provapplikatorerna efter 60 minutes fokusering av proven.

Anmärkning: Om gelernas tjocklek eller bredd ändras måste strömstyrkan och kraften justeras därefter (dubbla t.ex. strömstyrkan och kraften om en gel med måtten 265 × 125 × 0,5 mm används).

6.3.2 Exempel på spänningsprogram för en automatisk elektroforesapparat (2 geler på 5,0 × 4,5 cm); elektroderna placeras utan remsor direkt på gelen.

Steg	Spänning	Strömstyrka	Kraft	Temp.	Voltmeter
1. Förfokusering	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Provfokusering	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusering	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Slutfokusering	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Placera provapplikatoren i steg 2 vid 0000 Vh.

Ta bort provapplikatoren i steg 2 vid 0030 Vh.

6.4 Proteinfärgning

6.4.1 Proteifixering

Ta bort elektrodremsorna omedelbart efter det att strömmen slagits av och placera geten i en färgningsskål eller avfärgningsskål fylld med 200 ml fixervätska (4.9). Låt den stå i 15 minuter och skaka om då och då.

6.4.2 Tvättning och färgning av gelplattan

Låt fixervätskan rinna av ordentligt och tvätta gelplattan två gånger under 30 sekunder med 100 ml avfärgningslösning (4.10) per gång. Håll av avfärgningslösningen och fyll skålen med 250 ml färgningslösning (4.11.3). Låt färgen verka under 45 minuter under försiktig skakning.

6.4.3 Avfärgning av gelplattan

Häll bort färgningslösningen och tvätta gelplattan två gånger med 100 ml avfärgningslösning (4.10) per gång, skaka sedan under minst 2×15 minuter med 200 ml avfärgningslösning tills bakgrunden är klar och färglös. Tvätta sedan gelplattan med destillerat vatten (2×2 minuter) och låt lufttorka (2–3 timmar) eller torka med en hårtork (10–15 minuter).

Anmärkning nr 1: Utför fixering, tvättning, färgning och avfärgning vid 20 °C. Högre temperatur får inte användas.

Anmärkning nr 2: Om en mer känslig silverfärg önskas (t.ex. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code nr 17-1150-01) måste plasminbehandlade kaseinprov tunnas ut till 5 mg/ml.

7. Utvärdering

Utvärderingen genomförs genom att provets proteinmönster jämförs med stamlösningar av samma gel. Påvisande av komjolk i ost som tillverkats av mjölk från tackor, getter och bufflar och blandningar av mjölk från dessa djur sker via de γ_2 - och γ_3 -kaseiner vars isoelektriska punkter ligger mellan pH 6,5 och pH 7,5 (figurerna 4a, 4b och 5). Detektionsgränsen ligger under 0,5 %.

7.1 Visuell värdering

För visuell värdering av mängden komjolk rekommenderas att provens och standardernas koncentration justeras till samma intensitetsnivå för γ_2 - och γ_3 -kaseinerna från mjölk från kor, getter och bufflar (jfr. " γ_2 E, G, B" och " γ_3 E, G, B" i figurerna 4a, 4b och 5). Därefter kan innehållet av komjolk (lägre, lika med eller högre än 1 %) i det okända provet bedömas direkt genom jämförelse med intensiteten hos γ_3 - och γ_2 -kaseinerna från komjolk (jfr. " γ_3 C" och " γ_2 C" i figurerna 4a, 4b och 5) med en stamlösning på 0 % och 1 % (tacka, get) eller med laboratoriets interimstandarder (buffel).

7.2 Densitometrisk värdering

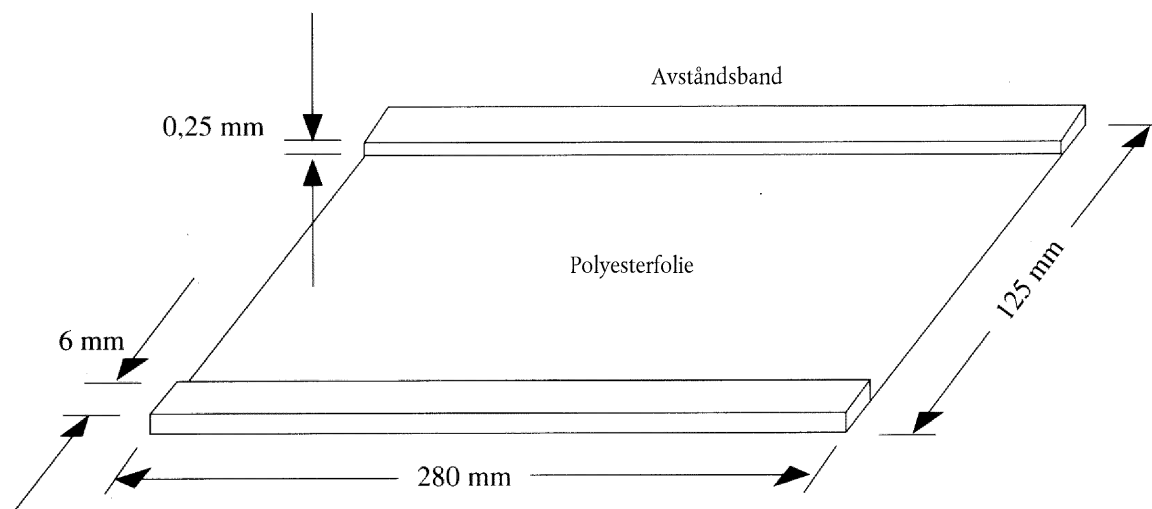
Om möjligt används densitometri (5.19) för att bestämma förhållandet mellan topparealerna för γ_2 - och γ_3 -kasein från mjölk från kor, getter och/eller bufflar (jfr. figur 5). Jämför detta värde med topparealerna för γ_2 - och γ_3 -kaseiner i den 1 %-stamlösning (tacka, get) eller i laboratoriets interimstandarder (buffel) som analyseras på samma gel.

Anmärkning: Metoden fungerar tillfredsställande om det är ett klart positivt tecken på både γ_2 - och γ_3 -kasein från komjolk i 1 %-standardlösningen, men inte i 0 %-stamlösningen. Om så inte är fallet, bör förfarandet förbättras genom att metoden följs noga i alla detaljer.

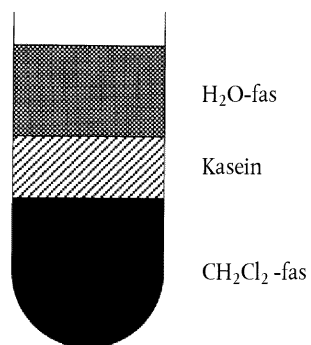
Ett prov betraktas som positivt om både γ_2 - och γ_3 -kaseiner eller de motsvarande topparealerna är lika med eller större än nivån på 1 %-stamlösningen.

8. Referenser

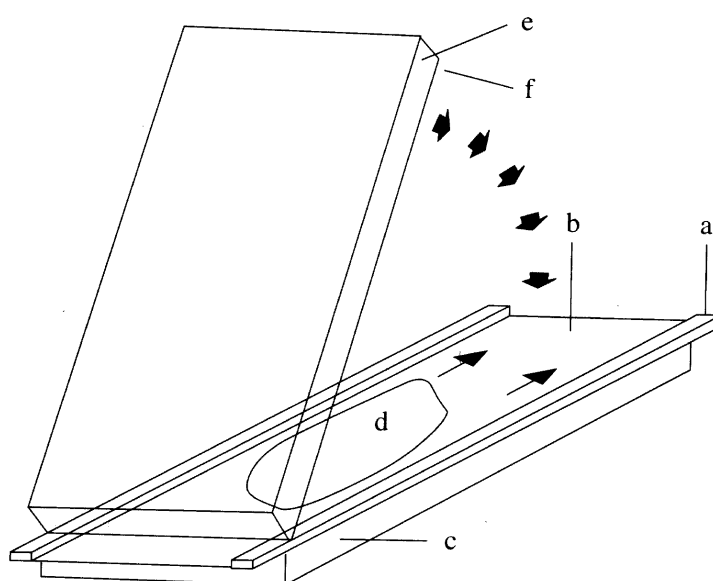
1. Addeo, F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner L, Krause L, Di Luccia A., Bocca A.: *Use of glansmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins.* *Milchwissenschaft* 45, 708–711 (1990).
2. Addeo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



Figur 1: Schematisk bild av täckfolien

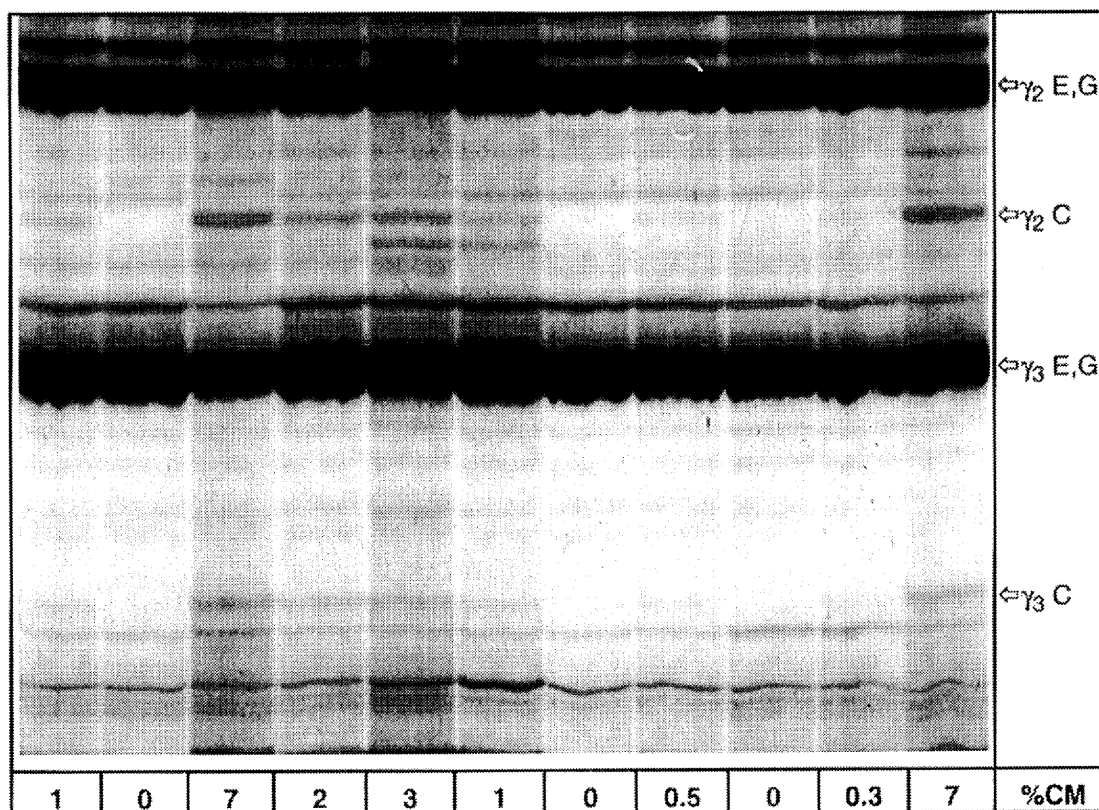


Figur 2: Kaseinlager som flyter mellan vattenfasen och den organiska fasen efter centrifugeringen



Figur 3: Vickningsteknik vid gjutning av ultratunna polyakrylamidgeler

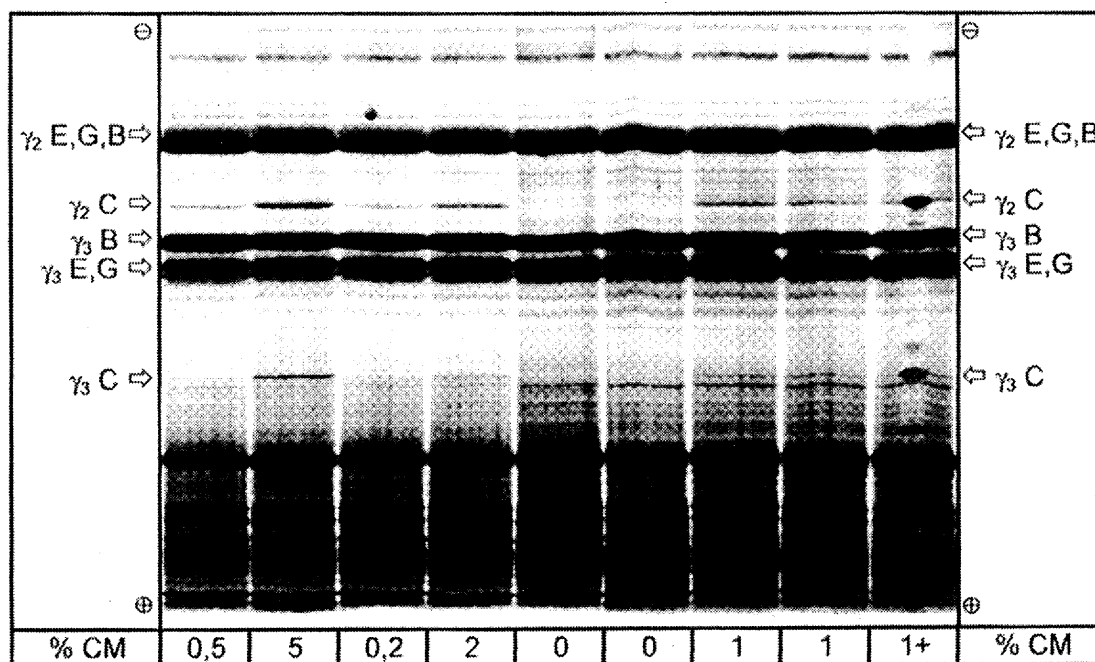
a = avståndsbånd (0,25 mm); b = täckfolie (5.3); c, e = glasplattor (5.1); d = gellösning (4.1.2); f = gelbärrarfolie (5.2)



Figur 4a: Isoelektrisk fokusering av plasminbehandlade kaseiner från ost som tillverkats av mjölk från tackor och getter och som innehåller olika mängder komjök.

% CM = procent komjök, C = ko, E = tacka, G = get.

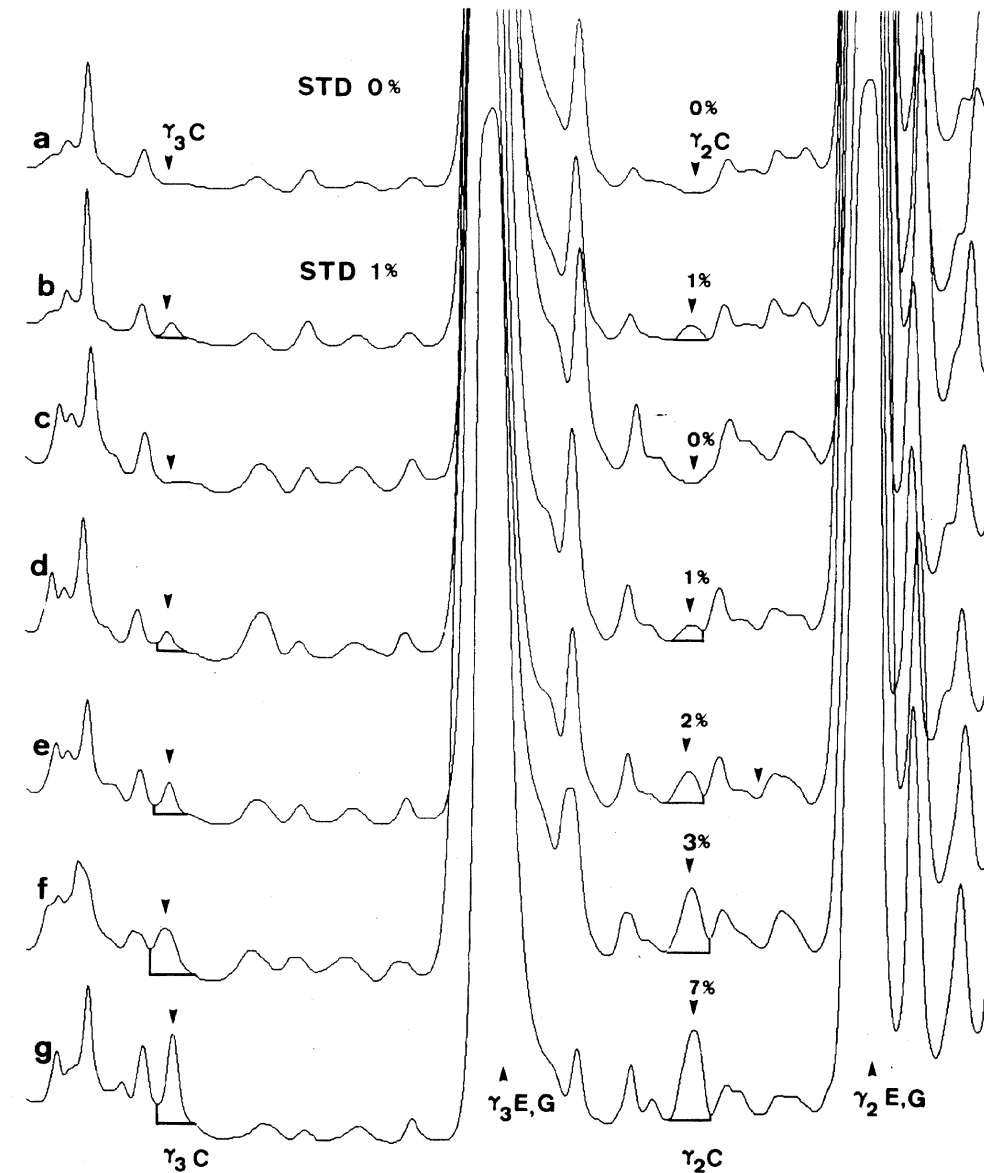
Den övre halvan av IEF-gelen visas.



