I

(Rättsakter som antagits i enlighet med EG- och Euratomfördragen och som ska offentliggöras)

FÖRORDNINGAR

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

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning (EG) nr 1255/1999 av den 17 maj 1999 om den gemensamma organisationen av marknaden för mjölk och mjölkprodukter [1], särskilt artiklarna 10, 15 samt artiklarna 26.3, 29.1 och 31.4, och

av följande skäl:

(1) I kommissionens förordning (EG) nr 213/2001 [2] fastställs tillämpningsföreskrifter för rådets förordning (EG) nr 1255/1999 när det gäller de metoder som ska användas för analys och kvalitetsbedömning av mjölk och mjölkprodukter. Mot bakgrund av den tekniska utvecklingen inom det analytiska metodområdet behöver ytterligare betydande förändringar göras. För att öka tydligheten och effektiviteten och med hänsyn till antalet ändringar och deras tekniska natur, bör förordning (EG) nr 213/2001 upphävas och ersättas med en ny förordning.

(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.

(3) Det föreskrivs ofta att referensmetoderna för sådana kontroller ska vara metoder som offentliggörs av internationella organisationer såsom europeiska standardiseringsorganisationen (CEN), internationella mejeriförbundet (IDF), internationella standardiseringsorganisationen (ISO) och AOAC International (Association of Official Analytical Chemists), och som regelbundet uppdateras av dessa organisationer. I vissa fall finns det en referensmetod för gemenskapen, men i andra fall specificeras ingen referensmetod i gemenskapens regelverk. För att skapa enhetlighet i tillämpningen av referensmetoder är det lämpligt att utarbeta en förteckning över referensmetoder och göra det möjligt för kommissionen att anpassa förteckningen om det behövs.

(4) Användning av rutinmetoder bör inte uteslutas. Minimivillkoren för deras tillämpning bör specificeras.

(5) Gemensamma metoder bör fastställas för att upprätta enhetliga rutiner för bedömning av analysresultaten. Samma sak gäller för sensorisk bedömning av produkterna 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 validerats. 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 internationellt fastställda regler och som bör användas som referensmetoder.

(7) I kommissionens förordning (EG) nr 1898/2005 [3] fastställs tillämpningsbestämmelser för rådets förordning (EG) nr 1255/1999 beträffande försäljning av grädde, smör och koncentrerat smör på gemenskapens marknad och för spårning av grädde, smör och koncentrerat smör under olika förhållanden i syfte att kontrollera korrekt slutanvändning av dessa produkter. Spårning är av betydelse för att ordningen ska fungera korrekt. För att aktörer som deltar i den ska behandlas likvärdigt bör gemensamma metoder i mesta möjliga mån införas för att bestämma spårämnen.

---

[1] EGT L 160, 26.6.1999, s. 48. Förordningen senast ändrad genom förordning (EG) nr 1152/2007 (EUT L 258, 4.10.2007, s. 3). Med verkan från och med den 1 juli 2008 ersätts förordning (EG) nr 1255/1999 av förordning (EG) nr 1234/2007 (EUT L 299, 16.11.2007, s. 1).

[2] EGT L 37, 7.2.2001, s. 1.

[3] EUT L 308, 25.11.2005, s. 1. Förordningen senast ändrad genom förordning (EG) nr 1546/2007 (EUT L 337, 21.12.2007, s. 68).

(8) 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 tredjeländer till gemenskapen importera ost som tillverkats av mjölk från tackor, getter eller bufflar eller av blandningar av mjölk från dessa djur i enlighet med förmånsbehandlingar. Till följd av det ovanstående 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.

(9) I kommissionens förordning (EEG) nr 2921/90 av den 10 oktober 1990 om beviljande av stöd för framställningen av kasein och kaseinater av skummjölk [1], föreskrivs att avsaknaden av koliforma bakterier ska fastställas. Den internationellt godkända referensmetoden för påvisande av koliforma bakterier i mjölk och mjölkprodukter är ISO 4831. En referensmetod för gemenskapen för att spåra koliforma bakterier, vilken grundar sig på den ovannämnda standarden, har upprättats.

(10) I rådets förordning (EEG) nr 2658/87 av den 23 juli 1987 om tulltaxe- och statistiknomenklaturen och om Gemensamma tulltaxan [2] differentieras tullsatserna för foderblandningar enligt 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 laktoshalten och att i detta syfte behålla en allmänt erkänd metod.

(11) I förordning (EG) nr 1255/1999 föreskrivs att vissa kvalitetsvillkor ska iakttas när det gäller smör och skummjölkspulver avsett för intervention eller skummjölkspulver som är avsett att användas som foder. Följaktligen bör referensmetoder fastställas för verifiering av dessa villkor.

(12) Vissa metoder introduceras för första gången i denna förordning. Laboratorierna bör ges en tillräckligt lång tid från tiden för denna förordnings ikraftträdande för att på ett korrekt sätt introducera och använda dessa nya metoder. När en referensmetod som anges i bilaga I revideras och publiceras av standardutvecklingsorganisationen bör laboratorierna få sex månader på sig att uppdatera sina analysförfaranden så att de överensstämmer med den nya standarden.

(13) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från förvaltningskommittén för mjölk och mjölkprodukter.

[1] EGT L 279, 11.10.1990, s. 22. Förordningen senast ändrad genom förordning (EG) nr 1487/2006 (EUT L 278, 10.10.2006, s. 8).

[2] EGT L 256, 7.9.1987, s. 1. Förordningen senast ändrad genom kommissionens förordning (EG) nr 1352/2007 (EUT L 303, 21.11.2007, s. 3).

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

KAPITEL I

ALLMÄNNA BESTÄMMELSER

Artikel 1

Syfte och tillämpningsområde

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

2. I bilaga I till denna förordning fastställs en förteckning över referensmetoder som är tillämpliga för de analyser som avses i punkt 1.

3. Kommissionen ska uppdatera denna förteckning i enlighet med förfarandet i artikel 42 i förordning (EG) nr 1255/1999.

Artikel 2

Rutinmetoder

Rutinmetoder får användas för de analyser som krävs enligt gemenskapens regelverk, förutsatt att de är väl kalibrerade och regelbundet kontrolleras mot referensmetoden. Resultaten ska jämföras med avseende på konstant bias, repeterbarhet och reproducerbarhet.

Vid tvister ska det resultat som erhålls med referensmetoden vara utslagsgivande.

Medlemsstaterna ska informera kommissionen om rutinmetoder används vid den analys som avses i artikel 1.

KAPITEL II

ANALYSMETODER

Artikel 3

Bedömning av ett partis överensstämmelse med ett lagstadgat gränsvärde

Med undantag av spårämnesanalys ska bilaga II till denna förordning tillämpas för att definiera överensstämmelse med de lagstadgade sammansättningskraven.

Artikel 4

Sensorisk bedömning

1. När det gäller mjölk och andra mjölkprodukter än smör för offentlig lagring ska medlemsstaterna som referensmetod för sensorisk bedömning använda antingen standarden IDF 99C:1997 eller andra likvärdiga metoder som de ska meddela kommissionen.

Metoderna i bilaga III ska tillämpas för kontroll av bedömarnas arbete och resultatens tillförlitlighet vid sensoriska analyser.

2. För smör för offentlig lagring ska metoderna i bilaga III tillämpas för kontroll av bedömarnas arbete och resultatens tillförlitlighet vid sensoriska analyser.

Den metod som beskrivs i bilaga IV ska tillämpas som referensmetod för sensorisk bedömning.

Artikel 5

Spårämnen

1. Den analysmetod som anges i bilaga V ska användas som referensmetod för bestämning av halten triglycerid av enantsyra i smör, smörolja och grädde.

2. Den analysmetod som anges i bilaga VI ska användas som referensmetod för bestämning av vanillin i koncentrerat smör, smör eller grädde.

3. Den analysmetod som anges i bilaga VII ska användas som referensmetod för bestämning av halten etylester av β-apo-8'-karotensyra i koncentrerat smör eller smör.

4. Den analysmetod som anges i bilaga VIII ska användas som referensmetod för bestämning av halten β-sitosterol eller stigmasterol i smör och koncentrerat smör.

5. Koncentrerat smör, smör eller grädde anses ha spårats i enlighet med gällande gemenskapslagstiftning om de erhållna resultaten motsvarar specifikationerna under punkterna 10 och 11 i bilaga V och punkt 8 i bilagorna VI, VII och VIII.

Artikel 6

Påvisande av komjölkskasein

1. Den referensmetod för analys som anges i bilaga IX 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 dessa djur inte innehåller komjölkskasein.

Komjölkskasein ska anses förekomma om halten komjölkskasein i det prov som analyseras motsvarar eller är högre än halten i det referensprov som innehåller 1 % komjölk enligt bilaga IX.

2. De rutinmetoder för att påvisa komjölkskasein i ost och 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 referensmetoder som anges i bilaga IX användas.

Artikel 7

Påvisande av koliforma bakterier

Koliforma bakterier i smör, skummjölkspulver, kasein och kaseinater ska påvisas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga X.

Artikel 8

Bestämning av laktoshalten

Laktoshalten i produkter enligt KN-nummer 2309 ska bestämmas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XI.

Artikel 9

Påvisande av löpevassle

1. Löpevassle i skummjölkspulver avsett för offentlig lagring ska påvisas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XII.

2. Löpevassle i skummjölkspulver och -blandningar avsedda att användas som foder ska påvisas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XII. Vid påvisande av löpevassle bör bilaga XIII genomföras.

Artikel 10

Påvisande av kärnmjölk

Kärnmjölk i skummjölkspulver ska påvisas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XIV.

Artikel 11

Påvisande av antimikrobiella restsubstanser

Antimikrobiella restsubstanser i skummjölkspulver ska påvisas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XV.

Artikel 12

Bestämning av halten skummjölkspulver

Halten skummjölkspulver i foderblandningar ska bestämmas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XVI.

Artikel 13

Påvisande av stärkelse

Stärkelse i skummjölkspulver, denaturerat mjölkpulver och foderblandningar ska påvisas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XVII.

Artikel 14

Bestämning av fukthalten i gräddpulver

Fukthalten i gräddpulver ska bestämmas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XVIII.

Artikel 15

Bestämning av fukthalten i syrat kärnmjölkspulver

Fukthalten i syrat kärnmjölkspulver avsett för användning i foder ska bestämmas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XIX.

Artikel 16

Bestämning av mjölkfettets renhet

Mjölkfettets renhet ska bestämmas i enlighet med den referensmetod som anges i bilaga XX.

KAPITEL III

ALLMÄNNA BESTÄMMELSER OCH SLUTBESTÄMMELSER

Artikel 17

Kvalitetssäkring

Analyser ska utföras i laboratorier som har ett kvalitetssäkringssystem för analyser som innefattar interna kvalitetsstyrningsrutiner. Laboratorier som saknar ackreditering ska delta i kvalifikationsprövningar minst en gång per år och resultaten får inte avvika mer än $2\sigma_R$ (standardavvikelsen för referensmetodens reproducerbarhet) från konsensusvärdet. En detaljerad beskrivning av de tillämpade systemen ska finnas tillgänglig på laboratoriet.

Laboratorier som är ackrediterade enligt de standarder som anges i artikel 12 i 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 bestämmelser om djurhälsa och djurskydd [1] ska undantas från skyldigheten att delta i kvalifikationsprövningen.

Artikel 18

Provtagning och ifrågasättande av analysresultat

1. Provtagning ska ske i enlighet med relevant förordning för produkten i fråga. Om det inte finns några provtagningsbestämmelser ska den bestämmelse som finns i ISO 707|IDF 50, Milk and milk products – Guidance of sampling, användas.

2. Laboratorierapporten rörande analysresultaten ska innehålla tillräckliga uppgifter för att möjliggöra en bedömning av resultaten i enlighet med bilaga II och bilaga XXI.

3. Dubbelprover ska tas för de analyser som föreskrivs i gemenskapslagstiftningen.

4. Förfarandet i bilaga XXI ska tillämpas i fall då resultaten av en analys inte godtas av operatören.

5. 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.

Artikel 19

Övergångsperiod

Bedömning av överensstämmelse enligt bilaga II till denna förordning ska utföras inom 12 månader efter det att förordningen har trätt i kraft. Medlemsstaterna ska om det behövs omedelbart rapportera till kommissionen om det har uppstått några större problem med det statistiska kontrollförfarandet under denna period.

Artikel 20

Upphävanden

Förordning (EG) nr 213/2001 ska upphöra att gälla.

Hänvisningar till den upphävda förordningen ska anses som hänvisningar till den här förordningen och ska läsas enligt jämförelsetabellen i bilaga XXII.

[1] EUT L 165, 30.4.2004, s. 1.

Artikel 21

Ikraftträdande

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

Den ska tillämpas från och med den 31 mars 2008.

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

Utfärdad i Bryssel den 5 mars 2008.

På kommissionens vägnar
Mariann FISCHER BOEL
Ledamot av kommissionen

BILAGA I

(Artikel 1)

FÖRTECKNING ÖVER REFERENSMETODER

Förteckning Min. = minimum, Max. = maximum, Bilaga = bilaga till nämnd förordning, IDF = International Dairy Federation (internationella mejeriförbundet), ISO = International Standards Organisation (internationella standardiseringsorganisationen), IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry (internationella kemiunionen), ADPI = American Dairy Products Institute (amerikanska institutet för mejeriprodukter), SCM = sötad kondenserad mjölk, EMC = evaporerad mjölk eller grädde.

DEL A

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärde [1]	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EG) nr 2771/1999 – Offentlig lagring	Osaltat smör	Fett	Min. 82 viktprocent	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vatten	Upp till 16 viktprocent	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		Fettfri torrsubstans	Upp till 2 viktprocent	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Halt fria fettsyror	1,2 mmol/100 g fett	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		Peroxidvärde (max.)	0,3 mekv. syre/1 000 g fett	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Anm. 1
		Koliforma bakterier	Ej påvisbart i 1 g	Bilaga X	Anm. 3
		Fett som inte härrör från mjölk	Ej påvisbart genom triglyceridanalys	Bilaga XX	
		Sterolspårämnen	Ej påvisbart, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	Bilaga VIII	
		Andra spårämnen			
		— vanillin	Inte påvisbart	Bilaga VI	
		— etylester av karotensyra	≤ 6 mg/kg	Bilaga VII	
		— triglycerider av enantsyra	Inte påvisbart	Bilaga V	
		Sensoriska egenskaper	Minst fyra poäng av fem för utseende, smak och konsistens	Bilaga IV	

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärde (1)	Referensmetod	Anmärkning
		Vattendispersion	Minst fyra poäng	ISO 7586:1985|IDF 112A:1989	
Förordning (EG) nr 2771/1999 Privat lagring	Osaltat smör	Fett	Min. 82 viktprocent	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vatten	Upp till 16 viktprocent	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		Fettfri torrsubstans	Upp till 2 viktprocent	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
Förordning (EG) nr 2771/1999 – Privat lagring	Saltat smör	Fett	Min. 80 viktprocent	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vatten	Upp till 16 viktprocent	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		Fettfri torrsubstans (exklusive salt)	Upp till 2 viktprocent	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Salt	Upp till 2 viktprocent	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Förordning (EG) nr 1898/2005 kapitel II	Osaltat smör	Fett	Min. 82 viktprocent	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Fett som inte härrör från mjölk		Bilaga XX	
		Vatten	Upp till 16 viktprocent	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		Fettfri torrsubstans	Upp till 2 viktprocent	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Spårämnen:			
		— steroler	Se Bilaga VIII	Bilaga VIII	
		— vanillin	Se Bilaga VI	Bilaga VI	
		— etylester av karotensyra	Se Bilaga VII	Bilaga VII	
		— triglycerider av enantsyra	Se Bilaga V	Bilaga V	
Förordning (EG) nr 1898/2005 kapitel II	Saltat smör	Fett	Min. 80 viktprocent	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Fett som inte härrör från mjölk		Bilaga XX	
		Vatten	Upp till 16 viktprocent	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		Fettfri torrsubstans (exklusive salt)	Upp till 2 viktprocent	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Salt	Upp till 2 viktprocent	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Spårämnen:			
		— steroler	Se Bilaga VIII	Bilaga VIII	
		— vanillin	Se Bilaga VI	Bilaga VI	

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärde (1)	Referensmetod	Anmärkning
		— etylester av karotensyra	Se Bilaga VII	Bilaga VII	
		— triglycerider av enantsyra	Se Bilaga V	Bilaga V	
Förordning (EG) nr 1898/2005 kapitel II	Koncentrerat smör	Fett	Min. 99,8 viktprocent	IDF 24:1964	
		Vatten och fettfri torrsubstans	Upp till 0,2 viktprocent	ISO 5536:2002|IDF 23:2002 (fukthalt) IDF 24:1964 (fettfri torrsubstans)	
		Halt fria fettsyror	1,2 mmol/100 g fett	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		Peroxidvärde (max.)	0,5 mekv. syre/1 000 g fett	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Anm. 1
		Fett som inte härrör från mjölk	Finns ej	Bilaga XX	
		Smak	Frisk		
		Lukt	Inga främmande lukter		
		Övriga	Inga neutraliseringsmedel, antioxidanter eller konserveringsmedel		
		Spårämnen:			
		— steroler	Se Bilaga VIII	Bilaga VIII	
		— vanillin	Se Bilaga VI	Bilaga VI	
		— etylester av karotensyra	Se Bilaga VII	Bilaga VII	
		— triglycerider av enantsyra	Se Bilaga V	Bilaga V	
Förordning (EG) nr 1898/2005 kapitel II	Grädde	Fett	Min. 35 viktprocent	ISO 2450:1999|IDF 16 C:1987	
		Fett som inte härrör från mjölk		Bilaga XX	
		Spårämnen:			
		— steroler	Se Bilaga VIII		Anm. 2
		— vanillin	Se Bilaga VI	Bilaga VI	
		— etylester av karotensyra	Se Bilaga VII		Anm. 2
		— triglycerider av enantsyra	Se Bilaga V	Bilaga V	

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärde (1)	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EG) nr 1898/2005 kapitel III	Koncentrerat smör	Fett	Min. 96 viktprocent		Anm. 2
		Fett som inte härrör från mjölk		Bilaga XX	
		Fettfri torrsubstans	Upp till 2 viktprocent		Anm. 2
		Spårämnen:			
		— stigmasterol (95 viktprocent)	15 g/100 kg koncentrerat smör	Bilaga VIII	
		— stigmasterol (85 viktprocent)	17 g/100 kg koncentrerat smör	Bilaga VIII	
		— triglycerider av enantsyra	10,34 kg/t koncentrerat smör	Bilaga V	
		— etylester av smörsyra och stigmasterol		— etylester av smörsyra — stigmasterol: Bilaga VIII	Anm. 2
		— etylester av smörsyra och triglycerider av enantsyra		— etylester av smörsyra — triglycerider av enantsyra: Bilaga V	Anm. 2
		Lecitin (E 322)	Upp till 0,5 viktprocent		Anm. 2
		NaCl	Upp till 0,75 viktprocent	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
		Halt fria fettsyror	1,2 mmol/100 g fett	ISO 1740:2004|IDF 6:2004	
		Peroxidvärde (max.)	Upp till 0,5 mekv. syre/1 000 g fett	ISO 3976:2006|IDF 74:2006	Anm. 1
		Smak	Frisk		
		Lukt	Inga främmande lukter		
		Övriga	Inga neutraliseringsmedel, antioxidanter eller konserveringsmedel		
Förordning (EG) nr 1898/2005 kapitel IV	Osaltat smör	Fett	Min. 82 viktprocent	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Vatten	Upp till 16 viktprocent	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		Fettfri torrsubstans	Upp till 2 viktprocent	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
Förordning (EG) nr 1898/2005 kapitel IV	Saltat smör	Fett	Min. 80 viktprocent	ISO 17189:2003|IDF 194:2003	

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärde (1)	Referensmetod	Anmärkning
		Vatten	Upp till 16 viktprocent	ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
		Fettfri torrsubstans (exklusive salt)	Upp till 2 viktprocent	ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	
		Salt	Upp till 2 viktprocent	ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
Artikel 9 och avdelning II i förordning (EG) nr 1255/1999	Ost av mjölk från tackor och/eller getter	Komjölk	< 1 viktprocent	Bilaga IX	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga I – Surt kasein	Vatten	Upp till 12,00 viktprocent	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Fett	Upp till 1,75 viktprocent	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Fria syror	Upp till 0,30 ml 0,1 N NaOH-lösning/g	ISO 5547:1978|IDF 91:1979	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga I – Löpekasein	Vatten	Upp till 12,00 viktprocent	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Fett	Upp till 1,00 viktprocent	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Aska	Min. 7,50 viktprocent	ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga I – Kaseinater	Vatten	Upp till 6,00 viktprocent	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Mjölkprotein	Min. 88,00 viktprocent	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Fett och aska	Upp till 6,00 viktprocent	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Gråaska		ISO 5544:1978|IDF 89:1979	
		Aska		ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga I – Surt kasein	Vatten	Upp till 10,00 viktprocent	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Fett	Upp till 1,50 viktprocent	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Fria syror	Upp till 0,20 ml 0,1 N NaOH-lösning/g	ISO 5547:1978|IDF 91:1979	
		Total bakteriehalt (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3
		Koliforma bakterier	Inga i 0,1 g	Bilaga X	Anm. 3
		Halt av termofila bakterier (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3 och 4
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga II – Löpekasein	Vatten	Upp till 8,00 viktprocent	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Fett	Upp till 1,00 viktprocent	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Aska	Min. 7,50 viktprocent	ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		Total bakteriehalt (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3
		Koliforma bakterier	Inga i 0,1 g	Bilaga X	Anm. 3

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärde (1)	Referensmetod	Anmärkning
		Halt av termofila bakterier (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3 och 4
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga II – Kaseinater	Vatten	Upp till 6,00 viktprocent	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Mjölkprotein	Min. 88,00 viktprocent	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Fett och aska	Upp till 6,00 viktprocent	ISO 5543:2004|IDF 127:2004 ISO 5544:1978|IDF 89:1979 eller ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		Total bakteriehalt (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3
		Koliforma bakterier	Inga i 0,1 g	Bilaga X	Anm. 3
		Halt av termofila bakterier (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3 och 4
Förordning (EEG) nr 2921/90	Bilaga III – Kaseinater	Vatten	Upp till 6,00 viktprocent	ISO 5550:2006|IDF 78:2006	
		Mjölkprotein	Min. 85,00 viktprocent	ISO 5549:1978|IDF 92:1979	
		Fett	Upp till 1,50 viktprocent	ISO 5543:2004|IDF 127:2004	
		Laktos	Upp till 1,00 viktprocent	ISO 5548:2004|IDF 106:2004	
		Aska	Upp till 6,50 viktprocent	ISO 5544:1978|IDF 89:1979 eller ISO 5545:1978|IDF 90:1979	
		Total bakteriehalt (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3
		Koliforma bakterier	Inga i 0,1 g	Bilaga X	Anm. 3
		Halt av termofila bakterier (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3 och 4
Förordning (EG) nr 2799/1999	Foderblandningar och skummjölkspulver (för användning i foder)	Vatten (syrat kärnmjölkspulver)	Upp till 5 viktprocent	Bilaga XIX	
		Protein	31,4 viktprocent (min.) av den fettfria torrsubstansen	ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
		Vatten (skummjölkspulver)	Upp till 5 viktprocent	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Fett (skummjölkspulver)	Upp till 11 viktprocent	ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
		Löpevassle (skummjölkspulver)	Ingen	Bilaga XIII	Anm. 6
		Stärkelse (skummjölkspulver)	Ingen	Bilaga XVII	
		Vatten (blandningar)	Upp till 5 viktprocent av den fettfria torrsubstansen	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Fett (blandningar)		Kommissionens direktiv 84/4/EEG (EGT L 15, 18.1.1984, s. 29)	

Kommissionens förordning	Produkt	Parameter	Gränsvärde (1)	Referensmetod	Anmärkning
		Löpevassle (blandningar)	Ingen	Bilaga XIII	
		Halt av skummjölkspulver (i slutprodukt)	Min. 50 viktprocent	Bilaga XVI	
		Fett (i slutprodukt)	Min. 2,5 viktprocent eller 5 viktprocent	Kommissionens direktiv 84/4/EEG (EGT L 15, 18.1.1984, s. 29)	Anm. 7
		Stärkelse (i slutprodukt)	Min. 2 viktprocent	Bilaga XVII	Anm. 8
		Koppar (i slutprodukt)	25 ppm	Kommissionens direktiv 78/633/EEG (EGT L 206, 26.7.1987, s. 43)	
Förordning (EG) nr 214/2001	Spraytorkat skummjölkspulver	Fett	Upp till 1,0 viktprocent	ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
		Protein	31,4 (2)viktprocent (min.) av den fettfria torrsubstansen	ISO 8968–1|2:2001|IDF 20–1|2:2001	
		Vatten	Upp till 3,5 viktprocent	ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
		Surhet	Upp till 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10 g fettfri torrsubstans	ISO 6091:1980|IDF 86:1981	
		Laktater	Upp till 150 mg/100 g fettfri torrsubstans	ISO 8069:2005|IDF 69:2005	
		Fosfatas	Negativ	ISO 11816–1:2006|IDF 155–1:2006	
		Olöslighetsindex	Upp till 0,5 ml vid 24 °C	ISO 8156:2005|IDF 129:2005	
		Brända partiklar	A- eller B-skiva (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		Total bakteriehalt	40 000/g	ISO 4833:2003	Anm. 3
		Koliforma bakterier	Negativ/(0,1 g)	Bilaga X	Anm. 3
		Kärnmjölk	Negativ	Bilaga XIV	
		Löpevassle	Negativ	Bilaga XII	
		Sur vassle	Negativ		Anm. 2
		Antimikrobiella ämnen		Bilaga XV	

(1) Utan att det påverkar tillämpningen av kraven i den specifika förordningen.
(2) Minimihalten av protein kommer att vara 34 % per den 1 september 2009.

DEL B

De referensmetoder som anges i del B kan användas för analys av produkter som omfattas av någon av de förordningar som förtecknas i första kolumnen.

