

KOMMISSIONENS GENOMFÖRANDEFÖRORDNING (EU) 2018/150**av den 30 januari 2018****om ändring av kommissionens genomförandeförordning (EU) 2016/1240 vad gäller analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölkprodukter som kan komma ifråga för offentlig intervention och stöd för privat lagring**

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 1306/2013 av den 17 december 2013 om finansiering, förvaltning och övervakning av den gemensamma jordbrukspolitiken och om upphävande av rådets förordningar (EEG) nr 352/78, (EG) nr 165/94, (EG) nr 2799/98, (EG) nr 814/2000, (EG) nr 1290/2005 och (EG) nr 485/2008 ⁽¹⁾, särskilt artikel 62.2 i, och

av följande skäl:

- (1) I kommissionens delegerade förordning (EU) 2016/1238 ⁽²⁾ och kommissionens genomförandeförordning (EU) 2016/1240 ⁽³⁾ fastställs reglerna för offentlig intervention och stöd för privat lagring. I kommissionens förordning (EG) nr 273/2008 ⁽⁴⁾ fastställs de metoder som ska användas vid bedömning av huruvida mjölk och mjölkprodukter uppfyller de krav som ställs i dessa förordningar för offentlig intervention och stöd för privat lagring.
- (2) Mot bakgrund av den tekniska utvecklingen för de metoder som används vid analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölkprodukter bör stora förändringar göras för att förenkla och tillhandahålla uppdaterade hänvisningar till ISO-standarder. För att göra lagstiftningen enklare och tydligare, och med beaktande av omfattningen och den tekniska karaktären på ändringarna av bestämmelserna i förordning (EG) nr 273/2008, bör de relevanta bestämmelserna i den förordningen införlivas i genomförandeförordning (EU) 2016/1240.
- (3) För att säkerställa att de nya standarderna och metoderna tillämpas enhetligt i medlemsstaterna bör laboratorierna få tillräckligt lång tid på sig för att se över förfarandena och börja tillämpa de uppdaterade metoderna.
- (4) Genomförandeförordning (EU) 2016/1240 bör därför ändras i enlighet med detta.
- (5) Av rättssäkerhetsskäl bör förordning (EG) nr 273/2008 upphävas.
- (6) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från kommittén för den samlade marknadsordningen inom jordbruket.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Genomförandeförordning (EU) 2016/1240 ska ändras på följande sätt:

1. Artikel 4 ska ändras på följande sätt:

a) Punkt 1 ska ändras på följande sätt:

i) led d ska ersättas med följande:

”d) För smör: bilaga IV del I och Ia till denna förordning.”

ii) led e ska ersättas med följande:

”e) För skummjörkspulver: bilaga V del I och Ia till denna förordning.”

⁽¹⁾ EUT L 347, 20.12.2013, s. 549.⁽²⁾ Kommissionens delegerade förordning (EU) 2016/1238 av den 18 maj 2016 om komplettering av Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 1308/2013 vad gäller offentlig intervention och stöd för privat lagring (EUT L 206, 30.7.2016, s. 15).⁽³⁾ Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2016/1240 av den 18 maj 2016 om regler för tillämpningen av Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 1308/2013 vad gäller offentlig intervention och stöd för privat lagring (EUT L 206, 30.7.2016, s. 71).⁽⁴⁾ Kommissionens förordning (EG) nr 273/2008 av den 5 mars 2008 om tillämpningsföreskrifter för rådets förordning (EG) nr 1255/1999 när det gäller de metoder som ska användas för analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölkprodukter (EUT L 88, 29.3.2008, s. 1).

b) Punkt 2 ska ersättas med följande:

”2. De metoder som ska användas för att fastställa kvaliteten på spannmål, smör och skummjörkspulver som är föremål för offentlig intervention enligt bilagorna I, IV och V ska vara de som anges i de senaste versionerna av de europeiska eller internationella standarder som, allt efter omständigheterna, är i kraft minst 6 månader före den första dagen i perioden för offentlig intervention så som definieras i artikel 12 i förordning (EU) nr 1308/2013.”

2. Följande artikel ska införas som artikel 60a:

”Artikel 60a

Särskilda bestämmelser om kontroller med avseende på offentlig intervention och stöd för privat lagring av mjörk och mjörkprodukter

1. För att fastställa om smör, skummjörkspulver och ost kan komma i fråga för stödbelopp för privat lagring ska de metoder som fastställs i bilagorna VI, VII och VIII användas.

Dessa metoder ska fastställas med hänvisning till de senaste versionerna av de europeiska eller internationella standarder som, allt efter omständigheterna, är i kraft minst 6 månader före den första dagen i perioden för offentlig intervention så som definieras i artikel 12 i förordning (EU) nr 1308/2013.

2. Resultatet av de kontroller som genomförs med de metoder som fastställs i denna förordning ska utvärderas i enlighet med bilaga IX.”

3. Bilagorna ska ändras i enlighet med bilagan till denna förordning.

Artikel 2

Förordning (EG) nr 273/2008 ska upphöra att gälla.

Artikel 3

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

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

Utfärdad i Bryssel den 30 januari 2018.

På kommissionens vägnar

Jean-Claude JUNCKER

Ordförande

BILAGA

Bilagorna till genomförandeförordning (EU) 2016/1240 ska ändras på följande sätt:

1. Bilaga IV ska ändras på följande sätt:

a) I del I punkt 2 ska andra stycket ersättas med följande:

”Varje prov ska bedömas för sig. Ingen ny provtagning eller ny bedömning är tillåten.”

b) Följande del Ia ska införas:

”DEL IA

Metoder för analys av osaltat smör för offentlig intervention

Parameter	Metod
Fett ⁽¹⁾	ISO 17189 eller ISO 3727 del 3
Vatten	ISO 3727 del 1
Fettfri torrs substans	ISO 3727 del 2
Halt fria fettsyror	ISO 1740
Peroxidtal	ISO 3976
Annat fett än mjölkfett	ISO 17678
Sensoriska egenskaper	ISO 22935 del 2 och 3 och poängtabell nedan.

⁽¹⁾ Den metod som används ska ha godkänts av det utbetalande organet.

Poängtabell

Utseende		Konsistens		Lukt och smak	
Poäng	Kommentar	Poäng	Kommentar	Poäng	Kommentar
5	Mycket bra Perfekt Högsta kvalitet (lika med torr)	5	Mycket bra Perfekt Högsta kvalitet (lika med bredbar)	5	Mycket bra Perfekt Högsta kvalitet (absolut ren fin lukt)
4	Bra (inga påtagliga fel)	4	Bra (inga påtagliga fel)	4	Bra (inga påtagliga fel)
1, 2 eller 3	Någon defekt	1, 2 eller 3	Någon defekt	1, 2 eller 3	Någon defekt”

2. Följande del Ia ska införas i bilaga V:

"DEL IA

Metoder för analys av skummjölkpulver för offentlig intervention

Parameter	Metod
Proteiner	ISO 8968 del 1
Fett	ISO 1736
Vatten	ISO 5537
Surhetsgrad	ISO 6091
Laktathalt	ISO 8069
Fosfatatest	ISO 11816 del 1
Olöslighetsindex	ISO 8156
Brända partiklar ⁽¹⁾	ADPI
Mikroorganismer	ISO 4833 del 1
Kärnmjölk	Tillägg I
Löpevassle ⁽²⁾	Tillägg II och III
Sur vassle ⁽³⁾	ISO 8069 eller kontroller på plats
Sensoriska kontroller ⁽⁴⁾	ISO 22935 del 2 och 3

⁽¹⁾ Analysen av brända partiklar får genomföras systematiskt. Sådana analyser ska dock alltid genomföras om ingen sensorisk kontroll genomförs.

⁽²⁾ Den metod som används ska ha godkänts av det utbetalande organet (en eller båda metoderna).

⁽³⁾ Den metod som används ska ha godkänts av det utbetalande organet.

⁽⁴⁾ Sensoriska kontroller ska genomföras när det bedöms som nödvändigt efter en riskbaserad analys som godkänts av det utbetalande organet.

Tillägg I

SKUMMJÖLKSPULVER: KVANTITATIV BESTÄMNING AV FOSFATIDYLSERIN OCH FOSFATIDYLETANOLAMIN**Metod: HPLC med omvänd fas****1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE**

Metoden omfattar ett förfarande för kvantitativ bestämning av fosfatidylserin (PS) och fosfatidyletanolamin (PE) i skummjölkspulver och är lämplig för att påvisa fasta kärnmjölkspartiklar i skummjölkspulver.

2. DEFINITION

PS- + PE-halt: substansens massfraktion bestäms genom det förfarande som specificeras här. Resultatet uttrycks i milligram fosfatidyletanolamindipalmitoyl (FEDP) per 100 g pulver.