Figur 4b: Isoelektrisk fokusering av plasminbehandlade kaseiner från ost som tillverkats av blandningar av mjölk från tackor, getter och bufflar och som innehåller olika mängder komjök.

% CM = procent komjök, 1 + = prov som innehåller 1 % komjök och där rent kasein från komjök tillsatts i mitten av figuren. C = ko, E = tacka, G = get, B = buffel.

Den övre halvan av IEF-gelen visas.



Figur 5: Överlagring av densitogram av på standarder och ostprover som tillverkas av en blandning av mjölk från tackor och getter efter isoelektrisk fokusering.

a, b = standarderna innehåller 0 % och 1 % komjölk, c-g = ostprov som innehåller 0, 1, 2, 3 och 7 % komjölk.
 C = ko, E = tacka, G = get.

Den övre halvan av IEF-gelen analyserades vid $\lambda = 634 \text{ nm}$.

BILAGA XVI

(Artikel 11)

REFERENSMETOD FÖR PÅVISANDE AV KOLIFORMA BAKTERIER I SMÖR, SKUMMJÖLKSPULVER OCH KASEIN/KASEINATER

Prover som motsvarar 1 kg smör inokuleras i odlingsmediet, om smör testas för påvisande av koliforma bakterier. När skummjölkspulver eller kasein/kaseinater testas för påvisande av koliforma bakterier, inokuleras 0,1 g-prover i odlingsmediet.

IDF-standard 73A:1985 metod B tillämpas med följande ändringar:

- 1) Provbereidningen utförs i enlighet med IDF-standard 122B:1992. För surt kasein kan provberedningen alternativt utföras i enlighet med IDF-standard 73A:1985.
- 2) Endast provrör som inokulerats med 1 g-prov (smör) eller 0,1 g-prov (skummjölkspulver, kasein/kaseinater) inkuberas och utvärderas. Inga spädningar 1:10 görs.

Utvärdering av resultaten

Vid tre negativa resultat:	Kravet är uppfyllt
Vid två eller tre positiva resultat:	Kravet är inte uppfyllt
Vid två negativa resultat:	Analysera två kompletterande 1 g-prover (smör) och 0,1 g-prover (skummjölkspulver, kasein/kaseinater). Kravet är uppfyllt om de två sista resultaten är negativa, i annat fall är kravet inte uppfyllt.

Anmärkning

Antal koliforma bakterier: 1/10 g smör, 1/g skummjölkspulver eller kasein/kaseinater i genomsnitt:

Resultat som visar att kravet är uppfyllt erhålls med 93 % sannolikhet.

Antal koliforma bakterier: 1/g smör, 1/0,1 g skummjölkspulver eller kasein/kaseinater i genomsnitt:

Resultat som visar att kravet inte är uppfyllt erhålls med 91 % sannolikhet.

(Antagande: Poisson-fördelning)

BILAGA XVII

(Artikel 12)

ANALYSMETOD FÖR ATT BESTÄMMA LAKTOSINNEHÅLLET I DE PRODUKTER SOM OMFATTAS AV KN-NUMMER 2309 ⁽¹⁾

DEL I

1. Användningsområde

Metoden skall tillämpas i de fall där laktosinnehållet överstiger 0,5 %.

2. Princip

Lös socker i vatten. Låt jästen (*Saccharomyces cerevisiae*) verka. Detta påverkar inte laktosen. Efter klarning och filtrering bestäms laktosinnehållet i lösningen med Luff-Schoorls metod.

3. Reagenser

Natriumtiosulfat 0,1 n

Indikator: stärkelseslösning. Tillsätt en blandning av 5 g löslig stärkelse (10 mg kvicksilverjodid kan tillsättas som konserveringsmedel) och 30 ml vatten i 1 liter kokande vatten. Låt blandningen koka i tre min och därefter svalna.

Kaliumjodidlösning AF à 30 % (v/v)

Svalvelsyralösning 6 n

Luff-Schoorls reagens:

- Lös 25 g kopparsulfat AF fritt från järn ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i 100 ml vatten.
- Lös 50 g citronsyra AF ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i 50 ml vatten.
- Lös 143,8 g vattenfri natriumkarbonat AF (Na_2CO_3) i ungefär 300 ml varmt vatten.

Häll under försiktig skakning b) i c) (efter nedkylning) och häll sedan i a). Späd till 1 liter, låt stå över natten och filtrera sedan. Den erhållna reagensen bör kontrolleras (0,1 N i Cu, 2 N i Na_2CO_3). pH-värdet bör ligga nära 9,4.

Carrez-lösning I: lös 23,8 g $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ och 3 g isättika i vatten och späd till 100 ml.

Carrez-lösning II: lös 10,6 g $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i vatten och späd till 100 ml.

Pimpstenskorn, som under kokning behandlats med saltsyra, tvättas med vatten och torkas. Suspension av *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g färsk jäst i 100 ml vatten (förvara inte längre än en vecka i kylskåp).

4. Förfarande

Väg med 1 mg noggrannhet upp 1 g prov för analys. Överför provet till en 100 ml mätkolv. Tillsätt 25–30 ml vatten. Låt kolven stå i ett kokande vattenbad i 30 min och sedan svalna till ca 35 °C.

Tillsätt 5 ml av jästsuspensionen ⁽²⁾ och skaka sedan. Låt mätkolven och dess innehåll stå kvar i vattenbadet med en temperatur av 38–40 °C i 2 tim.

Efter jäsnings, låt svalna ca 20 °C. Tillsätt 2,5 ml Carrez-lösning I och skaka i 30 sekunder. Tillsätt därefter 2,5 ml lösning Carrez II och skaka i ytterligare 30 sekunder. Späd med vatten till 100 ml, blanda och filtrera. Pipettera högst 25 ml av filtratet, som bör innehålla 40–80 mg laktos. Späd vid behov med vatten till 25 ml och bestäm innehållet av vattenfri laktos med användning av Luff-Schoorls metod.

Gör ett fullständigt blindprov med enbart jäst.

⁽¹⁾ Förordning (EEG) nr 222/88.

⁽²⁾ För produkter som innehåller mer än 40 % jäsbart socker bör kvantiteten jästsuspension ökas.

DEL II

1. Bestämning av laktosinnehållet med Luff-Schoorls metod

Pipettera 25 ml av Luff-Schoorls reagens och placera det i en 300 ml Erlenmeyer-kolv. Mät upp och tillsätt exakt 25 ml av den klarnade lösningen.

Tillsätt två pimpstenskorn, upphetta, skada för hand över en öppen, medelhög låga och låt vätskan koka i ungefär två min. Placera omedelbart Erlenmeyer-kolven på ett metallradsnät med ett asbestgaller under vilket en låga tidigare har tänts. Denna regleras på ett sådant sätt att Erlenmeyer-kolven endast upphettas i botten. Anbringa därefter en återloppskylare. Koka omedelbart vätskan i exakt 10 minuter. Kyl omedelbart i kallt vatten och testa efter ungefär fem minuter på följande sätt:

Tillsätt först 10 ml kaliumjodid i vätskan och omedelbart därefter, men försiktigt (kraftig skumning kan förekomma), 25 ml svavelsyra 6 n.

Testa därefter med natriumtiosulfat tills en matt gul färg observeras och tillsätt stärkelseindikatorn mot slutet av testet.

Utför samma test med en blandning av exakt 25 ml Luff-Schoorls reagens och 25 ml vatten efter tillsättande av 10 ml kaliumjodid och 25 ml svavelsyra 6 n, denna gång utan att koka upp.

Använd tabellen nedan för att i mg bestämma mängden laktos som motsvarar skillnaden mellan de två testresultaten (uttryckt i ml natriumtiosulfat 0,1 n).

TABELL

Tabell för 25 ml Luff-Schoorls reagens
(se förutsättningarna som anges i texten till denna förordning)

1. Natriumtiosulfat 0,1 n

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

1			2		
ml	mg	Skillnad	ml	mg	Skillnad
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

BILAGA XVIII

(Artikel 13)

FASTSTÄLLANDE AV VASSLEFÖREKOMST I SKUMMJÖLKSPULVER AVSETT FÖR OFFENTLIG LAGRING GENOM BESTÄMNING AV GLYKOMAKROPEPTIDER MED HÖGTRYCKSVÄTSKEKROMATOGRAFISK METOD (HPLC)**1. Syfte och tillämpningsområde**

Med denna metod kan vassle påvisas i skummjörkspulver avsett för offentlig lagring genom bestämning av glykomakropeptider.

2. Hänvisning

Internationell standard ISO 707 – mjörk och mjörkprodukter – metoder för provtagning i enlighet med riktlinjerna i bilaga I.2 c sista stycket.

3. Definition

Glykomakropeptidhalten i skummjörkspulver: halten substanser fastställd med den nedan beskrivna metoden och uttryckt i viktprocent.

4. Princip

- Skummjörkspulvret löses i vatten, fett och proteiner avlägsnas med triklorättiksyra, varefter lösningen centrifugeras.
- Bestämning av kvantiteten glykomakropeptider (GMP) i supernatanten med högtrycksvätskekromatografi (HPLC).
- Bedömning av det resultat som erhålls från proverna med hänvisning till standardprover som består av skummjörkspulver med eller utan tillsats av en känd procentsats vasslepulver.

5. Reagenser

Alla reagenser skall vara för analytika ändamål godkänd klass. Vattnet skall vara destillerat vatten eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad.

5.1 Triklörättiksyralösning

Lös 240 g triklorättiksyra (Cl_3CCOOH) i vatten och späd till 1 000 ml.

5.2 Elueringslösning pH 6,0

Lös 1,74 g dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4), 12,37 g kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4) och 21,41 g natriumsulfat (Na_2SO_4) i cirka 700 ml vatten. Justera vid behov till pH 6,0 med en lösning av fosforsyra eller kaliumhydroxid.

Späd till 1 000 ml med vatten och homogenisera.

Före användning skall elueringslösningen filtreras genom filtermembran med pordiameter 0,45 μm .

5.3 Tvättvätska

Blanda en del acetonitril (CH_3CN) med nio delar vatten. Före användning skall blandningen filtreras genom filtermembran med pordiameter 0,45 μm .

Obs! Andra tvättvätskor med bakteriedödande effekt får användas, förutsatt att de inte sätter ned kolonnens separationsförmåga.

5.4 Standardprover

5.4.1 Skummjörkspulver som uppfyller kraven i denna förordning (dvs. [0]).

5.4.2 Samma skummjörkspulver uppblandat med 5 % (m/m) vasslepulver med en standardsammansättning (dvs. [5]).

6. Utrustning

- 6.1 Analysvåg
- 6.2 Centrifug med kapacitet för en centrifugalkraft på 2 200 g, utrustad med proppförsedda centrifugrör som rymmer ca 25 ml.
- 6.3 Mekanisk skakapparat.
- 6.4 Magnetomrörare.
- 6.5 Glastrattar, diameter ca 7 cm.
- 6.6 Filtrerpapper, medelfint, diameter ca 12,5 cm.
- 6.7 Glasfilterutrustning, filtermembran med pordiameter 0,45 µm.
- 6.8 Graderade pipetter som medger tillförsel av 10 ml (ISO 648, klass A, eller ISO/R 835).
- 6.9 Termostatstyrt vattenbad, inställt på $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10 Utrustning för högtrycksvätskekromatografi (HPLC) bestående av:
 - 6.10.1 Pump.
 - 6.10.2 Spruta, manuell eller automatisk, med kapaciteten 15–30 µl.
 - 6.10.3 Två sammankopplade kolonner TSK 2 000-SW (längd 30 cm, inre diameter 0,75 cm) eller motsvarande kolonner med förkolonn (3 cm × 0,3 cm) fylld med I 125 eller material som är lika effektivt.
 - 6.10.4 Termostatstyrd kolonnugn, inställd på 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5 UV-detektor, variabel våglängd, som medger mätningar vid 205 nm med känsligheten 0,008 A.
 - 6.10.6 Integrator som medger integrering av enskilda toppar.

Anmärkning: Man kan använda kolonner vid rumstemperatur, men separationsförmågan blir då något lägre. I sådant fall bör vid varje analys temperaturvariationen vara mindre än ± 5 °C.

7. Provtagning

- 7.1 Internationell standard ISO 707 – provtagningsmetoder för mjölk och mjölkprodukter enligt riktlinjerna i bilaga I.2 c sista stycket.
- 7.2 Proven skall förvaras under sådana förhållanden som förhindrar nedbrytning eller förändring i sammansättningen.

8. Förfarande

- 8.1 *Beredning av proverna*

Överför mjölkpulvret till ett kärl som rymmer ungefär dubbelt så stor volym som pulvrets och som är försett med lufttätt lock. Förslut behållaren omedelbart. Blanda mjölkpulvret väl genom att upprepade gånger vända behållaren.
- 8.2 *Provmängd*

Väg upp $2,000 \pm 0,001$ g av testmaterialet i ett centrifugrör (6.2).
- 8.3 *Borttagande av fett och proteiner*
 - 8.3.1 Tillsätt 20 g varmt vatten (50 °C) till det uppvägda provet. Lös pulvret genom att skaka det 5 minuter i mekanisk skakapparat (6.3). Kyl röret till 25 °C.
 - 8.3.2 Tillsätt under två minuter 10,0 ml triklorättiksyralösningen (5.1) under omrörning med magnetomröraren (6.4). Placera röret i vattenbad (6.9) och lämna det i 60 minuter.
 - 8.3.3 Centrifugera (6.2) i 10 minuter vid 2 200 g eller filtrera genom pappersfilter (6.6) och kasta de första 5 ml av filtratet.

- 8.4 *Kromatografisk analys*
- 8.4.1 Spruta in 15–30 µl noggrant uppmätt supernatant eller filtrat (8.3.3) i HPLC-apparaten (6.10) med en flödes hastighet av 1,0 ml elueringslösning (5.2) per minut.
- Anmärkning:*
- Håll elueringslösningen (5.2) vid 85 °C under den kromatografiska analysen för att bibehålla eluenten avgasad och för att förhindra bakterieväxt. Annan åtgärd med samma effekt får användas.
 - Skölj kolonnerna med vatten under varje uppehåll. Lämna aldrig elueringslösningen i dem (5.2).
- För varje uppehåll på mer än 24 timmar, skölj kolonnerna med vatten, tvätta dem sedan med lösning (5.3) under minst tre timmar med en flödes hastighet av 0,2 ml per minut.
- 8.4.2 Resultaten av den kromatografiska analysen av provet [E] erhålls i form av kromatogram där varje topp definieras av sin retentionstid (RT) enligt följande:
- Topp II: Andra toppen i kromatogrammet med en retentionstid av ca 12,5 minuter.
- Topp III: Tredje toppen i kromatogrammet, motsvarande GMP med en retentionstid av 15,5 ± 1,0 minuter.
- Topp IV: Fjärde toppen i kromatogrammet med en retentionstid av ca 17,5 minuter.
- Kolonnens kvalitet kan påverka de enskilda topparnas retentionstid.
- Integratorn (6.10.6) beräknar automatiskt arean. A för varje topp:
- A_{II} : arean av topp II,
 A_{III} : arean av topp III,
 A_{IV} : arean av topp IV.
- Det är av största vikt att varje kromatograms utseende undersöks före kvantitativ bestämning för att upptäcka eventuella avvikelser som beror antingen på felfunktion hos apparaten eller kolonnerna eller på ursprunget eller beskaffenheten hos det analyserade provet.
- Upprepa analysen i händelse av tveksamhet.
- 8.5 *Kalibrering*
- 8.5.1 Tillämpa exakt det förfarande som beskrivs i punkt 8.2–8.4.2 på standardproven (5.4).
- Använd nyberedda lösningar, eftersom GMP bryts ner i åttaprocentig triklorättisksyralösning. Förlusten kan uppskattas till 0,2 % per timme vid 30 °C.
- 8.5.2 Före kromatografisk analys av proven, fukta kolonnerna genom att upprepade gånger spruta in standardprov (5.4.2) i lösning (8.5.1) tills arean och retentionstiden för toppen som motsvarar GMP är konstanta.
- 8.5.3 Bestäm kalibreringsfaktorn R genom att spruta in samma volym filtrat (8.5.1) som används i proven.

9. Resultatangivelse

- 9.1 *Beräkningsmetod och formler*
- 9.1.1 Beräkning av kalibreringsfaktorerna R:

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

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

där:

R_{II} och R_{IV} = kalibreringsfaktorerna för topp II respektive topp IV,
 $A_{II}[0]$ och $A_{IV}[0]$ = areorna av standardprovets [0] topp II respektive topp IV erhållna i 8.5.3.

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

där:

R_{III} = kalibreringsfaktor för topp III,
 $A_{III}[0]$ och $A_{III}[5]$ = areorna av topp III i standardprov [0] respektive [5] erhållna i 8.5.3,
W = mängden vassle i standardprov [5], dvs. 5.

9.1.2 Beräkning av den relativa arean av topparna i provet [E]

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

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

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

där:

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = de relativa areorna av topparna II, III respektive IV i provet [E],

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = areorna av topparna II, III respektive IV i provet [E] som erhållits i 8.4.2,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = kalibreringsfaktorerna som beräknats i 9.1.1.

9.1.3 Beräkning av den relativa retentionstiden för topp III i provet [E]

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

där:

$RRT_{III} [E]$ = den relativa retentionstiden för topp III i prov [E],

$RT_{III} [E]$ = retentionstiden för topp III i prov [E] som erhållits i 8.4.2,

$RT_{III} [5]$ = retentionstiden för topp III i kontrollprovet [5] som erhållits i 8.5.3.

9.1.4 Experiment har visat att det föreligger ett linjärt samband mellan den relativa retentionstiden för topp III, dvs. $RRT_{III} [E]$ och procentsatsen tillsatt vasslepulver upp till 10 %.