Kommissionens förordning	Produkt	KN-nr	Parameter	Gränsvärde	Referensmetod	Anmärkning
Förordning (EEG) nr 2658/87 Förordning (EG) nr 2535/2001 Förordning (EG) nr 1282/2006	Mjölk och grädde, inte koncentrerade och inte försatta med socker eller annat sötningsmedel	0401	Fett (≤ 6 viktprocent)	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 2535/2001 (EGT L 341, 22.12.2001, s. 29)	ISO 1211:2001|IDF 1D:1996	
			Fett (> 6 viktprocent)		ISO 2450:1999|IDF 16C:1987	
	Mjölk och grädde, koncentrerade eller försatta med socker eller annat sötningsmedel	0402	Fett (i flytande form)		ISO 1737:1999|IDF 13C:1987	
			Fett (i fast form)		ISO 1736:2000|IDF 9C:1987	
			Protein		ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
			Sackaros (normal halt)		ISO 2911:2004| IDF 35:2004	
			Sackaros (låg halt)			Anm. 2
			Torrsubstans (SCM)		ISO 6734:1989|IDF 15B:1991	
			Torrsubstans (EMC)		ISO 6731:1989|IDF 21B:1987	
			Vatten (mjölkpulver)		ISO 5537:2004|IDF 26:2004	
			Vatten (gräddpulver)		Bilaga XVIII	
	Kärnmjölk, fermenterad eller syrad mjölk och grädde, även koncentrerade, försatta med socker eller annat sötningsmedel	0403	Fett		ISO 1211:2001|IDF 1D:1996 ISO 1736:2000|IDF 9C:1987 ISO 2450:1999|IDF 16 C:1987 ISO 7208:1999|IDF 22B:1987 ISO 8262–3:2005|IDF 124–3:2005	

Kommissionens förordning	Produkt	KN-nr	Parameter	Gränsvärde	Referensmetod	Anmärkning
			Protein		ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
			Sackaros (normal halt)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Sackaros (låg halt)			Anm. 2
			Vatten (syrat kärnmjölkspulver)		Bilaga XIX	
			Vatten (osyrat kärnmjölkspulver)		ISO 5537:2004|IDF26:2004	
			Torrsubstans (andra produkter)		Metoder godkända av behörig myndighet	
	Vassle, även koncentrerad, eller försatt med socker eller annat sötningsmedel; produkter bestående av naturliga mjölkbeståndsdelar	0404	Fett		ISO 1736:2000|IDF 9C:1987 ISO 2450:1999|IDF 16C:1987 ISO 7208:1999|IDF 22B:1987	
			Protein		ISO 8968–1|2|3:2001|IDF 20–1|2|3:2001	
			Sackaros (normal halt)		ISO 2911:2004|IDF 35:2004	
			Sackaros (låg halt)			Anm. 2
		0404 90	Protein		ISO 8968–1|2:2001|IDF 20–1|2:2001	
			Vatten		IDF 21B:1987	
			Torrsubstans		ISO 6734:1989|IDF 15B:1991	
			(Koncentrerade produkter)		ISO 6731:1989|IDF 21B:1987	
	Smör och andra fetter framställda av mjölk; smörfettsprodukter	0405	Fett (om ≤ 85 viktprocent)		ISO 17189:2003|IDF 194:2003	
		Smör	Vatten		ISO 3727–1:2001|IDF 80–1:2001	
			Fettfri torrsubstans		ISO 3727–2:2001|IDF 80–2:2001	

Kommissionens förordning	Produkt	KN-nr	Parameter	Gränsvärde	Referensmetod	Anmärkning
			NaCl		ISO 15648:2004|IDF 179:2004	
			Fett (om > 99 viktprocent)		IDF 24:1964	
	Smörolja		Vatten (om fett < 99 viktprocent)		ISO 5536:2002|IDF 23:2002	
	Ost och ostmassa	0406	Fett		ISO 1735:2004|IDF 5:2004	
			Torrsubstans		ISO 5534:2004|IDF 4:2004	
			Torrsubstans (Ricotta)		ISO 2920:2004|IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006|IDF 88:2006	
			Laktos		ISO 5765–1|2:2002|IDF 79–1|2:2002	
Förordning (EEG) nr 2658/87	Foderblandningar	2309	Laktos		Bilaga XI	

Anmärkningar till förteckningen över Europeiska unionens referensmetoder:
Anmärkning 1: Mjölkfettisolering enligt beskrivning i ISO 1740:1991 (skydd mot ljus).
Anmärkning 2: Ingen referensmetod har upprättats. Metoder godkända av behörig myndighet.
Anmärkning 3: Provberedning ska utföras enligt ISO 8261:2001|IDF 122:2001.
Anmärkning 4: Inkubation i 48 timmar vid 55 °C, försiktighetsåtgärder ska vidtas så att odlingsmediet inte torkar.
Anmärkning 5: viktprocent fettfri torrsubstans = viktprocent torrsubstans – viktprocent fett.
Anmärkning 6: Kommissionens direktiv 84/4/EEG.
Anmärkning 7: Kommissionens förordning (EG) nr 2799/1999 (EGT L 340, 31.12.1999, s. 3–27).
Anmärkning 8: Kommissionens direktiv 78/633/EEG.

BILAGA II

(Artikel 3)

BEDÖMNING AV ETT PARTIS ÖVERENSSTÄMMELSE MED DET LAGSTADGADE GRÄNSVÄRDET

1. PRINCIP

I de fall då detaljerade provtagningsförfaranden anges i relevant lagstiftning ska dessa förfaranden följas. I alla andra fall används ett prov omfattande minst 3 stickprovsenheter som har tagits slumpmässigt från det parti som ska kontrolleras. Ett sammansatt prov kan beredas. Det erhållna resultatet jämförs med de lagstadgade gränsvärdena genom att ett 95-procentigt konfidensintervall beräknas som 2 × standardavvikelsen, där den relevanta standardavvikelsen beror på om 1) metoden är validerad genom internationellt samarbete med värden för σr och σ_R eller 2) om 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 σr och standardavvikelsen för reproducerbarhet σ_R fastställts och laboratoriet kan påvisa överensstämmelse med prestandaegenskaperna för den validerade metoden.

Beräkna det aritmetiska medelvärdet för $\bar{x}$ 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 $x = y_1 / y_2$ måste 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 måste en intern validering utföras. Standardavvikelsen för intern repeterbarhet s_{ir} och standardavvikelsen för intern reproducerbarhet s_{iR} måste användas i stället för σ_r eller σ_R, i formlerna för beräkning av den expanderade osäkerheten *U*.

Beslutsreglerna är desamma som under 1. Om partiet bedöms att inte överensstämma med det lagstadgade gränsvärdet måste mätningarna upprepas med den metod som är specificerad i denna förordning och ett beslut fattas enligt 1.

BILAGA III

(Artikel 4)

UTVÄRDERING AV BEDÖMARE OCH RESULTATENS TILLFÖRLITLIGHET I SENSORISKA ANALYSER

Följande förfarande ska tillämpas om poängsättningsmetoder tillämpas (IDF-standard 99C:1997).

A. BESTÄMNING AV ”REPETERBARHETSINDEX”

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

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

där:

w_1: Repeterbarhetsindex

x_{i1}: poäng för första bedömningen av prov x_i

x_{i2}: poäng för andra bedömningen av prov x_i

n: antal prover

Proverna som ska bedömas bör avspegla ett brett kvalitetsområde. w_I 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. De poäng som erhålls från bedömaren jämförs med medeltalet av de poäng som erhålls från bedömargruppen.

Följande formel används för bedömning av resultaten:

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

där:

x_{i1}, x_{i2}: jfr punkt A

$\bar{x}_{i1}$; $\bar{x}_{i2}$: medelpoäng för bedömargruppen för den första resp. andra bedömningen av provet x_i

n: antal prover (minst 10 per 12 månader)

Proverna som ska bedömas bör avspegla ett brett kvalitetsområde. D_I bör inte överskrida 1,5 (5-gradig skala).

Medlemsstaterna ska rapportera eventuella problem vid tillämpning av detta förfarande.

I de fall då individuella bedömare överskrider 1,5-gränsen för avvikelse- eller repeterbarhetsindex måste någon expert från en offentlig myndighet utföra en eller flera slumpmässiga ”upprepade kontroller av arbetet” på prover som de har bedömt under de senaste veckorna, eller utföra en eller flera ”handledda” kontroller med dessa bedömare. Noggrann övervakning krävs för att bestämma om deras tjänster ska anlitas. Resultaten ska dokumenteras och bevaras som bevis vid en uppföljning.

C. JÄMFÖRELSE AV RESULTAT ERHÅLLNA I OLIKA OMRÅDEN INOM EN MEDLEMSSTAT OCH I OLIKA MEDLEMSSTATER

I förekommande fall måste det minst en gång om året genomföras en undersökning som jämför resultat erhållna av bedömare från olika områden. Om påtagliga skillnader noteras bör medlemsstaterna vidta nödvändiga åtgärder för att klarlägga skälen och nå jämförbara resultat.

Medlemsstaterna får organisera undersökningar för att jämföra resultat erhållna av deras egna bedömare och av bedömare från angränsande medlemsstater. Påtagliga skillnader bör föranleda en grundlig undersökning i syfte att nå jämförbara resultat.

Medlemsstaterna ska rapportera resultaten av dessa jämförelser till kommissionen.

BILAGA IV

(Artikel 4)

SENSORISK BEDÖMNING AV SMÖR

1. SYFTE

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

Mer information finns i den aktuella internationella IDF-standarden för mjölk och mjölkprodukter, IDF 99, del 1, 2 och 3 om sensorisk bedömning.

2. DEFINITIONER

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

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

Bedömare definieras som någon som har valts för hans eller hennes förmåga att utföra en sensorisk test. Denna typ av bedömare kan ha begränsad erfarenhet.

Expertbedömare definieras som någon med en hög grad av sensorisk känslighet och erfarenhet av sensorisk metodik, som kan genomföra konsekventa och tillförlitliga sensoriska bedömningar av olika produkter. Denna typ av bedömare har ett gott långfristigt sensoriskt minne.

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

Mer information finns i ISO 8589 och ISO/DIS 22935–2 | IDF 99–2 punkt 7.

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

Testrummet ska vara fritt från främmande lukter och lätt att rengöra. Väggarna ska vara ljust färgade och reflexionsfria.

Testrummet och dess belysning ska vara sådant att egenskaperna hos de produkter som ska poängsättas inte påverkas.

Rummet ska vara utrustat med lämplig temperaturreglering för att göra det möjligt att hålla en konstant temperatur på smöret. Smöret ska ha en temperatur på 12 °C (± 2 °C) vid klassningen.

4. VAL AV BEDÖMARE

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

4.1 Se efter i ISO/DIS 22935–1 | IDF 99–1 punkt 4 (recruitment) och punkt 5.1 beträffande allmänna krav och screeningtester som kan användas innan en ny bedömare tas i tjänst.

Det är viktigt att utbildningen är kontinuerlig och allmänna möten ska hållas regelbundet. Mer information om utbildning av paneler finns i ISO 8586–1.

4.2 Grundutbildningen ska omfatta följande:

— Allmän teori och praktisk betydelse av sensorisk bedömning.

— Metoder, skalor för och beskrivning av sensoriska intryck.

— Påvisande och igenkännande av sensoriska egenskaper och särskilda sensoriska termer.

— Orienterande utbildning om smörtillverkning.

— Validerade referenser och prover som hjälper bedömaren att identifiera särskilda smaker och smakintensiteten för produkten.

5. KRAV PÅ PANELEN

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

En panelledare ska ansvara för hela förfarandet och kan delta i panelen.

Flera faktorer ska beaktas före bedömningen för bästa resultat:

— Smakdomarna får inte lida av någon sjukdom som kan påverka deras arbete. Om så ändå är fallet ska smakdomaren ifråga ersättas med en annan smakdomare.

— Smakdomarna ska komma i tid för att delta i bedömningen och ha avsatt tillräckligt med tid för att genomföra bedömningen.

— Smakdomarna ska undvika att använda starkt doftande produkter som parfym, aftershave, deodorant samt att äta matvaror med stark smak (kryddor), osv.

— Smakdomarna får inte röka, äta eller dricka annat än vatten under en halvtimme före bedömningen.

6. BIBEHÅLLANDE AV KOMPETENS

Alla bedömare ska delta i regelbundna paneler för sensorisk bedömning för att bibehålla sin kompetens. Intervallen beror på smörvolymen och kapaciteten och, då det är möjligt, bör panelbedömningen ske minst en gång per månad.

Erfarna bedömare bör också delta i ett antal paneler varje år, om möjligt minst en gång per kvartal.

7. PROVTAGNING OCH PROVBEREDNING

Det är viktigt att provernas identitet inte avslöjas under bedömningen så att eventuell partiskhet undviks. Proverna bör kodas.

Detta ska ordnas före bedömningen. Ett krav på smörets temperatur under transporten till testrummet ska fastställas (6 °C ± 2 °C).

När den sensoriska bedömningen genomförs vid ett kylhus, ska provet tas ut med hjälp av en smörprovare. Om den sensoriska bedömningen genomförs på annan plats än vid kylhuset, ska ett prov om minst 500 g tas ut. Under bedömningen ska smöret ha en temperatur på 12 °C (± 2 °C) (se: i ISO/DIS 22935–2 | IDF 99–2 är bedömningstemperaturen för smör 14 °C ± 2 °C). Stora avvikelser bör till varje pris undvikas.

8. BEDÖMNING AV VÄRDET AV VARJE EGENSKAP

8.1 Den sensoriska bedömningen ska utföras i förhållande till följande tre egenskaper: utseende, konsistens och smak:

Utseende inbegriper följande faktorer: färg, synlig renhet, avsaknad av fysisk kontaminering, avsaknad av mögeltillväxt och enhetlighet för vattendispersion. Vattendispersion testas i enlighet med IDF-standarden 112A:1989.

Konsistens inbegriper följande faktorer: hårdhet, textur och fasthet. Bredbarheten kan övervakas med hjälp av fysiska medel om en enskild medlemsstat så önskar för att uppfylla kundbehov. Kommissionen kan fatta beslut om att harmonisera metodiken i framtiden.

Med *hårdhet* menas produktens sammanhållande egenskaper då den konsumeras. Den förknippas normalt med fasthet och bredbarhet och ska vara enhetlig i hela produkten. Den är nära besläktad med textur och är produktens förmåga att förbli stående under den egna vikten. Den anges med hjälp av skärmotståndet och kan mätas mekaniskt och med mun- och fingerkänsla.

Smak är den egenskap som uppfattas i munnen, huvudsakligen genom tungans smaklökar.

Lukt är den egenskap som uppfattas av näsan och luktsinnet.

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

Klassningen av smör måste skjutas upp om temperaturen ligger utanför det rekommenderade intervallet.

8.2 Varje egenskap ska bedömas sensoriskt var för sig. Poängsättningen ska ske enligt tabell 1.

8.3 Det är önskvärt att bedömarna innan bedömningen påbörjas, tillsammans poängsätter ett eller flera referensprover med avseende på utseende, konsistens och smak, så att en enhetlighet uppnås.

8.4 Poängsättningen för godkännande är som följer:

Se punkt 7 om nomenklatur och beskrivning av de kriterier som gäller för respektive poäng, vid poängsättningen.

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

— Om den nödvändiga poängen inte uppnås, ska en beskrivning av defekten lämnas.

— Den poäng som varje bedömare ger för varje egenskap ska 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 prover). I så fall ska panelledaren kontrollera panelens kompetens.

9. KONTROLL

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

10. NOMENKLATUR

Se tabell 2.

11. REFERENSER

FIL-IDF 99C:1997 Sensory evaluation of dairy products by scoring – Reference method

ISO/DIS 22935 | IDF 99 International Standard for Milk and Milk Products – Sensory analysis – Parts 1–3

ISO 8586–1 Sensory analysis – General guidance for selection, training and monitoring of assessors – Part 1

ISO 8589 Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms

FIL-IDF 112A:1989 Butter – Determination of water dispersion value

Tabell 1

Poängsättning av smör

Utseende			Konsistens			Smak och lukt		
Poäng	Nr (1)	Anmärkning	Poäng (kvalitetsklass)	Nr (1)	Anmärkning	Poäng (kvalitetsklass)	Nr (1)	Anmärkning
5		*Mycket bra* perfekt högsta kvalitet (lika med torr)	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 (obetydliga fel)* vattnigt, fria vattendroppar ej homogent, två färger strimmigt flammigt, marmorerat fläckigt fri olja för kraftig färgning poröst, tydliga håligheter	3	 14 15 16 17 18	*Varken bra eller dåligt (obetydliga fel)* kort, spröd, smulig salvig, oljig klibbig hård mjuk	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Varken bra eller dåligt (obetydliga fel)* oren främmande smak syrlig kokt smak, bränd smakf odersmak skarp, bitter för salt
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Dåligt (tydliga fel)* vattnigt, fria vattendroppar strimmigt flammigt, marmorerat 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, bitter för salt smaklös, unken kemikalie
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Mycket dåligt (avsevärda fel)* vattnigt, fria vattendroppar strimmigt flammigt, marmorerat fläckigt fri olja för kraftig färgning kornigt främmande föremål mögelväxt olöst salt (saltkristaller)	1	 14 15 16 17 18	*Mycket dåligt (avsevärda fel)* kort, spröd, smulig salvig, oljig klibbig hård mjuk	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Mycket dåligt (avsevärda fel)* främmande smak ostliknande syrlig jäst möglig härsken oljig, fiskliknande talgig oxiderad, metall skarp, bitter för salt 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) bränd
28.	möglig
29.	härsken
30.	oljig, fiskliknande
31.	talgig
32.	(a) oxiderad
	(b) metall
33.	fodersmak
34.	skarp, bitter
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 V

(Artikel 5)

BESTÄMNING AV HALTEN TRIGLYCERID AV ENANTSYRA I SMÖR, SMÖROLJA OCH GRÄDDE MED GASKROMATOGRAFISK ANALYS AV TRIGLYCERIDER

1. SYFTE

Denna metod fastställer en metod för att bestämma halten triglycerid av enantsyra i smörolja, smör och grädde.

2. TERMER OCH DEFINITIONER

Halt av enantsyra: halten triglycerid av enantsyra fastställd med hjälp av det förfarande som är specificerat i denna metod.

Anmärkning: Halten enantsyra uttrycks i kg per ton produkt för smörolja och smör, och i kg per ton mjölkfett för grädde.

3. PRINCIP

Mjölkfett extraheras från olika produkter enligt ISO 14156 | IDF 172:2001. Den kvantitativa bestämningen av halten triglycerid av enantsyra i det extraherade fettet bestäms med gaskromatografi med kapillärkolonn (GC). Det resultat som erhålls för provet bedöms med hjälp av triglycerid av kapronsyra som intern standard.

Anmärkning: Tributyrin har också visat sig vara en tillfredsställande intern standard.

4. REAGENSER

Använd endast reagenser av vedertagen analyskvalitet.

4.1 n-Hexan.

4.2 Standardtriglycerid av kapronsyra, med en renhetsgrad på minst 99 %.

4.3 Standardtriglycerid av enantsyra, med en renhetsgrad på minst 99 %.

4.4 Vattenfritt natriumsulfat (Na_2SO_4).

5. UTRUSTNING

Normal laboratorieutrustning och särskilt följande:

5.1 Analysvåg, med 1 mg noggrannhet.

5.2 Mätkolvar med en kapacitet på 10 ml och 20 ml.

5.3 Centrifugrör med en kapacitet på 30 ml.

5.4 Rotationsindunstare.

5.5 Ugn, med förmåga att hålla en temperatur på 50 °C ± 5 °C.

5.6 Filterpapper, medelfint, med en diameter på ca 15 cm.

5.7 Gaskromatografisk utrustning, som består av:

5.7.1 Gaskromatograf utrustad med en split-/splitless-injektor eller ”on-column”-injektor och flamjonisationsdetektor (FID).

5.7.2 GC-kolonn med stationär fas som är lämplig för triglyceridseparering (100 % dimetylpolysiloxan eller 5 % fenylpolysiloxan–95 % metylpolysiloxan). Välj stationär fas, kolonnlängd (mellan 4 m och 15 m), innerdiameter (mellan 0,22 mm och 0,50 mm) och filmtjocklek (0,12 µm eller mer) med hänsyn till laboratoriets erfarenhet och det injiceringssystem som används. Den valda kolonnen ska i varje fall ge både en fullständig separation mellan lösningsmedelstoppen och triglyceriden av kapronsyran och en baslinjesupplösning mellan topparna för triglyceriderna av kapronsyra och enantsyra. Exempel på tillämpliga betingelser anges nedan.

5.7.2.1 Exempel på tillämpliga betingelser vid användning av splitinjektor:

— Bärgas: helium.

— Bärgasens tryck i kolonninloppet: 100 kPa.

— Kolonn: kolonn av syntetisk kvarts, 12 m lång, 0,5 mm innerdiameter, 0,1 µm filmtjocklek.

— Stationär fas: 100 % dimetylpolysiloxan eller 5 % fenylpolysiloxan–95 % dimetylpolysiloxan (t.ex. HT5).

— Kolonntemperatur: initial temperatur 130 °C, som hålls under 1 minut, ökas med en hastighet på 20 °C/min upp till 260 °C och ökas därefter med en hastighet på 30 °C/min upp till 360 °C, hålls 10 minuter vid 360 °C.

— Detektortemperatur: 370 °C.

— Injektortemperatur: 350 °C.

— Splitförhållande: 1:30.

— Mängd injicerat prov: 1 µl.

5.7.2.2 Exempel på tillämpliga betingelser vid användning av ”on-column”-injektor:

— Bärgas: väte (konstant flödessystem).

— Bärgasens tryck i kolonninloppet: 89 kPa.

— Kolonn: kolonn av syntetisk kvarts, 4 m lång, 0,32 mm innerdiameter, 0,25 µm filmtjocklek.

— Stationär fas: 5 % fenylpolysiloxan, 95 % dimetylpolysiloxan.

— Kolonntemperatur: initial temperatur 60 °C, som hålls under 2 minuter, ökas med en hastighet på 35 °C/min upp till 340 °C, hålls vid denna temperatur under 5 minuter.

— Detektortemperatur: 350 °C.

— Mängd injicerat prov: 1 µl.

5.8 Injektionsspruta, 5 µl kapacitet.

6. PROVTAGNING

Det är viktigt att laboratoriet erhåller ett prov som verkligen är representativt och inte har skadats eller förändrats under transport eller lagring.

Provtagning ingår inte som en del av den metod som finns specificerad i den här internationella standarden. En rekommenderad provtagningsmetod anges i IDF-standarden 50C:1995 eller ISO 707–1997 – Milk and milk products – Methods of sampling.

7. FÖRFARANDE

7.1 **Beredning av prov och provmängd**

Gå tillväga enligt ISO 14156 | IDF 172:2001.

7.1.1 *Smörolja, smör*

7.1.1.1 Smält 50 g till 100 g av provet i ugnen (5.5).

7.1.1.2 Placera 0,5 g till 1,0 g vattenfritt natriumsulfat (5.4) i ett vikt filterpapper.

7.1.1.3 Filtrera fettet genom filterpapperet innehållande vattenfritt natriumsulfat och samla filtratet i en bägare som hålls i ugnen (5.5). Se vid dekanteringen av det smälta smöret på filterpapperet till att inget serum överförs.

7.1.2 *Grädde*

7.1.2.1 Värm provet till en temperatur på 20 °C ± 2 °C.

7.1.2.2 Blanda eller rör om provet ordentligt.

7.1.2.3 Späd en lämplig mängd av provet så att en provmängd på 100 ml med en massfraktion på ca 4 % fett erhålls.

7.1.2.4 Gör på samma sätt som med obehandlad mjölk och homogeniserad mjölk (se ISO 14156 | IDF 172:2001, § 8.3) för att extrahera fettet från grädden.

7.1.2.5 Väg upp 1 g extraherat fett, på 1 mg när, i en 10 ml mätkolv (5.2). Tillsätt 1 ml av lösningen 7.2.2. Fyll på med n-hexan (4.1) till 10 ml och homogenisera.

7.1.2.6 Tillför 1 ml av lösningen 7.1.1.2 i en 10 ml mätkolv (5.2) och späd till 10 ml med n-hexan (4.1).

7.2 **Beredning av kalibreringsstandarderna**

7.2.1 Lös 100 mg triglycerid av enantsyra (4.3) i 10 ml n-hexan (4.1).

7.2.2 Lös 100 mg triglycerid av kapronsyra (4.2) i 10 ml n-hexan (4.1).

7.2.3 Tillför 1 ml av lösningen 7.2.2 till en 10 ml mätkolv (5.2). Fyll på med n-hexan (4.1) till 10 ml.

7.2.4 Tillför 1 ml av lösningen 7.2.1 och 1 ml av lösningen 7.2.2. till en 10 ml mätkolv (5.2). Fyll på med n-hexan (4.1) till 10 ml.

7.2.5 Tillför 1 ml av lösningen 7.2.4 i en 10 ml mätkolv (5.2) och fyll på med n-hexan till 10 ml (4.1).

7.3 **Kromatografisk analys**

7.3.1 Injicera 1 µl av standardlösningen 7.2.5 två gånger.

7.3.2 Injicera 1 µl av varje provlösning.

Anmärkning: Om ”on-column”-injektorsystem används måste spädningen av både standard- och provlösningarna ökas.

7.3.3 Upprepa moment 7.3.1 vart tredje prov för att avgränsa proverna mellan varje standardinjektion i duplikat. Resultaten baseras på medelvärdet för responsfaktorerna från standardkromatogrammen.

8. BERÄKNING AV RESULTAT

Integrera för varje kromatogram arean av de toppar som hör samman med triglyceriderna av enantsyra och kapronsyra.

Följ dessa anvisningar för varje avgränsad sekvens, dvs. för en uppsättning avgränsade prover är STD_1 den standard som injiceras två gånger omedelbart före dem och STD_2 den standard som injiceras två gånger omedelbart efter dem.

8.1 **Kalibrering**

8.1.1 Beräkna responsfaktorn för varje duplikat av STD_1, Rf_1(a) och Rf_1(b):

Rf_1(a) eller (b) = (topparean för triglycerid av enantsyra/topparean för triglycerid av enantsyra) × 100

Beräkna medelvärdet för responsfaktorn, Rf_1:

$$Rf_1 = (Rf_1(a) + Rf_1(b))/2$$

8.1.2 Beräkna på samma sätt medelvärdet för responsfaktorn STD_2, Rf_2.

8.1.3 Beräkna medelvärdet för responsfaktorn, Rf:

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2)/2$$

8.2 **Prover**

Beräkna för varje provkromatogram som har erhållits mellan STD_1 och STD_2 halten enantsyra C (kg/t):

C = (topparea för triglycerid av enantsyra × Rf × 100)/(topparea för triglycerid av kapronsyra × Wt × 1 000)

där:

— Wt = vikt för det tagna fettet (g),

— 100 = provets utspädningsvolym,

— 1 000 = omvandlingsfaktor (från µg/g till kg/t).