3. PRINCIP

Extrakt av aminofosfolipider genom metanol från rekonstituerat mjölkpulver. Bestämning av PS och PE som o-ftaldialdehydderivat genom HPLC med omvänd fas och fluorescensdetektion. Kvantifiering av PS- och PE-halt i provet görs med hjälp av ett standardprov som innehåller en känd mängd FEDP.

4. REAGENSER

Alla reagenser ska vara av vedertagen analyskvalitet. Vattnet ska vara destillerat eller minst av motsvarande renhetsgrad om inte annat anges.

4.1 Standardmaterial: FEDP med en lägsta renhetsgrad av 99 %.

Anm.: Standardmaterial ska lagras vid – 18 °C.

4.2 Reagenser för standardprov och provberedning**4.2.1 Metanol av HPLC-kvalitet****4.2.2 Kloroform av HPLC-kvalitet****4.2.3 Tryptaminmonohydroklorid****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****4.4.1 Elueringslösningarna ska beredas med reagenser av HPLC-kvalitet****4.4.2 Vatten av HPLC-kvalitet****4.4.3 Metanol av fluorimetriskt testad renhet****4.4.4 Tetrahydrofuran****4.4.5 Natriumdivätefosfat****4.4.6 Natriumacetat****4.4.7 Ättiksyra**

5. UTRUSTNING

5.1 **Analysvåg med kapacitet att väga på 1 mg när, med en avläsbarhet på 0,1 mg**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 **Sprutor på 20 och 100 µl**5.8 **Ultraljudsbad**5.9 **Centrifug med kapaciteten 27 000 × g**5.10 **Provrör på ca 5 ml**5.11 **Graderat mätklas på 25 ml**5.12 **pH-meter med 0,1 pH-enheters noggrannhet**5.13 **HPLC-utrustning:**5.13.1 *Gradientpumpsystem med en kapacitet på 1,0 ml/min vid 200 bar*5.13.2 *Automatisk provtagare med derivatiseringsmöjlighet*5.13.3 *Kolonnvärmare som kan hålla en kolonn temperatur på 30 °C ± 1 °C*5.13.4 *Fluorescensdetektor med 330 nm excitationsvåglängd och 440 nm emissionsvåglängd*5.13.5 *Integrator eller databehandlingsprogram för mätning av topparea*5.13.6 *En LiChrospher® – 100-kolonn (250 × 4,6 mm) eller en motsvarande kolonn packad med oktadecylsilan (C18), 5 µm partikelstorlek*

6. PROVTAGNING

Provtagningen ska ske i enlighet med ISO-standard 707.

7. FÖRFARANDE

7.1 **Beredning av intern standardlösning**7.1.1 *Väg upp 30,0 ± 0,1 mg tryptaminmonohydroklorid (4.2.3) i en mätkolv på 100 ml (5.6) och späd till markeringen med metanol (4.2.1).*7.1.2 *Pipettera 1 ml av denna lösning (5.3) i en 10 ml mätkolv (5.6) och späd till markeringen med metanol (4.2.1) för att få en 0,15 mM tryptaminkoncentration.*7.2 **Beredning av provlösning**7.2.1 *Väg upp 1,000 ± 0,001 g skummjölkspulver i en glasbägare på 25 ml (5.2). Tillsätt 10 ml destillerat vatten med en temperatur på 40 °C ± 1 °C med en pipett (5.3) och rör om med magnetomröraren (5.4) under 30 minuter för att lösa upp eventuella klumpar.*7.2.2 *Pipettera 0,2 ml (5.5) av den rekonstituerade mjölken i en 10 ml mätkolv (5.6). Tillsätt 100 µl 0,15 mM tryptaminlösning (7.1) med hjälp av en spruta (5.7) och späd med metanol (4.2.1). Blanda noggrant genom att vända kolven upprepade gånger och ultraljudsbehandla (5.8) i 15 minuter.*7.2.3 *Centrifugera (5.9) vid 27 000 g × g i 10 minuter och samla upp supernatanten i ett provrör (5.10).*

Anm.: Provlösningen ska förvaras vid 4 °C tills HPLC-analysen ska utföras.

7.3 Beredning av extern standardlösning

- 7.3.1 Väg upp 55,4 mg FEDP (4.1) i en 50 ml mätkolv (5.6) och tillsätt ca 25 ml kloroform (4.2.2) med hjälp av ett graderat mätglas (5.11). Värm upp den förslutna kolven till 50 °C ± 1 °C och blanda försiktigt tills FEDP löser sig. Kyl ned kolven till 20 °C och späd sedan till märket med metanol (4.2.1). Blanda genom att vända kolven upp och ned upprepade gånger.
- 7.3.2 Pipettera 1 ml (5.3) av denna lösning i en 100 ml mätkolv (5.6) och späd till märket med metanol (4.2.1). Pipettera 1 ml (5.3) av denna lösning i en 10 ml mätkolv (5.6), tillsätt 100 µl (5.7) 0,15 mM tryptaminlösningen (7.1) och späd till märket med metanol (4.2.1). Blanda genom att vända kolven upp och ned upprepade gånger.

Anm. Referensprovlösningen ska förvaras vid 4 °C tills HPLC-analysen ska utföras.

7.4 Beredning av derivatiseringsreagens

Väg upp 25,0 ± 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 o-ftaldialdehyden. Späd till markeringen med borsyralösning (4.3.2) och tillsätt 20 µl av 2-merkaptoetanol (4.3.3) med en spruta (5.7).

Anm.: Derivatiseringsreagentet ska förvaras vid 4 °C i en brun glasflaska och är stabilt under en vecka.

7.5 Bestämning med HPLC

7.5.1 Elueringslösningar (4.4)

Lösning A: Lösning av 0,3 mM natriumvätefosfat och 3 mM natriumacetat (justerad till pH 6,5 ± 0,1 med ättiksyra): metanol: tetrahydrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Lösning B: metanol

7.5.2 Föreslagen elueringsgradient:

Tid (min)	Lösning A (%)	Lösning B (%)	Flödes hastighet
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

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

Kolonntemperatur: 30 °C.

7.5.3 *Injiceringsvolym: 50 µl derivatiseringsreagens och 50 µl provlösning*

7.5.4 *Jämviktning av kolonnen*

När systemet startas för dagligt bruk: spola kolonnen med 100-procentig lösning B i 15 minuter, ställ sedan in A: B = 40: 60 och jämvikta vid 1 ml/min under 15 minuter. Kör ett blankprov genom att injicera metanol (4.2.1).

Anm.: Spola kolonnen med metanol:kloroform = 80: 20 (v/v) under 30 minuter före långvarig förvaring.

7.5.5 *Bestämning av PS- + PE-halt i provet*

7.5.6 *Gennomför 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 beräkna responsfaktorn.*

Anm.: Kolonnen ska rengöras genom spolning med 100-procentig B-lösning (7.5.1) under minst 30 minuter vid var 20:e till 25:e provomgång.

7.6 Integrering

7.6.1 *FEDP-topp*

FEDP elueras som en enkel topp. Bestäm toppens höjd genom dal till dal-integrering.

7.6.2 *Tryptamintopp*

Tryptamin elueras som en enkel topp (figur 1). Bestäm toppens höjd genom dal-till-dal-integrering.

7.6.3 *Grupperade PS- och PE-toppar*

Under de betingelser som beskrivs (figur 1), elueras PS som två delvis separerade huvudtoppar som föregås av en mindre topp. PE elueras som tre delvis separerade huvudtoppar. Bestäm hela arean för respektive toppkluster genom att en baslinje dras på det sätt som visas i figur 1.

8. BERÄKNING OCH RESULTAT

PS- och PE-halt i provet ska beräknas enligt följande:

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

där:

C = PS- eller PE-halten (mg/100 g pulver) i provet,

A₁ = FEDP-topparean för standardprovlösningen (7.3),

A₂ = PS- eller PE-topparean för provlösningen (7.2),

T₁ = tryptamintopparean för standardprovlösningen (7.3),

T₂ = tryptamintopparean för provlösningen (7.2).

9. METODENS NOGGRANNHET

Anm.: Värden för repeterbarhet har beräknats enligt IDF:s internationella standard (*).

9.1 Repeterbarhet

Den relativa standardavvikelsen för repeterbarheten, som uttrycker variabiliteten i av varandra oberoende analytiska resultat som har erhållits av samma person under användning av samma utrustning, under samma betingelser på samma prov inom ett kort tidsintervall, bör inte överskrida ett relativvärde på 2 %. Om två bestämningar erhålls under dessa betingelser, bör motsvarande skillnad mellan resultaten inte vara större än 6 % av resultatets aritmetiska medelvärde.