— $RRT_{III} [E]$ är $< 1,000$ när halten vassle är $> 5 \%$,

— $RRT_{III} [E]$ är $\geq 1,000$ när halten vassle är $\leq 5 \%$.

Den tillåtna osäkerheten för värdena RRT_{III} är $\pm 0,002$.

Normalt avviker värdet på $RRT_{III} [0]$ endast litet från 1,034. Beroende på kolonnernas skick kan värdet närma sig 1,000, men måste alltid vara större.

9.2 Beräkning av procentsatsen vasslepulver i provet

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

där:

W = procentsatsen m/m vassle i provet [E],

$S_{III} [E]$ = den relativa arean av topp III i provet [E] som erhållits i 9.1.2,

1,3 = representerar den relativa medelarean av topp III uttryckt i gram vassle per 100 gram bestämd i oförfalskat skummjörkspulver av olika ursprung. Siffran har erhållits empiriskt,

$S_{III} [0]$ = representerar den relativa arean av topp III som är lika med $R_{III} \times A_{III} [0]$. Dessa värden har erhållits i 9.1.1 respektive 8.5.3,

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = representerar den korrigering av den relativa medelarean 1,3 som skall göras när $S_{III} [0]$ ej är lika med 0,9. Empiriskt är den relativa medelarean av topp III för kontrollprovet [0] lika med 0,9.

9.3 Metodens noggrannhet

9.3.1 Repeterbarhet

Skilnaden mellan resultaten av två analyser som samtidigt eller med kort tidsintervall utförts av samma person med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 0,2 % m/m.

9.3.2 Reproducerbarhet

Skilnaden mellan två enstaka och av varandra oberoende resultat erhållna från två identiskt lika prover i två skilda laboratorier får inte överstiga 0,4 % m/m.

9.4 *Tolkning*

9.4.1 Vassle förekommer inte om den relativa arean av topp III, S_{III} [E] uttryckt i gram vassle per 100 g av produkten är $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$,

där

2,0 är det maximalt tillåtna värdet på den relativa arean av topp III med hänsyn tagen till den relativa arean av topp III, dvs. 1,3, osäkerheten på grund av variationer i skummjölkspulvrets sammansättning och i metodens reproducerbarhet (9.3.2),

$(S_{III} [0] - 0,9)$ är den korrigering som skall göras då arean $S_{III} [0]$ avviker från 0,9 (se punkt 9.2)

9.4.2 Om den relativa arean av topp III, S_{III} [E] är $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ och den relativa arean av topp II, S_{II} [E] ≤ 160 , bestäm vasslehalten i enlighet med punkt 9.2.

9.4.3 Om den relativa arean av topp III, S_{III} [E], är $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ och den relativa arean av topp II, S_{II} [E] > 160 , berstäms det sammanlagda proteininnehållet (P %); undersök sedan figur 1 och 2.

9.4.3.1 Data som erhållits efter analys av prover av oförfalskat skummjölkspulver med högt sammanlagt proteininnehåll har sammanförts i figur 1 och 2.

Den heldragna linjen representerar den linjära regressionen, för vilken koefficienterna beräknas enligt minsta kvadratmetoden.

Den streckade räta linjen bestämmer den övre gränsen för den relativa arean av topp III med en sannolikhet att inte överskridas i 90 % av fallen.

Ekvationerna för de streckade räta linjerna i figur 1 och 2 är:

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

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

där:

S_{III} är den relativa arean av topp III beräknad antingen enligt det totala proteininnehållet eller enligt den relativa arean av topp S_{III} [E],

P % är det totala proteininnehållet uttryckt som viktprocent,

$(S_{III} [E])$ är den relativa arean av provet beräknad i punkt 9.1.2.

Dessa ekvationer är ekvivalenta med siffran 1,3 som nämns i punkt 9.2.

Avvikelsen (T_1 och T_2) mellan den funna relativa arean S_{III} [E] och den relativa arean S_{III} erhålls enligt nedan:

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

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

9.4.3.2 Om T_1 och/eller T_2 är noll eller mindre är noll, kan förekomst av vassle inte fastställas.

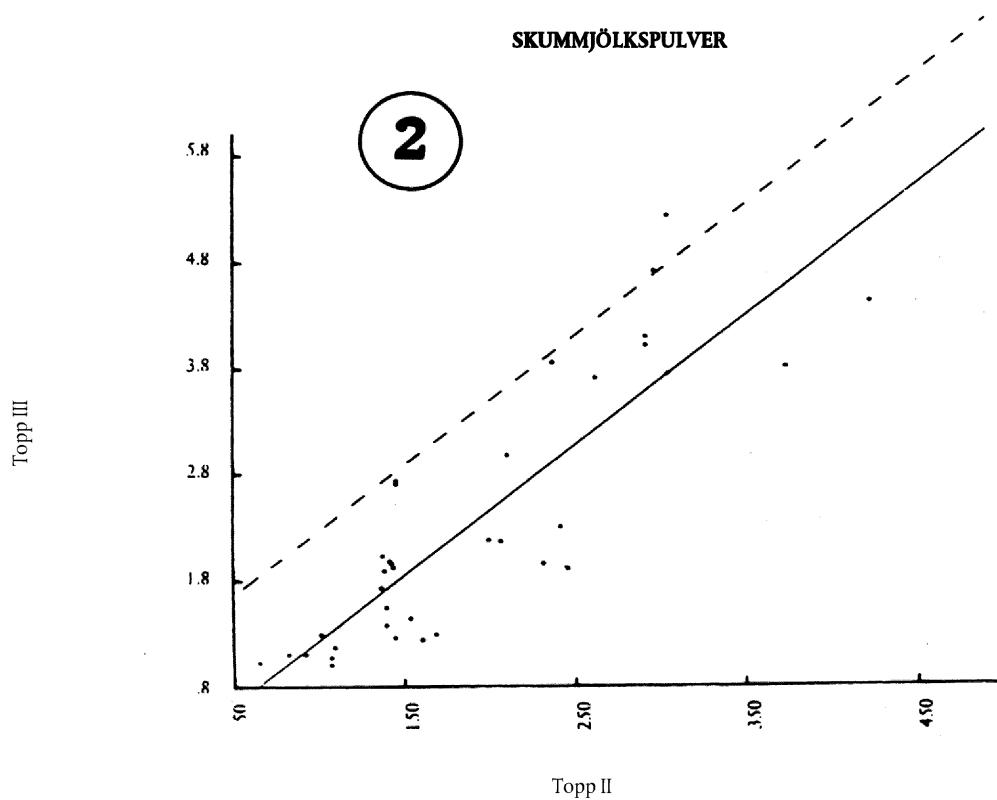
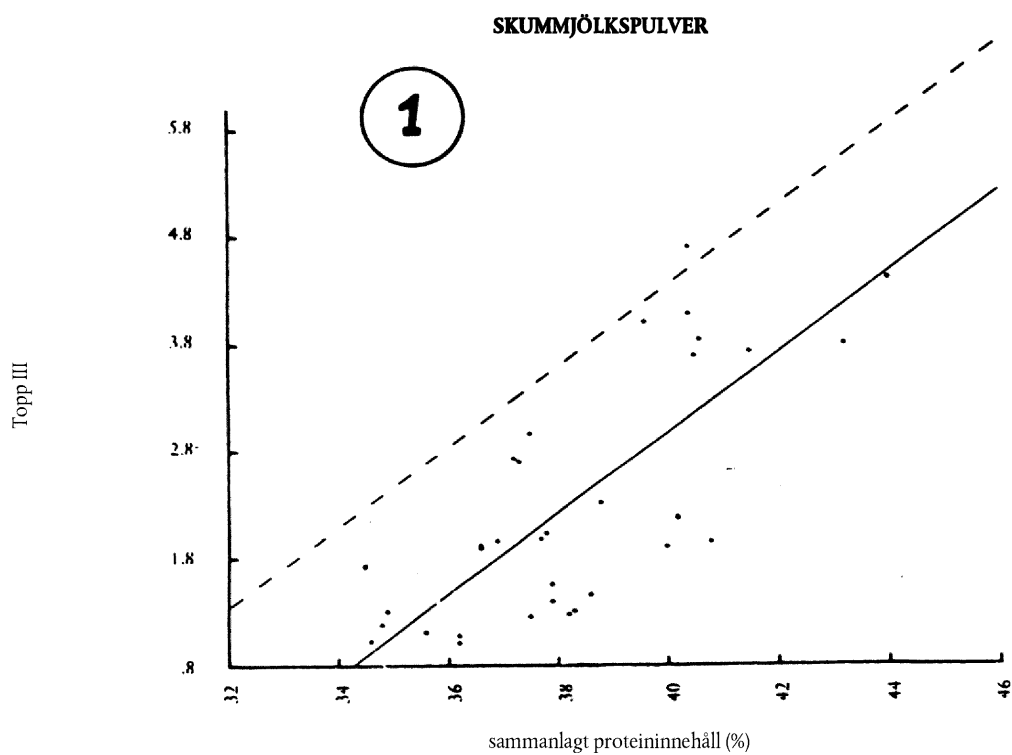
Om T_1 och T_2 överstiger noll förekommer vassle.

Halten vassle beräknas enligt följande formel:

$$W = T_2 + 0,91$$

där

0,91 är avståndet på den vertikala axeln mellan heldragen rät linje och streckad rät linje.



BILAGA XIX

(Artikel 13)

BESTÄMNING AV LÖPEVASSLEPULVER I SKUMMJÖLKSPULVER OCH BLANDNINGAR ENLIGT FÖRORDNING (EG) nr 2799/1999**1. Syfte: Påvisande av tillsatt löpevasslepulver i följande produkter:**

- a) skummjörkspulver enligt artikel 2 i förordning (EG) nr 2799/1999, och
- b) blandningar enligt artikel 4 i förordning (EG) nr 2799/1999.

2. Hänvisning: Internationell standard ISO 707**3. Definition**

Halten löpevasslepulver fastställs med den nedan beskrivna metoden och uttrycks i viktprocent.

4. Princip

Fastställande av kvantiteten glykomakropeptid A enligt bilaga XVIII. Prov som ger positiva resultat analyseras för glykomakropeptid A genom högtrycksvätskekromatografi med omvänd fas (HPLC-metod). Bedömning av det erhållna resultatet görs med hänvisning till standardprover, som består av skummjörkspulver med eller utan tillsats av vasslepulver. Resultat över 1 % (m/m) visar på förekomst av löpevasslepulver.

5. Reagenser

Alla reagenser måste ha erkänd analytisk renhet. Det använda vattnet skall vara destillerat vatten eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad. Acetonitril skall vara av spektroskopisk kvalitet eller HPLC-kvalitet.

De reagenser som är nödvändiga för metoden beskrivs i bilaga XVIII till den här förordningen.

Reagenser till HPLC med omvänd fas.

5.1 Triklorättiksyralösning

Lös 240 g triklorättiksyra (CCl_3CCOOH) i vatten och späd till 1 000 ml.

5.2 Elueringslösning A och B

Elueringslösning A: Blanda 150 ml acetonitril (CH_3CN), 20 ml isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) och 1,00 ml trifluorättiksyra (TFA, CF_3COOH) med vatten till 1 000 ml. Elueringslösning B: Blanda 550 ml acetonitril, 20 ml isopropanol och 1,00 ml TFA med vatten till 1 000 ml. Före användning skall elueringslösningen filtreras genom filtermembran med pordiameter 0,45 μm .

5.3 Regenerering av kolonnen

Skölj kolonnen med elueringslösning B (med användning av en gradient) efter analyserna och därefter med acetonitril (med användning av en gradient i 30 min). Förvara kolonnen i acetonitril.

5.4 Standardprover

- 5.4.1 Skummjörkspulver som uppfyller kraven på offentlig lagring (dvs. [0]).
- 5.4.2 Samma skummjörkspulver uppblandat med 5 % (m/m) vasslepulver (löpetyp) med en standardsammansättning (dvs. [5]).
- 5.4.3 Samma skummjörkspulver uppblandat med 50 % (m/m) vasslepulver (löpetyp) med en standardsammansättning (dvs. [50])⁽¹⁾.

6. Utrustning

Den utrustning som behövs för metoden beskrivs i bilaga XVIII i den här förordningen.

6.1.1 Analysvåg.

- 6.2 Centrifug med kapacitet för en centrifugalkraft på 2 200 g, utrustad med proppförsedda centrifugrör som rymmer ca 50 ml.

⁽¹⁾ Vasslepulver (löpetyp) med standardsammansättning samt uppblandat skummjörkspulver kan fås från NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL 671C BA., Nederländerna. Pulver som ger resultat motsvarande NIZO-pulver får också användas.

- 6.3 Mekanisk skakapparat med kapacitet att skaka vid 50 °C.
- 6.4 Magnetomrörare.
- 6.5 Glastrattar, diameter cirka 7 cm.
- 6.6 Filterpapper, medelfint, diameter cirka 12,5 cm.
- 6.7 Glasfilterutrustning, filtermembran med pordiameter 0,45 µm (mikrometer).
- 6.8 Graderade pipetter som medger tillförsel av 10 ml (ISO 648, klass A, eller ISO/R 835), eller ett system som kan tillföra 10,0 ml på två min.
- 6.9 Termostatstyrt vattenbad, inställt på 25 ± 0,5 °C.
- 6.10 Utrustning för högtrycksvätskekromatografi (HPLC) bestående av:
 - 6.10.1 Binärt gradientpumpsystem.
 - 6.10.2 Injektor, manuell eller automatisk, med kapaciteten 100 µl (mikroliter).
 - 6.10.3 En Dupont Protein Plus-kolonn (25 x 0,46 cm invändig diameter) eller en motsvarande grovporig kiselbaserad kolonn med omvänd fas.
 - 6.10.4 Termostatstyrd kolonnugn, inställd på 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5 UV-detektor, variabel våglängd, som medger mätningar vid 210 nm med känsligheten 0,02 Å (vid behov kan en högre våglängd upp till 220 nm användas).
 - 6.10.6 Integrator som medger integrering av enskilda toppar.

Anmärkning

Man kan använda kolonner vid rumstemperatur, förutsatt att rumstemperaturen inte varierar mer än 1 °C. I annat fall uppstår för stor variation i retentionstiden för GMP_A.

7. Provtagning

- 7.1 Provtagningen skall göras enligt internationell standard ISO 707. Medlemsstaterna får dock använda andra provtagningsmetoder om dessa är likvärdiga med nämnd standard.
- 7.2 Proven skall förvaras under förhållanden som förhindrar nedbrytning eller förändring i sammansättningen.

8. Förfarande

8.1 Beredning av proverna

Överför mjölkpulvret till ett kärl som rymmer ungefär dubbelt så stor volym som pulvrets och som är försett med lufttätt lock. Förslut behållaren omedelbart. Blanda mjölkpulvret väl genom att upprepa gånger vända behållaren.

8.2 Provmängd

Tillsätt 2,000 ± 0,001 g av provet i ett centrifugrör (6.2) eller i en lämpligt försluten kolv (50 ml).

8.3 Borttagande av fett och proteiner

- 8.3.1 Tillsätt 20,0 g varmt vatten (50 °C) till det uppvägda provet. Lös pulvret genom att skaka det i mekanisk skakapparat i 5 minuter eller i 30 minuter om det gäller sur kärnmjolk. Ställ röret i vattenbad (6.9) och temperera vid 25 °C.
- 8.3.2 Tillsätt under 2 minuter 10,0 ml av den till 25 °C tempererade triklorättiksyralösningen (5.1) under kraftig omröring med magnetomröraren (6.4). Placera röret i vattenbad (6.9) och lämna det i 60 min.
- 8.3.3 Centrifugera (6.2) i 10 minuter vid 2 200 g eller filtrera genom pappersfilter (6.6) och kasta de första 5 ml av filtratet.

8.4 Kromatografisk analys

- 8.4.1 Utför HPLC-analysen som beskrivs i bilaga XVIII. Vid negativt resultat innehåller provet inget löpevasslepulver i påvisbara mängder. Vid positivt resultat skall den HPLC-metod med omvänd fas som beskrivs nedan tillämpas. Förekomsten av pulver från sur kärnmjolk kan ge felaktigt positiva resultat. Genom att använda HPLC-metoden med omvänd fas utesluts denna risk.

- 8.4.2 Innan HPLC-analysen med omvänd fas utförs bör gradientförhållandena optimeras. En retentionstid på 26 ± 2 minuter för GMPÅ är optimal för gradientsystem med en dödvolyms på ca 6 ml (volyms från den punkt där lösningarna blandas till och med den punkt där insprutningsslingan slutar). I gradientsystem med lägre dödvolyms (t.ex. 2 ml) bör en optimal retentionstid på 22 minuter användas.

Bered lösningar av standardproven (5.4) med och utan 50 % löpevassle.

Injicera 100 µl av supernatanten eller filtratet (8.3.3) i en HPLC-apparat som arbetat under de kontrollgradientvillkor som anges i tabell 1.

Tabell 1
Kontrollgradientvillkor för optimal kromatografi

Tid (minuter)	Flöde (ml/minut)	% A	% B	Gradient
Init	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

En jämförelse mellan båda kromatogrammen bör visa GMPA-toppens läge.

Vid användning av nedanstående formel kan den ursprungliga sammansättningen av den lösning som kommer att användas för den normala gradienten (se 8.4.3) beräknas:

$$\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{GMPA} - 26)/6) * 30/27$$

$$\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{GMPA} - 26)/6) * 1,11$$

där:

- RT_{GMPA} är retentionstiden för GMPÅ vid användning av kontrollgradienten,
 10 är den ursprungliga % B av kontrollgradienten,
 2,5 är % B vid medelpunkten minus % B vid början vid användning av normalgradienten,
 13,5 är medelpunktstiden för kontrollgradienten,
 26 är den nödvändiga retentionstiden för GMPÅ,
 6 är förhållandet mellan kontroll- och normalgradientens lutning,
 30 är % B vid början minus % B efter 27 minuter vid användning av kontrollgradienten,
 27 är kontrollgradientens löptid.