Ta för smörprover hänsyn till smörets fetthalt och beräkna ett korrigerat koncentrationsvärde C_{butter} (kg/t smör)

$$C_{butter} = C_{fat} \times F$$

där F är smörets fetthalt.

9. PRECISION

Närmare uppgifter från en interlaborativ jämförelse vid provning av smör i enlighet med ISO 5725–1 och ISO 5725–2 om precisionsmetoden visas i 12.

Gränsvärdena för repeterbarhet och reproducerbarhet anges för 95 % konfidensgrad och kan eventuellt inte tillämpas på andra koncentrationsintervall och koncentrationsmatriser än dem som anges.

9.1 **Repeterbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium utförda av samma person som använder samma utrustning inom ett kort tidsintervall, kommer inte att vara större än 0,35 kg/t i högst 5 % av fallen.

9.2 **Reproducerbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i olika laboratorier utförda av olika personer som använder olika utrustning kommer inte att vara större än 0,66 kg/t i högst 5 % av fallen.

10. TOLERANSGRÄNSER: UNDRE GRÄNSVÄRDEN (VID OTILLRÄCKLIGA MÄNGDER)

10.1 **Tre prover ska tas från den spårade produkten för att kontrollera att produkten har spårats på rätt sätt.**

10.2 **Smör och koncentrerat smör**

10.2.1 Inblandningsgraden är 11 kg av triglycerid av enantsyra med en lägsta renhetsgrad på 95 % per ton smör, dvs. 10,45 kg/t.

10.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 9,51 kg/t (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för triglycerid av enantsyra med en lägsta renhetsgrad av 95 %, en bestämning).

— 6,89 kg/t (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för triglycerid av enantsyra med en lägsta renhetsgrad av 95 %, en bestämning).

— Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 9,51 kg/t och 6,89 kg/t.

10.3 **Grädde**

10.3.1 Inblandningsgraden är 10 kg av triglycerid av enantsyra med en lägsta renhetsgrad på 95 % per ton mjölkfett, dvs. 9,50 kg/t spårat mjölkfett.

10.3.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 8,60 kg/t (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för triglycerid av enantsyra med en lägsta renhetsgrad av 95 %, en bestämning).

— 6,23 kg/t (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för triglycerid av enantsyra med en lägsta renhetsgrad av 95 %, en bestämning).

— Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 8,60 kg/t och 6,23 kg/t.

11. TOLERANSGRÄNSER: ÖVRE GRÄNSVÄRDEN (DÅ MÄNGDEN ÖVERSKRIDS MED MER ÄN 20 %)

11.1 **Tre prover ska tas från den spårade produkten för att kontrollera att produkten har spårats på rätt sätt**

11.2 **Smör och koncentrerat smör**

11.2.1 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och medelvärdet av dessa resultat ska jämföras med följande gränser:

— Den övre gränsen är 12,96 kg/t.

11.3 **Grädde**

11.3.1 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och medelvärdet av dessa resultat ska jämföras med följande gränser:

— Den övre gränsen är 11,82 kg/t.

12. TILLÄGGSINFORMATION: STATISTISK ANALYS AV RESULTATEN VID BESTÄMNING AV TRIENANTAT I SMÖRFETT VID TRIGLYCERIDANALYS

Fyra jämförelseprovningar har utförts för att bestämma trienantathalten i spårat smör.

Nio laboratorier deltog i denna första ringtest och inga specifikationer tillhandahölls om vilka analysmetoder som skulle användas.

Tio laboratorier deltog i den andra ringtesten och fyra olika metoder användes:

— Kvantifiering av metylheptanoat genom användning av n-nonan eller metylnonanoat som intern standard.

— Kvantifiering av trienantat genom användning av trikaproat som intern standard.

— Kvantifiering av metylheptanoat genom användning av ett kalibreringsprov/en kalibreringsblandning.

— Kvantifiering av metylheptanoat genom användning av en kalibreringsblandning.

Vidare, om fettsyrametylester (FAME) analyserades användes två olika metyleringsförfaranden (De Francesco och Christopherson & Glass).

Till följd av de erhållna resultaten valdes två metoder ut för den tredje ringtesten:

— Kvantifiering av metylheptanoat genom användning av n-nonan eller metylnonanoat som intern standard.

— Kvantifiering av trienantat genom användning av trikaproat som intern standard.

Resultaten från de sju laboratorierna visade att FAME-metoden gav en högre variabilitet och följaktligen beslutades att endast bestämningen av trienantat som triglycerid skulle användas efter förfarandet med q kvantifieringar av trienantat under användning av trikaproat som intern standard. Vidare måste triglyceridanalysen utföras med kapillärkolonn.

I den fjärde ringtesten cirkulerades fyra prover (A, B, C, D) och resultat erhölls från nio laboratorier (tabell 1–2).

Två laboratorier (DE och UE) analyserade proverna med FAME-metoden.

På grund av det låga antalet laboratorier har den statistiska beräkningen utförts på både hela datauppsättningen (figur 1–2) inklusive FAME-resultaten och på data som erhölls från triglyceridanalysen (TG).

Tester på avvikare:

— Prov A. I Dixon-, Cochran- och Grubbs-testerna för nivåerna 1 och 5 % konstaterades ett avvikande laboratorium.

— Prov B. I Grubbs-testet för nivån 5 % konstaterades ett avvikande laboratorium.

— Prov C. I Dixon- och Grubbs-testerna för nivåerna 1 och 5 % konstaterades ett avvikande laboratorium.

— Prov D. I Dixon- och Grubbs-testerna för nivåerna 1 och 5 % konstaterades ett avvikande laboratorium.

Avvikaren har tagits bort från beräkningen.

Det är värt att notera att de resultat som erhölls med FAME-metoden aldrig betraktades som avvikare genom de tester som tillämpades.

Precisionsparametrar

I tabellerna 1 och 2 rapporteras resultaten från alla laboratorierna och de precisionsparametrar som har beräknats för att godtagbart antal (8) laboratorier. Dessvärre härrör de inte från samma analysmetod.

I tabellerna 3 och 4 rapporteras resultaten som endast härrör från TG-metoden och motsvarande precisionsparametrar. Dessa parametrar accepteras under förutsättning att det låga antalet laboratorier (6) accepteras.

I figurerna 3 och 4 visas trenden för Sr och SR som har beräknats för de fyra proverna från de två datauppsättningarna som beskrivs ovan.

I tabell 5 rapporteras Sr- och SR-värdena tillsammans med motsvarande poolade värden och de totala r- och R-parametrarna.

Slutligen har den kritiska skillnaden vid 95 % konfidensgrad beräknats.

Tabell 1

Statistiska resultat för TG- och FAME*-metoden

Prov A		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Avvikare	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Medelvärde	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Sant värde	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Repeterbarhet r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Relativ repeterbarhet r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,23
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	2,04
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,84
					Relativ reproducerbarhet R %	5,71
Prov B		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Avvikare	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Medelvärde	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Sant värde	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Repeterbarhet r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Relativ repeterbarhet r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,35
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	2,61
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,99
					Relativ reproducerbarhet R %	7,31

Tabell 2

Statistiska resultat för TG- och FAME*-metoden

Prov C		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Avvikare	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Medelvärde	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Sant värde	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Repeterbarhet r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Relativ repeterbarhet r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,17
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	1,82
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,47
					Relativ reproducerbarhet R %	5,10

Prov D		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Avvikare	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Medelvärde	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Sant värde	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repeterbarhet r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Relativ repeterbarhet r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,24
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	11,43
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,67
					Relativ reproducerbarhet R %	32,00

Tabell 3

Statistiska resultat för TG- och FAME*-metoden

Prov A		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Avvikare	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Medelvärde	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Sant värde	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Repeterbarhet r (95 %)	0,25
					Relativ repeterbarhet r %	2,24
					Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,13
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	1,16
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,36
					Relativ reproducerbarhet R %	3,25
Prov B		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Avvikare	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Medelvärde	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Sant värde	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Repeterbarhet r (95 %)	0,42
					Relativ repeterbarhet r %	3,16
					Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,33
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	2,48
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,93
					Relativ reproducerbarhet R %	6,94

Tabell 4

Statistiska resultat för TG-metoden

Prov C		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Avvikare	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Medelvärde	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Sant värde	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Repeterbarhet r (95 %)	0,42
					Relativ repeterbarhet r %	4,51
					Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,19
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	2,04
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,53
					Relativ reproducerbarhet R %	5,71
Prov D		R_1	R_2	Medel	Antal kvarstående laboratorier efter att avvikare har tagits bort	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Antal avvikare	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Avvikare Medelvärde	DK
					Medelvärde	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Sant värde	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Standardavvikelse för repeterbarhet (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Relativ standardavvikelse för repeterbarhet (RSDr%)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repeterbarhet r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Relativ repeterbarhet	12,01
					Standardavvikelse för reproducerbarhet (SR)	0,25
					Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet (RSDR%)	11,90
					Reproducerbarhet R (95 %)	0,69
					Relativ reproducerbarhet R %	33,32

Tabell 5

Repeterbarhet och reproducerbarhet (med FAME)

	Antal labb	Avvikare	Repeterbarhet Sr (95 %)	Reproducerbarhet SR (95 %)
Prov A	8	1	0,09	0,23
Prov B	8	1	0,14	0,35
Prov C	8	1	0,14	0,17
Prov D	8	1	0,08	0,24
Poolat värde			0,116	0,256
			R	**R**
Poolat värde * 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Lägsta angivna renhetsgrad för trienantat = 95 %
Angivet minimigränsvärde för trienantat i smörfett = 11 kg/t
Med beaktande av den kritiska skillnaden för en 95 % konfidensgrad ska medelvärdet av de två resultaten inte vara mindre än:
10,05 kg/t vid inblandning av trienantat med en lägsta renhetsgrad av 95 %.

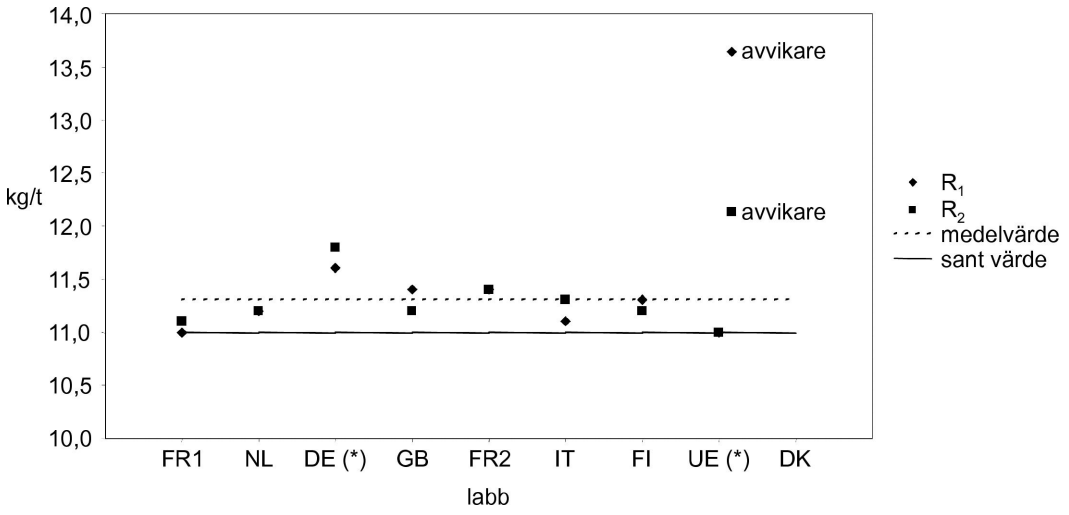
Repeterbarhet och reproducerbarhet (utan FAME)

	Antal labb	Avvikare	Repeterbarhet SR (95 %)	Reproducerbarhet SR (95 %)
Prov A	6	1	0,09	0,13
Prov B	6	1	0,15	0,33
Prov C	6	1	0,15	0,19
Prov D	6	1	0,09	0,25
Poolat värde			0,124	0,237
			r	**R**
Poolat värde * 2,8			**0,347**	**0,663**

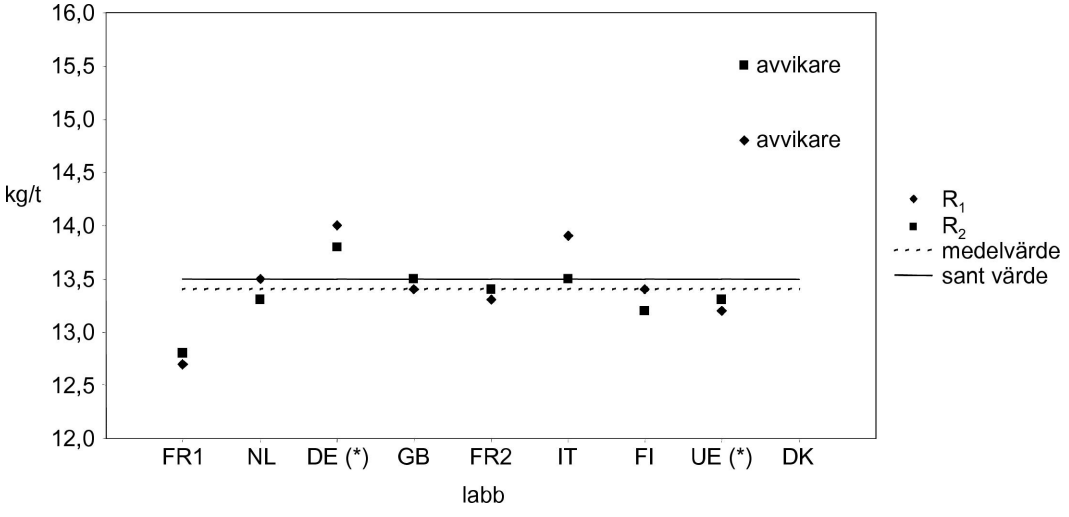
CrD95 = 0,36
Lägsta angivna renhetsgrad för trienantat = 95 %
Angivet minimigränsvärde för trienantat i smörfett = 11 kg/t
Med beaktande av den kritiska skillnaden för en 95 % konfidensgrad ska medelvärdet av de två resultaten inte vara mindre än: 10,09 kg/t vid inblandning av trienantat med en lägsta renhetsgrad av 95 %.

Figur 1 (*)

Experimentella resultat: Prov A

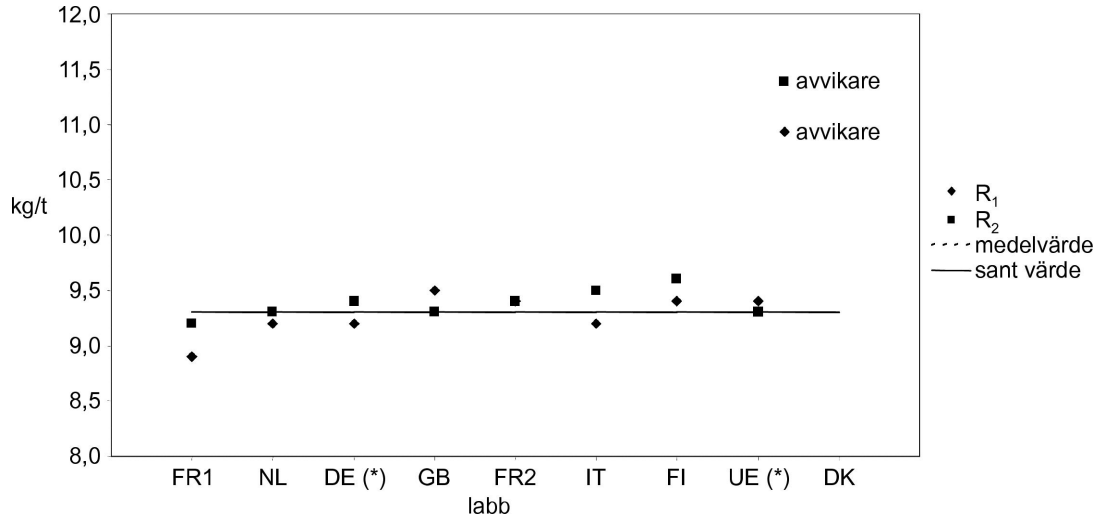


Experimentella resultat: Prov B

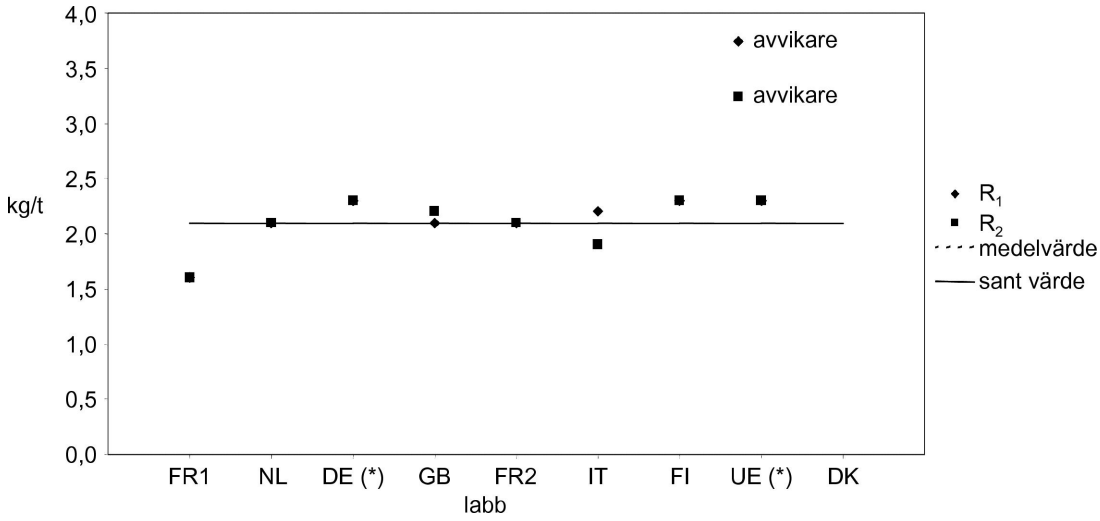


(*) = FAME-metoden.

Experimentella resultat: Prov C

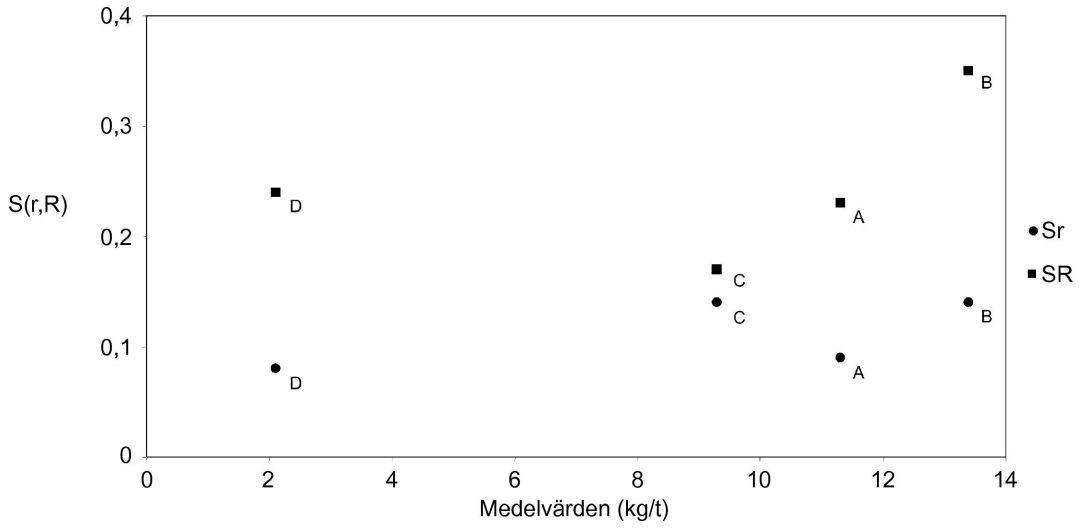


Experimentella resultat: Prov D



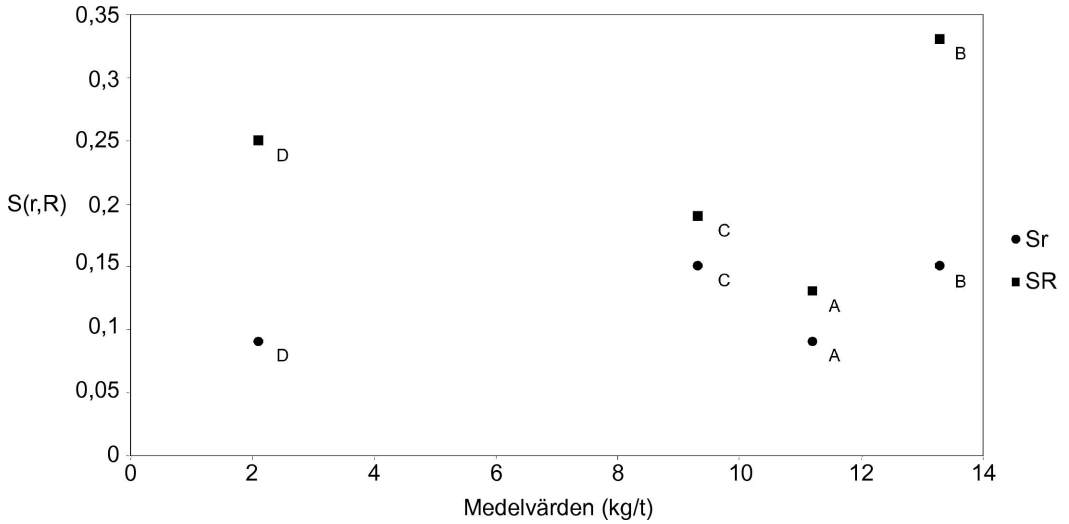
Figur 2

Standardavvikelse för repeterbarhet och reproducerbarhet vid olika nivåer (TG+FAME)



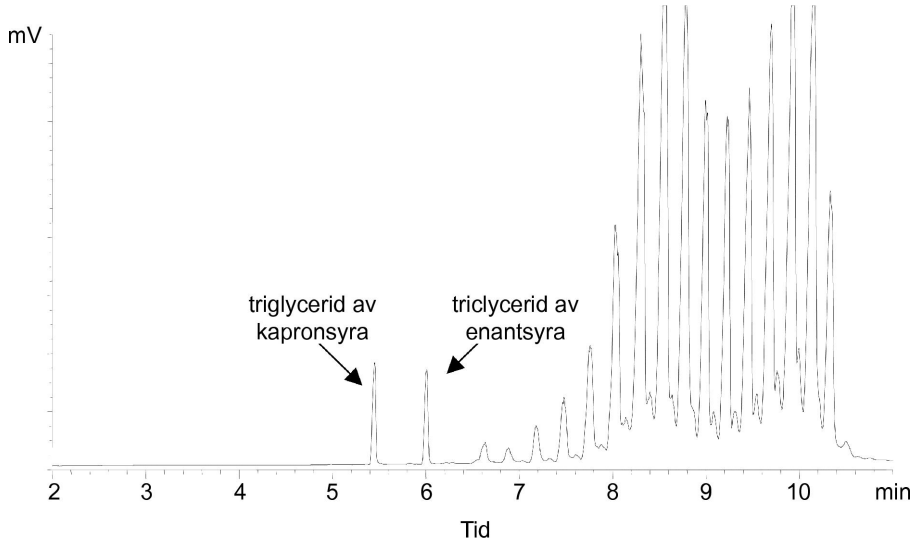
Figur 3

Standardavvikelse för repeterbarhet och reproducerbarhet vid olika nivåer (TG+FAME)



Figur 4

Exempel på användning av ”on-column”-injektor



BILAGA VI

(Artikel 5)

BESTÄMNING AV VANILLINHALTEN I KONCENTRERAT SMÖR, SMÖR OCH GRÄDDE MED HÖGUPPLÖSANDE VÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

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 avkylning till mellan – 15 och – 20 °C, åtföljd av centrifugering.

Efter spädning med vatten, bestämning av vanillinhalten med högupplösande vätskekromatografi (HPLC).

3. UTRUSTNING

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 Å fullt utslag), en skrivare eller integrator och en kolonntermostat inställd på 25 °C.

3.5 Analyskolonn (250 mm × 4,6 mm innerdiameter) packad med LiChrospher RP 18 (Merck, 5 µm) eller motsvarande.

3.6 Förkolonn (ca 20 mm × 3 mm innerdiameter), torrpackad med LiChrospher RP 18 (5–10 µm) eller motsvarande.

3.7 Centrifug med 2 000 varv/minut.

4. REAGENSER

Alla använda reagenser ska vara av vedertagen analyskvalitet.

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) ≥ 98 %.

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-stamlösning (= 10 µg/ml).*

Pipettera 5 ml vanillinstamlösning (4.5.1) i en 250 ml mätkolv och späd till märket med vatten.

4.5.3 *Metanol, HPLC-kvalitet.*

4.5.4 *Isättika.*

4.5.5 *Vatten, HPLC-kvalitet.*

4.5.6 *HPLC – mobil fas.*

Blanda 300 ml metanol (4.5.3), ca 500 ml vatten (4.5.5) och 20 ml isättika (4.5.4) i en 1 000 ml mätkolv och späd till märket med vatten (4.5.5). Filtrera genom 0,45 µm filter (3.3).

5. FÖRFARANDE

5.1 **Provberedning**

5.1.1 *Smör*

Värm provet tills det börjar smälta. Undvik lokal överhettning över 30 °C. Smöret får under inga omständigheter separera i två faser. När provet blir tillräckligt plastiskt, ska det homogeniseras genom skakning. Rör om smöret i 15 sekunder innan ett prov tas. Väg upp 5 g (SM g) smör, på 1 mg när, i 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) koncentrerat smör, på 1 mg när, i en 100 ml mätkolv.

5.1.3 *Grädde*

Värm upp provet i ett vattenbad eller en inkubator vid en 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, i 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 minuter 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 där i ca 30 minuter. Centrifugera det kalla extraktet 5 minuter vid ca 2 000 varv/min och häll upp omedelbart. Låt den upphällda lösningen anta rumstemperatur. Pipettera 5 ml upphälld lösning i en 100 ml mätkolv och späd med vatten. Filtrera en alikvot genom ett membranmikrofilter (3.3) under användning av en spruta (3.2). Filtratet är färdigt för bestämning genom HPLC.