9.2 Reproducerbarhet

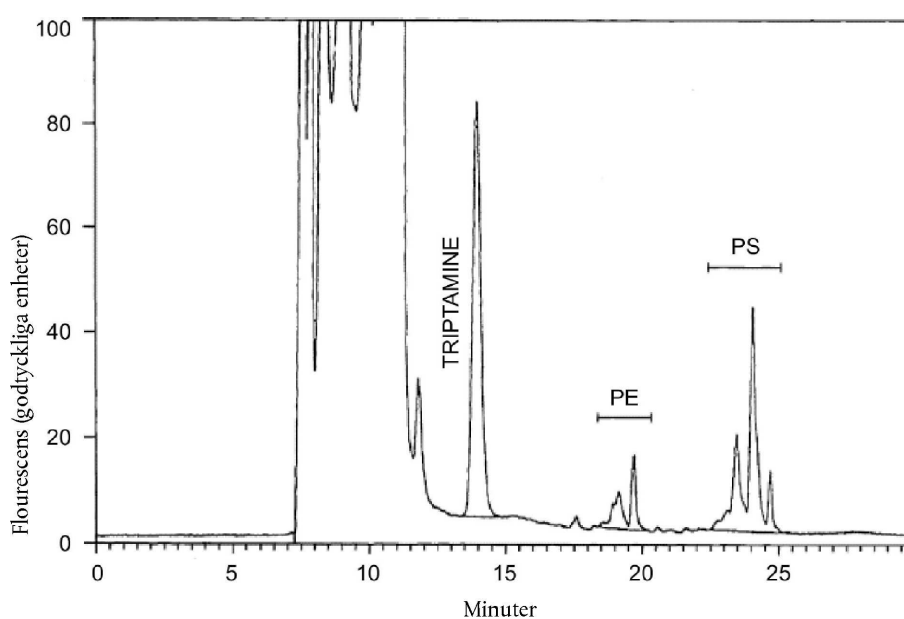
Om två bestämningar erhålls från personer i olika laboratorier under användning av olika utrustning under olika betingelser för analys av samma prov, bör den relativa skillnaden mellan de två resultaten inte vara större än 11 % av resultatets aritmetiska medelvärde.

10. REFERENSER

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

Figur 1

HPLC-mönster för o-ftaldialdehydderivat av fosfatidylserin (PS) och fosfatidyletanolamin (PE) i metanolextrakt av rekonstituerat skummjölkspulver. Integrationstyp för PS-, PE- och tryptamintoppar (intern standard) rapporteras



Tillägg II

PÅVISANDE AV LÖPEVASSLE I SKUMMJÖLKSPULVER AVSETT FÖR OFFENTLIG LAGRING GENOM BESTÄMNING AV KASEINMAKROPEPTIDER MED HÖGUPPLÖSANDE VÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)**1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE**

Med denna metod kan löpevassle påvisas i skummjölkspulver avsett för offentlig lagring genom bestämning av kaseinmakropeptider.

2. HÄNVISNING

ISO 707, Milk and milk products – Guidance on sampling.

3. DEFINITION

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

4. PRINCIP

— Skummjölkspulvret rekonstitueras i vatten, fett och proteiner avlägsnas med triklorättiksyra, varefter lösningen centrifugeras eller filtreras.

— Bestämning av kvantiteten kaseinmakropeptider (CMP) i supernatanten med högupplösande vätskekromatografi (HPLC).

— Bedömning av det resultat som erhålls från proverna görs med hjälp av standardprover som består av skummjölkspulver med eller utan tillsats av en känd procentandel vasslepulver.

5. REAGENSER

Alla reagenser ska vara av vedertagen analyskvalitet. Vattnet ska vara destillerat vatten eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad.

5.1 Triklorättiksyralösning

Lös 240 g triklorättiksyra (CCl_3COOH) i vatten och späd till 1 000 ml. Lösningen ska vara klar och färglös.

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 ca 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.

Anm.: Eluentsammansättningen kan uppdateras för att överensstämja med certifikatet för standarderna eller rekommendationer från tillverkaren av kolonnpackningsmaterialet.

Före användning ska elueringslösningen filtreras genom ett membranfilter med pordiametern 0,45 μm .

5.3 Tvättvätska

Blanda en del acetonitril (CH_3CN) med nio delar vatten. Före användning ska blandningen filtreras genom ett membranfilter med pordiametern 0,45 μm .

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

5.4 Standardprover**5.4.1 Skummjölkspulver som uppfyller kraven i denna förordning (dvs. [0])****5.4.2 Samma skummjölkspulver uppblandat med 5 % (viktprocent) vasslepulver av löpetyp med en standardsammansättning (dvs. [5])**

6. UTRUSTNING

6.1 Analysvåg

6.2 Om så önskas centrifug med kapacitet för en centrifugalkraft på 2 200 g, utrustad med proppförsedda centrifugrör som rymmer ca 50 ml

6.3 Mekanisk skakapparat

6.4 Magnetomrörare

6.5 Glastrattar, diameter ca 7 cm

6.6 Filterpapper, medelfint, diameter ca 12,5 cm

6.7 Glasfilterutrustning med membranfilter med pordiameter 0,45 µm

6.8 Graderade pipetter som medger tillförsel av 10 ml (ISO 648, klass A, eller ISO/R 835), eller ett dispenseringsystem som kan tillföra 10,0 ml på 2 minuter

6.9 Dispenseringsystem som kan tillföra 20,0 ml vatten vid ca 50 °C

6.10 Termostatstyrt vattenbad, inställt på $25 \pm 0,5$ °C

6.11 HPLC-utrustning bestående av följande:

6.11.1 Pump

6.11.2 Injektor, manuell eller automatisk, med kapaciteten 15–30 µl

6.11.3 Två seriekopplade kolonner TSK 2 000-SW (längd 30 cm, innerdiameter 0,75 cm) eller motsvarande kolonner (t.ex. en TSK 2 000-SWxl, en Agilent Technologies Zorbax GF 250) med förkolonn (3 cm × 0,3 cm) fylld med I 125 eller material som är lika effektivt

6.11.4 Termostatstyrd kolonnugn, inställd på 35 ± 1 °C

6.11.5 UV-detektor, variabel våglängd, som medger mätningar vid 205 nm med en känslighet på 0,008 Å

6.11.6 Integrator som medger dal-till-dal-integrering

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

7. PROVTAGNING

7.1 Provtagningen ska göras i enlighet med internationell standard ISO 707. Medlemsstaterna får dock använda andra provtagningsmetoder om dessa är likvärdiga med nämnd standard

7.2 Proverna ska förvaras under förhållanden som förhindrar nedbrytning eller förändring i sammansättningen

8. FÖRFARANDE

8.1 Provberedning

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 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 ml varmt vatten (50 °C) till det uppvägda provet. Lös pulvret genom att skaka det 5 minuter i mekanisk skakapparat (6.3). Ställ röret i vattenbad (6.10) och temperera vid 25 °C

8.3.2 Tillsätt under två minuter 10,0 ml triklorättiksyralösningen (5.1) med en temperatur på 25 °C under omrörning med magnetomröraren (6.4). Placera röret i vattenbad (6.10) och låt det stå 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 Injicera 15–30 µl noggrant uppmätt supernatant eller filtrat (8.3.3) i HPLC-apparaten (6.11) med en flödes hastighet av 1,0 ml elueringslösning (5.2) per minut

Anm. 1: En annan flödes hastighet kan användas beroende på kolonnernas innerdiameter eller anvisningar från kolonntillverkaren.

Anm. 2: Skölj kolonnerna med vatten under varje uppehåll. Lämna aldrig elueringslösningen i dem (5.2).

För varje uppehåll på mer än 24 timmar ska kolonnerna sköljas med vatten och sedan tvättas 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 CMP med en retentionstid av 15,5 minuter.

Valet av kolonn(er) kan påverka de enskilda topparnas retentionstid.

Integratorn (6.11.6) beräknar automatiskt arean A för varje topp:

A _{II} :	arean av topp II
A _{III} :	arean av topp III

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 standardproverna (5.4)

Använd nyberedda lösningar eftersom CMP bryts ned i 8-procentig triklorättiksyralösning. Förlusten kan uppskattas till 0,2 % per timme vid 30 °C.

8.5.2 Före kromatografisk analys av proverna, fukta kolonnerna genom att upprepade gånger injicera standardprov (5.4.2) i lösning (8.5.1) tills arean och retentionstiden för toppen som motsvarar CMP är konstanta

8.5.3 Bestäm responsfaktorerna R genom att injicera samma volym filtrat (8.5.1) som används i proverna

9. RESULTATANGIVELSE

9.1 Beräkningsmetod och formler

9.1.1 Beräkning av responsfaktorerna R:

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

där:

R_{II} = responsfaktorn för topp II,

$A_{II} [0]$ = arean för standardprovets topp II [0] som erhållits i 8.5.3.