- 8.4.3 Bered lösningar av testproven.

Injicera 100 µl noggrant uppmätt supernatant eller filtrat (8.3.3) i HPLC-apparaten med en flödes hastighet av 1,0 ml elueringslösning (5.2) per minut.

Elueringslösningens sammansättning i början av analysen fås fram från 8.4.2. Normalt är den nära A:B = 76:24 (5.2). Omedelbart efter insprutningen påbörjas en linjär gradient så att B höjs med 5 % efter 27 minuter. Därefter påbörjas en linjär gradient som höjer eluentsammansättningen andel B till 90 % inom 5 minuter. Sammansättningen bibehålls i 5 minuter varefter den inom 5 minuter ändras tillbaka till den ursprungliga sammansättningen via en linjär gradient. Beroende på pumpsystemets inre volym kan nästa insprutning ske 15 minuter efter det att de ursprungliga förhållandena har uppnåtts.

Anmärkingar

- Retentionstiden för glykomakropeptid bör vara 26 ± 2 minuter. Detta kan uppnås genom att variera initial- och slutförhållandena för den första gradienten. Skillnaden i % B för initial- och slutförhållandena för den första gradienten måste dock fortfarande vara 5 % B.
- Elueringslösningarna bör avgasas tillräckligt och bör också förbli avgasade. Detta är viktigt för att gradientpumpsystemet skall kunna arbeta på ett korrekt sätt. Standardavvikelsen för retentionstiden för GMP-toppen bör vara mindre än 0,1 minuter (n = 10).
- Efter vart femte prov bör referensprovet (5) injiceras och användas för att beräkna en ny kalibreringsfaktor R (9.1.1).

- 8.4.4 Resultaten av den kromatografiska analysen av provet (E) erhålls i form av kromatogram där GMP-toppen identifieras genom sin retentionstid på 26 minuter.

Integratorn (6.10.6) beräknar automatiskt GMP-toppens höjd H. Baslinjens läge bör kontrolleras i varje kromatogram. Analysen eller integrationen bör upprepas om baslinjens läge inte var korrekt.

Det är av största vikt att varje kromatograms utseende undersöks före kvantitativ bestämning för att upptäcka eventuella avvikelser som beror antingen på felfunktion hos apparaten eller kolonnerna, eller på ursprunget och beskaffenheten hos det analyserade provet. Upprepa analysen i händelse av tveksamhet.

8.5 Kalibrering

- 8.5.1 Tillämpa exakt det förfarande som beskrivs i punkt 8.2–8.4.4 på standardproven (5.4.1–5.4.2). Använd nyberedda lösningar, eftersom GMP bryts ner i 8 procentig triklorättiksyralösning vid rumstemperatur. Vid 4 °C förblir lösningen stabil i 24 timmar. Vid långa serier av analyser är det önskvärt att en nedkyld provbricka används i autoinjektorn.

Anmärkning

8.4.2 kan utelämnas om % B vid initialförhållandena är känd från tidigare analyser.

Kromatogrammet till referensprovet (5) bör motsvara tabell 1. I denna figur föregås GMP_a-toppen av två mindre toppar. Det är viktigt att uppnå en liknande separation.

- 8.5.2 Injicera 100 µl av standardprovet utan löpevassle (0) (5.4.1) före den kromatografiska analysen av proven.

Kromatogrammet bör inte uppvisa någon topp vid GMP_a-toppens retentionstid.

- 8.5.3 Fastställ kalibreringsfaktorerna R genom att injicera filtrat (8.5.1) i samma mängd som för proven.

9. Resultatangivelse

9.1 Beräkningsmetod och formler

- 9.1.1 Beräkning av kalibreringsfaktorn R:

$$\text{GMP-topp} = W/H$$

där

R = GMP-toppens kalibreringsfaktor,

H = GMP-toppens höjd,

W = vasslemängden i standardprovet (5).

- 9.2 Beräkning av procentsatsen löpevasslepulver i provet

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

där

W(E) = procentsatsen m/m löpevassle i provet (E),

R = GMP-toppens kalibreringsfaktor (9.1.1),

H(E) = höjden på provets (E) GMP-topp.

Om W(E) är större än 1 % och skillnaden mellan retentionstiden och standardprovets (5) retentionstid är mindre än 0,2 minuter, innehåller provet löpevasslepulver.

9.3 Metodens noggrannhet

- 9.3.1 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som samtidigt eller med kort tidsintervall utförts av samma person med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 0,2 % m/m.

9.3.2 Reproducerbarhet

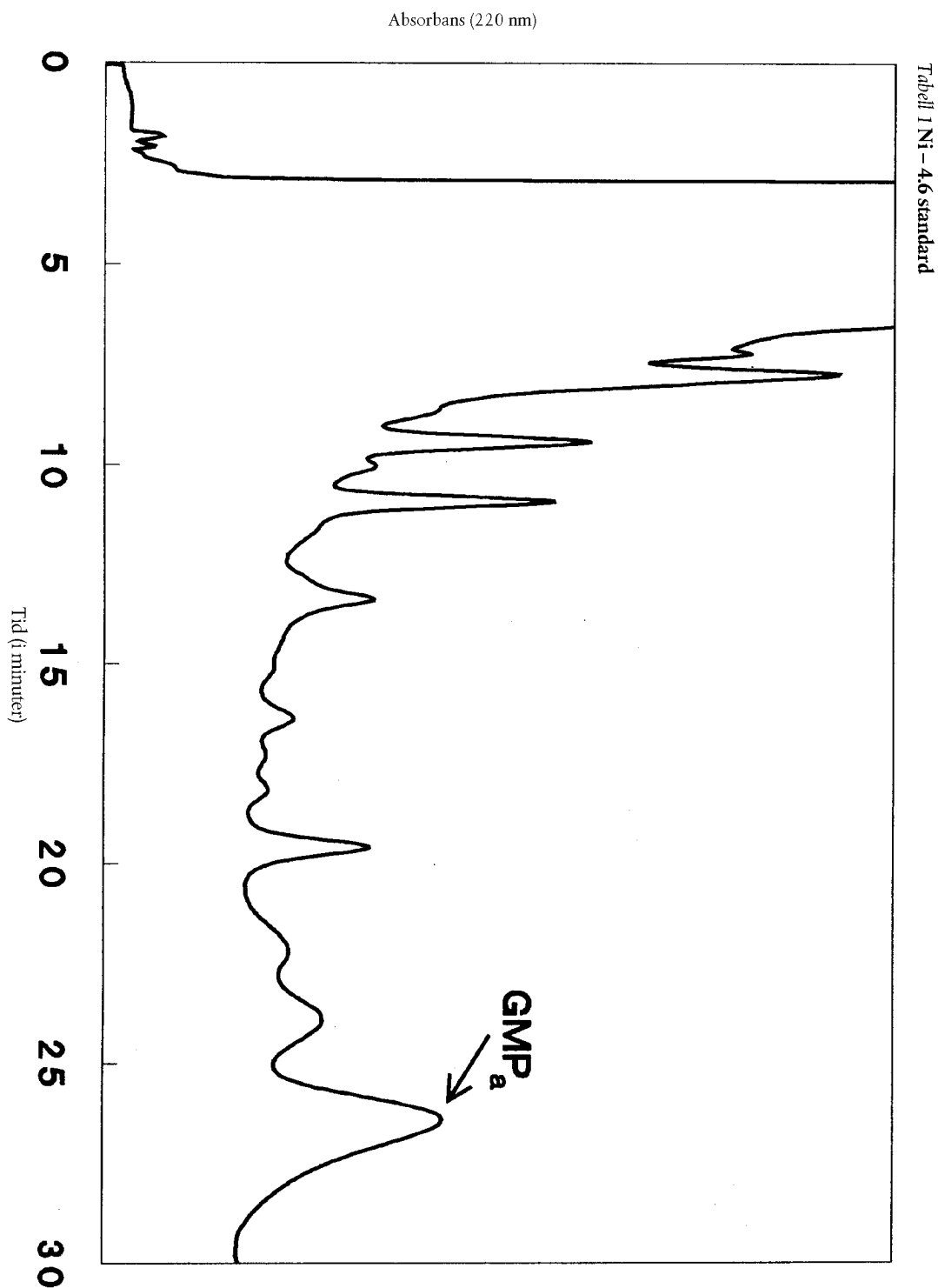
Ännu inte fastlagd.

9.3.3 Linjäritet

För mellan 0 % och 16 % löpavshalt bör ett linjärt förhållande uppnås med en korrelationskoefficient som är $> 0,99$.

9.4 *Tolkning*

9.4.1 Vassle anses förekomma om resultatet enligt 9.2 är större än 1 % m/m och retentionstiden för GMP-toppen avviker mindre än 0,2 minuter från standardprovets (5) retentionstid. Gränsen på 1 % är fastlagd i enlighet med bestämmelserna i bilaga V till förordning (EEG) nr 625/78, punkterna 9.2 och 9.4.1.



BILAGA XX

(Artikel 14)

SKUMMJÖLKSPULVER: BESTÄMMING AV INNEHÅLLET FOSFATIDYLSERIN OCH FOSFATIDYLETANOLAMIN**HPLC-metoden (omvänd fas)****1. Omfattning och tillämpningsområde**

Metoden omfattar bestämning av fosfatidylserin (FS) och fosfatidyletanolamin (FE) i skum mjölkpulver och gör det möjligt att påvisa kärnmjölk.

2. Definition

FS- + FE-innehåll: substansens massfraktion bestäms genom det förfarande som specificeras här. Resultatet uttrycks i milligram fosfatidyletanolamin dipalmitoyl (FEDP) per 100 g pulver.

3. Princip

Extrakt av aminofosfolipider genom metanol från rekonstituerat mjölkpulver. Bestämning av FS och FE som o-ftaldialdehydderivat genom vätskekromatografi (RP HPLC-metod) och flourensenssprövning. Kvantifiering av FS- och FE-innehåll i testet med referens till ett standardprov som innehåller en känd halt av FEDP.

4. Reagenser

Alla reagenser måste ha erkänd analytisk renhet. Vattnet måste vara destillerat eller av en motsvarande renhetsgrad om inte annat anges.

4.1 *Standardmaterial: FEDP, med en renhetsgrad på minst 99 %*

Märk: Standardmaterial skall lagras vid -18 °C.

4.2 *Reagenser för standardprov och förberedelser för testextrakt*

4.2.1 Metanol som skall vara av HPLC-grad

4.2.2 Kloroform som skall vara av HPLC-grad

4.2.3 Tryptamin monohydroklorid

4.3 *Reagenser för derivatisering av o-ftaldialdehyd*

4.3.1 Natriumhydroxid, 12 M vattenlösning

4.3.2 Borsyra, 0,4 M vattenlösning, justerad till pH 10,0 med natriumhydroxid (4.3.1)

4.3.3 2-merkaptoetanol

4.3.4 o-ftaldialdehyd

4.4 *Elueringslösningar för HPLC*

Elueringslösningarna måste förberedas genom reagenserna av HPLC-grad.

4.4.1 Vatten av HPLC-grad

4.4.2 Metanol av en renhet som mäts med flourensensmätare

4.4.3 Tetrahydrofuran

4.4.4 Natriumvätefosfat

4.4.5 Natriumacetat

4.4.6 Ättiksyra

5. Provningsutrustning

5.1 Analysvåg

5.2 Glasbägare på 25 och 100 ml

5.3 Pipetter för 1 och 10 ml

5.4 Magnetomrörare

- 5.5 Graderade pipetter för 0,2, 0,5 och 5 ml
- 5.6 Mätkolvar på 10, 50 och 100 ml
- 5.7 Injiceringsnålar på 20 och 100 µl
- 5.8 Ultraljudbad
- 5.9 Centrifug med en centrifugalkraft på $27\,000 \times g$
- 5.10 Provrör på ca 5 ml
- 5.11 Graderad cylinder på 25 ml
- 5.12 pH-mätare
- 5.13 HPLC-utrustning
 - 5.13.1 Gradient pumpsystem med en kapacitet på 1,0 ml/min vid 200 bar
 - 5.13.2 Automatisk fraktionsprövning med derivatiseringsmöjlighet
 - 5.13.3 Kolonnset med värmare för 30 °C
 - 5.13.4 Fluorescendetektor på 330 nm magnetvåglängd och 440 nm strålningsvåglängd
 - 5.13.5 Integrator eller mjukvara för databehandling som kan mäta topparnas areor
 - 5.13.6 En LiChrospher 100-kolonn (250 × 4,6 mm) eller en motsvarande kolonn med oktadecylsilan (C18), 5 µm partikelstorlek

6. Provtagning

Provtagningen skall ske enligt IDF-standard 50B:1985.

7. Förfarande

7.1 Blandning av intern standardlösning

Väg in $30,0 \pm 0,1$ mg tryptamin monohydroklorid (4.2.3) i en mätkolv på 100 ml (5.6) och späd med metanol upp till märket (4.2.1). Tag 1 ml av denna lösning i en 1 ml-pipett (5.3) och för över till en graderad mätkolv på 10 ml (5.6) och späd med metanol upp till märket (4.2.1) för att få en 0,15 mM tryptaminlösning.

7.2 Beredning av provlösningen

Väg in $1000 \pm 0,001$ g av SMP-provet i en glasbägare på 25 ml (5.2). Tillsätt med pipett 10 ml destillerat vatten med en temperatur av 40 °C (5.3) och rör om med magnetomröraren (5.4) under 30 min för att lösa upp alla klumpar. Tag 0,2 ml (5.5) av den rekonstituerade mjölken i en pipett och sätt den i en mätkolv graderad till 10 ml (5.6), tillsätt 100 µl av tryptaminlösningen på 0,15 mM (7.1) med en injiceringsnål (5.7) och späd med metanol upp till märket (4.2.1). Blanda försiktigt genom inversion och låt ligga i ultraljudsbad under 15 min. Centrifugera (5.9) vid $27\,000 \times g$ under 10 min och samla in supernatanten i ett provrör (5.10).

Märk: Provlösningen skall lagras vid 4 °C tills HPLC-analysen skall utföras.

7.3 Beredning av extern standardlösning

Väg upp 55,4 mg FEDP (4.1) och håll det i en mätkolv på 50 ml (5.6) och tillsätt ca 25 ml kloroform (4.2.2) med en graderad cylinder (5.11). Värm upp den väl täckta kolven till 50 °C och blanda försiktigt tills FEDP löser sig. Kyl ned kolven till 20 °C och späd sedan med metanol upp till märket (4.2.1) och blanda genom inversion. Tag 1 ml (5.3) av lösningen med en pipett och håll den i en mätkolv på 100 ml (5.6) samt tillsätt metanol upp till märket (4.2.1). Tag 1 ml (5.3) av lösningen med en pipett och håll i en mätkolv på 10 ml (5.6), tillsätt 100 µl (5.7) av tryptaminlösningen på 0,15 mM (7.1) och späd med metanol upp till märket (4.2.1). Blanda genom inversion.

Märk: Provlösningen skall lagras vid 4 °C tills HPLC-analysen skall utföras.

7.4 Beredning av reagensen för derivatisering

Väg upp $25,0 \pm 0,1$ mg o-ftaldialdehyd (4.3.4) i en 10 ml mätkolv (5.6), tillsätt 0,5 ml (5.5) metanol (4.2.1) och blanda noga för att lösa upp o-ftaldialdehyden. Håll i borsyrelösning upp till graderingen (4.3.2) och tillsätt 20 µl av 2-merkaptotanol (4.3.3) med en injiceringsnål (5.7).

Märk: Reagensen skall lagras vid 4 °C i en mörk flaska och stabiliseras under en vecka.

7.5 HPLC-bestämning

7.5.1 Elueringslösningar (4.4)

A-lösning:

0,3 mM natriumvätefosfat och 3 mM natriumacetatlösning (anpassad till pH 6,5 med ättiksyra): metanol:tetrahydrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

B-lösning:

metanol

7.5.2 Föreslagen elueringsgradient:

Tid (min)	A-lösning (%)	B-lösning (%)	Flöde (ml/min)
Initial	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

Märk: Elueringsgradienten kan behöva justeras något för att nå den upplösning som visas i figur 1.

Kolonntemperatur: 30 °C

7.5.3 Injektionsvolym: 50 µl reagens för derivatiseringen och 50 µl av provlösningen.

7.5.4 Kolonnbalansering

För att starta systemet för dagligt bruk, spola kolonnen med 100 % metanol (B-lösning) i 15 min, ställ sedan in A : B = 40 : 60 och balansera vid 1 ml/min under 15 min. Genomför en provomgång genom att injicera metanol (4.2.1).

Märk: Spola kolonnen med en lösning av metanol : kloroform = 80 : 20 (v/v) under 30 min innan den läggs undan för längre tid.

7.5.5 Bestämning av FS + FE-innehåll i provet

7.5.6 Genomför sekvensen av de kromatografiska analyserna med konstant provtid för att få retentionstiderna konstanta. Injicera den externa standardlösningen (7.3) vart femte till tionde prov för att utvärdera svarsfaktorn.

Märk: Kolonnen skall rengöras genom att spola med 100-procentig B-lösning under 30 min vid var 20:e eller 25:e provomgång.

7.6 Integration

7.6.1 FEDP-topp

FEDP eluderas som en enkel topp. Bestäm toppens höjd genom dalintegrering.

7.6.2 Tryptamin-topp

Tryptamin eluderas som en enskild topp (figur 1). Bestäm toppens höjd genom dalintegrering.