5.3 **Kalibrering**

Överför med pipett 5 ml av vanillinstandardlösningen (4.5.2) till en 100 ml mätkolv. Tillsätt 5 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 minuter. Injicera standardlösningen (5.3). Upprepa detta tills skillnaden i topparea eller topphöjd mellan två på varandra följande injektioner är mindre än 2 %. Vid ovannämnda betingelser är retentionstiden för vanillin ca 9 minuter. Analysera standardlösningen (5.3) i duplikat genom att injicera 20 µl. Injicera 20 µl av provlösningarna (5.2). Bestäm arean eller höjden på den erhållna vanillintoppen. Upprepa injektionen av standardlösningen (5.3) i duplikat, efter 10 injektioner av provlösningar (5.2).

6. BERÄKNING AV RESULTATEN

Beräkna den genomsnittliga topparean (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:

$$C = \left| (AS \times 20 \times 0{,}96) / (SM \times R) \right|$$

där:

AS = topparea eller topphöjd för provets vanillintopp

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

Anmärkning: Om analysen görs för att bestämma mängden vanillin i grädde, ska 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 (viktprocent).

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

0,96 = korrektionsfaktor för fetthalten i första utspädningen av provet

Anmärkning: I stället för topparea kan topphöjd användas (se 8.3).

7. METODENS NOGGRANNHET

7.1 **Repeterbarhet (r)**

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts inom kortast möjliga tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 16 mg/kg.

7.2 **Reproducerbarhet (R)**

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier under användning av olika utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 27 mg/kg.

8. TOLERANSGRÄNSER

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

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

8.2.1 Inblandningsgraden för 4-hydroxi-3-metoxibensaldehyd är 250 g per ton koncentrerat smör eller smör. Vid spårning i grädde är inblandningsgraden 250 gram per ton mjölkfett.

8.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 220,8 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningen).

— 158,3 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 220,8 mg/kg och 158,3 mg/kg.

8.3 Spårämne som erhållits enbart från vaniljstänger eller fullständiga extrakt därav

8.3.1 Inblandningsgraden för 4-hydroxi-3-metoxibensaldehyd är 100 g per ton koncentrerat smör eller smör. Vid spårning i grädde är inblandningsgraden 100 gram per ton mjölkfett.

8.3.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 78,3 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningen).

— 53,3 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 78,3 mg/kg och 53,3 mg/kg.

9. ANMÄRKNINGAR

9.1 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 %.

9.2 Standardlösningen innehåller 5 % extraktionslösning för att kompensera för den toppbreddning som orsakas av närvaro av 5 % av extraktionslösningen i proverna. Detta möjliggör kvantifiering med hjälp av topphöjden.

9.3 Analysen bygger på en linjär kalibreringskurva med en nollskärningspunkt.

9.4 Genom användning av lämpliga utspädningar av standardlösningen (4.5.2) bör linjäriteten kontrolleras första gången analysen utförs och sedan regelbundet och efter byten eller reparationer av HPLC-utrustningen. Vanillin kan brytas ned till vanillinsyra, divanillin och andra föreningar genom naturligt förekommande enzymers aktivitet i opastöriserad grädde eller produkter framställda från detta.

BILAGA VII

(Artikel 5)

BESTÄMNING AV ETYLESTERN AV β-APO-8'-KAROTENSYRA I KONCENTRERAT SMÖR OCH SMÖR GENOM SPEKTROMETRI

1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Metoden är ett förfarande för kvantitativ bestämning av etylestern av β-apo-8'-karotensyra (apokarotenester) i koncentrerat smör och smör. Apokarotenestern 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 petroleumeter och absorbansen mäts vid 440 nm. Förekomsten av apokarotenester bestäms med hjälp av en extern standard.

3. UTRUSTNING

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 ljuspassagelängd är 1 cm.

3.3 Mätkolvar, t.ex. 20 ml och 100 ml.

3.4 Analysvåg med en känslighet av 0,1 mg, med kapacitet att väga på 1 mg när, med en avläsbarhet på 0,1 mg.

3.5 Ugn, 45 °C ± 1 °C.

3.6 Askfria snabbfilter.

4. REAGENSER

Alla reagenser ska vara av vedertagen analyskvalitet.

4.1 Suspension av apokarotenester (ca 20 %).

4.1.1 Fastställ suspensionens innehåll enligt nedanstående:

Värm suspensionen till mellan 45 °C och 50 °C och homogenisera i den oöppnade, ursprungliga behållaren. Väg upp ca 400 mg i en mätkolv (100 ml), lös upp detta i 20 ml kloroform (4.4) och späd till märket med cyklohexan (4.5). Späd 5 ml av lösningen till 100 ml med cyklohexan (lösning A). Späd 5 ml av lösning A till 100 ml med cyklohexan. Mät absorbansen vid 447–449 nm (mät maximum med cyklohexan som blankprov och med hjälp av kyvetter med ljuspassagelängden 1 cm).

Halt av apokarotenester P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **eller** utveckla: $(Abs_{max}/2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{max} = mätlösningens absorbans vid maximum

M_{susp} = suspensionens vikt (g)

2 550 = absorbansvärdet för referensen (1 %, 1 cm)

P = suspensionens renhetsgrad (halt) (%)

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

4.1.2 Apokarotenesterstandardlösning, ca 0,2 mg/ml.

Väg upp ca 0,100 g apokarotenestersuspension (4.1.1) (W), på 1 mg när, lös i petroleumeter (4.2), överför kvantitativt till en 100 ml mätkolv och fyll på upp till märket med petroleumeter.

Denna lösning innehåller (W × P)/10 mg/ml apokarotenester.

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 **Provberedning**

5.1.1 *Koncentrerat smör*

Smält provet i en ugn vid ca 45 °C.

5.1.2 *Smör*

Smält provet i en ugn vid ca 45 °C och filtrera en del därav med ett filter innehållande ca 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. Ta en lämplig mängd smörfett.

5.2 **Bestämning**

Väg upp ca 1 g koncentrerat smör (eller extraherat smörfett (5.1.2)), (M), på 1 mg när. Överför kvantitativt till en 20 ml (V) mätkolv genom att använda petroleumeter (4.2). Fyll på upp till märket och blanda väl.

Överför en alikvot till en optisk cell med 1 cm ljuspassagelängd och mät absorbansen vid 440 nm mot ett blankprov bestående av petroleumeter. Fastställ koncentrationen av apokarotenester i lösningen med hjälp av den erhållna standardkurvan (C µg/ml).

5.3 **Kalibrering**

Pipettera 0, 0,25, 0,5, 0,75 och 1,0 ml av apokarotenesterstandardlösningen (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 beräknas exakt med hjälp av standardlösningens koncentration (4.1.2), (W × P)/10 mg/ml. Mät absorbanserna vid 440 nm mot ett blankprov bestående av petroleumeter (4.2).

Pricka in värdena i ett diagram med absorbansen längs y-axeln och apokarotenesterkoncentrationen längs x-axeln. Beräkna ekvationen för standardkurvan.

6. BERÄKNING AV RESULTATEN

6.1 Apokarotenesterhalten, uttryckt som mg per kg produkt, fås enligt följande:

Koncentrerat smör: (C × V)/M

Smör: 0,82 (C × V)/M

där:

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

V = provlösningens volym (ml) (5.2)

M = provets (5.2) vikt (g)

0,82 = korrektionsfaktor för smörfetthalten i smör

7. METODENS NOGGRANNHET

7.1 **Repeterbarhet**

7.1.1 *Smöranalys*

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts inom kortast möjliga tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 1,4 mg/kg.

7.1.2 *Analys av koncentrerat smör*

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts inom kortast möjliga tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 1,6 mg/kg.

7.2 **Reproducerbarhet**

7.2.1 *Smöranalys*

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier under användning av olika utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 4,7 mg/kg.

7.2. ***2 Analys av koncentrerat smör***

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier under användning av olika utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 5,3 mg/kg.

7.3 **Källa för precisionsdata**

Precisionsdata erhölls från ett experiment som utfördes 1995 och som omfattade elva laboratorier och tolv spårämneshaltiga prover (sex stycken blindprover i duplikat) för smör och tolv spårämneshaltiga prover (sex stycken blindprover i duplikat) för koncentrerat smör.

8. TOLERANSGRÄNSER

8.1 Tre prover ska 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 produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 17,7 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningen).

— 12,2 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 17,7 mg/kg och 12,2 mg/kg.

8.3 **Koncentrerat smör**

8.3.1 Inblandningsgraden för koncentrerat smör, med beaktande av bakgrundsabsorbansen är 24 mg/kg.

Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 19,2 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningen).

— 13,2 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningen).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 19,2 mg/kg och 13,2 mg/kg.

BILAGA VIII

(Artikel 5)

BESTÄMNING AV SITOSTEROL ELLER STIGMASTEROL I SMÖR ELLER KONCENTRERAT SMÖR GENOM GASKROMATOGRAFI MED KAPILLÄRKOLONN

1. SYFTE 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 förtvålas med kaliumhydroxid i en etanollösning och de icke-förtvålningsbara beståndsdelarna extraheras med dietyleter.

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

3. UTRUSTNING

3.1 En 150 ml kolv till förtvålning med återloppskylare med inslipade anslutningar.

3.2 500 ml separertrattar.

3.3 250 ml kolvar.

3.4 Tryckutjämningskärl, 250 ml eller motsvarande, för att samla upp överbliven dietyleter.

3.5 Glaskolonn, 350 mm × 20 mm med sintrad glaspropp.

3.6 Vattenbad eller värmemantel.

3.7 Reaktionsrör, 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 Förångningsenhet med inställbar temperatur.

3.8.3 Flamjoniseringsdetektor och signalomvandlingsförstärkare.

3.8.4 Skrivare med integrator som kan användas tillsammans med signalomvandlingsförstärkaren (3.8.3).

3.9 Kapillärkolonn av syntetisk kvarts, helt belagd med BP1 eller likvärdigt material (eller någon annan kolonn med minst samma upplösning), med en enhetlig tjocklek av 0,25 µm. Kolonnen ska kunna separera trimetylsilylderivat av lanosterol och sitosterol. En 12 m lång BP1-kolonn med en innerdiameter på 0,2 mm är lämplig.

3.10 En 1 µl mikrospruta för gaskromatografi med härdad nål.

4. REAGENSER

Alla reagenser ska vara av vedertagen analyskvalitet. Vattnet ska vara destillerat vatten 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 ska ha koncentrationen 1,0 mg/ml.

4.3.1.2 Betulinlösning som används vid bestämning av stigmasterol ska ha koncentrationen 0,4 mg/ml.

4.4 Analytiskt ren dietyleter (fri från peroxider och restsubstanser).

4.5 Natriumsulfat, vattenfritt, i granulatform och torkat 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 ska 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 ska bestämmas genom tillämpning av normaliseringsmetoden. 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 ska kontrolleras för de aktuella koncentrationsnivåerna.

4.8.1 Standardlösning av sitosterol: bered en lösning som, på 0,001 mg/ml när, 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, på 0,001 mg/ml när, 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. FÖRFARANDE

5.1 **Beredning av standardlösningar för kromatografi**

Den interna standardlösningen (4.3.1) ska tillsättas till den aktuella sterolstandardlösningen, samtidigt som den tillsätts till 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 reaktionsrören (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 reaktionsrören (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-förtvålningsbara beståndsdelar**

5.2.1 Smält smörprovet vid en temperatur på högst 35 °C. Blanda provet noggrant genom omrörning.

Väg upp ca 1 g smör (W_2) eller koncentrerat smör (W_2), på 1 mg när, 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 minuter. 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 ska 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, tvålfria 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 reaktionsrör (3.7) med 2 ml alikvoter av dietyleter och avlägsna etern med en kväveström. Skölj kolven ytterligare två gånger med 2 ml dietyleter. Innehållet överförs varje gång till reaktionsröret 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 upplösningsförmågan (4.10) på samma sätt som proverna.

Anmärkning 4: Silylering ska 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 extraktionsskedet är otillräcklig. Om problemet kvarstår, kan en femte tvättning göras under extraktionen varvid reaktionsröret skakas kraftigt i 30 sekunder.

5.4 **Gaskromatografisk analys**

5.4.1 *Kromatografibetingelser*

Installera gaskromatografen enligt bruksanvisningen.

Riktlinjerna för kromatografens driftbetingelser är följande:

— Kolonntemperatur: 265 °C

— Injektortemperatur: 265 °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 linjäritet kontrolleras inom de aktuella koncentrationsområdena.

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

— Injicerad mängd: 1 µl trimetylsilyleterlösning

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

Dessa betingelser måste ändras beroende på kolonnens och gaskromatografens specifika egenskaper, för att erhålla kromatogram som uppfyller följande krav:

— Sitosteroltoppen ska vara tydligt skild från lanosteroltoppen. Figur 1 visar hur ett typiskt kromatogram av en silylerad lösning för kontroll av upplösningsförmågan (4.10) ska se ut.

— De relativa retentionstiderna för följande steroler bör vara ungefär:

kolesterol: 1,0

stigmasterol: 1,3

sitosterol: 1,5

betulin: 2,5.

— Retentionstiden för betulin bör vara ungefär 24 minuter.

5.4.2 *Analysförfarande*

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

Injicera ytterligare 1 µl silylerad standardlösning för bestämning av responsfaktorerna för betulin.

Injicera 1 µl silylerad provlösning och mät topparnas areor. Varje provserie ska inledas och avslutas med en injicering av standardlösningar.

Som regel bör en standardlösning injiceras efter varje serie om sex injiceringar 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 för båda standarderna som omger en serie och beräkna R_1 på följande sätt:

R_1 = (genomsnittlig area för steroltoppen i standardlösningen)/(genomsnittlig area för betulintoppen i standardlösningen)

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

R_2 = (area för steroltoppen i provet)/(area för betulintoppen 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).

Halten sterol i provet (mg/kg) = $((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$

7. METODENS NOGGRANNHET

7.1 **Smör**

7.1.1 *Repeterbarhet*

7.1.1.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts inom kortast möjliga tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 19,3 mg/kg.

7.1.1.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts inom kortast möjliga tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 23,0 mg/kg.

7.1.2 *Reproducerbarhet*

7.1.2.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier under användning av olika utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 31,9 mg/kg.

7.1.2.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier, under användning av olika utrustning på identiskt provmaterial, får inte överstiga 8,7 % i förhållande till genomsnittet av resultaten.

7.1.3 *Källa för precisionsdata*

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

7.2 **Koncentrerat smör**

7.2.1 *Repeterbarhet*

7.2.1.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts inom kortast möjliga tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 10,2 mg/kg.

7.2.1.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som har utförts inom kortast möjliga tidsintervall av samma person under användning av samma utrustning på identiskt provmaterial, får inte överstiga 3,6 % i förhållande till genomsnittet av resultaten.

7.2.2 *Reproducerbarhet*

7.2.2.1 Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier under användning av olika utrustning på identiskt provmaterial får inte överstiga 25,3 mg/kg.

7.2.2.2 Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar utförda i olika laboratorier, under användning av olika utrustning på identiskt provmaterial, får inte överstiga 8,9 % i förhållande till genomsnittet av resultaten.

7.2.3 *Källa för precisionsdata*

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

8. TOLERANSGRÄNSER

8.1 Tre prover ska 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 Inblandningsgraden för stigmasterol är 150 g med en lägsta renhetsgrad av 95 % stigmasterol per ton smör, dvs. 142,5 mg/kg, eller 170 g med en lägsta renhetsgrad av 85 % stigmasterol per ton smör, dvs. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 115,8 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).

— 117,7 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).

— 80,1 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).

— 81,5 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden 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 115,8 mg/kg och 80,1 mg/kg eller 117,7 mg/kg och 81,5 mg/kg.

8.2.2 *Sitosterol*

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

8.2.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 482,6 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgrad för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).

— 347,6 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgrad för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 482,6 mg/kg och 347,6 mg/kg.

8.3 **Koncentrerat smör**

8.3.1 *Stigmasterol*

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

8.3.1.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 118,5 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).

— 120,4 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).

— 82,9 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).

— 84,3 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden 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 118,5 mg/kg och 82,9 mg/kg eller 120,4 mg/kg och 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitosterol*

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

8.3.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna ska användas för att kontrollera spårämnets inblandningsgrad och homogenitet, och det lägsta resultatet ska jämföras med följande gränser:

— 480,9 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).

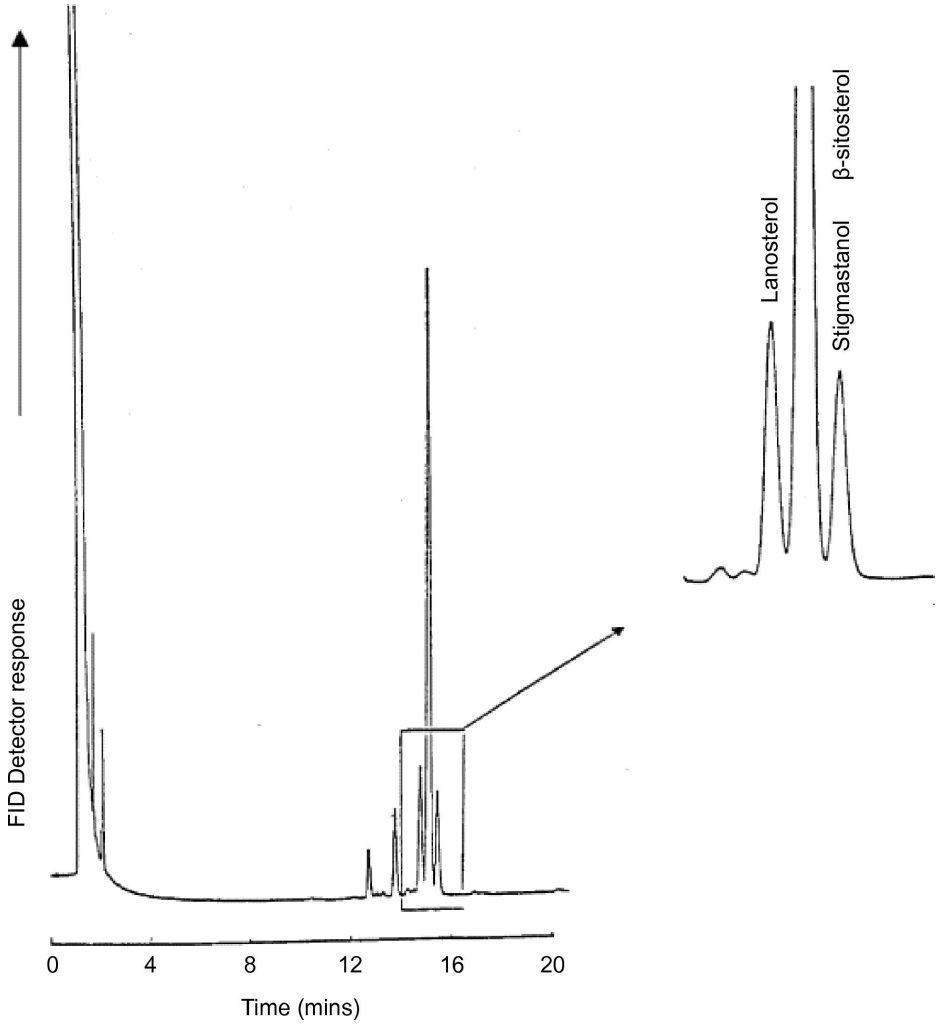
— 345,9 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna inblandningsgraden för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 480,9 mg/kg och 345,9 mg/kg.

Figur 1

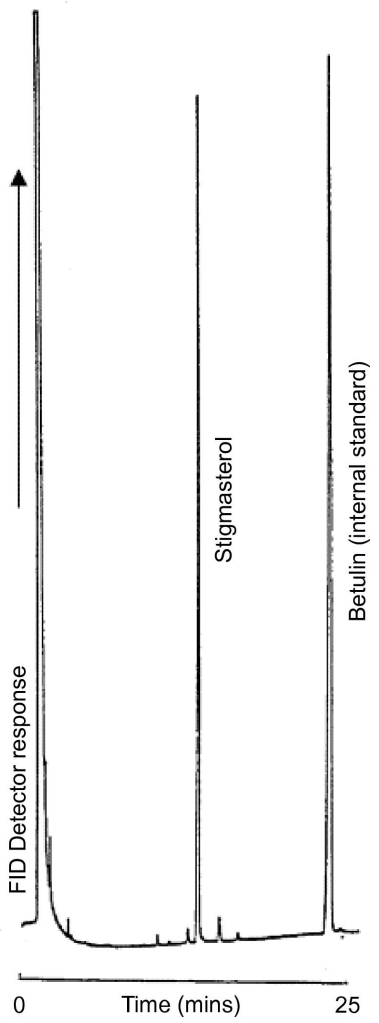
Chromatogram of resolution test mixture

Complete resolution is preferable, i.e. the peak trace for lanosterol should return to baseline before leaving for the sitosterol peak although incomplete resolution is tolerable.



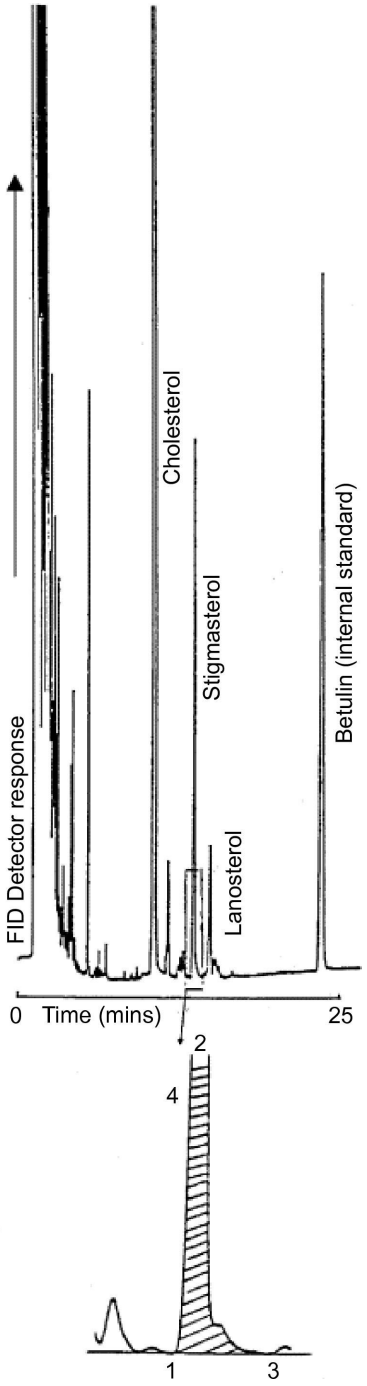
Figur 2a

Stigmasterol standard



Figur 2b

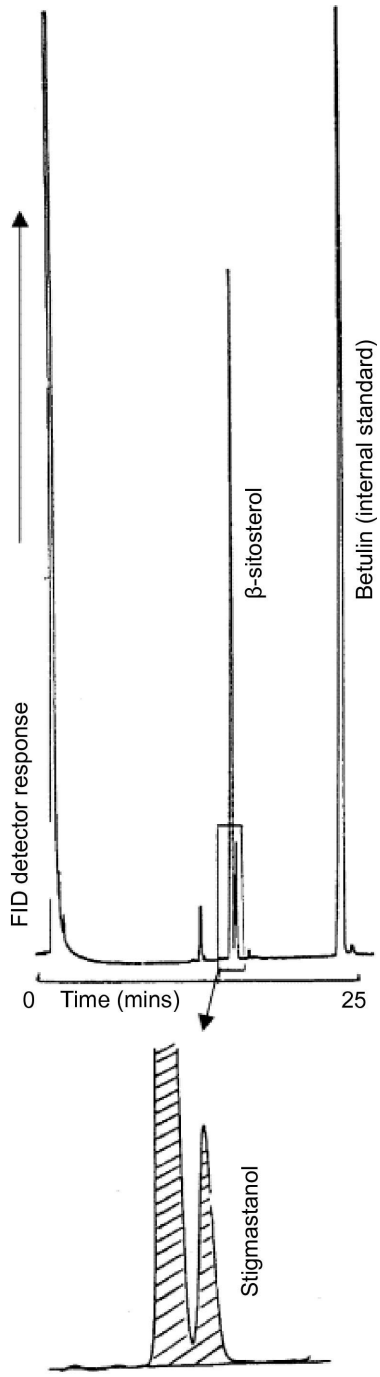
Butter sample denatured with stigmasterol



Note: Integration of the stigmasterol peak should include any tailing as defined by points 1, 2 and 3.

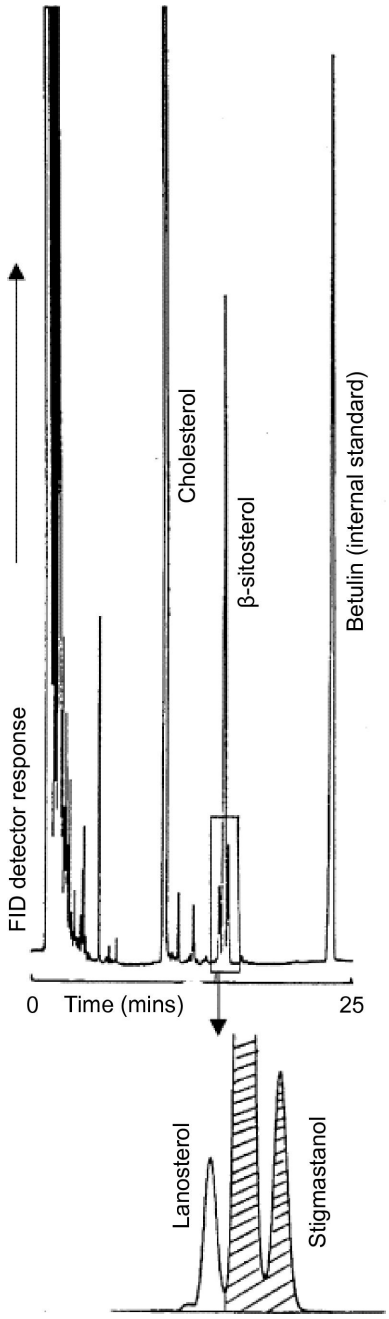
Figur 3a

Sistosterol standard



Figur 3b

Butter sample denatured with β-Sitosterol



Note: β-sitosterol often contains an impurity (identified as stigmastanol) which elutes immediately after β-sitosterol. The areas of these two peaks should be summed when evaluating the total β-sitosterol present.