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

där:

- R_{III} = responsfaktorn för topp III,
 $A_{III}[0]$ och $A_{III}[5]$ = areorna för topp III i standardprov [0] respektive [5] som erhållits 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 för topp II, III respektive IV i provet [E],
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = areorna för topp II respektive III i provet [E] som erhållits i 8.4.2,
 R_{II} , R_{III} = responsfaktorerna beräknade i 9.1.1.

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

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

där:

- $RRT_{III}[E]$ = den relativa retentionstiden för topp III i provet [E],
 $RT_{III}[E]$ = retentionstiden för topp III i provet [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 procentandelen 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 ≤ 5 %.

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

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

9.2 Beräkning av procentandelen löpevasslepulver i provet:

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

där:

- W = procentandelen (viktprocent) löpevassle i provet [E],
 $S_{III}[E]$ = Den relativa arean för topp III i provet [E] som erhållits i 9.1.2,
 $1,3$ = representerar den relativa genomsnittliga arean för topp III uttryckt i gram löpevassle per 100 g, fastställd i oblandat skummjölkspulver av olika ursprung. Denna siffra har erhållits genom experiment,
 $S_{III}[0]$ = representerar den relativa arean för 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 som ska göras av den relativa genomsnittliga arean 1,3, då $S_{III}[0]$ avviker från 0,9. Enligt experiment är den relativa genomsnittliga arean för topp III för kontrollprovet [0] 0,9.

9.3 Metodens noggrannhet

9.3.1 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts samtidigt eller med ett kort tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 0,2 viktprocent.

9.3.2 Reproducerbarhet

Skillnaden mellan två individuella och av varandra oberoende resultat erhållna från två olika laboratorier på identiskt provmaterial får inte överstiga 0,4 viktprocent.

9.4 Tolkning

9.4.1 Vassle förekommer inte om den relativa arean av topp III, S_{III} [E] uttryckt i gram löpavassle 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 genomsnittliga 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 ska 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, $S_{II}[E] \leq 160$, bestäms löpavasslehalten 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, $S_{II}[E] \leq 160$, bestäms den totala proteinhalten (P %) och därefter undersöks figur 1 och 2.

9.4.3.1 Data som erhållits efter analys av prover av oblandat skummjölkspulver med hög total proteinhalt 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:

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

där:

S_{III} är den relativa arean av topp III beräknad antingen enligt den totala proteinhalten eller enligt den relativa arean av topp $S_{II}[E]$,

P % är den totala proteinhalten uttryckt som viktprocent,

$S_{II}[E]$ 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 relativa arean $S_{III}[E]$ och den relativa arean S_{III} fås enligt följande: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$; $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

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

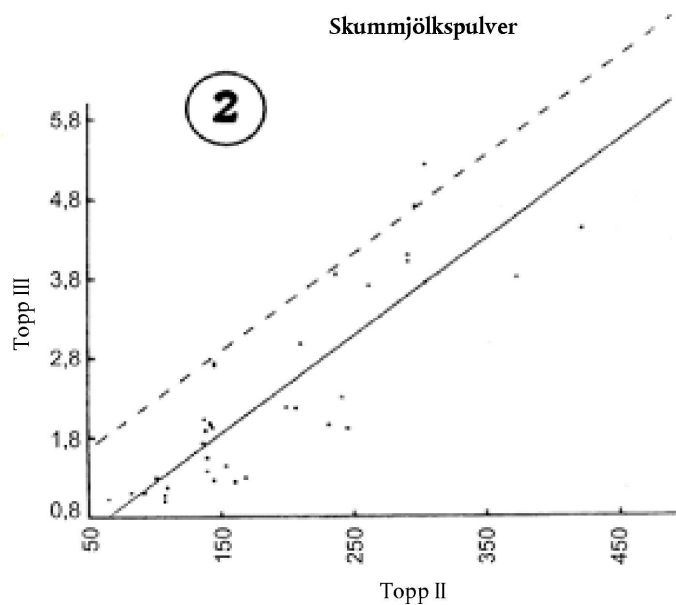
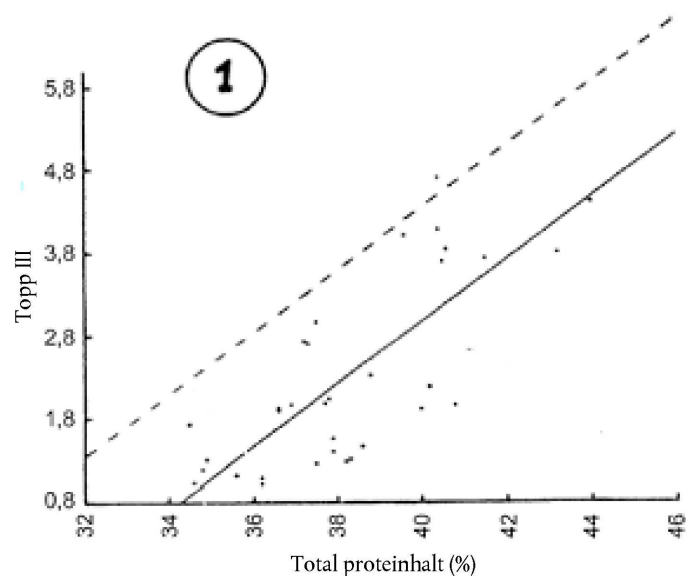
Om T_1 och T_2 överstiger noll förekommer löpessle.

Halten löpessle beräknas enligt följande formel: $W = T_2 + 0,91$

där:

0,91 är avståndet på den vertikala axeln mellan den heldragna räta linjen och den streckade räta linjen.

Skummjölkspulver



Tillägg III

BESTÄMNING AV LÖPEVASSLEPULVER I SKUMMJÖLKSPULVER

1. SYFTE: PÅVISANDE AV TILLSATT LÖPEVASSLEPULVER I SKUMMJÖLK

2. REFERENSER: INTERNATIONELL STANDARD ISO 707

3. DEFINITION

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

4. PRINCIP

Prover analyseras med avseende på kaseinmakropeptid A genom högupplösande vätskekromatografi med omvänd fas (HPLC-metod). Bedömning av det erhållna resultatet görs med hjälp av standardprover som består av skummjölkspulver med eller utan tillsats av vasslepulver. Resultat över 1 viktprocent visar på förekomst av löpevasslepulver.

5. REAGENSER

Alla reagenser ska vara av vedertagen analyskvalitet. Vattnet ska vara destillerat vatten eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad. Acetonitril ska vara av spektroskopisk kvalitet eller HPLC-kvalitet.

5.1 **Triklorättiksyralösning**

Lös 240 g triklorättiksyra (CCl_3COOH) i vatten och späd till 1 000 ml. Lösningen ska vara klar och färglös.

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) i en 1 000 ml mätkolv. Späd till 1 000 ml med vatten.

Elueringslösning B: Blanda 550 ml acetonitril, 20 ml isopropanol och 1,00 ml TFA i en 1 000 ml mätkolv. Späd till 1 000 ml med vatten. Före användning ska elueringslösningen filtreras genom ett membranfilter med pordiametern 0,45 μm .

5.3 **Konservering av kolonnen**

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

5.4 **Standardprover**

5.4.1 Skummjölkspulver som uppfyller kraven på offentlig lagring (dvs. [0])

5.4.2 Samma skummjölkspulver uppblandat med 5 % (viktprocent) vasslepulver av löpetyp med en standardsammansättning (dvs. [5])

5.4.3 Samma skummjölkspulver uppblandat med 50 % (viktprocent) vasslepulver av löpetyp med en standardsammansättning (dvs. [50])

6. UTRUSTNING

6.1 **Analysvåg**

6.2 Om så önskas centrifug med kapacitet för en centrifugalkraft på 2 200 g, utrustad med proppförsedda centrifugrör som rymmer ca 50 ml

6.3 **Mekanisk skakapparat**

6.4 **Magnetomrörare**

6.5 **Glastrattar, diameter ca 7 cm**

- 6.6 **Filterpapper, medelfint, diameter ca 12,5 cm**
- 6.7 **Glasfilterutrustning, membranfilter med pordiameter 0,45 µm**
- 6.8 **Graderade pipetter som medger tillförsel av 10 ml (ISO 648, klass A, eller ISO/R 835), eller ett dispenseringsystem som kan tillföra 10,0 ml på 2 minuter**
- 6.9 **Dispenseringsystem som kan tillföra 20,0 ml vatten vid ca 50 °C**
- 6.10 **Termostatstyrt vattenbad, inställt på 25 ± 0,5 °C**
- 6.11 **HPLC-utrustning bestående av följande:**
 - 6.11.1 *Pumpsystem för binära gradienter*
 - 6.11.2 *Injektor, manuell eller automatisk, med kapaciteten 100 µl*
 - 6.11.3 *En Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3-kolonn (längd 25 cm, innerdiameter 0,46 cm) eller en motsvarande grovporig kiselbaserad kolonn med omvänd fas*
 - 6.11.4 *Termostatstyrd kolonnugn, inställd på 35 ± 1 °C*
 - 6.11.5 *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)*
 - 6.11.6 *Integrator som kan ställas in för integrering med avseende på en gemensam baslinje eller en dal-till-dal-baslinje*

Anm.: 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 CMP_A.