7.6.3 Grupperade FS- och FE-toppar

Under de villkor som beskrivs (figur 1), eluderar FS som 2 högre toppar som delvis är olösta och som föregås av en lägre topp. FE eluderar som 3 högre toppar som delvis är olösta. Bestäm hela fasen av varje toppkluster genom att sätta den baslinje som finns i figur 1.

8. Kalkyl och resultat

FS- och FE-innehåll i provet skall kalkyleras enligt följande formel:

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

där:

C = FS- eller FE-innehåll (mg/100 g pulver) i provet

A₁ = FEDP-topparea i standardlösningen (7.3)

A₂ = FS- eller FE-topparea i provlösningen (7.2)

T₁ = Tryptamintopparea i standardlösningen (7.3)

T₂ = Tryptamintopparea i provlösningen (7.2).

9. Precision

Märk: Värderna för repeterbarhet har kalkylerats enligt IDF:s internationella standard ⁽¹⁾. Det provisoriska reproducerbarhetsgränsvärdet har kalkylerats i enlighet med bilaga III b.

9.1 Repeterbarhet

Den relativa repeterbarhetens standardavvikelse som uttrycker variabiliteten i av varandra oberoende analytiska resultat som erhållits av samma provtagare genom att använda samma utrustning, under samma villkor, men för samma prov med kort intervall, bör inte överskrida motsvarande 2 %. Om två bestämningar erhålls under dessa villkor, bör motsvarande differens mellan resultaten inte vara större än 6 % av resultatets aritmetiska mått.

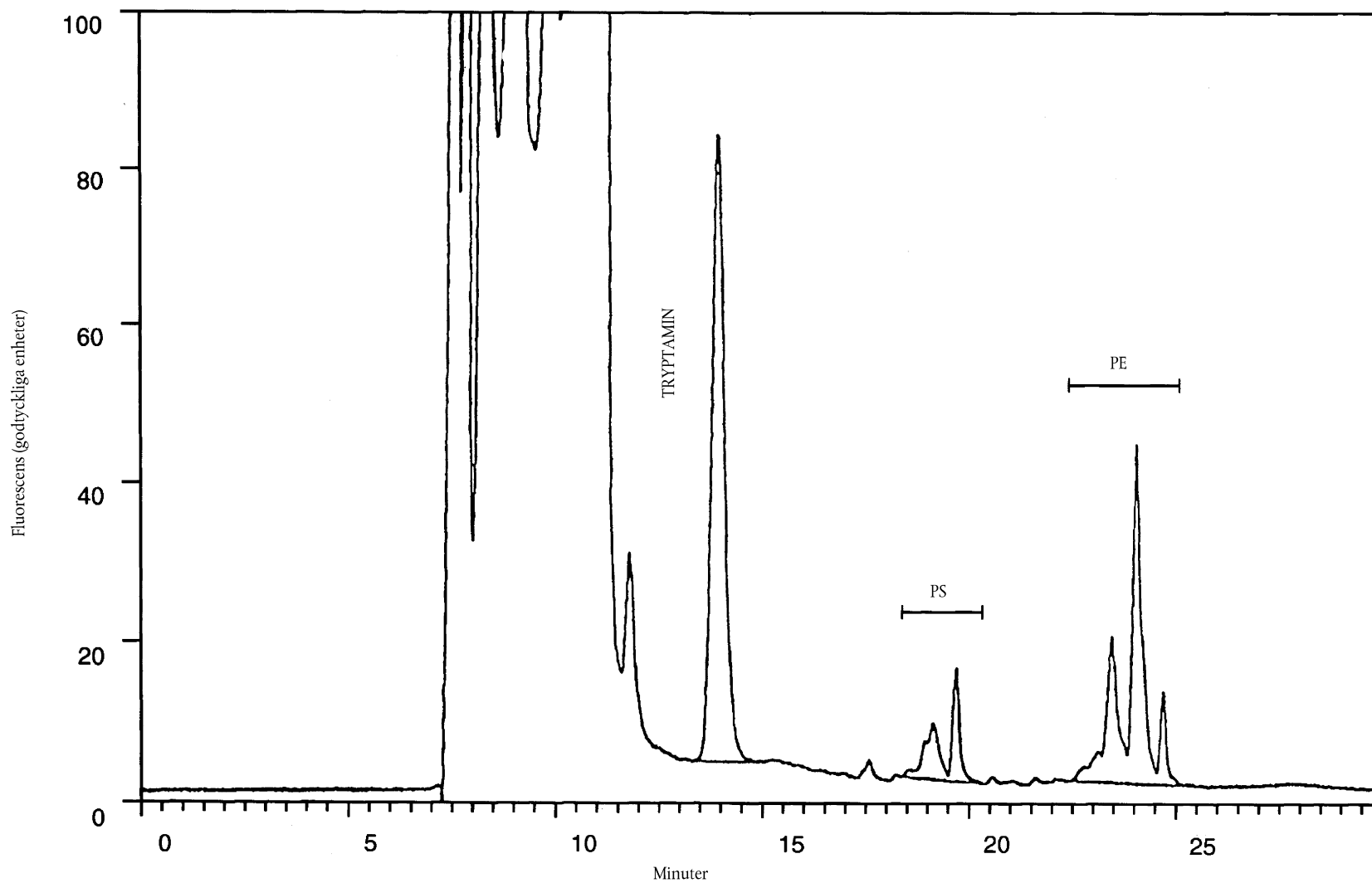
9.2 Reproducerbarhet

Om två bestämningar erhålls i olika laboratorier genom att använda olika utrustning under olika villkor men för samma prov, bör den motsvarande differensen mellan resultaten inte vara större än 11 % av resultatets aritmetiska mått.

10. Bibliografi

- 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" (Spårning av kärnmjolkssubstanser i skummjölkspulver genom HPLC-bestämning av aminofosfolipider), Sci. Tecn. Latt. Cas., 39, 395 (1988).

⁽¹⁾ IDF Standard 135/1991 135B/1991. "Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure" (metodmodell för kollaborativa studier).



Figur 1: HPLC-mönster av OPA-derivat av fosfatidylserine (PS) och fosfatidyletanolamin (PE) i metanolextrakt av rekonstituerat skummjölkspulver. Integrationstyp för PS-, PE- och tryptamintoppar (intern standard) rapporteras.

BILAGA XXI

(Artikel 15)

SPÅRNING AV ANTIBIOTIKA OCH SULFAMID/DAPSON-RESTER I SKUMMJÖLKSPULVER

Screeningtesta för att spåra hämmare av mikrobiell aktivitet genom att använda testmikroorganismen *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953. Testet skall ha tillräcklig känslighet för att spåra 4 µg benzylpenicillin och 100 µg sulfamidin per liter mjölk. Kommersiella testutrustningar finns och kan användas om de har den känslighet som krävs för benzylpenicillin och sulfamidin ⁽¹⁾.

För testet används rekonstituerat skummjörkspulver (1 g pulver + 9 ml dest. vatten). Testet utförs enligt beskrivning i IDF-Bulletin nr 258/1991, avsnitt 1, kapitel 2, eller i enlighet med instruktionerna från testutrustningens tillverkare.

Positiva resultat skall tolkas enligt följande:

1. Gör om testet och tillsätt penicillinase:

Positivt resultat: Hämmande substanser kan inte identifieras genom denna procedur.

Negativt resultat: Hämmande substans är ett β-laktam antibiotikum.

2. Gör om testet och tillsätt p-aminobenzosyra:

Positivt resultat: Hämmande substanser kan inte identifieras genom denna procedur.

Negativt resultat: Den hämmande substansen är ett sulfamid/dapson.

3. Gör om testet och tillsätt penicillinase + p-aminobenzosyra:

Positivt resultat: Hämmande substanser kan inte identifieras genom denna procedur.

Negativt resultat: De hämmande substanserna är ett β-laktam antibiotikum och ett sulfamid/dapson.

⁽¹⁾ Viktigt meddelande: Falskt positivt resultat kan erhållas vid analys av skummjörkspulver. Det är därför viktigt att bekräfta att det testsystem som används inte visar sådana resultat.

BILAGA XXII

(Artikel 16)

ANALYS AV KVANTITETEN SKUMMJÖLKSPULVER I FODERBLANDNINGAR GENOM ENZYMATISK KOAGULERING AV PARAKASEIN**1. Syfte**

Kvantitativ fastställelse av innehållet skummjörkspulver i foderblandningar genom enzymatisk koagulering av parakasein.

2. Tillämpningsområde

Denna metod tillämpas vid undersökning av foderblandningar som innehåller minst 10 % skummjörkspulver. Förekomsten av stora kvantiteter kärnmjörk eller av vissa andra proteiner än mjörkproteiner kan leda till interferenser.

3. Metodens princip

- 3.1 Upplösning av kaseinet i foderblandningen genom extraktion med en natriumcitratlösning.
- 3.2 Justering av kalciumets jonkoncentration till den nivå som krävs för att utfälla parakasein. Genom tillsättning av löpe till kaseinet erhålls parakasein.
- 3.3 Kväveinnehållet i parakaseinfällningen fastställs genom Kjeldahl-metoden enligt beskrivningen i standard IDF 20A 1986. Kvantiteten skummjörkspulver beräknas på grundval av ett lägsta kaseininnehåll på 27,5 % (se 9.1).

4. Reagenser

De använda reagenserna skall vara av p.a. kvalitet. Använd antingen destillerat vatten eller vatten av motsvarande kvalitet. Med undantag för löpet (4.5) skall samtliga reagenser och lösningar vara fria från kvävesubstanser.

- 4.1 Trinatriumcitrat, vattenfri (1 % w/v lösning)
- 4.2 Kalciumklorid (2 M lösning). Mät upp 20,018 g CaCO₃ (p.a. kvalitet) i en degel av lämplig storlek (150 till 200 ml) eller i en glasbägare. Tillsätt destillerat vatten tills pulvret är täckt och uppvärm över ett kokande vattenbad. Tillsätt långsamt 50 till 60 ml HCl-lösning (koncentration HCl: vatten = 1:1) så att karbonatet löses helt. Håll kvar lösningen över det kokande vattenbadet tills CaCl₂ har torkat så att mängden HCl som inte har reagerat elimineras. Flytta över lösningen till en 100 ml måttflaska och späd med destillerat vatten upp till markeringen. Kontrollera pH-värdet som inte får understiga 4,0. Förvara lösningen i ett kylskåp.
- 4.3 0,1 N natriumhydroxid.
- 4.4 0,1 N saltsyra.
- 4.5 Flytande kalvlöpe (standardstyrka 1:10 000). Lagra i kylskåp vid 4 till 6 °C
- 4.6 Reagenser för fastställelsen av kvantiteten kväve enligt Kjeldahl-metoden beskriven i standard IDF 20 A 1986.

5. Material

Vanligt laboratoriematerial och särskilt följande:

- 5.1 Mortel eller homogeniseringsblandare
- 5.2 Analytisk våg
- 5.3 Bänkcentrifug (2 000 till 3 000 varv per minut) med 50 ml rör
- 5.4 Magnetisk blandare med (10 till 15 mm) blandare
- 5.5 150 till 200 ml glasbägare
- 5.6 Erlenmeyerglaskolvar på 250 ml och 500 ml
- 5.7 Glastrattar med diameter mellan 60 och 80 mm
- 5.8 Askfria snabbfilter med en diameter av 150 mm (S.S. 589², S.S. 595 1/2)
- 5.9 Pipetter av olika storlek

- 5.10 Termostatkontrollerat vattenbad vid 37 °C
- 5.11 pH-mätare
- 5.12 Kjeldahl kok- och destillationsapparat med tillbehör
- 5.13 Byrett med 25 ml graderingar
- 5.14 Tvättflaska i plast för destillerat vatten
- 5.15 Rostfria stålspalsar
- 5.16 Termometrar
- 5.17 Temperaturkontrollerad torkugn

6. Metod

- 6.1 Förberedelse av provet

Mal 10 till 20 g av provet i morteln eller homogeniseringsblandaren till en homogen blandning.
- 6.2 Upplösning av mjölkpulvret och borttagning av den ouplösliga bottensatsen.
 - 6.2.1 Mät upp $1,000 \pm 0,002$ g homogen foderblandning (6.1) som hålls direkt i ett 50 ml centrifugeringsrör. Tillsätt 30 ml vattenlöst trinitiumcitrat (4.1) som tidigare uppvärmts till 45 °C. Blanda med hjälp av magnetblandare i minst 5 minuter.
 - 6.2.2 Centrifugera 500 g (2 000 till 3 000 varv per minut) i 10 minuter och dekantera den klara vattniga supernatanten i en 150 till 200 ml glasbägare. Se till att ingen lös bottensats följer med.
 - 6.2.3 Gör ytterligare två extraktioner av bottensatsen, enligt samma förfarande, varvid extrakterna läggs till den första.
 - 6.2.4 Om en oljehinna bildas på ytan, kyl i kylskåp tills fettstelnar och ta bort den stelade hinnan med spatel.
- 6.3 Koagulering av kaseinet med löpe-enzym.
 - 6.3.1 Under kontinuerlig omrörning tillsätt droppvis 3,4 ml (a) av en mättad kalciumkloridlösning (4.2) till det vattenhaltiga extraktet (ungefär 100 ml). Justera pH till 6,4–6,5 med hjälp av NaOH (4.3) eller HCl (4.4) lösningar. Ställ i termostatkontrollerat vattenbad vid 37 °C i 15 till 20 minuter för att få saltbalans. Detta blir förnimbart genom att grumlighet bildas.
 - 6.3.2 Överför vätskan till ett (eller två) centrifugalrör och centrifugera vid 2 000 g i 10 minuter för att avlägsna fällningen. Överför supernatanten utan sediment, till ett (eller två) centrifugalrör.
 - 6.3.3 Höj supernatantens temperatur till 37 °C. Tillsätt droppvis 0,5 ml flytande löpe (4.5) under omrörning av extraktet. Koagulering uppstår efter en till två minuter.
 - 6.3.4 Flytta provet tillbaka till vattenbadet och lämna det i 15 minuter vid en temperatur av 37 °C. Ta bort provet från badet och bryt koagulatet genom omrörning. Centrifugera vid 2 000 g i 10 minuter. Filtrera supernatanten genom ett lämpligt pappersfilter (¹⁾, Whatman nr 541 eller motsvarande, behåll pappersfiltret. Skölj fällningen i centrifugalröret med 50 ml vatten vid ungefär 35 °C genom omrörning.

Centrifugera igen vid 2 000 g i 10 minuter. Filtrera supernatanten genom samma pappersfilter som använts förut.
- 6.4 Bestämning av kaseinkväve.
 - 6.4.1 Efter sköljning överför kvantitativt fällningen till pappersfiltret, som behövs efter 6.3.4, med hjälp av destillerat vatten. Flytta pappersfiltret till Kjeldahl-flaskan. Bestäm kvävehalten med Kjeldahl-metoden enligt beskrivningen i standard IDF 20A 1986.

7. Blindtest

- 7.1 Blindtest skall genomföras regelbundet genom att blöta ett askfritt filter (5.8) med en blandning av 90 ml natriumcitratlösning (4.1), 1 ml mättad kalciumkloridlösning (4.2), 0,5 ml flytande löpe (4.5) och sedan sköljs med 3×15 ml destillerat vatten innan mineralisering sker genom Kjeldahl-metoden som beskrivs i standard IDF 20A 1986.
- 7.2 Volymen av syra som används för blindtestet skall dras ifrån volymen av syra (4.4) som används för titrering av provet.

⁽¹⁾ Askfritt snabbpappersfilter skall användas.

8. Kontrolltest

- 8.1 För att kontrollera förfarandet och reagenterna som beskrivs ovan görs en analys av en standardfoderblandning med känt innehåll av skummjörkspulver fastställt genom interkalibrering. Genomsnittresultatet av en upprepad analys skall inte avvika mer än 1 % från resultatet av interkalibreringen.

9. Beräkning av resultaten

- 9.1 Procentsatsen skummjörkspulver i foderblandningen beräknas med följande formel:

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

där N är den procentuella andelen parakaseinkväve, 27,5 är faktorn för konvertering av fastställt kasein till procentuell andel skummjörkspulver, 2,81 och 0,908 är korrektionsfaktorer som erhållits från regressionsanalysen.

10. Metodens noggrannhet

10.1 Repeterbarhet

I minst 95 % av de undersökta fallen har upprepad analys av samma prov genom samma laborant i samma laboratorium visat resultat som skiljer sig med högst 2,3 g skummjörkspulver per 100 g foderblandning.

10.2 Reproducerbarhet

I minst 95 % av de undersökta fallen har samma prov som analyserats av två olika laboratorier visat resultat som skiljer sig med högst 6,5 g skummjörkspulver per 100 g foderblandning.

11. Toleransgränsen:

CrD₉₅-värdet (kritisk differens, 95 % konfidensintervall) beräknas med följande formel (ISO 5725):

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

(R : reproducerbarhet, r: repeterbarhet)

Dubbel bestämning : CrD₉₅ = 4,5 g

Om skillnaden mellan resultatet av den kemiska analysen och det uppgivna innehållet skummjörkspulver inte överstiger 4,5 g (dubbel bestämning) anses partiet foderblandning överensstämma med bestämmelsen i denna förordning.

12. Amärkningar

- 12.1 Tillsättning av höga procentsatser av vissa andra proteiner än mjörkproteiner, särskilt sojamjörkproteiner, kan i samband med bearbetning med skummjörkspulver, leda till överdrivet höga värden på grund av samfällning med mjörkens parakasein.
- 12.2 Tillsättning av kärnmjörk kan leda till något låga värden på grund av att endast den fettfria delen analyseras. Tillsättning av viss kärnmjörk från syrad grädde kan leda till mycket låga värden på grund av ofullständig upplösning i citratlösningen.
- 12.3 Tillsättning av 0,5 % eller mer lecitin kan också leda till för låga värden.
- 12.4 Blandning med skummjörkspulver som är uppvärmd till höga temperaturer kan leda till för höga värden på grund av samfällning av vissa vassleproteiner med mjörkens parakasein.