BILAGA IX

(Artikel 6)

REFERENSMETOD FÖR PÅVISANDE AV 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 komjölk och kaseinat 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 komjölk och kaseinat 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 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 komjölk) genom jämförelse av provets mönster med mönster i samma gel från standardlösningar som innehåller 0 % och 1 % komjölk.

4. REAGENSER

Om inte annat anges ska kemikalier av analyskvalitet användas. Vattnet måste vara dubbeldestillerat eller av motsvarande renhetsgrad.

Anmärkning: Följande uppgifter gäller för laboratorietillverkade polyakrylamidgeler med måtten 265 × 125 × 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 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 ska 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 μS, avjoniseras den genom omrörning med 2 g Amberlite MB-3 i 30 minuter och filtreras därefter genom ett 0,45 μm 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 µl amfolyt pH 3,5–9,5 [1]
250 µl amfolyt pH 5–7 [1]
250 µl 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 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.

Anmärkning: 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 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 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 *Ammoniumkarbonatbuffert*

Titrera 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.

[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.

4.7.2 *Bovin plasmin (E.C.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 skummjölk från tackor och getter vilken behandlats med löpe och som innehåller 0 % och 1 % komjölk är tillgängliga från kommissionens institut för referensmaterial och mätningar, B-2440 Geel, Belgien.*

4.8.2 *Beredning av interimstandarder för laboratoriebruk av buffelmjölk som behandlats med löpe och som innehåller 0 % och 1 % komjölk.*

Skummjölken bereds genom att obehandlad och opaketerad mjölk 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 skummjölk från ko tillsätts till 495 ml skummjölk från buffel 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 IE/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 skummjölk från buffel. Standarden måste lagras vid – 20 °C.

Anmärkning: Det är lämpligt att kontrollera buffelmjölkens renhet genom isoelektrisk fokusering av de plasminbehandlade kaseinerna 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 isättika 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) 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.

Anmärkning: Färgningslösningen 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 Gelbärarfolie (265 × 125 mm).

5.3 Täckfolie (280 × 125 mm). Fäst en tejpremsa (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 Elektrodremsor (≥ 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 pincetter av rostfritt stål.

5.11 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 λ = 634 nm.

6. FÖRFARANDE

6.1 **Provberedning**

6.1.1 *Isolering av kaseiner*

Väg upp en mängd som motsvarar 5 g torr ost eller referensstandarder 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 fettet och vasslen. 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) 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 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 kvävestrom och pulverisera dem sedan fint i mortel.

Anmärkning: 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 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 proteinupplösande buffert (4.6).

6.2 **Beredning av akrylamidgeler som innehåller urea**

Rulla ut gelbärarfolien (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 häll omedelbart ut ett jämt lager på mitten av täckfolien. Placera ena sidan av gelbärarplattan (med folien nedåt) på täckfolieplattan och sänk ned den långsamt så att en gelfilm bildas mellan folierna och sprids ut jämt utan bubblor (figur 3). Sänk försiktigt ned hela gelbärarplattan 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 gelbärarfolien tillsammans med täckfolien genom att vicka på glasplattorna. Rengör baksidan av gelbärarfolien 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 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 gelbärarfolien med fotogen och droppa sedan några droppar fotogen (4.2) på mitten av kylblocket. Rulla därefter ut gelsandwichen (med bärarsidan nedåt) på den och se till att det inte bildas några bubblor. Torka av eventuellt överflödigt fotogen och ta bort täckfolien. 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 (elektrodavstånd 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	max. 2 500	max. 15	konst. 4	ca 300
2. Provfokusering (1)	60	max. 2 500	max. 15	konst. 4	ca 1 000
3. Slutfokusering	60	max. 2 500	max. 5	max. 20	ca 3 000
	40	max. 2 500	max. 6	max. 20	ca 3 000
	30	max. 2 500	max. 7	max. 25	ca 3 000

(1) 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 tryck ned lätt. Genomför fokuseringen enligt ovanstående betingelser och avlägsna försiktigt provapplikatorerna efter 60 minuters provfokusering.

Anmärkning: 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 provapplikatorn i steg 2 vid 0 Vh.

Ta bort provapplikatorn i steg 2 vid 30 Vh.

6.4 **Proteinfärgning**

6.4.1 *Proteinfixering*

Ta bort elektrodremsorna 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 minst 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 1: Utför fixering, tvättning, färgning och avfärgning vid 20 °C. Högre temperatur får inte användas.

Anmärkning 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 genomförs genom att proteinmönstret för det okända provet jämförs med referensstandarder på samma gel. Påvisande av komjölk 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 bedömning**

För visuell bedömning av mängden komjölk rekommenderas att provernas 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 komjölk (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 komjölk (jfr "γ_3 C" och "γ_2 C" i figurerna 4a, 4b 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 %-referensstandarden (tacka, get) eller i laboratoriets interimstandard (buffel) som analyseras på samma gel.

Anmärkning: Metoden fungerar tillfredsställande om det finns en tydlig positiv signal för både γ_2- och γ_3-kasein från komjölk i 1 %-referensstandarden, men inte i 0 %-referensstandarden. 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 %-referensstandarden.

8. REFERENSER

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

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

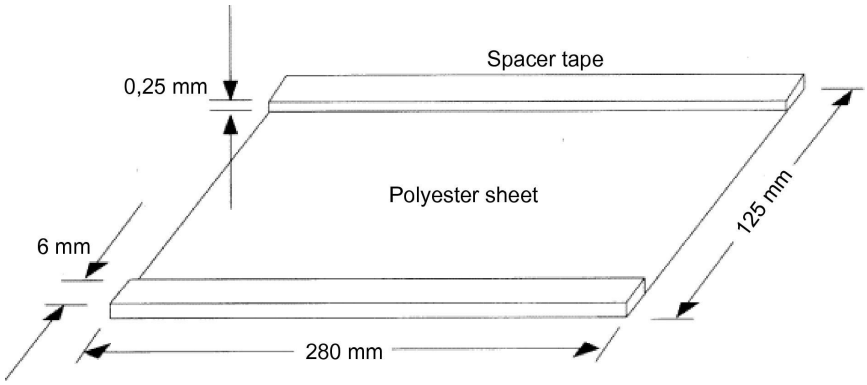
3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. i: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ed.) s. 389–393,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

4. *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).*

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

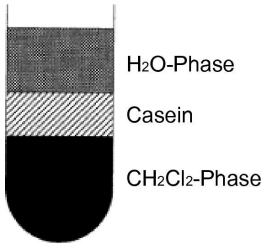
Figur 1

Schematisk bild av täckfolien



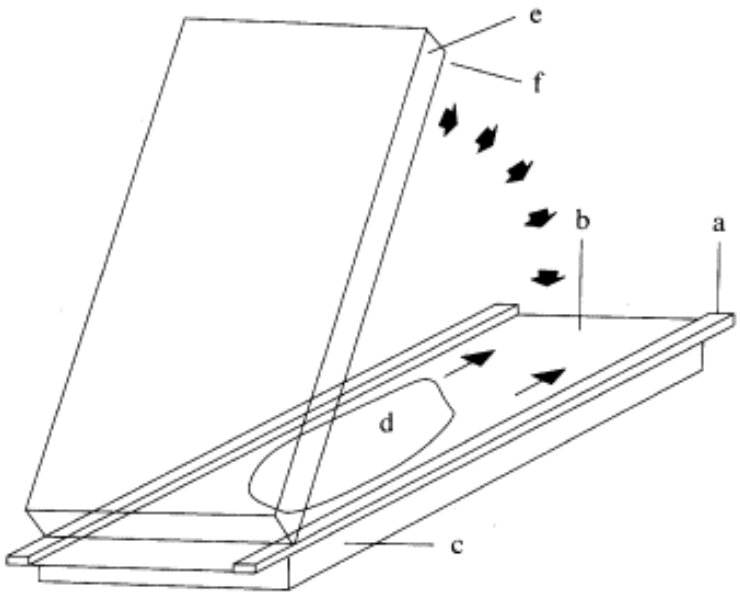
Figur 2

Kaseinlager som flyter mellan vattenfasen och den organiska fasen efter centrifugeringen



Figur 3

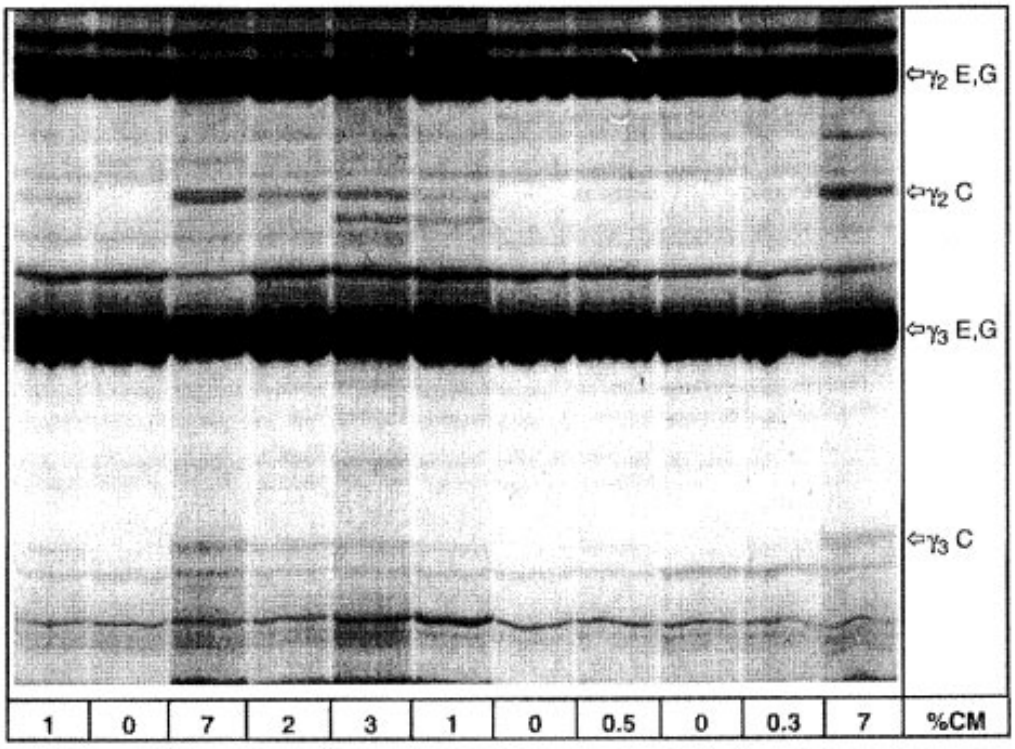
Vickningsteknik vid gjutning av ultratunna polyakrylamidgeler



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

Figur 4a

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

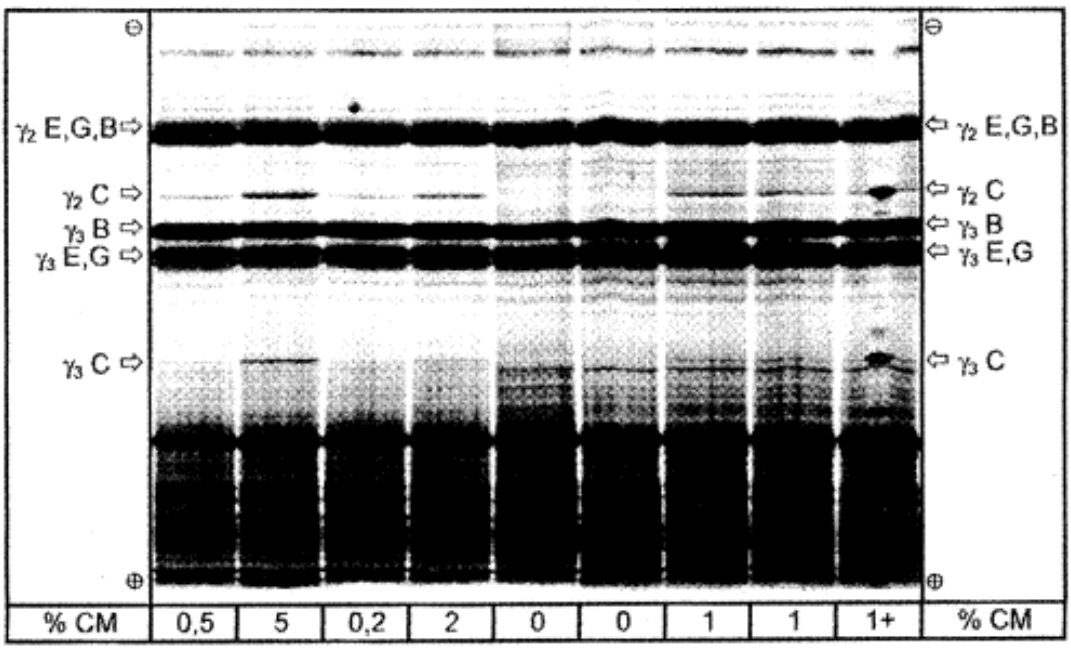


% CM = procent komjölk, C = ko, E = tacka, G = get.

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 komjölk

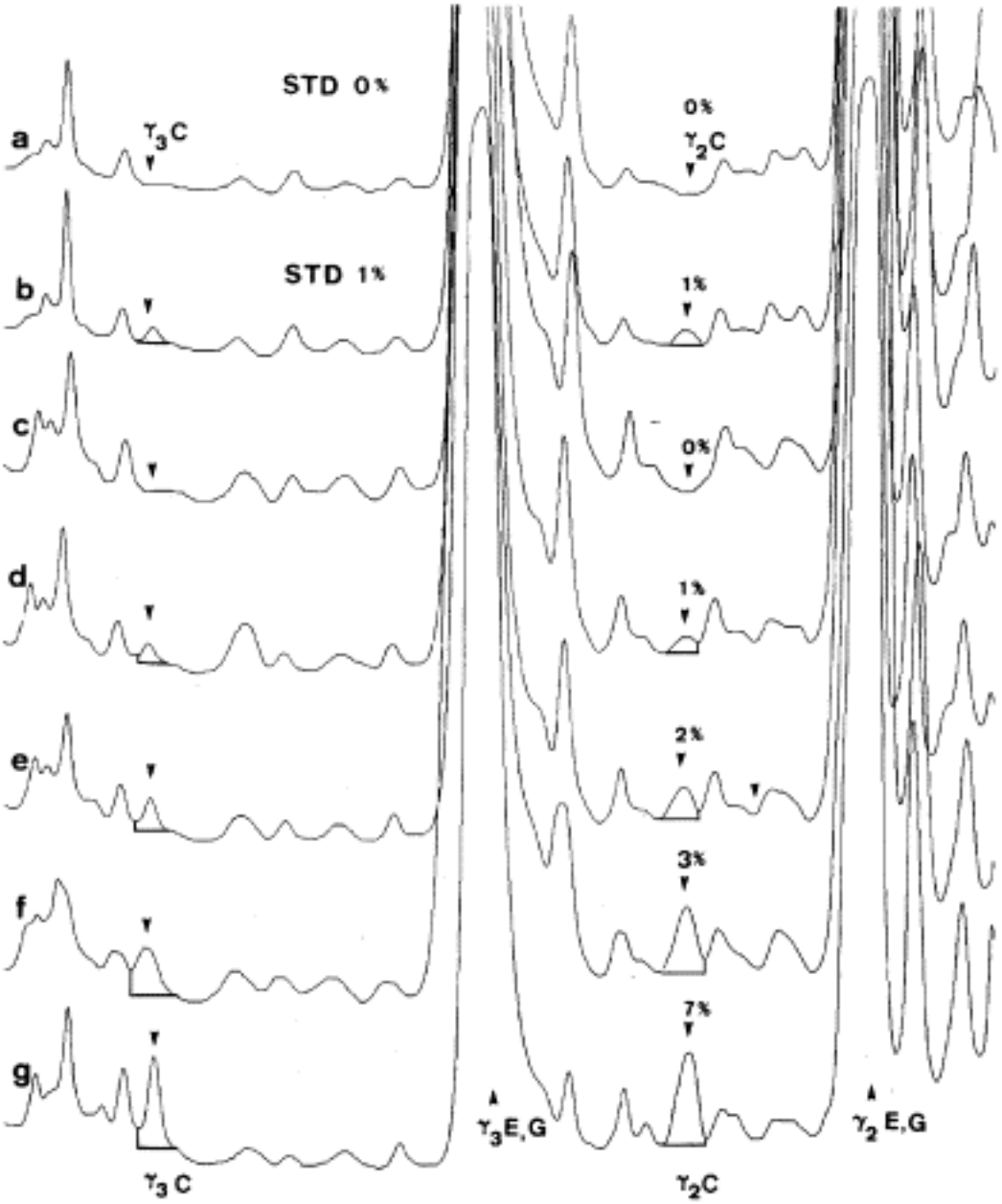


% CM = procent komjölk, 1 + = prov som innehåller 1 % komjölk och där rent kasein från komjölk tillsatts i mitten av figuren. C = ko, E = tacka, G = get, B = buffel.

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 = ostprov som innehåller 0, 1, 2, 3 och 7 % komjölk. C = ko, E = tacka, G = get.
Den övre halvan av IEF-gelen analyserades vid λ = 634 nm.

BILAGA X

(Artikel 7)

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

1. PROVBEREDNING

   ISO-standard 8261.

2. FÖRFARANDE

   ISO-standard 4831.

   Prover som motsvarar 1 g smör eller 0,1 g skummjölkspulver eller kasein/kaseinater inokuleras i odlingsmediet.

   Tre rör inokuleras per prov.

3. RESULTAT

   Om de tre rören ger tre negativa resultat är kravet ”uppfyllt”

   Om de tre rören ger två eller tre positiva resultat är kravet ”inte uppfyllt”.

   Om de tre rören ger två negativa resultat görs analysen om två gånger (med två rör).

   — Om de två resultaten är negativa resultat är kravet ”uppfyllt”.

   — Om åtminstone ett resultat är positivt är kravet ”inte uppfyllt”.

BILAGA XI

(Artikel 8)

BESTÄMNING AV LAKTOSHALTEN I FODERBLANDNINGAR

1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Bestämning av laktoshalten i foderblandningar.

2. HÄNVISNING

Laktoshalten fastställs med den nedan beskrivna metoden och uttrycks i viktprocent.

3. DEFINITION

Halten vattenfri laktos uttrycks som g per 100 g.

4. PRINCIP

Foderblandningen rekonstitueras med vatten. En ”Biggs”-lösning tillsätts till en utspädd vägd alikvot för att fälla ut fettet och proteinkomponentfraktionerna i foderblandningen. Provet filtreras (eller centrifugeras) och filtratet (eller supernatanten) injiceras i en HPLC-kolonn med katjonbytare av blyform under användning av vatten av HPLC-kvalitet som den mobila fasen. Den eluerade laktosen detekteras med en differentialrefraktometer (i).

5. REAGENSER

5.1 **Allmänt**

Använd endast reagenser med vedertagen analyskvalitet, om inget annat anges, och avgasat vatten av HPLC-kvalitet.

5.2 **Laktos**

D-laktosmonohydrat ($(C_{12}H_{22})O_{11}\cdot H_2O$) kan ta upp ytterligare fukt. Mät den verkliga mängden vatten innan användning med Karl-Fisher-metoden eller ta bort överskottsfukten genom att placera laktosen i en ugn vid 105 °C i 8 timmar (laktos förlorar inte sitt kristallvatten genom denna behandling).

5.3 **Koncentrerad Biggs-/Szijarto-lösning** (ii)

Lös 9,10 g zinkacetatdihydrat ($Zn(CH_3COO)_2\cdot 2H_2O$) och 5,46 g fosforwolframsyramonohydrat ($H_3[P(W_3O_{10})_4\cdot xH_2O]$) i ca 70 ml vatten av HPLC-kvalitet (6.8) i en 100 ml mätkolv.

Tillsätt 5,81 ml isättika (CH_3COOH). Späd till 100 ml-märket med vatten av HPLC-kvalitet (6.8) och blanda. Lösningen kan förvaras vid rumstemperatur i ett år.

5.4 **Utspädd Biggs-/Szijarto-lösning**

Späd 25 ml koncentrerad Biggs/Szijarto-lösning (5.3) med vatten till 500 ml i en mätkolv. Lösningen kan förvaras vid rumstemperatur i en månad.

5.5 **Beredning av vatten av HPLC-kvalitet**

Filtrera ultrarent vatten (6.8) med hjälp av vakuumsystemfiltrering (6.9). För att förbättra pumpens prestanda och erhålla en stabil baslinje ska den mobila fasen avgasas varje dag. Använd någon tillgänglig teknik, såsom genomblåsning med helium, ultraljudsbehandling, vakuum- eller inlineavgasningssystem.

Anmärkning: För att förlänga kolonnens livstid är det viktigt att eluentens koldioxidhalt är så låg som möjligt och att återupptag förhindras.

6. UTRUSTNING

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

6.1 **HPLC-jonbytarkolonn**

Kolonnpackning: 8 % tvärbunden polystyren-divinylbensen-sampolymer som har modifierats med katjonbytargrupper av blyform.

Kolonndimensioner: 300 mm lång med en innerdiameter på ca 8 mm.

Andra diametrar kan användas under förutsättning att flödeshastigheten anpassas till ändringen.

6.2 **Förkolonn**

Förkolonnen är en kombination av en separat katjonbytare (H^+) och en anjonbytare (CO_3-), som var och en är packade i kolonner med dimensionerna ca 30 mm × 4,6 mm (L × ID) (t.ex. Micro-Guard-kolonner i en Micro-Guard-hållare) som i sin tur är anslutna i serie eller i form av en blandad bädd bestående av AG 50W–X4, –400 mesh (H^+) och AG3-X4A, 200–400 mesh (OH-) i förhållandet 35:65 (viktprocent) som är manuellt packad i en kolonn med dimensionerna ca 20 × 9 mm (L × ID).

6.3 **Kolonnugn**

Ugn som kan bibehålla en konstant temperatur på 85 °C ± 1 °C.

6.4 **HPLC-pump**

Pump som kan generera en konstant flödeshastighet (< 0,5 % fluktuationer) på 0,2–1,0 m/min.

6.5 **HPLC-injektor**

Automatisk provtagare som kan injicera 25 µl och har en repeterbarhet på < 0,5 %.

Alternativt kan en manuell anordning användas (samma krav som för den automatiska provtagaren).

6.6 **HPLC-detektor**

Brytningsindexdetektor med hög känslighet och ett brus på < $5{,}10^{-9}$ brytningsindexenheter.

6.7 **Integrator**

Programvara eller en dedicerad integrator för att samla in data, behandla och generera toppareor och topphöjder som kan omvandlas till laktoskoncentrationer.

6.8 **Vattenreningsenhet**

System som kan ge ultrarent vatten (typ 1) med en resistivitet på > 14 MΩ.cm.

6.9 **Lösningsmedelsfiltreringsenhet**

System som möjliggör filtrering av vattnet med ett membranfilter med porstorleken 0,45 µm.

Anmärkning: Många vattenreningsenheter (6.8) har inbyggd 0,45 eller 0,2 µm filtrering. Ingen ytterligare filtrering behövs om detta vatten används direkt.

6.10 **Analysvåg**

Våg med en avläsbarhet på 0,1 mg.

6.11 **Vattenbad**

Vattenbad som kan hålla en temperatur på 40 °C (± 0,5).

6.12 **Centrifug**

Med en kapacitet på minst 3 000 g för Eppendorf-rör eller motsvarande eller större rör.

6.13 **Mätkolv på 50 ml**

Kapacitet på 50 ml, klass A.

Anmärkning: Kolvar med annan kapacitet kan användas om volymfaktorn beaktas.

6.14 **Mätkolv på 100 ml**

Kapacitet på 100 ml, klass A.

6.15 **Graderad pipett**

Graderad pipett för 10 ml.

Anmärkning: Alternativt kan en manuell pipett med en kapacitet på 5 ml användas genom att 5 ml reagens (5.3) tillsätts två gånger.

7. PROVTAGNING

Det är viktigt att laboratoriet erhåller ett prov som har tagits enligt ISO 707|IDF 50 [iii], och som verkligen är representativt och inte har skadats eller förändrats under transport eller lagring.

8. BEREDNING AV LAKTOSSTANDARDLÖSNING

8.1 **Standard 1**

Lös en noggrant uppvägd (0,1 mg noggrannhet) mängd laktosmonohydrat (5.2) på ca 50 mg i en 100 ml mätkolv (6.14) och späd till märket med vatten.

8.2 **Standard 2**

Lös en noggrant uppvägd (0,1 mg noggrannhet) mängd laktosmonohydrat (5.2) på ca 100 mg i en mätkolv på 100 ml (6.14) och späd till märket med vatten.

Anmärkning: Standardlösningarna kan förvaras högst en vecka vid ca 5 °C.

9. PROVBEREDNING

9.1 **Rekonstituering av provet**

Väg upp ca 5 g av pulvret i en 50 ml mätkolv (6.13) och notera vikten med 1 mg noggrannhet ($W1_1$, (11)). Tillsätt 50 ml vatten och notera viktökningen (W_2 (11)) med 0,01 g noggrannhet. Placera den förslutna kolven i ett vattenbad (6.11) i 30 minuter. Vänd kolven upp och ned några gånger under tiden. Låt därefter provet svalna till rumstemperatur.

9.2 **Provbehandling**

Ta ca 1 g av denna lösning och överför det till en 50 ml mätkolv (6.13). Notera vikten med 1 mg noggrannhet (W_3 (11)). Tillsätt 20 ml vatten följt av 10 ml utspätt Biggs/Szijarto-reagens (5.4) och späd till märket med vatten. Vänd försiktigt kolven upp och ned 5 gånger under de första 30 minuterna.

Ta efter en timme en alikvot och centrifugera (6.12) den vid 3 000 g under 10 minuter (högre g kan användas vid motsvarande kortare tid). Använd en alikvot av supernatanten för HPLC-analys.

10. HPLC-BESTÄMNING

10.1 **Förberedande beredning av HPLC**

10.1.1 *Installation av kolonn och förkolonn*

Installera förkolonnen (6.2) utanför kolonnugnen (6.3) och kolonnen (6.1) i ugnen.

Anmärkning: Om ugnen inte har något rörsystem för förvärmning av eluenten måste eluenten passera ett ca 15 cm rostfritt rörsystem i ugnen innan den når kolonnen (det är absolut nödvändigt att värma eluenten innan den når kolonnen, i annat fall uppträder toppbreddning).

10.1.2 *Detektor och initialt flöde*

För att få en stabil baslinje ska detektorn (6.6) slås på minst 24 timmar före analysen. Ställ in detektorns innertemperatur på 35 °C. Ställ in flödeshastigheten på 0,2 ml/min (6.4) under minst 20 minuter medan kolonnugnen (6.3) är inställd på rumstemperatur.