7. PROVTAGNING

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

8. FÖRFARANDE

8.1 **Provberedning**

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 2,00 ± 0,001 g av provet i ett centrifugrör (6.2) eller i en lämpligt försluten kolv (50 ml).

Anm. Vid blandningar ska en så stor mängd prov vägas upp att det avfettade provet motsvarar 2,00 g.

8.3 **Borttagande av fett och proteiner**

- 8.3.1 *Tillsätt 20,0 ml varmt vatten (50 °C) till det uppvägdade provet. Lös pulvret genom att skaka det 5 minuter i mekanisk skakapparat (6.3). Ställ röret i vattenbad (6.10) och temperera vid 25 °C.*
- 8.3.2 *Tillsätt under två minuter 10,0 ml triklorättiksyralösningen (5.1) med en temperatur på ca 25 °C under omrörning med magnetomröraren (6.4). Placera röret i vattenbad (6.10) och låt det stå 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 *Genom att använda HPLC-metoden med omvänd fas utesluts risken för falskt positiva resultat på grund av förekomsten av pulver från syrad kärnmjölk.*

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

Använd lösningar av standardproverna (5.4) med och utan 50 % löpevassle.

Injicera 100 µl av supernatanten eller filtratet (8.3.3) i en HPLC-apparat som används enligt de kontrollgradientbetingelser som anges i tabell 1.

Tabell 1

Kontrollgradientbetingelser för optimering av kromatografin

Tid (min)	Flöde (ml/min)	% A	% B	Kurva
Initial	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	linjär
32	1,0	10	90	linjär
37	1,0	10	90	linjär
42	1,0	90	10	linjär

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

Vid hjälp av nedanstående formel kan den ursprungliga sammansättningen för det lösningsmedel som kommer att användas för den normala gradienten (se 8.4.3) beräknas: $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26)/6) \times 30/27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26)/6) \times 1,11$

där:

RT_{CMP_A} = retentionstiden för CMP_A vid användning av kontrollgradienten,

10 = den ursprungliga % B för kontrollgradienten,

2,5 = % B vid medelpunkten minus % B vid start vid användning av normalgradienten,

13,5 = medelpunkttiden för kontrollgradienten,

26 = nödvändig retentionstid för CMP_A ,

6 = förhållandet mellan kontroll- och normalgradientens lutning,

30 = % B vid start minus % B vid 27 minuter vid användning av kontrollgradienten

27 = kontrollgradientens löptid.

8.4.3 Analysera provlösningarna:

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 från 8.4.2. Normalt är den nära A:B = 76:24 (5.2). Omedelbart efter injiceringen påbörjas en linjär gradient så att B har höjts 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 injicering ske 15 minuter efter det att de ursprungliga förhållandena har uppnåtts.

Anm. 1: Retentionstiden för CMP_A bör vara 26 ± 2 minuter. Detta kan uppnås genom att start- och slutbetingelserna för den första gradienten varieras. Skillnaden i % B för start- och slutbetingelserna för den första gradienten måste dock fortfarande vara 5 % B.

Anm. 2: Elueringslösningarna bör avgasas tillräckligt och bör också förbli avgasade. Detta är viktigt för att gradientpumpsystemet ska kunna arbeta på rätt sätt. Standardavvikelsen för retentionstiden för CMP_A-toppen bör vara mindre än 0,1 minuter (n = 10).

Anm. 3: Efter vart femte prov bör referensprovet [5] injiceras och användas för att beräkna en ny responsfaktor R (9.1.1).

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

Integratorn (6.11.6) beräknar automatiskt topphöjden H för CMP_A-toppen. Baslinjens läge bör kontrolleras i varje kromatogram. Analysen eller integrationen bör upprepas om baslinjens läge inte var korrekt.

Anm.: Om CMP_A-toppen är tillräckligt separerad från de andra topparna ska en dal-till-dal-baslinje dras. I annat fall ska linjer dras vinkelrätt mot en gemensam baslinje, vars startpunkt ska ligga nära CMP_A-toppen (dvs. inte vid t = 0 minuter!). Använd samma integreringsmetod för standard och prover och kontrollera, om metoden med gemensam baslinje används, att baslinjen överensstämmer för prover och standard.

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 standardproverna (5.4.1–5.4.2). Använd nyberedda lösningar, eftersom CMP bryts ned 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.

Anm.: 8.4.2 kan utelämnas om % B vid startbetingelserna är känd från tidigare analyser.

Kromatogrammet för referensprovet [5] bör motsvara figur 1. I denna figur föregås CMP_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 proverna.

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

- 8.5.3 Bestäm responsfaktorn R genom att injicera samma volym filtrat (8.5.1) som används i proverna.

9. RESULTATANGIVELSE

9.1 Beräkningsmetod och formler

- 9.1.1 Beräkning av responsfaktorn R

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

där:

R = responsfaktorn för CMP_A-toppen,

H = CMP_A-toppens höjd,

W = vasslemängden i standardprovet [5].

9.2 Beräkning av procentandelen löpavasslepulver i provet

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

där:

$W(E)$ = procentandelen (viktprocent) löpavassle i provet (E),

R = responsfaktorn för CMP_A -toppen (9.1.1),

$H(E)$ = höjden på provets (E) CMP_A -topp.

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

9.3 Metodens noggrannhet

9.3.1 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts samtidigt eller med ett kort tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 0,2 viktprocent.

9.3.2 Reproducerbarhet

Inte fastställd.

9.3.3 Linjäritet

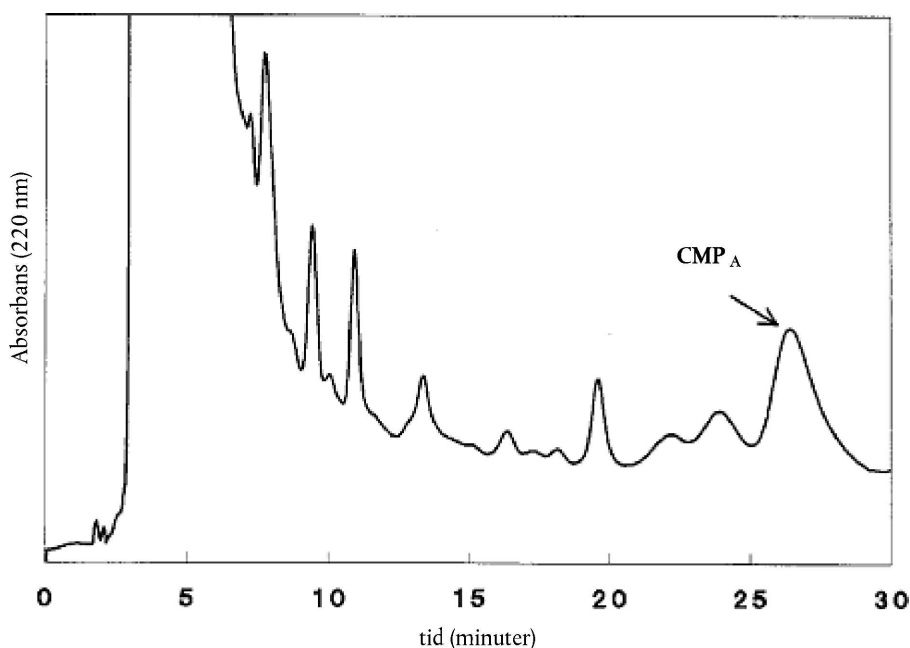
För mellan 0 % och 16 % löpavasslehalt bör ett linjärt förhållande uppnås med en korrelationskoefficient som är $> 0,99$.

9.4 Tolkning

Gränsen på 1 % innefattar osäkerhet på grund av reproducerbarhet.

Figur 1

Ni-4.6 standard



(*) Internationell standard IDF 135B:1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure."