BILAGA XXIII

(Artikel 17)

KVALITATIV BESTÄMNING AV STÄRKELSE I SKUMMJÖLKPULVER, DENATURERAT MJÖLKPULVER OCH FODERBLANDNINGAR**1. Syfte**

Denna metod används till påvisning av stärkelse, som används som spårämne i denaturerat mjölkpulver. Metodens påvisningsgränser är cirka 0,05 g stärkelse per 100 g av provet.

2. Princip

Reaktionen är baserad på den reaktion som används vid jodometri:

- Kolloidernas bindning av fritt jod i vattenlösning.
- Stärkelsemicellernas absorption och färgbildning.

3. Reagenser

3.1 Jodlösning

- Jod 1 g.
- Kaliumjodid 2 g.
- Destillerat vatten 100 ml.

4. Utrustning

- 4.1 Analysvåg.
- 4.2 Vattenbad.
- 4.3 Provrör, 25 mm × 200 mm.

5. Förfarande

Väg upp 1 g av provet och överför till provröret (4.3).
Tillsätt 20 ml destillerat vatten och skaka provröret så att provet löses.
Placera i kokande vattenbad (4.2) och låt stå i 5 minuter.
Tag ut provröret från badet och låt det svalna till rumstemperatur.
Tillsätt 0,5 ml av jodlösningen (3.1), skaka och notera vilken färg provet antar.

6. Resultatangivelse

Om provet färgas blått innehåller det naturlig stärkelse.
Om provet innehåller modifierad stärkelse får det inte färgas blått.

7. Anmärkningar

Färgen, färgintensiteten och stärkelsens mikroskopiska utseende varierar beroende på den naturliga stärkelsens ursprung (t. ex. majs eller potatis) och den typ av modifierad stärkelse som finns i provet.

Om provet innehåller modifierad stärkelse färgas det violett, rött eller brunt, beroende på i vilken grad den naturliga stärkelsens kristalliniska struktur är modifierad.

BILAGA XXIV

(Artikel 18)

BESTÄMNING AV VATTENHALT I SYRAT KÄRNMJÖLKPULVER

1. Syfte

Att fastställa vattenhalten i syrat kärnmjölkpulver avsett att användas i djurfoder.

2. Princip

Provet torkas i vakuum. Massaförlusten bestäms genom vägning.

3. Utrustning

3.1 Analysväg.

3.2 Torra behållare av metall som inte fräts eller av glas och med lock som medger lufttät förslutning. Arbetsytan skall göra det möjligt att sprida ut provet med cirka 0,3 g/cm².

3.3 Reglerbar elektrisk vakuumugn med oljepump och antingen en mekanism för tillförsel av varm, torkad luft eller ett torkmedel (t.ex. kalciumoxid).

3.4 Exsickator med ett effektivt torkmedel.

3.5 Ventilerad torkugn med termostatregering på 102 ± 2 °C.

4. Utförande

Värm en behållare (3.2) med lock i ugnen (3.5) i minst 1 timme. Placera locket på behållaren, byt omedelbart till exsickatorn (3.4), låt svalna till rumstemperatur och väg med en noggrannhet av 0,5 mg.

Väg en behållare (3.2) med lock med en noggrannhet av 0,5 mg. Väg upp cirka 5 g av provet med en noggrannhet av 1 mg i den vägda behållaren och fördela det jämnt. Placera behållaren utan lock i vakuumugnen (3.3) som förvärmats till 83 °C. Sätt in behållaren i ugnen så snabbt som möjligt så att ugnstemperaturen inte sjunker alltför mycket.

Ställ in trycket på 100 torr (13,3 kPa) och låt torka vid detta tryck under 4 timmar, antingen med en torr varmluftsström eller med hjälp av torkmedel (cirka 300 g till 20 prov). Om det senare alternativet väljs skall vakuumpumpen fränkopplas när det föreskrivna trycket har uppnåtts. Räkna torkningstiden från det att ugnstemperaturen åter har uppnått 83 °C. Återställ försiktigt det atmosfäriska trycket i ugnen. Öppna ugnen, sätt omedelbart lock på behållaren, ta ut den ur ugnen, låt svalna 30–45 minuter i exsickatorn (3.4) och väg med en noggrannhet av 1 mg. Låt torka ytterligare 30 minuter i vakuumugnen (3.3) vid 83 °C och väg på nytt. Skillnaden i vattenhalt mellan de båda vägningarna får inte överstiga 0,1 %.

5. Resultatberäkning

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

där

E = provets ursprungliga massa i gram.

m = det torkade provets massa i gram.

6. Precision**6.1 Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 0,4 g vatten/100 g syrat kärnmjölkpulver.

6.2 Reproducerbarhet

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts av kemister i olika laboratorier med användning av olika utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 0,6 g vatten/100 g syrat kärnmjörkspulver.

6.3 Källa till precisionsdata

Precisionsdata bestämdes genom ett experiment som utfördes 1995 i åtta olika laboratorier med tolv prover (sex dubbla blindtester).

BILAGA XXV

(Artikel 19)

REFERENSMETOD FÖR DETEKTION AV FRÄMMANDE FETTER I MJÖLKFETT MED GASKROMATOGRFISK ANALYS AV TRIGLYCERIDER – OMARBETNING 1

1. **Omfattning och användningsområde**

Denna standard fastställer en metod för detektion av främmande fetter, både vegetabiliska och animaliska fetter såsom fett av nötkreatur och ister, i mjölkfett och mjölkprodukter med hjälp av gaskromatografisk analys av triglycerider.

Med hjälp av fastställda triglyceridformler, detekteras vegetabiliska och animaliska fettett kvalitativt och kvantitativt i rent mjölkfett oberoende av utfodrings- och mjölkavsöndringsförhållanden.

Anmärkning 1: Även om smörsyra (C4) som förekommer uteslutande i mjölkfett möjliggör kvantitativa uppskattningar av små till medelstora mängder mjölkfett i vegetabiliska fetter, kan kvalitativa och kvantitativa uppgifter knappast erhållas inom ett intervall på en tillsats av upp till minst 20 % (viktprocent) främmande fett till rent mjölkfett på grund av den stora variationen i C4, uppskattningsvis mellan 3,5 % och 4,5 % (viktprocent).

Anmärkning 2: Kvantitativa resultat kan i praktiken endast erhållas genom triglyceridanalyser, eftersom sterolinnehållat i de vegetabiliska fetterna varierar beroende på produktionsförhållanden och behandling.

2. **Definition**

Främmande fetter i mjölkfett: främmande fetter definieras i denna standard som alla vegetabiliska och animaliska fetter med undantag av mjölkfett.

3. **Metodens princip**

Efter extrahering av mjölkfettet framställs en standardlösning. Ur denna lösning bestäms triglyceriderna (totalt kolantal) gaskromatografiskt i packade kolonner. Genom att föra in viktprocenten av fettmolekyler av olika storlek (C24–C54– endast jämna antal) i triglyceridformeln, detekteras de främmande fetterna kvalitativt eller bestäms kvantitativt.

Anmärkning: Om den utvärdering används som beskrivs här, kan kapillär gaskromatografi användas, om det finns garanti för att jämförbara resultat erhålls (1).

4. **Reagenser**

Kemikalier av analyskvalitet skall användas.

4.1 Bäckgas: kväve, renhet $\geq 99,996$ %.

4.2 Standardtriglycerider (2), mättade, samt kolesterol för standardisering av standardmjölkfett i enlighet med avsnitt 6.5.4.

4.3 Metanol, vattenfri

4.4 n-Hexan

4.5 n-Heptan

4.6 Toluén

4.7 Dimetylklorosilanlösning: 50 ml dimetylklorosilan löses i 283 ml toluén.

4.8 Brännbar gas: väte och syntetisk luft.

4.9 Stationär fas: 3 % OV-1 på 125/150 μm (100/120 maskvidd) GasChromQ (3).

4.10 Tioprocentig lösning av kakaosmör.

5. **Utrustning**

Normal laboratorieutrustning och särskilt följande:

5.1 Gaskromatograf för höga temperaturer, lämplig för temperaturer på minst 400–450 °C, utrustad med en flamjonisationsdetektor (FID) och ett reglage för konstant massflöde av bärgas. Förbränningsgas: 30 ml/min H₂, 270 ml/min syntetisk luft.

(1) Lämpliga metoder har redan beskrivits, se D. Precht och J. Molckentin: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4, 16–17 (1993).

(2) Lämpliga produkter finns kommersiellt tillgängliga.

(3) Handelsnamn som t.ex. Extrelut, GasChromQ, Chrompack, är exempel på lämpliga produkter som finns tillgängliga i fackhandeln. Denna upplysning skall hjälpa användaren till en smidig hantering av standarden och utgör inte ett krav på att denna produkt används. Angivelsen om textur överfördes till SI-enheten μm i enlighet med BS 410:1988 "British Standard Specification for test sieves".

På grund av det stora flödet av bärigas skall munstycket till lågan vara särskilt brett.

Anmärkning: På grund av de höga temperaturer som förekommer under triglyceridanalyser måste glasinsatserna i flamjonisationsdetektorn eller i injektorsystemet rengöras ofta.

Gaskromatografen skall vara utrustad med septa, som tål höga temperaturer, som kan användas ofta och som uppvisar en allmänt låg grad av "genomsläpplighet".

Anmärkning: Lämpliga är Chromblue (™) septa (Chrompack).

Septa skall bytas regelbundet, t.ex. efter ca 100 injektioner eller så snart upplösningen försämras (se figur 4).

5.2 Kromatografkolonn

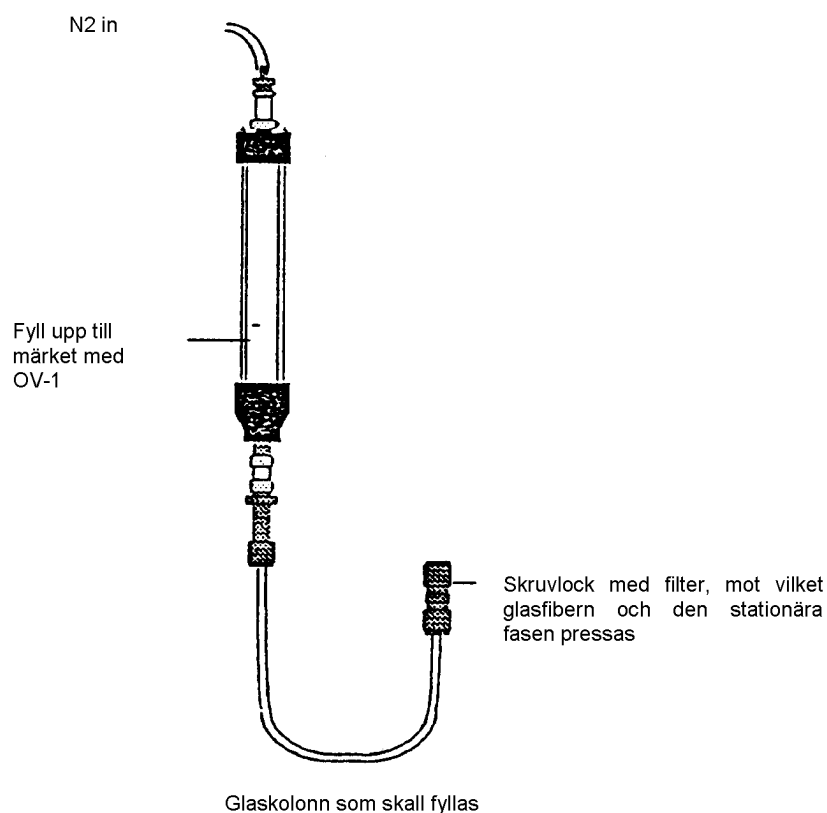
U-formad glaskolonn (innerdiameter 2 mm, 500 mm lång), som först silaniseras i enlighet med avsnitt 6.1 med dimetylklorosilan i syfte att deaktivera glasytan.

Anmärkning: Lämpliga är också något längre (800–2 000 mm långa) packade kolonner. Med dessa kan en något bättre reproducerbarhet uppnås vad avser resultaten. Å andra sidan uppvisar den stationära fasen ibland brott efter användning, vilket i sin tur kan leda till sämre kvantitativa resultat. Vidare utsläcks lätt flamjonisationsdetektorns låga till följd av det mycket höga flöde av bärigas som krävs, 75–85 ml/min.

5.3 Uppställning för påfyllning av kolonnen (se figur 1)

Fig. 1

Påfyllning av kolonnen



- 5.3.1 Plastkolonn med fastskruvade lock i ändarna, försedd med ett märke upp till vilket den erforderliga mängden av den stationära fasen kan fyllas på.
- 5.3.2 Finmaskig sikt (maskvidd ungefär 100 µm) med ett skruvlock, lämplig för att försluta glaskolonnen enligt figur 1.
- 5.3.3 Deaktiverad, silaniserad glasull.
- 5.3.4 Vibrator för jämn fördelning av den stationära fasen under påfyllningen.
- 5.4 1–3 ml Extrelut-kolonn ⁽¹⁾ med kiselgel. Denna kolonn kan alternativt användas för extraktion för att erhålla mjölkfett.

⁽¹⁾ Se fotnot 3 på sidan 86.

- 5.5 Grafitpackning 6,4 mm (1/4") med 6 mm hål.
- 5.6 Utrustning för silanisering av kolonnens glasyta enligt avsnitt 6.1.
 - 5.6.1 Wolff-flaska
 - 5.6.2 Vattensugpump
- 5.7 Vattenbad, justerbart till 50 ± 2 °C.
- 5.8 Torkskåp, justerbart till 50 ± 2 °C och 100 ± 2 °C
- 5.9 Mikroliterpipett
- 5.10 5 ml mätpipett för tillsättning av metanol
- 5.11 50 ml rundkolv
- 5.12 Erlenmeyerkolv, åsatt volym 50 ml
- 5.13 Tratt
- 5.14 Finporigt filter
- 5.15 Roterande indunstningsapparat
- 5.16 Ampuller, åsatt volym 1 ml, möjliga att försluta med ett aluminiumlock, med ett septum invändigt.
- 5.17 Injektionsspruta, sprutans kolv får inte nå nålens överände

Anmärkning: Sådana sprutor gör det möjligt att öka resultatens reproducerbarhet.

För att undvika att septumet förstörs, bör nålens spets kontrolleras regelbundet (t.ex. med ett stereomikroskop).

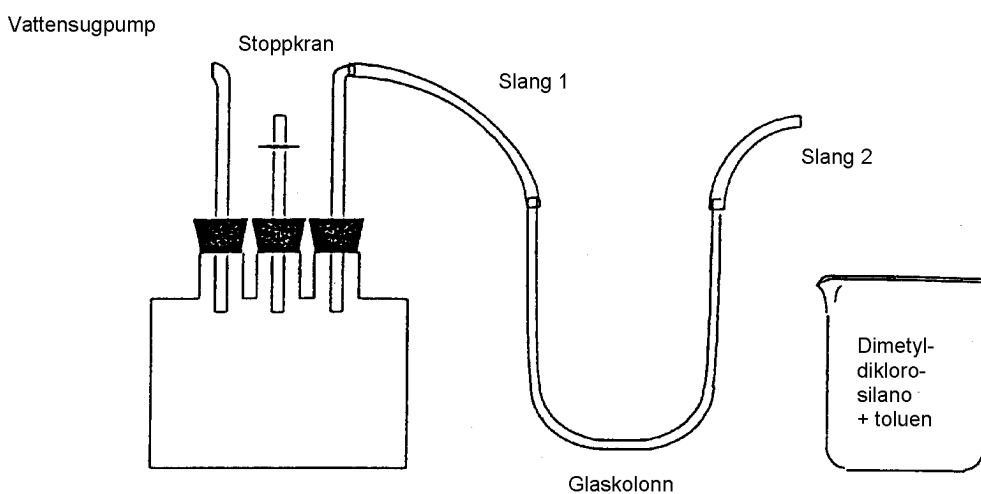
6. Förfarande

6.1 Beredning av kolonnen (silanisering)

Efter anslutning av Wolff-flaskan, som visas i figur 2, till vattensugpumpen, doppas slang 2 i lösningen enligt avsnitt 4.7. Genom stängning av stoppkranen fylls kolonnen. Därefter avlägsnas de två slangarna.

Figur 2

Uppställning för silanisering



Kolonnen fästes i en ställning och fylls fullständigt med dimetyldiklorosilanlösningen med hjälp av en pipett.

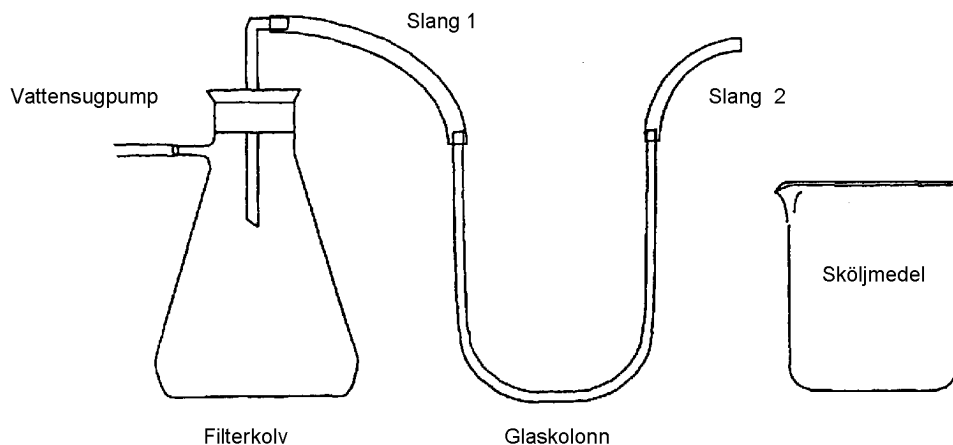
Efter 20–30 minuter ersätts Wolff-flaskan med en filterkolv och kolonnen töms genom att den ansluts till en vattensugpump (se figur 3).