10.1.3 *Kolonnugn och slutlig flödeshastighet*

Ställ in kolonnugnen (6.3) på 85 °C. Då temperaturen har uppnåtts ökas flödeshastigheten gradvis efter 30 minuter från 0,2 ml/min till 0,6 ml/min (6.4). Låt systemet nå jämvikt vid denna flödeshastighet och vid 85 °C under 2 timmar eller tills en stabil baslinje erhålls.

10.1.4 *Integrering*

Välj noggrant insamlings- och integreringsparametrar (6.7), såsom datahastighet, känslighet, tidskonstant, toppbredd och tröskel.

Retentionstiden för laktos är ca 11 minuter.

Anmärkning: Många program för datainsamling (6.7) erbjuder enkel mätning av antalet teoretiska bottnar. Mät antalet teoretiska bottnar för standard 1 (8.1) regelbundet och byt kolonn (6.1) då plate count-värdet är 25 % lägre än initialvärdet för en ny kolonn.

10.1.5 *Test av förkolonn*

Kontrollera regelbundet (minst en gång för varje sekvens) förkolonnens (6.2) förmåga att eliminera salter från provet genom att injicera 25 µl 0,05 % natriumkloridlösning. Då toppar uppträder måste förkolonnen bytas.

10.2 **Köra standarder**

Injicera i början av varje analysserie 25 µl (‎6.5) av standard 1 (8.1) och därefter av standard 2 (8.2). Upprepa detta för vart 10:e till 20:e prov och dessutom i slutet av varje sekvens.

10.3 **Köra prover**

Injicera 25 µl supernatant (9.2) av provet.

11. BERÄKNING OCH RESULTAT

11.1 **Kalibrering**

Normalt används topphöjder för att beräkna resultat. Om signalen innehåller alltför mycket brus kan topparean användas (kvantifiering med hjälp av topphöjden påverkas mindre av toppar av komponenter med låg koncentration och som är delvis, men inte i tillräcklig grad, separerade från laktostoppen).

Programmet (6.7) ska beräkna en linjär kalibreringskurva som går genom origo. Kontrollera om kurvan eventuellt är olinjär (märkbar olinjäritet beror i första hand på ett misstag vid beredningen av standarderna 1 [8.1] och 2 [8.2], dålig integrering och, mindre sannolikt, av en felaktig injektor).

Använd de beräknade laktoskoncentrationerna i mg/ml av standarderna 1 (8.1) och 2 (8.2) som ingångsvärde för vattenfri laktos.

Kalibreringslinjens lutning (RF) definieras som arean/koncentrationen i mg/ml.

11.2 **Prover**

Analysresultatet erhålls som g/100 g och beräknas med programmet (6.7) eller med hjälp av följande formel:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0{,}1$$

där:

C: laktoskoncentrationen i g/100 pulver

H: topphöjden av laktos i provet

RF: responsfaktorn (eller lutningen) för kalibreringslinjen i mV/mg/ml

W_1: provvikten i g för pulverprovet (9.1)

W_2: vikten i g för tillsatsen av vatten till pulverprovet (9.1)

W_3: provvikten i g för den rekonstituerade lösningen av pulver (9.2)

50: volym för mätkolven som används i (9.2)

0,1: omvandling av resultatet till g/100 g

12. PRECISION

De värden som härrör från denna interlaboratoriva jämförelse behöver inte vara tillämpbara för andra koncentrationsintervall- och koncentrationsmatriser än dem som anges. Värdena för repeterbarhet och reproducerbarhet härleds från resultatet från en interlaborativ jämförelse som utförs i enlighet med ISO 5725 [iv].

12.1 **Repeterbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium utförda av samma person som använder samma utrustning inom ett kort tidsintervall, kommer inte att vara större än xxx (fastställs i en jämförelseprovning) i högst 5 % av fallen [v].

12.2 **Reproducerbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i olika laboratorier utförda av olika personer som använder olika utrustning kommer inte att vara större än 0,5 g/100 g (fastställs i en jämförelseprovning) i högst 5 % av fallen.

13. REFERENSER

[i] J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89–106.

[ii] D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

[iii] ISO 707 (IDF 50), Milk and milk products – Methods of sampling.

[iv] ISO 5725–1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions.

[v] ISO 5725–2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: A basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

BILAGA XII

(Artikel 9)

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

Internationell standard ISO 707 – Milk and Milk Products – Methods of sampling, i enlighet med riktlinjerna i bilaga I.2 c sista stycket.

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 kaliumdivätefostat (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.

Anmärkning: Eluentsammansättningen kan uppdateras för att överensstämma 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.

Anmärkning: 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, 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 dispenseringssystem som kan tillföra 10,0 ml på 2 minuter.

6.9 Dispenseringssystem 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 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 A.

6.11.6 Integrator som medger dal-till-dal-integrering.

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

7.2 Proverna ska förvaras under sådana 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 ± 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 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 Injicera 15–30 µl noggrant uppmätt supernatant eller filtrat (8.3.3) i HPLC-apparaten (6.11) med en flödeshastighet av 1,0 ml elueringslösning (5.2) per minut.

Anmärkning 1: En annan flödeshastighet kan användas beroende på kolonnernas innerdiameter eller anvisningar från kolonntillverkaren.

Anmärkning 2: 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.

Anmärkning 3: 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 flödeshastighet 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 trikloräättiksyralösning. 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 [0] topp II 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 ≥ 1,000 när halten vassle är ≤ 5 %.

Den tillåtna osäkerheten för RRT_{III}-värdena är ± 0,002.

Normalt avviker värdet på RRT_{III} [0] endast lite från 1,034. Beroende på kolonnernas skick kan värdet närma sig 1,000, men måste 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 löpevassle per 100 g av produkten är ≤ 2,0 + (S_{III}[0] − 0,9) där

2,0	=	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)	=	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] ≤ 160, bestäm löpevasslehalten 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, bestäm den totala proteinhalten (P %), undersök därefter 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} = den relativa arean av topp III beräknad antingen enligt den totala proteinhalten eller enligt den relativa arean av topp S_{II} [E]

P % = den totala proteinhalten uttryckt som viktprocent

S_{II} [E] = 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: $T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\ \% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)] T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$

9.4.3.2

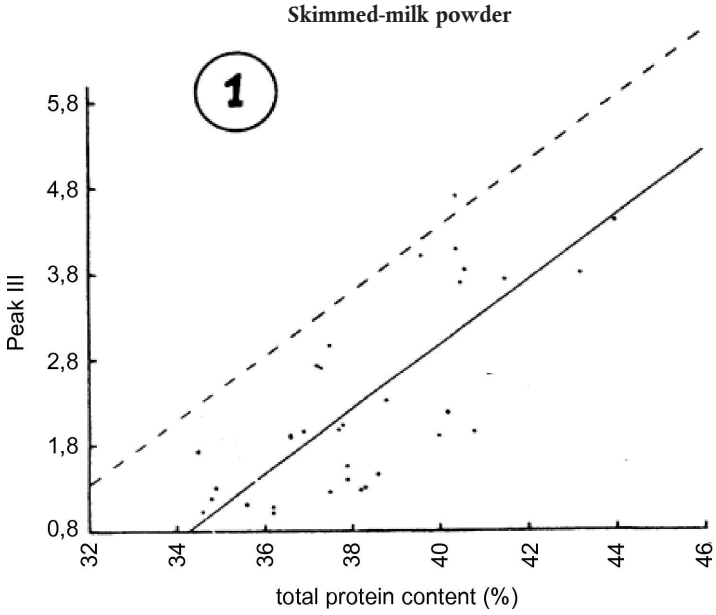
Om T_1 och/eller T_2	är noll eller mindre än noll, kan förekomst av löpevassle inte fastställas
Om T_1 och T_2	överstiger noll förekommer löpevassle

Halten löpevassle beräknas enligt följande formel: $W = T_2 + 0{,}91$

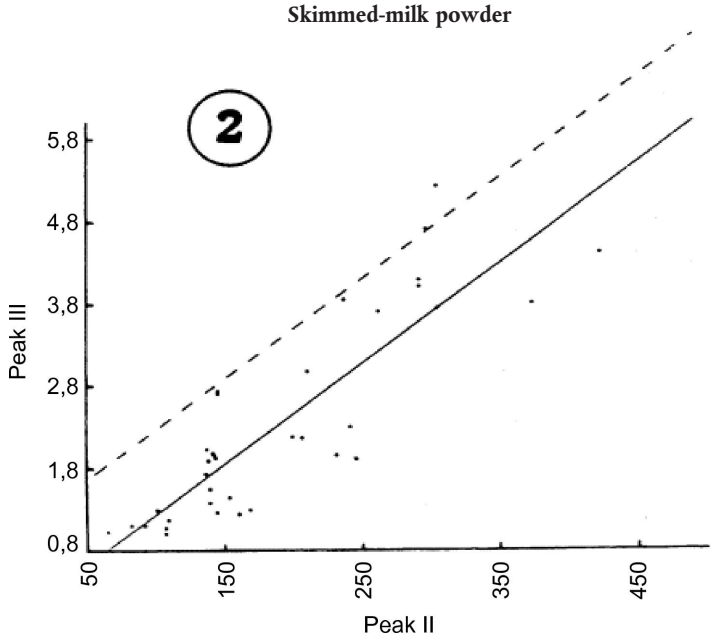
där:

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

Skimmed-milk powder



Skimmed-milk powder



BILAGA XIII

(Artikel 9)

BESTÄMNING AV LÖPEVASSLEPULVER I SKUMMJÖLKSPULVER OCH BLANDNINGAR ENLIGT FÖRORDNING (EG) NR 2799/1999

1. SYFTE: PÅVISANDE AV TILLSATT LÖPEVASSLEPULVER I

a) skummjölkspulver enligt artikel 2 i förordning (EG) nr 2799/1999, och

b) blandningar enligt artikel 4 i förordning (EG) nr 2799/1999.

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

Halten kaseinmakropeptid fastställs enligt bilaga XII. Prover som ger positiva resultat analyseras med avseende på kaseinmakropeptid A genom högupplösande vätskekromatografi med omvänd fas (HPLC-metod). Alternativt kan prover analyseras direkt med HPLC-metoden med omvänd fas. 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.

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

Reagenser till HPLC med omvänd fas.

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 ($CH_3CHOHCH_3$) 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].) ([1]).

6. UTRUSTNING

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

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 dispenseringssystem som kan tillföra 10,0 ml på 2 minuter.

6.9 Dispenseringssystem 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.

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 CMP_A.

7. PROVTAGNING

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

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

([1]) Vasslepulver (löpetyp) med standardsammansättning samt uppblandat skummjölkspulver kan fås från NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL 6710 BA., Nederländerna. Pulver som ger resultat motsvarande NIZO-pulver får också användas.

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

Anmärkning: 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 uppvägda provet. Lös pulvret genom att skaka det i mekanisk skakapparat (6.3) i 5 minuter eller i 30 minuter om det gäller syrad kärnmjölk. 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 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 Utför HPLC-analysen som beskrivs i bilaga XII. Vid negativt resultat innehåller provet inget löpevasslepulver i påvisbara mängder. Vid positivt resultat ska den HPLC-metod med omvänd fas som beskrivs nedan tillämpas. Alternativt kan HPLC-metoden med omvänd fas tillämpas direkt. Förekomsten av pulver från syrad kärnmjölk kan ge falskt positiva resultat om den metod som beskrivs i bilaga XII används. 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 CMP_A är optimal för gradientsystem med en dödvolym på ca 6 ml (volym från den punkt där lösningsmedlen blandas till och med den punkt där injiceringsslingan slutar). I gradientsystem med lägre dödvolym (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 (minuter)	Flöde (ml/min)	% A	% B	Kurva
Start	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 användning av nedanstående formel kan den ursprungliga sammansättningen för det lösningsmedel som kommer att användas för den normala gradienten (se 8.4.3) beräknas: $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26)/6) \times 30/27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26)/6) \times 1,11$

där:

RT_{cmpA}: 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 flödeshastighet 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 eluentsammansättningens 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.

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

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

Anmärkning 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 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.

Anmärkning: 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.

Anmärkning: 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*

CMP_A-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 löpevasslepulver i provet**

W(E) = R × H(E)

där:

W(E) = procentandelen (viktprocent) löpevassle 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 löpevasslepulver.

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*

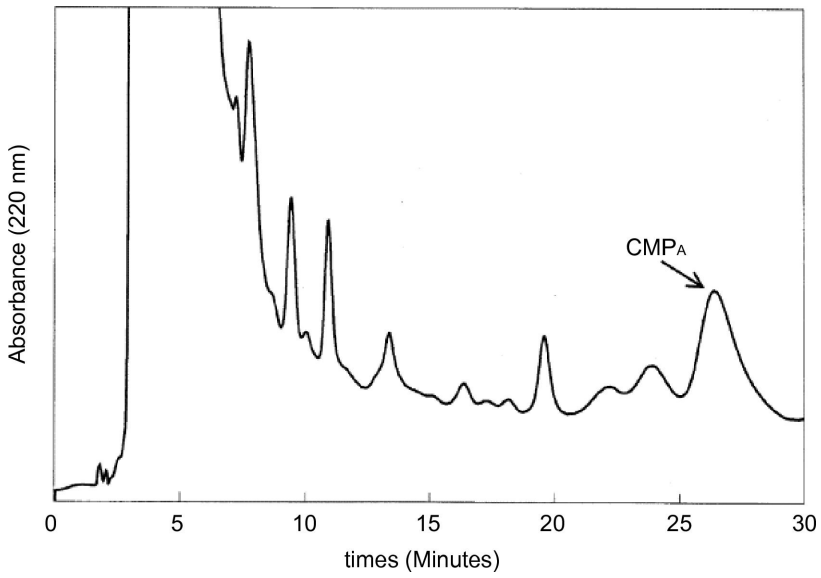
För mellan 0 % och 16 % löpevasslehalt bör ett linjärt förhållande uppnås med en korrelationskoefficient som är > 0,99.

9.4 **Tolkning**

Gränsen på 1 % är fastlagd i enlighet med bestämmelserna i bilaga XIX till förordning (EEG) nr 214/2001, punkterna 9.2 och 9.4.1, vilket innefattar osäkerheten på grund av reproducerbarheten.

Table 1

Ni –4,6 standard



BILAGA XIV

(Artikel 10)

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 gör det möjligt att påvisa fasta kärnmjölkspartiklar i skummjölkspulver.

2. DEFINITION

PS- och PE-halt: substansens massfraktion bestäms genom det förfarande som specificeras här. Resultatet uttrycks i milligram fosfatidyletanolamindipalmitoyl (PEDP) 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 fluorenscensdetektion. Kvantifiering av PS- och PE-halt i provet görs med hjälp av ett standardprov som innehåller en känd mängd PEDP.

4. REAGENSER

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

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

Anmärkning: Standardmaterial måste 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 måste 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 mätglas på 25 ml.

5.12 pH-meter, med 0,1 pH-enheters noggrannhet.

5.13 HPLC-utrustning, som består av följande:

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 kolonntemperatur 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 enligt 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 märket 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 märket 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 till märket 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 x g i 10 minuter och samla upp supernatanten i ett provrör (5.10).

Anmärkning: 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 PEDP (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 PEDP 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.

Anmärkning: 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 märket med borsyralösning (4.3.2) och tillsätt 20 µl av 2-merkaptoetanol (4.3.3) med en spruta (5.7).

Anmärkning: Derivatiseringsreagenset 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 (minuter)	Lösning A (%)	Lösning B (%)	Flödeshastighet (ml/min)
Start	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

Anmärkning: 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*

För att starta systemet 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).

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

7.5.5 *Bestämning av PS- och PE-halt 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 beräkna responsfaktorn.*

Anmärkning: Kolonnen måste 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*

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

7.6.2 *Tryptamintopp*

Tryptamin elueras som en enskild 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 eluerar 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-halten i provet ska beräknas enligt följande formel: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

där:

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

A_1 = PEDP-topparean för standardprovlösningen (7.3)

A_2 = PS- eller PE-topparean för provlösningen (7.2)

T_1 = tryptamintopparean för standardprovlösningen (7.3)

T_2 = tryptamintopparean i provlösningen (7.2)

9. METODENS NOGGRANNHET

Anmärkning: Värden för repeterbarhet har beräknats enligt IDF:s internationella standard ([1]). Det preliminära reproducerbarhetsgränsvärdet har beräknats i enlighet med bilaga III b.

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.

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

9.2 **Reproducerbarhet**

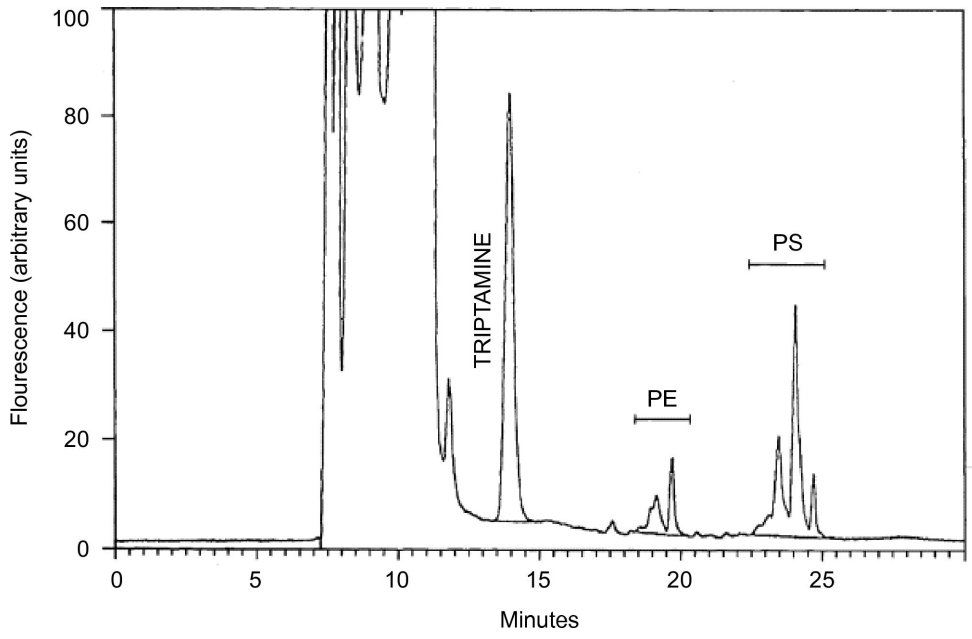
Om två bestämningar erhålls från personer i olika laboratorier under användning av olika utrustning under olika betingelser för analys av samma prov, bör den relativa skillnaden mellan de två resultaten inte vara större än 11 % av resultatets aritmetiska medelvärde.

10. REFERENSER

10.1 *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skimmilk 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



BILAGA XV

(Artikel 11)

PÅVISANDE AV ANTIMIKROBIELLA RESTSUBSTANSER I SKUMMJÖLKSPULVER

Utför en screeningtest för att påvisa hämmare av mikrobiell aktivitet genom att använda testmikroorganismen *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (identisk med stammen C953). Testet ska ha tillräcklig känslighet för att påvisa 4 µg bensylpenicillin per kg mjölk och 100 µg sulfadimidin per kg mjölk. Kommersiella testutrustningar finns och kan användas om de har den känslighet som krävs för bensylpenicillin och sulfadimidin.

För testet används rekonstituerat skummjölkspulver (1 g pulver + 9 ml dest. vatten). Testet utförs enligt beskrivning i ISO/TS 26844:2006 Milk and milk products – Determination of antimicrobial residues – Tube diffusion test IDF – Bulletin No 258/1991, section 1, Chapter 2, eller enligt testtillverkarens anvisningar ([1]).

Positiva resultat ska tolkas enligt följande:

1. Närvaro av β-laktamer kan bekräftas genom att testet upprepas under tillsats av penicillinas till testsystemet ([2]):

   Negativt resultat: Den hämmande substansen är ett β-laktamantibiotikum.

   Positivt resultat kvarstår: Den hämmande substansen kan inte identifieras genom denna procedur, gå vidare till punkt 2.

2. Närvaro av sulfonamider kan bekräftas genom att testet upprepas under tillsats av p-aminobensoesyra till testsystemet:

   Negativt resultat: Den hämmande substansen är en sulfonamid.

   Positivt resultat kvarstår: Den hämmande substansen kan inte identifieras genom denna procedur, gå vidare till punkt 3.

3. Närvaro av en kombination av β-laktam och sulfonamid kan bekräftas genom att testet upprepas under tillsats av penicillinas + p-aminobensoesyra till testsystemet:

   Negativt resultat: De hämmande substanserna är ett β-laktamantibiotikum och en sulfonamid.

   Positivt resultat: Den hämmande substansen kan inte identifieras genom denna metod.

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

([2]) Vissa β-laktamer är mindre känsliga för β-laktamas. I sådana fall rekommenderas en ytterligare förbehandling av provet (1 ml prov med 0,3 ml Penase-koncentrat (penicillinas) vid 37 °C under 2 timmar).

BILAGA XVI

(Artikel 12)

KVANTITATIV BESTÄMNING AV SKUMMJÖLKSPULVER I FODERBLANDNINGAR GENOM ENZYMATISK KOAGULERING AV PARAKASEIN

1. SYFTE

Kvantitativ bestämning av skummjölkspulver i foderblandningar genom enzymatisk koagulering av parakasein.

2. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

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

3. PRINCIP

3.1 Upplösning av kaseinet i foderblandningen genom extraktion med en natriumcitratlösning.

3.2 Justering av kalciumjonkoncentrationen till den nivå som krävs för att fälla ut parakasein, genom tillsats av löpe.

3.3 Kväveinnehållet i parakaseinfällningen fastställs genom Kjeldahl-metoden enligt beskrivningen i standarden ISO 8968–2:2001|IDF 20–2:2001. Kvantiteten skummjölkspulver beräknas på grundval av en lägsta kaseinhalt på 27,5 % (se 8.1).

4. REAGENSER

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

4.1 Trinatriumcitratdihydrat (1 % w/v lösning).

4.2 Kalciumklorid (ca 5 M lösning).

Lös 75 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ genom att skaka det i 100 ml destillerat vatten (tänk på att reaktionen är exoterm). Låt stå över natten och filtrera därefter lösningen. Förvara lösningen i kylskåp.

4.3 0,1 N natriumhydroxid.

4.4 0,1 N saltsyra.

4.5 Flytande kalvlöpe (styrka ca 100 IMCU/ml enligt standarden ISO 11815/IDF 157). Förvara i kylskåp vid 4 till 6 °C

4.6 Reagenser för kvantitativ bestämning av kväve enligt Kjeldahl-metoden så som beskrivs i ISO 8968–2:2001|IDF 20–2:2001.

5. UTRUSTNING

Vanligt laboratoriematerial och särskilt följande:

5.1 Mortel eller homogenisator.

5.2 Analysvåg med kapacitet att väga på 1 mg när, med en avläsbarhet på 0,1 mg.

5.3 Bänkcentrifug (500 g eller 2 000–3 000 varv/minut) med 50 ml rör och 2 000 g.

5.4 Magnetomrörare med (10 till 15 mm) stavar.

5.5 150 till 200 ml glasbägare.

5.6 Kolvar på 250 ml och 500 ml.

5.7 Glastrattar med diameter mellan 60 och 80 mm.

5.8 Askfria snabbfilter med en diameter på 150 mm (Whatman N° 41 eller motsvarande).

5.9 Pipetter av olika storlek.

5.10 Termostatstyrt vattenbad, 37 °C ± 1 °C.

5.11 pH-meter, med 0,1 pH-enheters noggrannhet.

5.12 Termometrar, med 1 °C noggrannhet.

6. FÖRFARANDE

6.1 **Provberedning**

Mal 10 till 20 g av provet i morteln eller homogenisatorn till en homogen blandning.

6.2 **Upplösning av mjölkpulvret och borttagning av den olösliga bottensatsen**

6.2.1 Väg upp 1,000 ± 0,002 g homogen foderblandning (6.1) direkt i ett 50 ml centrifugrör. Tillsätt 30 ml trinatriumcitratlösning (4.1) som tidigare värmts till 45 °C ± 2 °C. Blanda med hjälp av magnetomröraren i minst 5 minuter eller genom kraftig manuell skakning.

6.2.2 Centrifugera vid 500 g (2 000 till 3 000 varv per minut) i 10 minuter och dekantera den klara vattenhaltiga 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 extrakten läggs till den första.

6.2.4 Om en oljehinna bildas på ytan, kyl i kylskåp tills fettet stelnar och ta bort den stelnade hinnan med spatel.

6.3 **Koagulering av kaseinet med löpe-enzymer**

6.3.1 Tillsätt droppvis under kontinuerlig omrörning 2 ml kalciumkloridlösning (4.2) till det vattenhaltiga extraktet (ungefär 100 ml). Justera pH till 6,4–6,5 med hjälp av NaOH-lösning (4.3) eller HCl-lösning (4.4). Placera i termostatstyrt vattenbad vid 37 °C ± 1 °C i 15 till 20 minuter för att få saltbalans. Detta märks genom att en lätt grumlighet bildas.

6.3.2 Överför vätskan till ett centrifugrör och centrifugera vid 2 000 g i 10 minuter för att avlägsna fällningen. Överför supernatanten, utan att tvätta sedimentet, till ett (eller två) centrifugrör.

6.3.3 Värm på nytt supernatanten till en temperatur på 37 °C ± 1 °C. Tillsätt droppvis 0,5 ml flytande löpe (4.5) under omrörning av extraktet. Koaguleringen sker inom två minuter.

6.3.4 Flytta provet tillbaka till vattenbadet och lämna det i 15 minuter vid en temperatur av 37 °C ± 1 °C. Ta bort provet från badet och bryt koaglet genom omrörning. Centrifugera vid 2 000 g i 10 minuter. Filtrera supernatanten genom ett lämpligt filterpapper (5.8) och spara filterpapperet. Tvätta fällningen i centrifugröret med 50 ml vatten vid ungefär 35 °C genom att röra om fällningen.

Centrifugera igen vid 2 000 g i 10 minuter. Filtrera supernatanten genom samma filterpapper som använts förut.

6.4 **Bestämning av kaseinkväve**

6.4.1 Efter tvättningen överförs kvantitativt fällningen till filterpapperet, som sparades efter 6.3.4, med hjälp av destillerat vatten. Flytta det torkade filterpapperet till Kjeldahlkolven. Bestäm kvävehalten med Kjeldahl-metoden enligt beskrivningen i standarden ISO 8968–2:2001|IDF 20–2:2001.