3. Följande bilagor ska läggas till:

"BILAGA VI

Metoder för analys av smör vid privat lagring

Parameter	Metod
Fett ⁽¹⁾	ISO 17189 eller ISO 3727 del 3
Vatten	ISO 3727 del 1
Fettfri torrs substans (med undantag för salt)	ISO 3727 del 2
Salt	ISO 15648

⁽¹⁾ Den metod som används ska ha godkänts av det utbetalande organet.

BILAGA VII

Metoder för analys av skummjörkspulver vid privat lagring

Parameter	Metod
Fett	ISO 1736
Proteiner	ISO 8968 del 1
Vatten	ISO 5537

BILAGA VIII

Metoder för analys av ost vid privat lagring

1. Den analysmetod som anges i tillägget ska användas för att säkerställa att ost som uteslutande är framställd av mjölk från tackor, getter eller bufflar eller av en blandning av mjölk från tackor, getter och bufflar inte innehåller komjölkskasein.

Komjölkskasein ska anses förekomma om halten komjölkskasein i det prov som analyseras är lika med eller är högre än halten i det referensprov som innehåller 1 % komjölk enligt tillägget.

2. De metoder för att påvisa komjölkskasein i ost som avses i punkt 1 får användas förutsatt att
 - a) detektionsgränsen är högst 0,5 %,
 - b) det inte förekommer några falskt positiva resultat,
 - c) det är möjligt att påvisa komjölkskasein med erforderlig noggrannhet, även efter de långa mognadsperioder som kan förekomma under vanliga handelsförhållanden.

Om något av ovanstående villkor inte är uppfyllt ska de metoder som anges i tillägget användas.

Tillägg

METOD FÖR ATT PÅVISA KOMJÖLK OCH KASEINAT I OST SOM ÄR TILLVERKAD AV MJÖLK FRÅN TACKOR, GETTER ELLER BUFFLAR ELLER BLANDNINGAR AV MJÖLK FRÅN TACKOR, GETTER OCH BUFFLAR**1. SYFTE**

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

2. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

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

3. 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 fokusering av de plasminbehandlade kaseinerna i närvaro av urea och färgning av proteinerna****3.4 Bedömning 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 ska kemikalier av analyskvalitet användas. Vattnet ska vara dubbeldestillerat eller av motsvarande renhetsgrad.

Anm.: 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 Stamgellösning**

Lös

4,85 g akrylamid

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

48,05 g urea

15,00 g glycerol (87 viktprocent)

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

Anm.: 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 ska en volym på 16,2 ml användas i sammansättningen 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 m 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

250 μ l amfolyt pH 5–7

250 μ l amfolyt pH 6–8

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

Anm.: Bered gellösningen omedelbart före upphällningen (se 6.2).

4.1.3 Katalysatorlösningar

4.1.3.1 N, 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.

Anm.: Använd alltid nyblandad PER-lösning.

4.2 **Kontaktvätska**

Fotogen eller flytande paraffin.

4.3 **Anodlösning**

Lös 5,77 g fosforsyra (85 viktprocent) i vatten och späd med vatten till 100 ml.

4.4 **Katodlösning**

Lös 2,00 g natriumhydroxid i vatten och späd med vatten till 100 ml.

Provberedning

4.5 **Reagenser för proteinisolering**

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

4.5.2 Diklormetan

4.5.3 Aceton

4.6 **Proteinupplösande buffert**

Lös

5,75 g glycerol (87 viktprocent),

24,03 g urea,

250 mg ditiotreitol

i vatten och späd till 50 ml.

Anm.: Förvaras i kylskåp, hållbar i högst en vecka.

4.7 Reagenser till plasminspjälkning av kaseiner

4.7.1 Ammoniumkarbonatbuffert

Titra en 0,2 mol/l ammoniumvätekarbonatlösning (1,58 g/100 ml vatten) som innehåller 0,05 mol/l etylendiamintetraättiksyra (EDTA, 1,46 g/100 ml) med en 0,2 mol/l ammoniumkarbonatlösning (1,92 g/100 ml vatten) som innehåller 0,05 mol/l EDTA till pH 8.

4.7.2 Bovin plasmin (EC. 3.4.21.7), aktivitet minst 5 IE/ml

4.7.3 ϵ -Aminokapronsyralösning för enzyminhibition

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

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 interimstandarder för laboratoriebruk av buffelmjolk som behandlats 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 %-standardlösning bereds genom att 5,00 ml skummjolk från ko tillsätts till 495 ml skummjolk från buffel i 1-litersbägare och pH-värdet justeras till 6,4 genom tillsats av utspädd mjölksyra (10 % w/v). Ställ in temperaturen på 35 °C och tillsätt 100 μ l 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, frystorkas all den löpebehandlade mjölken utan föregående homogenisering eller avrinning av vasslen. Efter frystorkningen mals produkten fint till ett homogent pulver. Använd samma förfarande för att bereda 0 %-standardlösningen av ren skummad buffelmjolk. Standardlösningarna ska förvaras vid – 20 °C.

Anm.: Kontrollera buffelmjölakens renhet genom isoelektrisk fokusering av plasminbehandlade kaseiner innan standardlösningarna bereds.

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 isättika med destillerat vatten till 2 000 ml.

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

4.11 Färgningslösningar

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 omrörare (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 Färgningslösning (arbetslösning)

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

Anm.: Färgningslösningen bör beredas samma dag som den ska användas.

5. UTRUSTNING

- 5.1 **Glasplattor (265 × 125 × 4 mm) gummirulle (15 cm bred) vågrätt underlag**
- 5.2 **Gelbärrarfolie (265 × 125 mm)**
- 5.3 **Täckfolie (280 × 125 mm) Fäst en tejpremsa (280 × 6 × 0,25 mm) längs vardera långsidan (se figur 1)**
- 5.4 **Elektrofokuseringskammare med kylplatta (t.ex. 265 × 125 mm) med lämplig spänningskälla ($\geq 2,5$ kV) eller automatisk elektroforesapparat**
- 5.5 **Cirkulationskryostat, termostatstyrd vid $12 \pm 0,5$ °C**
- 5.6 **Centrifug, justerbar till 3 000 g**
- 5.7 **Elektrodremsor (≥ 265 mm långa)**
- 5.8 **Dropplaskor av plast till anod- och katodlösningarna**
- 5.9 **Provapplikatorer (10 × 5 mm, viskosfilterpapper eller filterpapper för låg proteinabsorption)**
- 5.10 **Färgningsskålar och avfärgningsskålar av rostfritt stål eller glas (t.ex. 280 × 150 mm instrumentbrickor)**
- 5.12 **Justerbar homogenisator med stång (10 mm diameter), varvtalsintervall 8 000–20 000.**
- 5.13 **Magnetomrörare**
- 5.14 **Ultraljudsbad**
- 5.15 **Foliesvets**
- 5.16 **25 µl mikropipetter**
- 5.17 **Vakuumindunstare 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. FÖRFARANDE

6.1 **Provberedning**6.1.1 *Isolering av kaseiner*

Väg upp en mängd som motsvarar 5 g torr ost eller referensstandarderna i ett 100 ml centrifugrör, tillsätt 60 ml destillerat vatten och homogenisera med en homogenisator med stång (8 000–10 000 varv/minut). Justera pH-värdet till 4,6 med utspädd ättiksyra (4.5.1) och centrifugera (5 minuter, 3 000 g). Avlägsna fett och vasslen och homogenisera återstoden vid 20 000 varv/min i 40 ml destillerat vatten som justerats till pH 4,5 med utspädd ättiksyra (4.5.1), tillsätt 20 ml diklormetan (4.5.2) och 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) och centrifugera. Upprepa detta förfarande tills båda extraktionsfaserna är färglösa (två eller tre gånger). Homogenisera proteinresterna med 50 ml 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.

Anm.: Torra kaseinisolat ska förvaras vid -20 °C.

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

Slamma upp 25 mg isolerade kaseiner (6.1.1) i 0,5 ml ammoniumkarbonatbuffert (4.7.1) och homogenisera under 20 minuter, exempelvis genom 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), och tillsätt sedan 200 mg fast urea och 2 mg ditiotreitol.

Anm.: För att få de fokuserade kaseinbanden mer symmetriska rekommenderas att lösningen frystorkas efter tillsättning av ϵ -aminokapronsyrans och att resterna löses i 0,5 ml proteinupplösande buffert (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 Temed (4.1.3.1) till den förbehandlade och avgasade gellösningen (4.1.2), rör om och tillsätt 10 µl Per-lösning (4.1.3.2), blanda noggrant och håll omedelbart ut ett jämnt lager på mitten av täckfolien. Placera ena sidan av gelbärfoliet (med folien nedåt) på täckfolieplattan och sänk ned den långsamt så att en gelfilm bildas mellan folierna och sprids ut jämnt utan bubblor (figur 3). Sänk försiktigt ned hela gelbärfoliet med hjälp av en tunn spatel och placera ytterligare tre glasplattor ovanpå den som vikter. När polymeriseringen är avslutad (efter ca 60 minuter) överför den polymeriserade gelen till gelbärfoliet tillsammans med täckfolien genom att vicka på glasplattorna. Rengör baksidan av gelbärfoliet försiktigt från gelrester och urea. Svetsa "gelsandwichen" till ett folierör, som förvaras i kylskåp (högst 6 veckor).