6.2 Påfyllning av kolonnen

Detta följs av sköljning med 75 ml toluen och därefter 50 ml metanol. Den tömda kolonnen torkas sedan i torkskåpet vid 100 °C under ungefär 30 min.

Figur 3

Uppställning för sköljning



För påfyllning av kolonnen används den uppställning som visas i figur 1. Den stationära fasen 4.9 fylls på i plastkolonnen upp till märket.

Den nedre änden av den glaskolonn som skall fyllas tillsluts med en ca 1 cm lång propp av glasull som dessförinnan har silaniserats, och som pressas in med hjälp av en stålstav. Sedan försluts kolonnens ände med den sikt som anges i 5.3.2. Kolonnen fylls på under tryck (3 bar, med N₂) med den stationära fasen. För att erhålla en enhetlig, kontinuerlig och fast packning, förs en vibrator upp och ner längs glaskolonnen under påfyllningen.

Efter påfyllningen pressas en fast propp av silaniserad glasull in i den andra änden av den packade kolonnen, de utskjutande delarna kapas och proppen pressas in i kolonnen några millimeter med hjälp av en spatel.

6.3 Beredning av proverna

Vid beredning av proverna används någon av följande metoder:

6.3.1 Isolering av mjölkfett från smör

5–10 g smör smältes i ett vattenbad enligt avsnitt 5.7 vid 50 °C.

En 50 ml Erlenmeyer-kolv och en tratt med ett filter enligt 5.14 uppvärms i torkskåpet till 50 °C. Fettlagret i det smälta smörprovet filtreras med hjälp av den föruppvärmda apparaturen.

Sådant fett är nästan fosfolipidfritt.

6.3.2 Extraktion av fettfraktionen enligt Röse-Gottlieb-metoden

Extraktion görs antingen enligt IDF Standard 1C: 1987, 16C: 1987 116A: 1987 eller 22 B: 1987.

Med sådant mjölkfett gör fosfolipiderna att en kolesteroltopp uppnås som höjs med 0,1 %.

Triglyceridspektrumet standardiserat till 100 med kolesterolen påverkas därigenom endast i obetydlig utsträckning.

6.3.3 Extraktion ur mjölk med hjälp av kiselgelkolonner

0,7 ml av ett mjölkprov tempererat till 20 °C fylls i en 1–3 ml Extrelut-kolonn med hjälp av en mikroliterpipett enligt avsnitt 5.4 och får stå under ca 5 min så att provet fördelas jämnt i kiselgelen.

För denaturering av protein-lipidkomplexen tillsätts 1,5 ml metanol med pipett. Därefter extraheras provet med 20 ml n-hexan. n-hexanen tillsätts långsamt i små mängder och det lösningsmedel som rinner av uppsamlas i en 50 ml rundkolv som har torkats till en konstant och känd vikt.

Efter extraktionen får kolonnen rinna av tills den är tom.

Från eluanten destilleras lösningsmedlen av på en roterande indunstningsapparat vid en vattenbadtemperatur på 40–50 °C.

Kolven torkas och fettinnehållet bestäms genom vägning.

Anmärkning: Fettextraktioner enligt Gerber, Weibull-Berntrop, Schmid-Bondzynski-Ratzlaff eller isolering av mjölkfett med hjälp av detergenter (BDI-metoden) är inte lämpliga för triglyceridanalys på grund av att med dessa metoder kan mer eller mindre stora kvantiteter partiella glycerider eller fosfolipider övergå i fettfas.

6.4 Beredning av provlösningen

För gaskromatografi används en 5 % lösning i n-heptan av det fett som erhålls enligt avsnitt 6.3. För beredning av denna provlösning invägs motsvarande mängder av det provmaterial som erhålls enligt avsnitt 6.3.1 och 6.3.2, och upplöses i motsvarande mängder n-heptan.

Med provberedning enligt avsnitt 6.3.3 beräknas den mängd n-heptan som skall tillsättas provmaterialet i kolven på grundval av vägningen och fettåterstoden löses i den.

Ungefär 1 ml av provlösningen fylls i en ampull enligt avsnitt 5.16.

6.5 Kromatografisk triglyceridbestämning

Med de höga temperaturer på upp till 350 °C som krävs för eluering av triglycerider med långa kedjor C52–C56 sker lätt en höjning av baslinjen, särskilt om kolonnerna inte har behandlats på ett tillfredsställande sätt i början. Denna höjning av baslinjen vid höga temperaturer kan undvikas helt antingen genom att två kolonner kopplas samman eller genom baslinjesubtraktion.

Med kompensationsmetoden eller användning av separata kolonner, liksom för glasinsatserna i injektorn och i detektorn, skall grafitpackningarna enligt avsnitt 5.5 användas.

6.5.1 Baslinjustering

För att undvika att baslinjen höjs används någon av följande metoder:

6.5.1.1 Sammankoppling av kolonner

Två packade kolonner används vid kompensationsmetoden.

6.5.1.2 Baslinjustering med hjälp av gaskromatografen

Med hjälp av en körning av gaskromatografen utan injektion av en fettlösning och sedan subtraktion av den lagrade baslinjen kan höjning av baslinjen undvikas.

6.5.1.3 Baslinjustering med hjälp av integrationsprogramvara

Med hjälp av en körning av integrationssystemet utan injektion av en fettlösning och sedan subtraktion av den lagrade baslinjen kan höjning av baslinjen undvikas.

6.5.1.4 Baslinjustering genom tillfredsställande behandling

Med tillfredsställande inledande behandling av kolonnen och ungefär 20 injektioner av mjölkfettlösningar, är ofta höjningen av baslinjen vid höga temperaturer så liten att baslinjusteringar inte är nödvändiga.

6.5.2 Injiceringsteknik

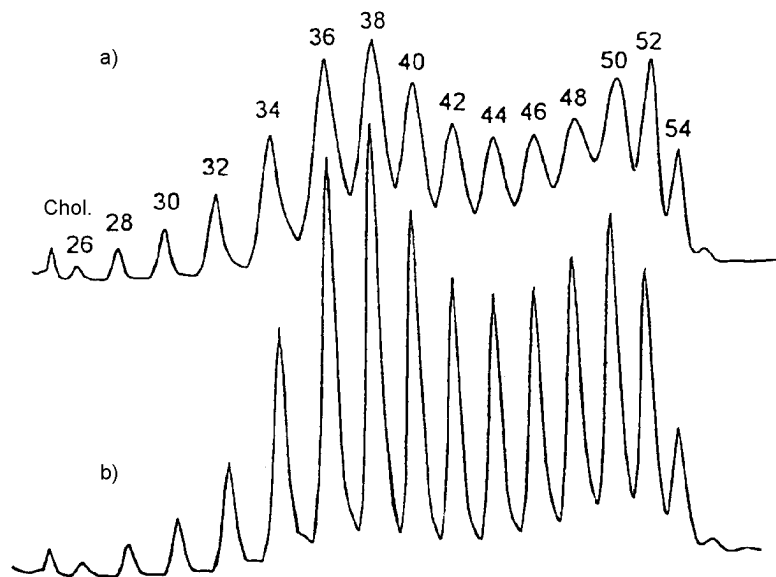
För att undvika diskriminerande effekter används tekniken "het injicering" för att uppnå bättre kvantitativa resultat med högkokande triglyceridkomponenter. Här dras fettlösningen upp i sprutan och den kalla sprutnålen värms upp före injektionen under ca 3 sekunder i injektionsporten. Sedan injiceras sprutans innehåll snabbt.

Anmärkning: Med denna injiceringsteknik reduceras risken för fraktionering i injektionssprutan eller injektionskammaren. Direktinjicering i den övre, förlängda uppvärmda delen av kolonnen tillämpas inte, eftersom fragment av septumet och föroreningar som ansamlas här lätt kan avlägsnas med hjälp av den tillämpade tekniken genom byte av injektorinsatsen utan att kolonnen demonteras.

Böjning av nålen av att botten av provbägaren vidrörs (även om det är knapp synligt för ögat) måste absolut undvikas för att inte septumet skall skadas.

Figur 4

Triglyceridkromatogram av ett prov av mjölkfett



a) Dålig upplösning till följd av ett skadat septum.
b) God upplösning

6.5.3 Behandling av en packad kolonn

För att undvika förorening är kolonnen inte ansluten till detektorn under steg a–c.

De kolonner som fyllts på enligt avsnitt 6.2 behandlas på följande sätt:

- 15 min 40 ml/min N_2 -flöde vid 50 °C
- Uppvärmning med 1 K/min upp till 355 °C vid 10 ml N_2 /min
- Hålls under 12–15 t vid 355 °C
- 2 injektioner av 1 μ l av kakaosmörslösning enligt avsnitt 4.10 och respektive temperaturprogram
- 20 injektioner av 0,5 μ l av en mjölkfettlösning under 2–3 dagar enligt avsnitt 6.4

Anmärkning: Kakaosmör består nästan uteslutande av högkokande C50–C56-triglycerider. Injektion av kakaosmör fyller syftet med särskild behandling i detta långkedjeintervall. Med de högkolande triglyceriderna C50–C54 kan delvis responsfaktorer på upp till ca 1,20 erhållas. Normalt, med upprepad injicering av en mjölkfettlösning, kan en sänkning av de i början höga responsfaktorerna för C50–C54 förväntas. Med triglycerider med lågt acyl-c-tal närmar sig faktorerna 1.

Tre par av de enligt 6.2 fyllda kolonnerna förbereds. De behandlade paren kontrolleras med en mjölkfettanalys för rutintestning. Det par som uppvisar de bästa kvantitativa resultaten (responsfaktorer nära 1) används i det följande. Med responsfaktorer > 1,20 används inte kolonnen.

6.5.4 Kalibrering

För kalibrering bör responsfaktorerna för motsvarande triglycerider, liksom för kolesterol i ett mjölkfett (standardfett), bestämmas med användande av standardiserade triglycerider (åtminstone de mättade triglyceriderna C24, C30, C36, C42, C48 och C54 liksom kolesterol; ännu bättre, även C50 och C52). Däremellan liggande responsfaktorer kan erhållas genom matematisk interpolering.

Vid användning av standardiserat fett måste 2–3 kalibreringar utföras per dag. Om nära identiska resultat erhålls, uppnås väl reproducerbara kvantitativa resultat med triglyceridanalys av proven.

Det standardiserade mjölkfettet har en lagringstid på flera månader vid en lagringstemperatur på högst –18 °C och kan därigenom användas som standard.

Anmärkning: responsfaktorn för respektive beståndsdel kan också bestämmas med hjälp av ett standardfett med garanterad triglyceridsammansättning, t.ex. CRM 519 (vattenfritt mjölkfett) som saluförs av "Institut de Matériaux de Référence et de Mesures" i Gell, Belgien.

6.5.5 Temperaturprogram, bärgas och andra förhållanden för triglyceridanalys.

Temperaturprogram: initial kolonn-temperatur 210 °C, håll under 1 min, programmera sedan en höjning med 6 °C/min till 350 °C och håll vid sluttemperaturen under 5 min.

Detektor- och injektor-temperatur: 370 °C för var och en.

Anmärkning: Detektor-, injektor- och ugnstemperaturerna (initialtemperatur) skall hållas på konstant nivå (även över natten, under helger och helgdagar).

Bärgas: kväve, flödes hastighet 40 ml/min.

Anmärkning: Om 80 cm kolonner används, skall flödet av N₂ vara minst 75 ml/min. Bärgasflödet skall hållas konstant (även över natten, under helger och helgdagar). Det exakta bärgasflödet skall justeras på ett sådant sätt att oberoende av kolonnens längd, C54 elueras vid 341 °C.

Analysens längd: 29,3 min.

Injiceringsvolym: 0,5 µl.

Anmärkning: Sprutan skall sköljas flera gånger med ren heptan efter varje injicering.

FID-förhållanden: enligt avsnitt 5.1.

Anmärkning: Flamjonisationsdetektorn antänds i början av varje arbetsdag.

7. Integration, utvärdering och kontroll av mätförhållanden

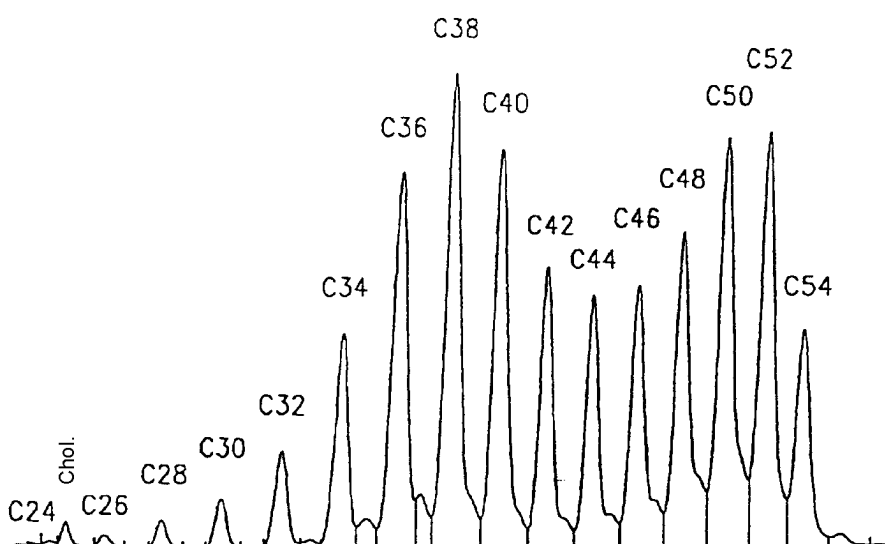
Triglycerider med udda acyl-c-tal ($2n + 1$) kombineras med föregående jämnt numrerade triglycerid ($2n$). Det mindre reproducerbara lägre innehållet av C56 tas inte med i beräkningen. De återstående triglyceriderna (toppyta) i kromatogrammet, inbegripet kolesterol (topp nära C24) multipliceras med respektive responsfaktorer hos standardfettet (senaste kalibreringen) och normaliseras tillsammans till 100. Förutom fri kolesterol utvärderas på så sätt triglyceriderna C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 och C54. Resultaten anges i viktprocent (g/100 g).

Utvärdering av kromatogramtopparna bör göras med en integrator, med vilken en baslinje kan plottas. Återintegration med optimerade integrationsparameter bör vara möjlig.

Figurerna 5 och 6 visar två exempel på triglyceridkromatogram. Figur 5 visar ett kromatogram som är lätt att utvärdera, medan figur 6 uppvisar ett sporadiskt fel i området C50–C54 där baslinjen är felaktigt jämfört med figur 5. Sådana typiska fel kan detekteras med ganska stor säkerhet och undvikas endast om en integrator används med vilken baslinjen plottas.

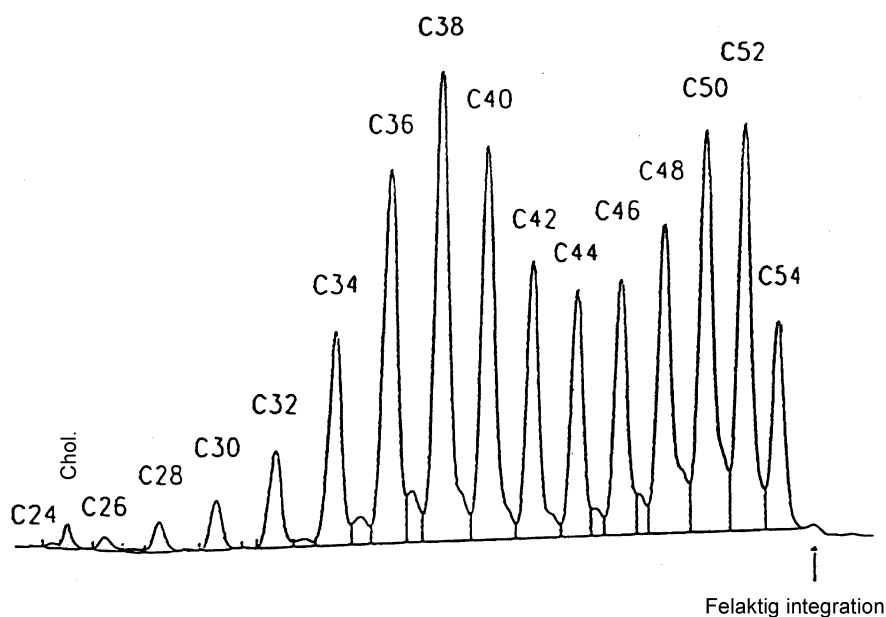
Figur 5

Triglyceridkromatogram av ett mjölkfett som är lätt att utvärdera, med baslinjen utritad



Figur 6

Felaktigt integrerat kromatogram av mjölkfett



För kontroll av mätförhållandena kan man använda de relativa standardavvikelserna (RSA: variationskoefficient $\times 100$) för de triglycerider som återges i tabell 1. De har beräknats på grundval av 19 analyser i rad av samma mjölkfett.

Tabell 1

Relativ standardavvikelse (RSA) för triglyceridhalter (n=19)

Triglycerid	RSA (%)
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

Om de relativa standardavvikelserna klart överstiger värdena i figur 1, är kromatografiförhållandena inte lämpliga och membraner eller flöde av bärgas bör kontrolleras. Vidare kan små fragment av membranerna ha bildat avsättningar på glasullen vid kolonnens inlopp, eller kolonnen kan ha blivit oanvändbar till följd av att den åldrats, genom temperaturpåverkan etc. (se figur 3).