7. BLANKTEST

7.1 Blanktest ska genomföras regelbundet genom att en mineralisering utförs enligt Kjeldahl-metoden, som beskrivs i standarden ISO 8968–2:2001|IDF 20–2:2001. Blöt ett askfritt filterpapper (5.8) med en blandning av 90 ml natriumcitratlösning (4.1), 2 ml kalciumkloridlösning (4.2), 0,5 ml flytande löpe (4.5). Tvätta därefter med 3 × 15 ml destillerat vatten.

7.2 Volymen av syra som används för blanktestet ska dras ifrån volymen av syra (4.4) som används för titrering av provet.

8. RESULTATANGIVELSE

8.1 Procentandelen skummjölkspulver i foderblandningen beräknas enligt följande formel:

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

där:

N är procentandelen parakaseinkväve,

27,5 är faktorn för att omvandla bestämt kasein till procentandel skummjölkspulver,

2,81 och 0,908 är korrektionsfaktorer som har erhållits från regressionsanalysen.

9. METODENS NOGGRANNHET

9.1 **Repeterbarhet**

I minst 95 % av de undersökta fallen får skillnaden i resultaten vid upprepad analys av samma prov utförd av samma person i samma laboratorium inte vara större än 2,3 g skummjölkspulver per 100 g foderblandning.

9.2 **Reproducerbarhet**

I minst 95 % av de undersökta fallen får skillnaden i resultaten vid analys av samma prov i två olika laboratorier inte vara större än 6,5 g skummjölkspulver per 100 g foderblandning.

10. OBSERVATIONER

10.1 Tillsättning av höga procentandelar av vissa andra proteiner än mjölkproteiner, särskilt sojaproteiner, kan då de värms tillsammans med skummjölkspulver, leda till för höga värden på grund av samfällning med mjölkens parakasein.

10.2 Tillsättning av kärnmjölk kan leda till något låga värden på grund av att endast den fettfria delen analyseras. Tillsättning av viss syrad kärnmjölk kan leda till mycket låga värden på grund av ofullständig upplösning i citratlösningen.

10.3 Tillsättning av 0,5 % eller mer lecitin kan också leda till för låga värden.

10.4 Blandning med skummjölkspulver som är uppvärmd till höga temperaturer kan leda till för höga värden på grund av samfällning av vissa vassleproteiner med mjölkens parakasein.

BILAGA XVII

(Artikel 13)

PÅVISANDE AV STÄRKELSE I SKUMMJÖLKSPULVER, DENATURERAT MJÖLKPULVER OCH FODERBLANDNINGAR

1. SYFTE

Denna metod används för påvisning av stärkelse, som används som spårämne i denaturerat mjölkpulver.

Metodens detektionsgräns är ca 0,05 g stärkelse per 100 g prov.

2. PRINCIP

Reaktionen är baserad på den reaktion som används vid jodometri:

— Kolloidernas bindning av fri jod i vattenlösning.

— Stärkelsemicellernas absorption och färgbildning.

3. REAGENSER

3.1 Jodlösning:

— Jod: 1,0 g.

— Kaliumjodid: 2,0 g.

— Destillerat vatten: 100 ml.

— Lös 1,0 g jod och 2,0 g kaliumjodid i vatten i en 100 ml mätkolv med ett graderingsmärke. Späd till 100 ml märket med vatten och blanda.

4. UTRUSTNING

4.1 Analysvåg.

4.2 Vattenbad för kokande vatten.

4.3 Provrör, 25 mm × 200 mm.

5. FÖRFARANDE

Väg upp 1,0 g av provet, på ett 0,1 g när, 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.

Ta upp 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. ANMÄRKNING

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 kristallina struktur är modifierad.

BILAGA XVIII

(Artikel 14)

BESTÄMNING AV FUKTHALTEN I GRÄDDPULVER

1. SYFTE

I denna bilaga specificeras en metod för bestämning av fukthalten i gräddpulver.

2. TERMER OCH DEFINITIONER

I denna bilaga används följande definition:

Fukthalt: Massförlust bestämd genom det förfarande som finns specificerat i denna internationella standard.

Den uttrycks i viktprocent.

3. PRINCIP

Torkning av en provmängd vid 102 ± 2 °C till konstant vikt och vägning för att bestämma massförlusten.

4. UTRUSTNING

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

4.1 Analysvåg med kapacitet att väga på 1 mg när, med en avläsbarhet på 0,1 mg.

4.2 Ventilerad, termostatreglerad torkugn som håller en jämn temperatur av 102 ± 2 °C i hela ugnen.

4.3 Exsickator med nyligen torkad kiselgel med hygrometrisk indikator eller något annat effektivt torkmedel.

4.4 Flatbottnade skålar, med ett djup på ca 25 mm, diameter på ca 50 mm och gjorda av ett lämpligt material (t.ex. glas, rostfritt stål, nickel eller aluminium), försedda med lätt avtagbara lock med bra passform.

4.5 Flaskor med tättslutande proppar för blandning av laboratorieprover.

5. PROVTAGNING

Det är viktigt att laboratoriet erhåller ett prov som verkligen är representativt och inte har skadats eller förändrats under transport eller lagring.

Provtagning ingår inte som en del av den metod som finns specificerad i den här internationella standarden. En rekommenderas provtagningsmetod finns i ISO 707|IDF 50.

Förvara provet på ett sådant sätt att nedbrytning eller förändring i sammansättningen förhindras.

6. PROVBEREDNING

Blanda noggrant provet genom att upprepade gånger skaka och vända behållaren upp och ned (vid behov efter att ha överfört alla prover till en lufttät behållare med tillräcklig storlek för att denna manöver ska kunna utföras).

Om fullständig homogenitet inte uppnås med detta förfarande, ta provmängderna (för två enkelbestämningar) från det beredda provet vid två punkter så långt ifrån varandra som möjligt.

7. FÖRFARANDE

7.1 **Skålberedning**

7.1.1 Torka en icke-försluten skål och dess lock (4.4) i ugnen (4.2) vid en temperatur på 102 °C ± 2 °C under minst en timme.

7.1.2 Sätt på locket på skålen, ställ skålen i exsickatorn (4.3) och låt den svalna till den temperatur som råder i vågrummet. Väg skålen, på 1 mg när, och ange vikten med 0,1 mg noggrannhet.

7.2 **Provmängd**

Överför ca 1–3 g av provet (6) till skålen och sätt på locket. Väg skålen, på 1 mg när, och ange vikten med 0,1 mg noggrannhet.

7.3 **Bestämning**

7.3.1 Ta av locket och ställ in skålen och locket i ugnen (4.2). Låt stå i ugnen vid 102 C ± 2 °C i två timmar.

7.3.2 Sätt på locket på skålen igen, ställ den täckta skålen i exsickatorn och låt den svalna till den temperatur som råder i vågrummet. Väg skålen, på 1 mg när, och ange vikten med 0,1 mg noggrannhet.

7.3.3 Ta av locket från skålen och värm skålen igen tillsammans med locket i ugnen under 1 timme. Upprepa därefter moment 7.3.2.

7.3.4 Upprepa torknings- och vägningsförfarandet tills massan minskar med 1 mg eller mindre, eller ökar mellan två på varandra följande vägningar.

Använd den lägsta massan som har noterats för beräkningen.

8. BERÄKNING OCH RESULTAT

8.1 **Beräkning**

Fukthalten, uttryckt i g/100 g beräknas enligt följande formel:

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

där:

m_0 är massan, i gram, för skålen och locket (7.1.2)

m_1 är massan, i gram, för skålen, locket och provmängden före torkning (7.2)

m_2 är massan, i gram, för skålen, locket och provmängden efter torkning (7.3.4)

Resultaten ska anges med två decimalers noggrannhet.

9. PRECISION

Anmärkning: Värdena för repeterbarhet och reproducerbarhet härleddes från resultaten från en interlaborativ jämförelse (se Steiger, G. Bulletin of IDF, nr 285/1993, s. 21–28) som utfördes i enlighet med IDF-standard 135B:1991. Milk and milk products – Precision characteristics of analytical methods – Outline of collaborative study procedure.

9.1 **Repeterbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium utförda av samma person som använder samma utrustning inom ett kort tidsintervall, kommer inte att vara större än 0,20 g fukt per 100 g produkt i högst 5 % av fallen.

9.2 **Reproducerbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i olika laboratorier utförda av olika personer som använder olika utrustning kommer inte att vara större än 0,40 g fukt per 100 g i högst 5 % av fallen.

10. ANALYSRAPPORT

I analysrapporten ska följande specificeras:

— All information som krävs för en fullständig identifiering av provet.

— Vilken provtagningsmetod som har använts, om denna är känd.

— Vilken analysmetod som har använts med hänvisning till denna internationella standard.

— Alla uppgifter av vikt som inte anges i denna internationella standard eller som är frivilliga, liksom upplysningar om eventuella missöden som kan ha påverkat resultatet.

Erhållna analysresultat, och om repeterbarheten har kontrollerats, det slutliga erhållna noterade resultatet.

BILAGA XIX

(Artikel 15)

BESTÄMNING AV FUKTHALTEN I SYRAT KÄRNMJÖLKSPULVER

1. SYFTE

Att fastställa fukthalten i syrat kärnmjölkspulver som ursprungligen är avsett att användas i djurfoder.

2. PRINCIP

Provet torkas i vakuum. Massförlusten bestäms genom vägning.

3. UTRUSTNING

3.1 Analysvåg med kapacitet att väga på 1 mg när, med en avläsbarhet på 0,1 mg.

3.2 Skålar av korrosionsbeständig metall eller av glas med lock som medger lufttät förslutning. Arbetsytan ska göra det möjligt att sprida ut provet med ca 0,3 g/cm^2.

3.3 Reglerbar eluppvärmd vakuumugn med oljepump och en mekanism för tillförsel av varm luft som har torkats genom ett torn innehållande exempelvis kalciumoxid eller kalciumsulfat (innehållande en fuktindikator).

3.4 Exsickator med ett effektivt torkmedel.

3.5 Ventilerad, termostatreglerad torkugn, med en temperatur på 102 C ± 2 °C.

4. FÖRFARANDE

Värm en skål (3.2) med lock i ugnen (3.5) i minst 1 timme. Sätt på locket på skålen, flytta omedelbart till exsickatorn (3.4), låt svalna till rumstemperatur. Väg skålen, på 1 mg när, och ange vikten med 0,1 mg noggrannhet.

Ta av locket och överför ca 5 g prov till skålen. Väg skålen, på 1 mg när, och ange vikten med 0,1 mg noggrannhet. Placera skålen med lock i vakuumugnen (3.3) som förvärmts till 83 °C. Sätt in skålen i ugnen så snabbt som möjligt så att ugnstemperaturen inte sjunker alltför mycket.

Öka trycket till 100 torr (13,3 kPa). Låt torka tills vikten är konstant (ca fyra timmar) vid detta tryck i torr varmluftsström.

Räkna torkningstiden från det att ugnstemperaturen åter har uppnått 83 °C. Återställ försiktigt det atmosfäriska trycket i ugnen. Öppna ugnen, sätt omedelbart lock på skålen, ta ut den ur ugnen, låt svalna 30–45 minuter i exsickatorn (3.4). Väg skålen, på 1 mg när, och ange vikten med 0,1 mg noggrannhet. Låt torka ytterligare 30 minuter i vakuumugnen (3.3) vid 83 °C och väg på nytt. Upprepa torknings- och vägningsförfarandet tills massan minskar med 1 mg eller mindre, eller ökar mellan två på varandra följande vägningar. Använd den lägsta massan som har noterats för beräkningen.

5. BERÄKNING

$\%\ \text{fukt} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100\ \%$

där:

m_0 är massan för skålen och locket

m_1 är massan för skålen, locket och provmängden före torkning

m_2 är massan för skålen, locket och provmängden efter torkning

Ange resultatet på 0,1 g/100 g när.

6. PRECISION

6.1 **Repeterbarhetsgränsvärde:**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium utförda av samma person som använder samma utrustning inom ett kort tidsintervall, kommer inte att vara större än 0,4 g fukt per 100 g kärnmjölksprodukt i högst 5 % av fallen.

6.2 **Reproducerbarhetsgränsvärde:**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i olika laboratorier utförda av olika personer som använder olika utrustning kommer inte att vara större än 0,6 g fukt per 100 g syrat kärnmjölkspulver i högst 5 % av fallen.

6.3 **Källa för precisionsdata**

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

BILAGA XX

(Artikel 16)

REFERENSMETOD FÖR BESTÄMNING AV MJÖLKFETTETS RENHET MED GASKROMATOGRAFISK ANALYS AV TRIGLYCERIDER – OMARBETNING 2

1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

I denna standard specificeras en referensmetod för bestämning av mjölkfettets renhet med gaskromatografisk analys av triglycerider. Både vegetabiliska fetter och animaliska fetter, såsom fett från nötkreatur och ister, kan påvisas.

Med hjälp av fastställda triglyceridekvationer bestäms mjölkfettets renhet. I princip hänför sig metoden till opaketerad komjölk eller produkter därav, oberoende av utfodrings-, ras- eller mjölkavsöndringsförhållanden. Endast undantagsvis kan foder med stora mängder rena, vegetabiliska oljor, såsom rapsolja, leda till falskt positiva resultat. Mjölkprodukter som har erhållits från enskilda kor kan också leda till ett falskt positivt resultat.

Metoden är i synnerhet tillämpbar på fett som har extraherats från mjölkprodukter som påstås innehålla rent mjölkfett med oförändrad sammansättning, såsom smör, grädde, mjölk och mjölkpulver. Teknisk behandling av mjölkfett, såsom borttagning av kolesterol eller fraktionering, kan leda till ett falskt positivt resultat. Detta gäller också mjölkfett från skummjölk eller kärnmjölk. Metoden kan inte alltid tillämpas på fett som har extraherats från ost eftersom mognadsprocessen kan ha en så stark påverkan på fettsammansättningen att ett falskt positivt resultat erhålls.

Anmärkning 1: Smörsyra (n-butansyra) (C_4) förekommer uteslutande i mjölkfett och möjliggör kvantitativa uppskattningar av små till medelstora mängder mjölkfett i vegetabiliska och animaliska fetter. På grund av den stora variationen i C_4, uppskattningsvis mellan 3,1 % och 3,8 % (viktprocent), är det emellertid svårt att erhålla kvalitativ och kvantitativ information om massfraktioner upp till 20 % av främmande fett till rent mjölkfett [1].

Anmärkning 2: I praktiken kan kvantitativa resultat inte erhållas från de vegetabiliska fetternas sterolhalt eftersom de är beroende av produktionsförhållanden och behandling. Den kvalitativa bestämningen av främmande fett med hjälp av steroler är ännu oklarare.

2. DEFINITION

Mjölkfettets renhet: avsaknad av vegetabiliska och animaliska fetter som bestäms med hjälp av det förfarande som anges i denna standard.

Anmärkning: Renheten bestäms med hjälp av *S*-värden, som beräknas ur triglyceridsammansättningen. Massfraktionerna för triglycerid uttrycks i procent.

3. PRINCIP

Fett som har extraherats från mjölk och mjölkprodukter analyseras gaskromatografiskt i en packad eller kort kapillärkolonn för att bestämma triglyceriderna (TG), som separeras med avseende på totalt antal kol. Genom att föra in massfraktionen, uttryckt som viktprocent, av fettmolekyler av olika storlek (C_{24} till C_{54}, endast jämna antal kol) i lämpliga triglyceridekvationer kan *S*-värdena beräknas. Om *S*-värdena överstiger de gränsvärden som har fastställts för rent mjölkfett påvisas närvaro av främmande fett.

Anmärkning 1: Lämpligheten och likvärdigheten för både packade kolonner och kapillärkolonner har demonstrerats tidigare [2–4].

Anmärkning 2: *S*-värdet är summan av triglyceridernas massfraktioner som var och en multipliceras med definierade faktorer.

4. REAGENSER

Alla reagenser ska vara av vedertagen analyskvalitet.

4.1 Bärgas: kväve eller alternativt helium eller väte, alla med renhet på minst 99,995 %.

4.2 Fettstandarder, för standardisering av en mjölkfettsstandard enligt avsnitt 7.3.3.

4.2.1 Triglyceridstandarder, mättade, lämpliga produkter finns kommersiellt tillgängliga.

4.2.2 Kolesterolstandard.

4.3 Metanol (CH_3OH), vattenfri.

4.4 n-Hexan ($CH_3(CH_2)4CH_3$).

4.5 n-Heptan ($CH_3(CH_2)5CH_3$).

4.6 Andra gaser: väte, renhet minst 99,995 %, fria från organiska föroreningar (C_nH_m < 1 µl/l), syntetisk luft, fri från organiska föroreningar (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7 Vattenfritt natriumsulfat (Na_2SO_4).

5. UTRUSTNING

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

5.1 **Gaskromatograf för höga temperaturer.**

Gaskromatograf för höga temperaturer ska vara lämplig för temperaturer på minst 400 °C och utrustad med en flamjonisationsdetektor (FID). De septa som används i injektorn ska vara beständiga mot höga temperaturer och uppvisa en mycket låg grad av ”genomsläpplighet”. Använd en ”on-column”-injektor för kapillär gaskromatografi. Använd alltid grafitpackningar för att ansluta kolonnen och injektor- och/eller detektorinsatser (där så är tillämpligt).

5.2 **Kromatografkolonn.**

5.2.1 *Packad kolonn*

Använd en glaskolonn med en innerdiameter på 2 mm och en längd på 500 mm, packad med en stationär fas bestående av 3 % OV–1 på 125 µm till 150 µm (100 till 120 mesh) Gas ChromQ ([1]). Beredning, silanisering, packning och konditionering av den packade kolonnen beskrivs i bilaga A.

Som alternativ kan en kapillärkolonn användas (5.2.2).

5.2.2 *Kapillärkolonn*

Använd en kort kapillärkolonn, t.ex. med en längd på 5 m, med en icke-polär stationär fas som är beständig mot temperatur på 400 °C eller mer ([2]). Konditionera kolonnen genom att utföra 20 analyser av en mjölkfettlösning (7.2) inom 2 till 3 dagar under användning av de inställningar som anges i 7.3.4.2. Efter detta ska responsfaktorerna (7.3.3) vara nära 1 och mindre än 1,20.

Anmärkning: Kolonner med andra dimensioner och en annan, icke-polär mycket temperaturbeständig fas kan användas så länge deras prestanda överensstämmer med denna standard. Se även 7.3.4.2.

5.3 Extrelut-kolonn, med en kapacitet på 1–3 ml, fylld med silikagel, behövs endast för extraktion av mjölkfett enligt 7.1.3.

5.4 Grafitpackningar som är beständiga mot temperaturer på minst 400 °C. Används för anslutning av GC-kolonnen och för injektor- och/eller detektorinsatserna.

5.5 Vattenbad som kan hålla en temperatur på 50 °C ± 2 °C.

5.6 Ugn som kan hålla en temperatur på 50 °C ± 2 °C respektive 100 °C ± 2 °C.

5.7 Mikroliterpipett.

([1]) Exempel på en lämplig produkt som finns kommersiellt tillgänglig. Denna information ska hjälpa användaren till en smidig hantering av denna internationella standard och utgör inte någon rekommendation om att denna produkt ska användas.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) är ett exempel på en lämplig, kommersiellt tillgänglig produkt. Denna information ska hjälpa användaren till en smidig hantering av denna internationella standard och utgör inte någon rekommendation om att denna produkt ska användas.

5.8 Graderad pipett på 5 ml.

5.9 Rundkolv på 50 ml.

5.10 Erlenmeyer-kolv med en nominell kapacitet på 250 ml.

5.11 Tratt.

5.12 Finporigt filterpapper.

5.13 Rotationsindunstare.

5.14 Ampuller med en nominell kapacitet på 1 ml, utrustade med ett polytetrafluoretenbelagt krymplock av aluminium eller skruvlock.

5.15 Injektionsspruta, vars kolv inte får nå in i nålspetsen (packad GC-kolonn).

Anmärkning: Med denna typ av sprutor uppnås bättre repeterbarhet för resultaten.

5.16 Analysvåg med kapacitet att väga på 1 mg när, med en avläsbarhet på 0,1 mg.

6. PROVTAGNING

Ett representativt prov ska ha skickats till laboratoriet. Det får inte ha skadats eller förändrats under transport eller lagring.

Provtagning ingår inte som en del av den metod som finns specificerad i den här internationella standarden. En rekommenderad provtagningsmetod finns i ISO 707|IDF 50 [5].

7. FÖRFARANDE

7.1 **Provberedning**

Vid provberedning ska någon av följande tre metoder för mjölkfettsextraktion användas.

7.1.1 *Isolering från smör eller smörolja*

Smält 50–100 g prov vid 50 °C i ett vattenbad (5.5) eller en ugn (5.6). Placera 0,5–1,0 g vattenfritt natriumsulfat (4.7) i ett vikt filterpapper (5.12). Förvärm en 250 ml Erlenmeyer-kolv (5.10) och en tratt (5.11) med ett filterpapper i ugnen (5.6) som är inställd på 50 °C. Det smälta provets fettlager filtreras medan den förvärmda utrustningen – kolven, tratten och filtret – fortfarande befinner sig i ugnen. Se till så att inget serum överförs.

I de fall då endast en begränsad mängd prov finns tillgänglig kan en mindre provmängd användas, varvid förfarandet måste anpassas i enlighet med detta. Hanteringen av en mindre provmängd innebär högre risk för att provet inte är representativt.

Anmärkning 1: Smör kan erhållas från grädde genom kärning och noggrann tvättning av de resulterande smörkornen.

Anmärkning 2: Det mjölkfett som erhålls genom förfarandet i 7.1.1 kommer att vara nästan fritt från fosfolipider.

7.1.2 *Extraktion enligt Röse-Gottliebs gravimetriska metod*

Extrahera fettfraktionen från provet under användning av den gravimetriska metod som beskrivs i någon av standarderna ISO 1211IDF 001D, ISO 2450IDF 016C eller ISO 7328IDF 116A.

Anmärkning: Om det finns fosfolipider i det erhållna mjölkfettet kommer en kolesteroltopp att fås som har ökat med ca 0,1 %. Triglyceridsammansättningen standardiserad till 100 % inklusive kolesterolen påverkas därigenom endast i obetydlig utsträckning.

7.1.3 *Extraktion från mjölk med hjälp av kiselgelkolonner*

Tillsätt med hjälp av en mikroliterpipett (5.7) 0,7 ml prov som har tempererats till 20 °C till en 1–3 ml Extrelut-kolonn (5.3). Låt provet fördela sig jämnt i silikagelen under ca 5 minuter.

För denaturering av proteinlipidkomplexen tillsätts 1,5 ml metanol (4.3) till Extrelut-kolonnen med hjälp av den graderade pipetten (5.8). Därefter extraheras fettfraktionen från provet med 20 ml n-hexan (4.4). Tillsätt n-hexanet långsamt i små mängder. Samla upp det lösningsmedel som rinner av i en 50 ml rundkolv (5.9) som har torkats till en konstant och känd vikt, vägd på 1 mg när, varvid vikten har angetts med 0,1 mg noggrannhet.

Låt kolonnen rinna av till den är tom efter extraktionen. Destillera av lösningsmedlen från eluatet med en rotationsindunstare (5.13) vid en vattenbadstemperatur på 40–50 °C. När lösningsmedlen har destillerats av, torkas och vägs därefter rundkolven och dess innehåll på 1 mg när, varvid vikten anges med 0,1 mg noggrannhet. Bestäm fettinnehållet genom att subtrahera massan för den torkade tomma rundkolven från den erhållna massan.

Anmärkning: Fettextraktioner enligt Gerber, Weibull-Berntrop, Schmid-Bondzynski-Ratzlaff eller isolering av mjölkfett med hjälp av detergenter (BDI-metoden) är inte lämpliga för triglyceridanalys eftersom betydande kvantiteter partiella glycerider eller fosfolipider kan övergå i fettfas. Därför är tillämpningen av denna internationella standard begränsad i fråga om vissa produkter, särskilt ost.

7.2 **Beredning av provlösning**

För gaskromatografi med en packad kolonn bereds en 5 % (volymprocent) lösning av fettet (som erhållits enligt 7.1) i n-hexan (4.4) eller n-heptan (4.5). Beroende på kolonndimensionerna används en koncentration på 1 % (0,53 mm innerdiameter Wide-bore) eller lägre för ”on-column”-injicering med en kapillärkolonn.

Bestäm, baserat på den kolonn som används och den mängd fett som erhölls i 7.1.3, den mängd lösningsmedel (4.4 eller 4.5) som ska tillsättas till provet i kolven genom invägning på 1 mg när, och ange massan med 0,1 mg noggrannhet. Lös resten fullständigt.

Överför ca 1 ml av provlösningen till en ampull (5.14).

7.3 **Kromatografisk triglyceridbestämning**

7.3.1 *Baslinjedrift*

För att minimera baslinjens höjning ska kolonnen konditioneras enligt 5.2.2 (kapillärkolonn) eller bilaga A.4 (packad kolonn).

Anmärkning: På grund av den höga kolonntemperaturen är analys av triglycerider särskilt känslig för höjning av baslinjen i intervallet för högt antal kol.

7.3.2 *Injiceringsteknik*

7.3.2.1 Packad kolonn

För att undvika diskrimineringseffekter används ”het injicering” för att uppnå bättre kvantitativa resultat för högkokande triglyceridkomponenter. Fyll nålen med luft genom att dra upp fettlösningen i sprutan. Injicera nålens innehåll i injektorn. Värm nålen före injicering under ca 3 sekunder. Injicera därefter snabbt sprutans innehåll.

7.3.2.2 Kapillärkolonn

Stick in injektionssprutans nål och injicera genast då ”cold on-column”-injicering (7.3.4.2) används. Nålens uppehållstid i injiceringsporten bör vara sådan att bred svansning av lösningsmedelstoppen undviks.

Anmärkning: Den optimala uppehållstiden uppgår normalt till ca 3 sekunder.

7.3.3 *Kalibrering*

7.3.3.1 Allmänt

För kalibrering av proverna utförs två till tre analyser av standardiserat mjölkfett i början av varje arbetsdag. Använd den senaste analysen av standardiserat mjölkfett för att bestämma responsfaktorerna, RF_{si} (massfraktion/areafraktion) för triglyceriderna och för kolesterol och använd dessa för de efterföljande proverna (se 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

där:

w_{si} är massfraktionen, uttryckt i procent, för varje triglycerid eller kolesterol i det standardiserade mjölkfettet,

A_{si} är det numeriska värdet för topparean för varje triglycerid eller kolesterol i det standardiserade mjölkfettet.