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

6.3 Isoelektrisk fokusering

Ställ in kyltermostaten på 12 °C. Torka av baksidan på gelbärfoliet med fotogen och droppa sedan några droppar fotogen (4.2) på mitten av kylblocket. Rulla därefter ut gelsandwichen på den (med bärsidan nedåt) och se till att det inte bildas några bubblor. Torka av eventuellt överflödigt fotogen och ta bort täckfoliet. Dränk in elektrodremsorna med elektrodlösningarna (4.3 och 4.4), skär till dem till samma längd som gelen 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 (mA)	Effekt (W)	Volttimmar (Vh)
1. Förfokusering	30	högst 2 500	högst 15	konstant 4	cirka 300
2. Provfokusering ⁽¹⁾	60	högst 2 500	högst 15	konstant 4	cirka 1 000
3. Slutfokusering	60	högst 2 500	högst 5	högst 20	cirka 3 000
	40	högst 2 500	högst 6	högst 20	cirka 3 000
	30	högst 2 500	högst 7	högst 25	cirka 3 000

⁽¹⁾ Provapplikation: Efter förfokusering (steg 1) pipetteras 18 µl av prov- och standardlösningarna på provapplikatorerna (10 × 5 mm), som placeras på gelen på ett avstånd av 1 mm från varandra och 5 mm i längsriktningen från anoden och trycks ned lätt. Genomför fokuseringen enligt ovanstående betingelser och avlägsna försiktigt provapplikatorerna efter 60 minuters provfokusering.

Anm.: Om gelernas tjocklek eller bredd ändras måste strömstyrkan och effekten justeras därefter (dubblera t.ex. strömstyrkan och effekten 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	Effekt	Temp.	Volttimmar
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. Fokusering	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Placera provapplikatoren i steg 2 vid 0 Vh.

Ta bort provapplikatoren i steg 2 vid 30 Vh.

6.4 Proteinfärgning

6.4.1 Proteinfixering

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

6.4.2 Tvättning och färgning av gelplattan

Låt fixeringsvätskan rinna av ordentligt och tvätta gelplattan två gånger under 30 sekunder med 100 ml avfärgningslösning (4.10) per gång. Häll 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 15 minuter med 200 ml avfärgningslösning. Upprepa avfärgningen två eller tre gånger 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).

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

Anm. 2: Om en mer känslig silverfärgning önskas (t.ex. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code No 17-1150-01) måste plasminbehandlade kaseinprov spädas till 5 mg/ml.

7. BEDÖMNING

Bedömningen görs genom att proteinmönstret för det okända provet jämförs med referensstandarder på 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_3 - och γ_2 -kaseiner, vars isoelektriska punkter ligger mellan pH 6,5 och pH 7,5 (figurerna 4 a, 4 b och 5). Detektionsgränsen ligger under 0,5 %.

7.1 Visuellt bedömning

För visuellt bedömning av mängden komjolk rekommenderas att provernas och standardernas koncentration justeras till samma intensitetsnivå för γ_2 - och γ_3 -kaseinerna från mjölk från får, getter och bufflar (jfr " γ_2 E, G, B" och " γ_3 E, G, B" i figurerna 4 a, 4 b 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 4 a, 4 b och 5) med referensstandarder på 0 % och 1 % (tacka, get) eller med laboratoriets interimstandarder (buffel).

7.2 Densitometrisk bedömning

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

Anm.: Metoden fungerar tillfredsställande om det finns en tydlig positiv signal för både γ_2 - och γ_3 -kasein från komjölk i 1 %-referensstandard, men inte i 0 %-referensstandard. 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 motsvarande förhållanden mellan toppareorna är lika med eller större än nivån för 1 %-referensstandard.

8. REFERENSER

Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708–711 (1990).

Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83–85 (1995).

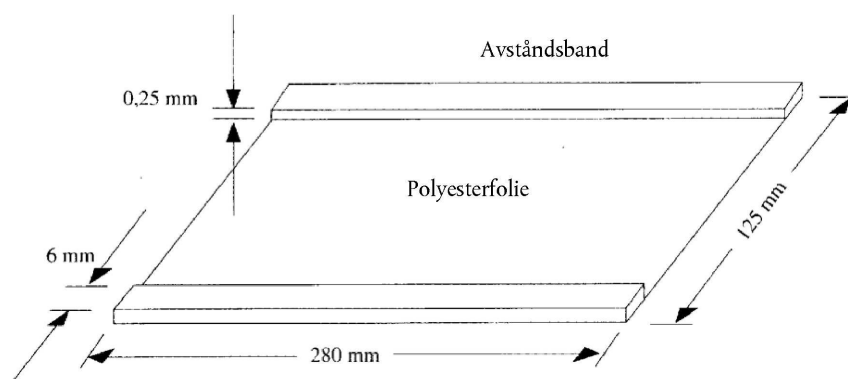
Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) s. 389–393,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

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

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

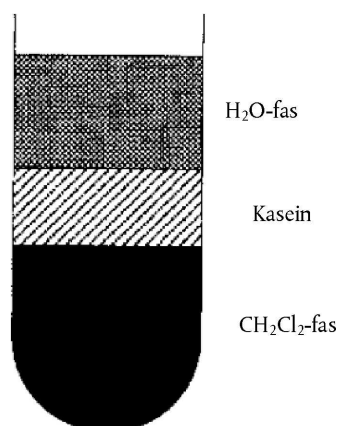
Figur 1

Schematisk bild av täckfolien



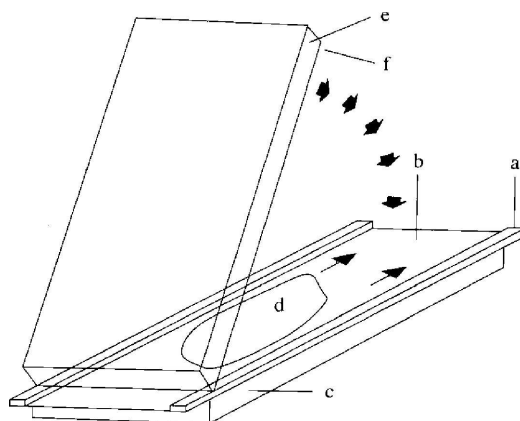
Figur 2

Kaseinlager som flyter mellan vattenfasen och den organiska fasen efter centrifugeringen



Figur 3

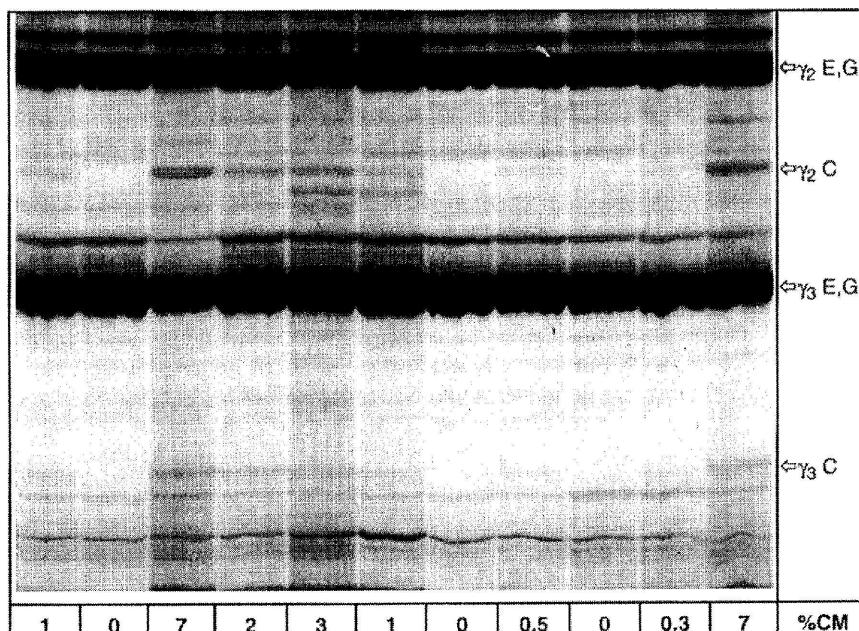
Vickningsteknik vid gjutning av ultratunna polyakrylamidgeler