Anmärkning: Värdena i figur 1 är inte obligatoriska utan ger bara en orientering om kontrollens kvalitet. Godkänns högre relativa standardavvikelser, måste emellertid repeterbarhetsgränsvärdena och reproducerbarhetsgränsvärdena enligt punkt 11 iakttas.

8. Kvalitativ detektion av främmande fett

För detektion av främmande fetter har triglyceridformler (tabell 2) med gränserna S (tabell 3) utvecklats, där S-värdena för rena mjölkfetter kan variera. Om dessa gränser överskrids, kan närvaron av främmande fett förmodas.

Den mest känsliga formeln för detektion av istertillsats är t.ex.

$$6,5125 \times C26 + 1,2052 \times C32 + 1,7336 \times C34 + 1,7557 \times C36 + 2,2325 \times C42 + 2,8006 \times C46 + 2,5432 \times C52 + 0,9892 \times C54 = S$$

Anmärkning: Med användande av 755 olika mjölkfettprover bestämdes ett 99 % konfidensintervall för $S = 97,96-102,04$ för prover av rent mjölkfett med en standardavvikelse för samtliga S-värden på $s = 0,39897$.

Med utgångspunkt från trygliceridsammansättningen i ett okänt fettprov gör en sådan formel det möjligt att, utan användning av dator, på ett enkelt sätt kontrollera om summan av de triglyceridhalter som anges här med motsvarande faktorer, hamnar utanför intervaller 97,96–102,04 och man har då med stor sannolikhet att göra med tillsatser av främmande fetter.

För detektion av främmande fetter visas i tabell 2 olika triglyceridformler. För detektion av de främmande fetterna sojabönolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja och hydrogenerad fiskolja, för de vegetabiliska fetterna kokosfett och palmkärnfett, liksom för palmolja och fett av nötkreatur, kan för vart och ett en gemensam formel användas.

Eftersom triglyceridsammansättningen i de främmande fetterna också kan variera, används upp till 4 olika, experimentellt uppmätta triglyceriddataset av samma typ. (Med samma främmande fetttyper har respektive minst gynnsamma gräns beaktats [se tabell 4].)

Med följande "totalformel" kan liknande goda resultat erhållas för alla främmande fetter:

$$- 2,7575 \times C26 + 6,4077 \times C28 + 5,5437 \times C30 - 15,3247 \times C32 + 6,2600 \times C34 + 8,0108 \times C40 - 5,0336 \times C42 + 0,6356 \times C44 + 6,0171 \times C46 = S$$

Beräkningar för detektion av vilken kombination som helst av främmande fett i mjölkfett har t.ex. visat att, även om den formel för ister som anges i tabell 2 ger en låg gräns för detta främmande fett, nämligen 2,7 %, kan andra fetter såsom kokosfett, palmolja eller palmkärnfett med detektionsgränser på 26,8, 12,5 respektive 19,3 %, endast detekteras med denna formel om extremt stora mängder har satts till mjölkfettet. Detta gäller även för andra formler i tabell 2.

Tabell 2

Triglyceridformler för detektion av olika främmande fetter i mjölkfett, med angivelse av standardavvikelsen s för S

Formel för sojabönolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja och fiskolja
$2,0983 \times C30 + 0,7288 \times C34 + 0,6927 \times C36 + 0,6353 \times C38 + 3,7452 \times C40 - 1,2929 \times C42 + 1,3544 \times C44 + 1,7013 \times C46 + 2,5283 \times C50 = S; s = 0,38157$
Formel för kokosfett och palmkärnfett
$3,7453 \times C32 + 1,1134 \times C36 + 1,3648 \times C38 + 2,1544 \times C42 + 0,4273 \times C44 + 0,5809 \times C46 + 1,2926 \times C48 + 1,0306 \times C50 + 0,9953 \times C52 + 1,2396 \times C54 = S; s = 0,11323$
Formel för palmolja och fett av nötkreatur
$3,6644 \times C28 + 5,2297 \times C30 - 12,5073 \times C32 + 4,4285 \times C34 - 0,2010 \times C36 + 1,2791 \times C38 + 6,7433 \times C40 - 4,2714 \times C42 + 6,3739 \times C46 = S; s = 0,81094$
Formel för ister
$6,5125 \times C26 + 1,2052 \times C32 + 1,7336 \times C34 + 1,7557 \times C36 + 2,2325 \times C42 + 2,8006 \times C46 + 2,5432 \times C52 + 0,9892 \times C54 = S; s = 0,39897$

Följaktligen måste för kontroll av ett okänt fettprov alla formler som anges i tabell 2 och totalformeln (2) användas, om provet sannolikt är en blandning av mjölkfett och någon av de 14 olika fetterna eller en kombination av dessa främmande fetter. Om man genom att infoga triglyceriderna som finns i ett fettprov som skall analyseras, erhåller ett S-värde som ligger utanför de intervaller som anges i tabell 3 i endast en av de fem formlerna, är provet sannolikt inte ett modifierat mjölkfett. Detektion av främmande fett i mjölkfett med hjälp av någon av de fyra formlerna i tabell 2, gör det inte möjligt att dra slutsatser om typen av främmande fettillsats.

Tabell 3

S-gränser för mjölkfetter

Formel för detektion av	S-intervall
Sojabönlja, solrosfröolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	98,05 – 101,95
Kokosfett och palmkärnfett	99,42 – 100,58
Palmolja och fett av nötkreatur	95,90 – 104,10
Ister	97,96 – 102,04
Totalformel	95,68 – 104,32

I tabell 4 anges detektionsgränserna för de olika främmande fetterna med 99 % konfidensintervall. I den första kolumnen anges den lägsta detektionsgränsen för den bästa mjölkfettformeln i tabell 2. I den andra kolumnen anges detektionsgränserna för totalformeln. Även om gränserna är något högre, räcker det med denna formel för att detektera något större mängder främmande fetter. Variationsgraden för triglyceriderna i olika främmande fetter av någon typ har inget nämnvärt inflytande på detektionsgränserna.

Tabell 4

99 % detektionsgränser genom tillsats av främmande fett till mjölkfett i %

	Individuell formel	Totalformel
Sojabönlja	2,1	4,4
Solrosolja	2,3	4,8
Olivolja	2,4	4,7
Kokosfett	3,5	4,3
Palmolja	4,4	4,7
Palmkärnfett	4,6	5,9
Rapsolja	2,0	4,4
Linolja	2,0	4,0
Vetegroddolja	2,7	6,4
Majsolja	2,2	4,5
Bomullsfröolja	3,3	4,4
Ister	2,7	4,7
Fett av nötkreatur	5,2	5,4
Hydrogenerad fiskolja	5,4	6,1

Anmärkning: S-intervallen beräknas på så sätt att ett främmande fett endast förutsätts föreligga, om gränserna för de enskilda formlerna överskrids (se tabell 4).

9. Kvantitativ bestämning av främmande fett

För att erhålla kvantitativa uppgifter om koncentrationen av främmande fett i ett mjölkfettprov, används följande formel:

$$X (\%) = 100 \times \left| \frac{(100 - S)(3)}{(100 - S_F)} \right|,$$

där X är kvantiteten okänt främmande fett eller okänd främmande fettblandning i ett okänt mjölkfett. S är resultatet av tillsatsen av ett okänt främmande fett genom infogning av triglyceriderna i blandningen av främmande fett/mjölkfett, i ovannämnda totalformel för triglycerider. Om ett okänt främmande fett sätts till mjölkfett, väljs medel-S-värdet av de olika främmande fetterna i totalformeln för S_F . Detta medel-S-värde erhålls genom infogning av triglyceridvärdena för de rena främmande fetterna i denna formel och beräkning av medelvärdet ($S_F = 7,46$). Bra kvantitativa resultat vad avser främmande fettillsatser erhålls också om formeln för palmolja/fett från nötkreatur (tabell 2) och ett medel S_F -värde på 10,57 används.

Med kända främmande fettyper skall följande S_F -värden infogas i ovannämnda formel och respektive fettformel ur tabell 2 väljas.

Tabell 5

S_F-värden för olika främmande fetter

Främmande fett	S _F
Sojabönlja	8,18
Solrosolja	9,43
Olivolja	12,75
Kokosfett	118,13
Palmolja	7,55
Palmkärnfett	112,32
Rapsolja	3,30
Linolja	4,44
Vetegroddolja	27,45
Majsolja	9,29
Bomullsfröolja	41,18
Ister	177,55
Fett av nötkreatur	17,56
Fiskolja	64,12

10. Detektionsmetodens användningsområde

Den beskrivna metoden gäller för oförpackad mjölk och baseras på mjölkfettprovernas representativitet.

Mycket noggrann detektion skulle vara möjlig om, för ett representativt antal mjölkfetter, formler av den typ som beskrivs ovan, tas fram för olika länder.

Särskilt lämpliga detektionsmöjligheter kunde uppnås, om det i de olika ländernas formler, såsom har beskrivits här, angavs ett representativt antal mjölkfetter. I detta fall krävs inte komplicerade dataprogram, om de triglyceridkombinationer som används i tabell 2 tillämpas och faktorerna bestäms igen med hjälp av minsta kvadratmetoden.

Med användande av de S-intervall som anges i tabell 3 är, vid särskilda utfodringsförhållanden, såsom t.ex. underutfodring eller utfodring av kor med foderjäst eller Ca-tvål, formeln allmänt tillämpliga. Endast i fall med extrema utfodringsförhållanden (t.ex. högt upptag av rena foderoljor, stor tilldelning av Ca-tvål i kombination med foderfett) indekerar formeln delvis ett modifierat mjölkfett.

Anmärkning: Fraktionerade mjölkfetter betraktas allmänt som omodifierat mjölkfett, om en modifiering förutsätts endast när gränserna överskrids. Endast när det gäller fraktionerade mjölkfetter med ovanlig mjölkfett-sammansättning, i den form som t.ex. är fallet med en hård fraktion, erhållen genom fraktionering med fysiska metoder vid höga temperaturer på ungefär 30 °C med lågt utfall på ett par procent eller genom fraktionering med överkritisk CO₂, indikerar formeln en modifiering.

Mjölkfettfraktionering kan dock detekteras med hjälp av andra metoder, t.ex. Differential-Scanning-Calorimetry.

11. Metodens noggrannhet

Bestäms med användande av mjölkfett på grundval av formeln från tabell 2 och S-intervallen i tabell 3.

11.1 Repeterbarhet

Som skillnaden i S-värden mellan två bestämningar utförda inom kortast möjliga tidsintervall av samma utförare med samma förfarande och identiskt provmaterial under samma förhållanden (samma person, samma instrument/samma utrustning, samma laboratorium):

Tabell 6

Repetierbarhetsgränser (r) för de olika formlerna

Formel för detektion av	r
Sojabönlolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	0,67
Kokosfett och palmkärnfett	0,12
Palmolja och fett av nötkreatur	1,20
Ister	0,58
Totalformel	1,49

11.2 *Reproducerbarhet*

Som skillnaden i S-värden mellan två bestämningar utförda av utförare i olika laboratorier, enligt samma förfarande med identiskt provmaterial under olika förhållanden (olika personer, olika instrument) vid olika tidpunkter:

Tabell 7

Reproducerbarhetsgränser (R) för de olika formlerna

Formel för detektion av	R
Sojabönlolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	1,08
Kokosfett och palmkärnfett	0,40
Palmolja och fett av nötkreatur	1,81
Ister	0,60
Totalformel	2,07

11.3 *Kritisk skillnad*

Med repeterbarhetsgränserna (r) och reproducerbarhetsgränserna (R) kan de kritiska skillnaderna för alla S-intervall i tabell 3 beräknas (dubbelanalys). De respektive värdena anges i tabell 8.

Tabell 8

Kritiska skillnader för samtliga triglyceridformler

Formel för detektion av	Intervall
Sojabönlolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	97,43 – 102,57
Kokosfett och palmkärnfett	99,14 – 100,86
Palmolja och fett av nötkreatur	94,91 – 105,09
Ister	97,65 – 102,35
Totalformel	94,58 – 105,42

11.4 Godtagbara resultat

Samtliga kalibrerade med två decimalers avrundning, skall triglyceridhalterna av C24, C26, C28–C54 liksom av kolesterol vara exakt normaliserade till 100.

Resultaten av dubbelanalyserna används för att kolla repeterbarheten. Om den absoluta skillnaden mellan de två S-resultaten för samtliga 5 triglyceridformler inte överskrider de repeterbarhetsgränser som anges i tabell 6, då är repeterbarhetsmålet uppnått.

För kontroll av optimala gaskromatografiska förhållanden och särskilt kolonnens kvalitet, bör det tillses att skillnaden i max- och min-S-värden för alla fem triglyceridformlerna med 10 upprepade körningar inte överskrider intervallet $x \times r$ där $x = 1,58$ (för 10 körningar, se litteraturreferens 16) och repeterbarhetsgränserna för de olika formelerna i tabell 6.

12. Refererade standarder

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

13. Referenser

1. Europeiska gemenskapernas kommission: Detection of foreign fats in milk fat by means of gas chromatographic triglyceride analysis; Doc. nr VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Europeiska gemenskapernas kommission: Control of butter fat purity of 100 different samples of different feeding periods from 11 EEC countries, Doc. nr VI/4577/93.
3. Europeiska gemenskapernas kommission: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat, Doc. 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., Heine, K.: Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen 41 406–410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 29–35 (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 triglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1–8, 107–114 (1992).
13. Precht, D.: "Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns" in CRC Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids, s. 123–138, Red. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkentin, J.: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4 16–17 (1993).
15. Molkentin, J., Precht, D.: Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. Chromatographia 39 (5/6) 265–270 (1994).
16. Stange, K.: Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme, Springer-Verlag, Berlin, s. 378 (1970).

Bilaga XXVI

FÖRTECKNING ÖVER DE FÖRORDNINGAR SOM ANGES I FÖRSTA SKÄLET

- Kommissionens förordning (EEG) nr 1216/68 av den 9 augusti 1968 om fastställande av metoden att bestämma laktosinnehållet i foderblandningar som importeras från tredje land ⁽¹⁾, ändrad genom förordning (EEG) nr 222/88 av den 22 december 1988 om ändring av vissa rättsakter om tillämpningen av den gemensamma organisationen av marknaden för mjölk och mjölkprodukter till följd av införandet av Kombinerade nomenklaturen ⁽²⁾.
- Kommissionens förordning (EEG) nr 3942/92 av den 22 december 1992 om införande av en referensmetod för bestämning av sitosterol och stigmasterol i smörolja ⁽³⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 175/1999 av den 26 januari 1999 om ändring av förordningarna (EEG) nr 3942/92, (EG) nr 86/94, (EG) nr 1082/96 och (EG) nr 1459/98 om referensmetoder för bestämning av vissa spårämnen i smör, smörolja och grädde ⁽⁴⁾.
- Kommissionens förordning (EG) nr 86/94 av den 19 januari 1994 om införande av en referensmetod för bestämning av sitosterol och stigmasterol i smör ⁽⁵⁾, ändrad genom förordning (EG) nr 175/1999.
- Kommissionens förordning (EG) nr 2721/95 av den 24 november 1995 om tillämpningsföreskrifter för referens- och rutinmetoder för analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölkprodukter inom den gemensamma marknadsorganisationen ⁽⁶⁾.
- Kommissionens förordning (EG) nr 1080/96 av den 14 juni 1996 om upprättande av en referensmetod för att spåra kolibakterier i smör, skummjölkspulver och kasein/kaseinater ⁽⁷⁾.
- Kommissionens förordning (EG) nr 1081/96 av den 14 juni 1996 om fastställande av en referensmetod för påvisande av komjolk och kaseinater i ost som tillverkats av mjölk från tackor, getter eller bufflar eller av blandningar av mjölk från tackor, getter och bufflar samt om upphävande av förordning (EEG) nr 690/92 ⁽⁸⁾.
- Kommissionens förordning (EG) nr 1082/96 av den 14 juni 1996 om upprättandet av en referensmetod för bestämning av etylestern av β -apo-8'-karotinsyra i koncentrerat smör och smör ⁽⁹⁾, ändrad genom förordning (EG) nr 175/1999.
- Kommissionens förordning (EG) nr 1854/96 av den 26 september 1996 om utarbetande av en förteckning över referensmetoder som skall tillämpas för analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölkprodukter inom den gemensamma marknadsorganisationen ⁽¹⁰⁾, ändrad genom förordning (EG) nr 881/1999 ⁽¹¹⁾.
- Kommissionens förordning (EG) nr 880/98 av den 24 april 1998 om införande av referensmetoder för bestämning av vatten, fettfri torrsubstans och fett i smör ⁽¹²⁾.
- Kommissionens förordning (EG) nr 1459/98 av den 8 juli 1998 om en referensmetod för bestämning av vanillin i koncentrerat smör, smör eller grädde ⁽¹³⁾, ändrad genom förordning (EG) nr 175/1999.

⁽¹⁾ EGT L 198, 10.8.1968, s. 13.

⁽²⁾ EGT L 28, 1.2.1988, s. 1.

⁽³⁾ EGT L 399, 31.12.1992, s. 29.

⁽⁴⁾ EGT L 20, 27.1.1999, s. 22.

⁽⁵⁾ EGT L 17, 20.1.1994, s. 7.

⁽⁶⁾ EGT L 283, 25.11.1995, s. 7.

⁽⁷⁾ EGT L 142, 15.6.1996, s. 13.

⁽⁸⁾ EGT L 142, 15.6.1996, s. 15.

⁽⁹⁾ EGT L 142, 15.6.1996, s. 26.

⁽¹⁰⁾ EGT L 246, 27.9.1996, s. 5.

⁽¹¹⁾ EGT L 111, 29.4.1999, s. 24.

⁽¹²⁾ EGT L 124, 25.4.1998, s. 16.

⁽¹³⁾ EGT L 193, 9.7.1998, s. 16.