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

Figur 4 a

Isoelektrisk fokusering av plasminbehandlade kaseiner från ost som tillverkats av mjölk från tackor och getter och som innehåller olika mängder komjolk

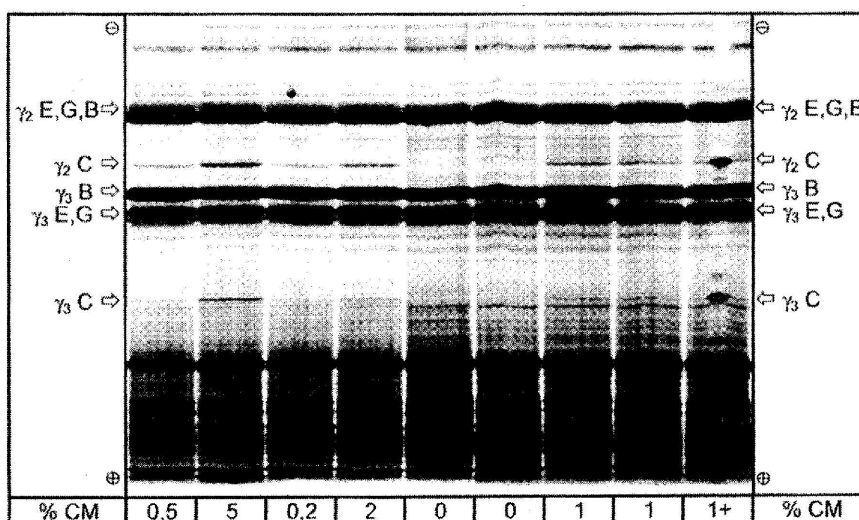


% CM = procent komjolk, C = ko, E = tacka, G = get

Den övre halvan av IEF-gelen visas.

Figur 4 b

Isoelektrisk fokusering av plasminbehandlade kaseiner från ost som tillverkats av blandningar av mjölk från tackor, getter och bufflar och som innehåller olika mängder komjolk

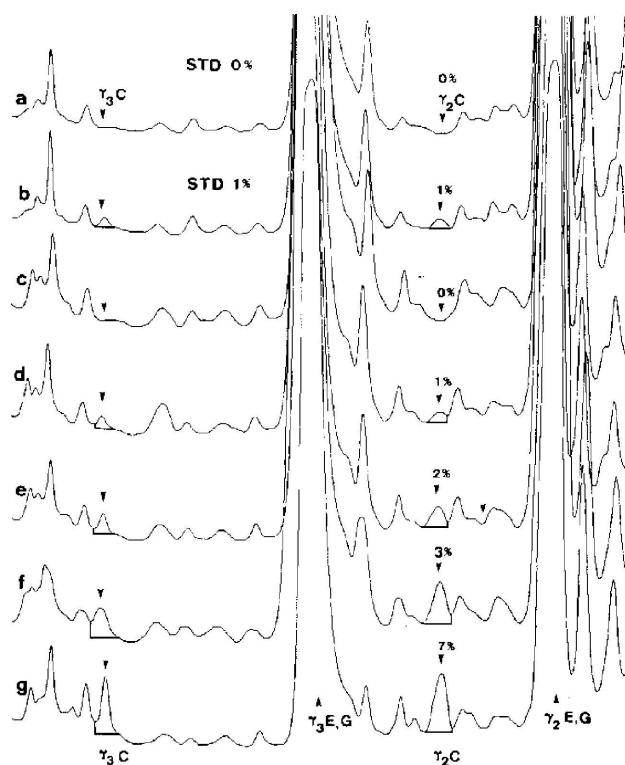


% CM = procent komjolk 1+ = prov som innehåller 1 % komjolk och där rent kasein från komjolk tillsatts i mitten av figuren. C = ko, E = tacka, G = get, B = buffel

Det totala separationsavståndet för IEF-gelen visas.

Figur 5

Överlagring av densitogram av standarder (STD) och ostprover som tillverkas av en blandning av mjölk från tackor och getter efter isoelektrisk fokusering



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

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

BILAGA IX

Bedömning av analyserna**1. Kvalitetssäkring**

Analyserna ska genomföras av laboratorier som utsetts i enlighet med artikel 12 i förordning (EG) nr 882/2004 (**) eller av de behöriga myndigheterna i medlemsstaten.

2. Provtagning och ifrågasättande av analysresultat

1. Provtagning ska ske i enlighet med den relevanta förordningen för produkten i fråga. Om det inte finns några uttryckliga provtagningsbestämmelser ska bestämmelserna i ISO 707, Milk and milk products – Guidance on sampling, användas.
2. Laboratorierapporten rörande analysresultaten ska innehålla tillräckliga uppgifter för att en bedömning av resultaten i enlighet med tillägget ska kunna göras.
3. Dubbelprover ska tas för de analyser som föreskrivs i unionslagstiftningen.
4. Om det uppstår en tvist om resultaten ska det utbetalande organet låta utföra den analys som krävs på produkten ifråga igen och den förlorande parten ska stå för kostnaden.

Ovannämnda analys ska utföras under förutsättning att förslutna dubbelprover av produkten finns tillgängliga och har lagrats på ett godtagbart sätt hos den behöriga myndigheten. Tillverkaren ska inom sju arbetsdagar efter det att resultaten av den första analysen har meddelats sända en begäran till det utbetalande organet om att analysen ska genomföras. Det utbetalande organet ska genomföra analysen inom 21 arbetsdagar efter det att begäran har tagits emot.

5. Resultatet efter överklagandet ska vara slutgiltigt.
 6. Om tillverkaren inom fem arbetsdagar efter det att proverna tagits kan bevisa att provtagningen inte har gjorts korrekt, ska provtagningen om möjligt upprepas. Om det inte är möjligt att genomföra en ny provtagning ska det analyserade partiet godtas.
-

Tillägg

Bedömning av ett partis överensstämmelse med det lagstadgade gränsvärdet**1. Princip**

Om det i lagstiftningen om offentlig intervention och privat lagring föreskrivs detaljerade provtagningsförfaranden ska dessa följas. I alla andra fall ska ett prov användas som omfattar minst tre stickprovsenheter som har tagits slumpmässigt från det parti som ska kontrolleras. Ett sammansatt prov kan beredas. Det erhållna resultatet ska jämföras med de lagstadgade gränsvärdena genom att ett 95-procentigt konfidensintervall beräknas som $2 \times$ standardavvikelsen, där den relevanta standardavvikelsen beror på om 1) metoden är validerad genom internationellt samarbete med värden för σ_r och σ_R eller 2) då intern validering används, en intern reproducerbarhet har beräknats. Detta konfidensintervall kommer då att motsvara resultatets mätosäkerhet.

2. Metoden valideras genom internationellt samarbete

I detta fall har standardavvikelsen för repeterbarhet σ_r och standardavvikelsen för reproducerbarhet σ_R fastställts och laboratoriet kan påvisa överensstämmelse med prestandaegenskaperna för den validerade metoden.

Beräkna det aritmetiska medelvärdet $\bar{x}$ för n upprepade mätningar.

Beräkna den expanderade osäkerheten ($k = 2$) för $\bar{x}$ som

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

Om det slutliga resultatet x för mätningen beräknas med en formel enligt formen $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ eller $x = y_1/y_2$ ska i sådana fall de normala förfarandena för kombination av standardavvikelser följas.

Partiet bedöms att inte överensstämma med det övre lagstadgade gränsvärdet UL om

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

i annat fall bedöms det överensstämma med UL.

Partiet bedöms att inte överensstämma med det undre lagstadgade gränsvärdet LL om

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

i annat fall bedöms det överensstämma med LL.

3. Intern validering med beräkning av standardavvikelsen för intern reproducerbarhet

I de fall då metoder som inte finns specificerade i denna förordning används och precisionsmätningar inte har fastställts ska en intern validering utföras. Standardavvikelsen för intern repeterbarhet s_{ir} och standardavvikelsen för intern reproducerbarhet s_{iR} måste användas i stället för σ_r respektive σ_R i formlerna för beräkning av den expanderade osäkerheten U .

De regler som ska följas för att fastställa överensstämmelse med de lagstadgade gränsvärdena är de som anges i punkt 1. Om partiet bedöms att inte överensstämma med det lagstadgade gränsvärdet måste mätningarna upprepas med den metod som specificeras i denna förordning och resultatet bedöms i enlighet med punkt 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 -kaseinseparationen.
- (**) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 882/2004 av den 29 april 2004 om offentlig kontroll för att säkerställa kontrollen av efterlevnaden av foder- och livsmedelslagstiftningen samt bestämmelserna om djurhälsa och djurskydd (EUT L 165, 30.4.2004, s. 1)."