Använd antingen 7.3.3.2 eller 7.3.3.3 för att erhålla standardiserat mjölkfett med en känd triglyceridsammansättning.

7.3.3.2 Kommersiell mjölkfettsstandard

Det bästa sättet att bestämma responsfaktorn för varje beståndsdel i provet är att använda ett standardiserat mjölkfett med en certifierad triglyceridsammansättning.

Anmärkning: En lämplig standard är CRM 519 (vattenfritt mjölkfett) som kan fås från IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), Geel, Belgien ([1]).

7.3.3.3 Laboratoriets mjölkfettsstandard

Bered ca 1 g av en blandning av fettstandarder (se 4.2, innehållande minst de mättade triglyceriderna, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} och C_{54}, och kolesterol, samt företrädesvis C_{50} och C_{52}) genom att väga upp på 1 mg när och ange massan med 0,1 mg noggrannhet för att få en relativ triglyceridsammansättning som liknar mjölkfett.

Analysera upprepade gånger en lösning av fettstandardblandningen i n-hexan (4.4) eller n-heptan (4.5) enligt 7.3.4. Analysera i samma sekvens upprepade gånger mjölkfett med genomsnittlig sammansättning.

Bestäm responsfaktorerna för triglycerider från fettstandardblandningen. Mellanliggande responsfaktorer för triglycerider som inte finns i blandningen kan beräknas med matematisk interpolering. Använd de erhållna responsfaktorerna på mjölkfettet för att erhålla en standardiserad sammansättning. Det standardiserade mjölkfett som har erhållits på detta sätt har en lagringstid på flera år om det lagras under kväve vid en maximal temperatur på -18 °C.

7.3.4 *Kromatografibetingelser*

Anmärkning: Användning av antingen packade kolonner eller kapillärkolonner ger i allmänhet en upplösning liknande den i figur 1. Uppdelning av triglycerider med jämnt antal kol brukar normalt inte observeras och ska undvikas.

7.3.4.1 Packad kolonn

a) Temperaturprogram: Ställ in ugnens starttemperatur på 210 °C. Bibehåll denna temperatur under 1 minut. Öka därefter temperaturen med en hastighet på 6 °C/min till 350 °C. Bibehåll denna (slut)temperatur under 5 minuter.

b) Detektor- och injektortemperaturer: Ställ in båda på 370 °C.

c) Bärgas: Använd kväve vid en konstant flödeshastighet på ca 40 ml/min. Justera det exakta bärgasflödet så att C_{54} elueras vid 341 °C.

d) Analysens längd: 29,3 minuter.

e) Injiceringsvolym: Injicera 0,5 µl 5 % (volymprocent) provlösning.

([1]) Exempel på en lämplig produkt som finns kommersiellt tillgänglig. Denna information ska hjälpa användaren till en smidig hantering av denna internationella standard och utgör inte någon rekommendation om att denna produkt ska användas.

Om ingen triglyceridanalys utförs ska ugnens starttemperatur hållas konstant enligt a), detektor- och injektortemperaturerna enligt b) och bärgasflödet enligt c), även under natten, helger och helgdagar. På så sätt säkerställs bästa prestanda för kolonnen.

7.3.4.2 Kapillärkolonn

a) Temperaturprogram: Ställ in ugnens starttemperatur på 80 °C. Bibehåll denna temperatur under 0,5 minut. Öka därefter temperaturen med en hastighet på 50 °C/min till 190 °C och därefter med en hastighet på 6 °C/min till 350 °C. Bibehåll denna (slut)temperatur under 5 minuter.

b) Detektortemperatur: Ställ in på 370 °C.

c) Bärgas: Använd kväve vid en konstant flödeshastighet på ca 3 ml/min.

d) Analysens längd: 34,4 minuter.

e) Injiceringsvolym: Injicera 0,5 µl 1 % (volymprocent) provlösning.

Bibehåll dessa inställningar under standby för att säkerställa bästa prestanda (se 7.3.4.1).

De analysinställningar som anges i 7.3.4.2 lämpar sig för användning med en Wide-bore-kolonn (innerdiameter 0,53 mm) såsom specificeras i 5.2.2. Andra betingelser kan tillämpas om någon annan kolonndimension eller fas används.

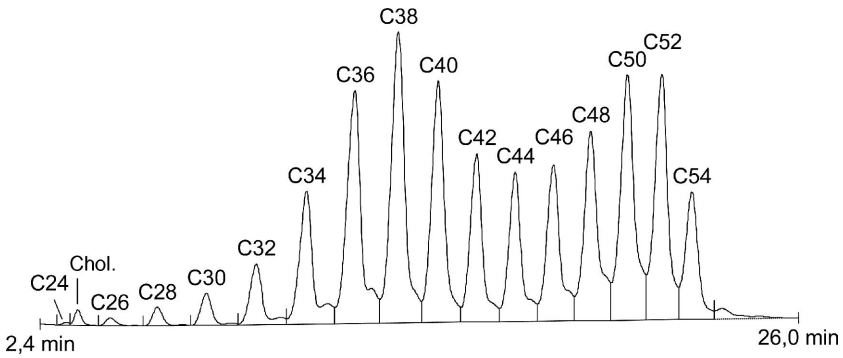
8. INTEGRERING, BEDÖMNING OCH KONTROLL AV ANALYSPRESTANDA

Bedöm kromatogramtopparna med ett integreringssystem som innehåller funktioner för baslinjesplottning och återintegrering. I figur 1 visas ett korrekt integrerat kromatogram medan figur 2 visar ett sporadiskt fel i slutet av baslinjen efter C_{54} som påverkar procentandelen för alla triglycerider. Toppar från ämnen som eluerar efter C_{54} ska hur som helst uteslutas från bedömningen.

Triglycerider med udda acyl-C-tal (2n + 1) kombineras med föregående jämnt numrerade triglycerid (2n). Ta inte med den låga C_{56}-halten i beräkningen. Multiplicera areaprocentandelarna för de återstående triglyceriderna, inklusive kolesterol, med motsvarande responsfaktorer för det standardiserade mjölkfettet (enligt den senaste kalibreringen) och normalisera allt till 100 % enligt 9.1.

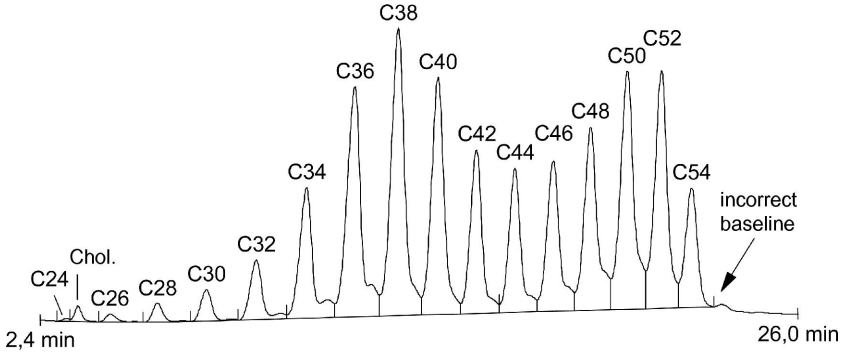
Figur 1

Exempel på triglyceridkromatogram för mjölkfett med korrekt inställd baslinje



Figur 2

Exempel på triglyceridkromatogram för mjölkfett med felaktigt inställd baslinje



För att kontrollera mätbetingelserna jämförs variationskoefficienterna, CV, uttryckt i procent, för de olika triglyceriderna som anges i tabell 1. De har beräknats baserat på 19 analyser i rad av samma mjölkfettsprov.

Om variationskoefficienterna är betydligt högre än värdena som anges i tabell 1 är kromatografibetingelserna inte riktiga.

Anmärkning: Värdena i tabell 1 är inte obligatoriska utan ger bara en orientering om kvalitetskontrollen.

Om de högre CV-värdena godkänns måste emellertid de repeterbarhets- och reproducerbarhetsgränsvärden som anges i punkt 10 iakttas.

Tabell 1

Variationskoefficienter för triglyceridhalter 19 analyser i rad)

Triglycerid	CV %
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. BERÄKNING OCH RESULTAT

9.1 **Triglyceridsammansättning**

9.1.1 *Beräkning*

Beräkna massfraktionen för varje triglycerid (för i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52}, and C_{54} plus kolesterol, w_i, uttryckt i procent, för den totala triglyceridhalten i provet med hjälp av följande ekvation:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum(A_1 \times RF_{si})} \times 100 \qquad (2)$$

där:

A_i är det numeriska värdet för topparean för varje triglycerid i provet,

RF_{si} är responsfaktorn för varje triglycerid som har bestämts genom kalibrering (7.3.3).

9.1.2 *Resultatangivelse*

Resultaten ska anges med två decimalers noggrannhet.

9.2 **S-värden**

9.2.1 *Beräkning*

9.2.1.1 Beräkna *S*-värdena, uttryckta i procent, genom att sätta in det beräknade w_i (9.1.1) för de korrekta triglyceridprocentandelarna i ekvationerna (3) till (7). Använd alla ekvationer oberoende av vilken typ av främmande fett som misstänks.

9.2.1.2 Formel för sojabönolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja och fiskolja.

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3 Kokosnötfett och palmkärnfett.

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4 Palmolja och fett från nötkreatur.

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5 Ister.

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6 Totalt.

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2 *Resultatangivelse*

Resultaten ska anges med två decimalers noggrannhet.

9.3 **Påvisande av främmande fett**

Jämför de fem *S*-värdena som har erhållits i 9.2.1 med motsvarande *S*-gränsvärden som anges i tabell 2.

Betrakta provet som rent mjölkfett då alla fem *S*-värdena ligger innanför de gränsvärden som anges i tabell 2. Om något *S*-värde ligger utanför motsvarande gränsvärden ska provet betraktas som innehållande ett främmande fett.

Eftersom de enskilda ekvationerna (3) till (6) är känsligare för vissa främmande fetter jämfört med totalekvationen (7) (se tabell B.1), kan ett positivt resultat som endast har erhållits för en av ekvationerna (3) till (6) inte användas för att dra några slutsatser om typen av främmande fett.

I bilaga B beskrivs ett förfarande för beräkning av halten vegetabiliskt eller animaliskt fett i uppblandat mjölkfett. Detta förfarande är inte validerat och är endast upplysande.

Tabell 2

***S*-gränsvärden för rena mjölkfetter**

Främmande fett	Ekvation	*S*-gränsvärden [a]
Sojabönolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	(3)	98,05–101,95
Kokosnötfett och palmkärnfett	(4)	99,42–100,58
Palmolja och fett från nötkreatur	(5)	95,90–104,10
Ister	(6)	97,96–102,04
Totalt	(7)	95,68–104,32

[a] Beräknat med 99 % konfidensgrad, så att främmande fett endast indikeras om detektionsgränserna för den relevanta ekvationen överskrids (se tabell B.1).

10. PRECISION

10.1 **Interlaborativ jämförelse**

Repeterbarhets- och reproducerbarhetsvärdena bestämdes baserat på ekvationerna (3) till (7) under användning av rent mjölkfett och är eventuellt inte tillämpbara på andra matriser än de angivna.

10.2 **Repeterbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium utförda av samma person som använder samma utrustning inom ett kort tidsintervall, kommer inte att vara större än de gränsvärden som finns angivna i tabell 3 i högst 5 % av fallen.

Tabell 3

Repeterbarhetsgränsvärden, r, för ekvationerna (3) till (7)

Främmande fett	Ekvation	r %
Sojabönolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	(3)	0,67
Kokosnötfett och palmkärnfett	(4)	0,12
Palmolja och fett från nötkreatur	(5)	1,20
Ister	(6)	0,58
Totalt	(7)	1,49

10.3 **Reproducerbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två individuella provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i olika laboratorium utförda av olika personer som använder olika utrustning, kommer inte att vara större än de gränsvärden som finns angivna i tabell 4 i högst 5 % av fallen.

Tabell 4

Reproducerbarhetsgränsvärden, R, för ekvationerna (3) till (7)

Främmande fett	Ekvation	R %
Sojabönolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	(3)	1,08
Kokosnötfett och palmkärnfett	(4)	0,40
Palmolja och fett från nötkreatur	(5)	1,81
Ister	(6)	0,60
Totalt	(7)	2,07

11. MÄTOSÄKERHET

Med repeterbarheten, r, och reproducerbarheten, R, kan den expanderade osäkerheten beräknas för ett *S*-värde.

Medtagande av den expanderade osäkerheten (baserad på duplikatanalyser) i *S*-gränsvärdena i tabell 2 leder till de expanderade *S*-gränsvärden som anges i tabell 5.

Tabell 5

Expanderade S-gränsvärden för rena mjölkfetter inklusive den expanderade osäkerheten

Främmande fett	Ekvation	Expanderade *S*-gränsvärden
Sojabönolja, solrosolja, olivolja, rapsolja, linolja, vetegroddolja, majsolja, bomullsfröolja, fiskolja	(3)	97,36–102,64
Kokosnötfett och palmkärnfett	(4)	99,14–100,86
Palmolja och fett från nötkreatur	(5)	94,77–105,23
Ister	(6)	97,65–102,35
Totalt	(7)	94,42–105,58

12. ANALYSRAPPORT

I analysrapporten ska följande specificeras:

— All information som krävs för en fullständig identifiering av provet.

— Vilken provtagningsmetod som har använts, om denna är känd.

— Vilken analysmetod som har använts med hänvisning till denna internationella standard.

— Alla uppgifter av vikt som inte anges i denna internationella standard eller som är frivilliga, liksom upplysningar om eventuella missöden som kan ha påverkat resultatet.

— Erhållna analysresultat, och om repeterbarheten har kontrollerats, det slutliga erhållna noterade resultatet.

BILAGA A

(normgivande)

BEREDNING AV EN PACKAD KOLONN

A.1 REAGENSER OCH UTRUSTNING

A.1.1 **Toluen** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2 **Lösning av dimetyldiklorosilan** [$Si(CH_3)_2Cl_2$].

Lös 50 ml dimetyldiklorosilan i 283 ml toluen (A.1.1).

A.1.3 **Kakaosmör**-lösning, med en massfraktion på 5 % kakaosmör i n-hexan (4.4) eller n-heptan (4.5).

A.1.4 **Stationär fas**, 3 % OV–1 på 125 µm till 150 µm (100 till 120 mesh) Gas ChromQ ([1]).

Anmärkning: Uppgiften om kornstorlek omvandlades till mikrometer i enlighet med BS 410 (alla delar)[6].

A.1.5 **Glaskolonn**, med en innerdiameter på 2 mm och en längd på 500 mm, U-formad.

A.1.6 **Utrustning**, för fyllning av den packade kolonnen.

A.1.6.1 *Fyllningskolonn*, med fastskruvade lock i ändarna, försedd med ett märke upp till vilket den erforderliga mängden av den stationära fasen kan fyllas på.

A.1.6.2 *Finmaskig sikt*, med en maskvidd på ca 100 µm, med ett skruvlock, lämplig för att försluta glaskolonnen enligt figur A.3.

A.1.6.3 *Silaniserad glasull*, inaktiverad.

A.1.6.4 *Vibrator*, för jämn fördelning av den stationära fasen under påfyllningen.

A.1.6.5 *Utrustning för silanisering*, för silanisering av kolonnens glasyta.

A.1.6.6 *Woulff-flaska*.

A.1.6.7 *Vattensugpump*.

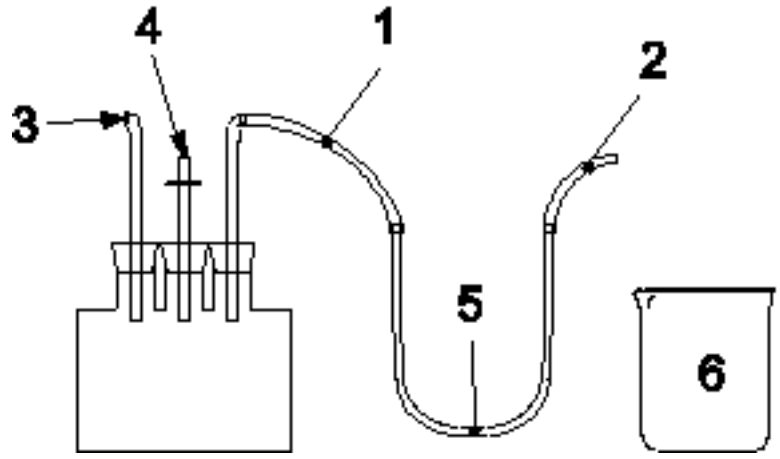
A.2 SILANISERING (INAKTIVERING AV GLASYTAN)

Efter anslutning av Woulff-flaskan (A.1.6.6) till vattensugpumpen (A.1.6.7), doppas slangen 2 (se figur A.1) i dimetyldiklorosilanlösningen (A.1.2). Fyll kolonnen (A.1.5) med denna lösning genom att stänga avstängningskranen. Öppna avstängningskranen igen och ta därefter bort de två slangarna. Fäst kolonnen på en ställning. Fyll den helt med dimetyldiklorosilanlösning (A.1.2) med hjälp av en pipett.

([1]) Exempel på en lämplig produkt som finns kommersiellt tillgänglig. Denna information ska hjälpa användaren till en smidig hantering av denna internationella standard och utgör inte någon rekommendation enligt ISO eller IDF om att denna produkt ska användas.

Figur A.1

Silaniseringsutrustning



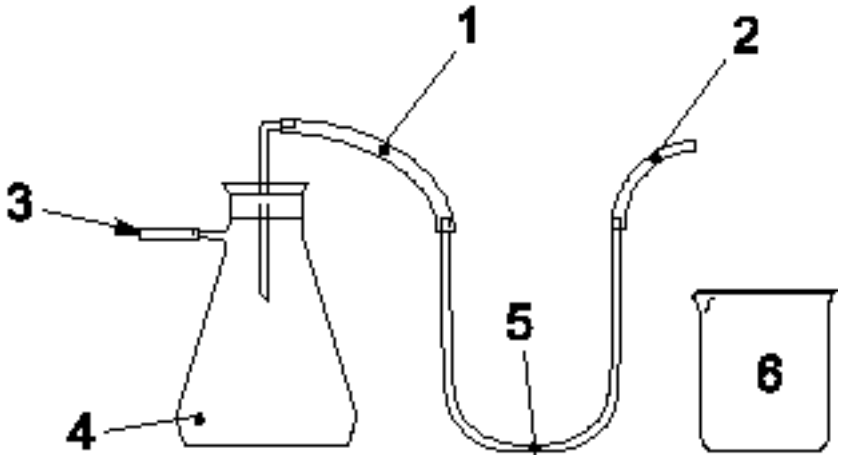
Teckenförklaring

1 slang 1
2 slang 2
3 vattensugpump
4 avstängningskran
5 glaskolonn
6 dimetyldiklorosilan och toluen

Låt kolonnen stå i 20–30 minuter. Ersätt därefter Woulff-flaskan med en filterkolv. Töm kolonnen genom att ansluta den till vattensugpumpen (A.1.6.7) (se figur A.2). Skölj därefter den tömda kolonnen med 75 ml toluen (A.1.1) och 50 ml metanol (4.3) genom att doppa slang 2 i lösningsmedlet. Torka den sköljda kolonnen i ugnen (5.6) vid 100 °C under ca 30 minuter.

Figur A.2

Sköljutrustning



Teckenförklaring

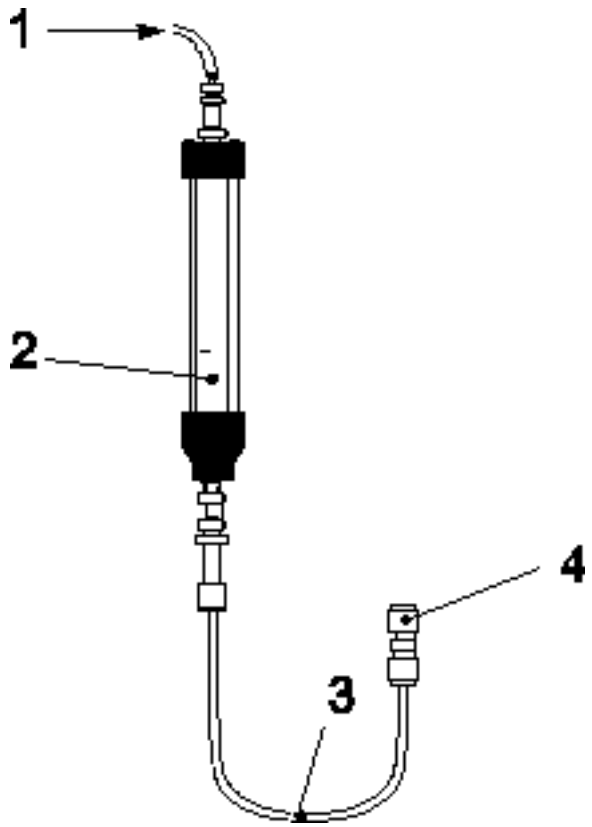
1 slang 1
2 slang 2
3 vattensugpump
4 filterkolv
5 glaskolonn
6 sköljmedel

A.3 PÅFYLLNING

Använd vid påfyllning av kolonnen den utrustning som visas i figur A.3. Fyll på fyllningskolonnen (A.1.6.1) med stationär fas (A.1.4) upp till märket. Förslut den nedre änden av glaskolonnen som ska fyllas med en ca 1 cm lång propp av hoppressad, silaniserad glasull (A.1.6.3). Förslut kolonnens ände med den finmaskiga sikten (A.1.6.2).

Figur A.3

Påfyllning av glaskolonnen



Teckenförklaring

1 kväveinlopp

2 fyllningskolonn, som ska fyllas upp till märket med OV-1

3 glaskolonn som ska fyllas

4 skruvlock med filter, mot vilken glasfiberproppen och den stationära fasen pressas

Fyll på kolonnen under tryck (300 kPa och en kväveflöde) med den stationära fasen. För att erhålla en enhetlig, kontinuerlig och fast packning, förs en vibrator upp och ned längs glaskolonnen under påfyllningen. Efter påfyllningen pressas en fast propp av silaniserad glasull (A.1.6.3) in i den andra änden av den packade kolonnen. Kapa av de utskjutande delarna. Pressa in proppen i kolonnen några millimeter med hjälp av en spatel.

A.4 KONDITIONERING

För att undvika kontaminering får inte den bakre änden av kolonnen anslutas till detektorn under steg a till c. Konditionera den fyllda kolonnen (A.3) enligt följande:

a) Spola kolonnen med kväve under 15 minuter, med en flödeshastighet på 40 ml/min och GC-ugnen inställd på 50 °C.

b) Värm kolonnen med en hastighet på 1 °C/min upp till 355 °C, med ett kväveflöde på 10 ml/min.

c) Värm kolonnen vid 355 °C i 12–15 h.

d) Injicera 1 µl kakaosmörlösning (A.1.3) två gånger enligt det temperaturprogram för den packade kolonnen som anges i 7.3.4.1.

Anmärkning: Kakaosmör består nästan uteslutande av högkokande C_{50}–C_{54} triglycerider och minskar därför behovet av kolonnkonditionering i fråga om respektive responsfaktor.

e) Injicera 0,5 µl mjölkfettlösning enligt 7.2 20 gånger inom 2–3 dagar under användning av de inställningar som anges i 7.3.4.1 för den packade kolonnen.

— Använd endast kolonner med responsfaktorer som ligger nära 1 för analys av proverna. Responsfaktorerna får inte vara högre än 1,20.

BILAGA B

(upplysande)

KVANTIFIERING AV HALTEN FRÄMMANDE FETT

B.1 ALLMÄNT

I tabell B.1 anges detektionsgränserna för olika främmande fetter beräknade med 99 % konfidensgrad. I den mellersta kolumnen visas detektionsgränserna för den bästa individuella ekvationen av ekvationerna (3) till (6).

Detektionsgränserna för den totala ekvationen (7), som visas i kolumnen längst till höger, är något högre. I princip används endast ekvation (7) för kvantifieringen av främmande fett.

Med alla ekvationerna kan kombinationer av olika främmande fetter också påvisas. Triglyceridsammansättningens variation mellan enskilda prover för en typ av främmande fett har ingen betydande inverkan på detektionsgränserna.

Då både de individuella ekvationerna och den totala ekvationen används gäller detektionsgränserna för de individuella ekvationerna. *S*-värdet för den totala ekvationen behövs emellertid för kvantifiering i vissa fall (B.2).

Tabell B.1

99 % detektionsgränser för tillsats av främmande fett till mjölkfett i %

Främmande fett	Individuell ekvation %	Total ekvation %
Sojabönolja	2,1	4,4
Solrosolja	2,3	4,8
Olivolja	2,4	4,7
Kokosolja	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
Härdad fiskolja	5,4	6,1

B.2 BERÄKNING

Gör endast en kvantitativ bestämning av främmande fett om åtminstone ett av *S*-gränsvärden (tabell 2 eller tabell 5) överskrids. För att erhålla kvantitativ information beräknas massfraktionen för främmande fett eller blandningen av främmande fett, w_f, uttryckt i procent, i provet med hjälp av följande ekvation:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (B.1)$$

där:

S är det resultat som erhålls då data för triglycerid från mjölkfett, med tillsats av främmande fett eller en blandning av främmande fett, sätts in i någon av ekvationerna (3) till (7),

S_f är en konstant, beroende på vilken typ av främmande fett som har satts till.

Om det inte är känt vilken typ av främmande fett som har satts till mjölkfettet ska ett allmänt S_f-värde på 7,46 (tabell B.2) användas. Använd alltid det *S*-värde som erhålls från ekvation (7), även om dess *S*-gränsvärden inte överskrids, om *S*-gränsvärdena för någon annan ekvation överskrids.

Då de främmande fetterna är kända sätts deras individuella S_f-värden (tabell B.2) in i ekvation (B.1). Välj relevant ekvation för det främmande fettet från ekvationerna (3) till (6) för att beräkna *S*.

Tabell B.2

Sf-värden för olika främmande fetter

Främmande fett	S_f
Okänt	7,46
Sojabönolja	8,18
Solrosolja	9,43
Olivolja	12,75
Kokosolja	118,13
Palmolja	7,55
Palmkärnolja	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

B.3 RESULTATANGIVELSE

Resultaten ska anges med två decimalers noggrannhet.

Litteraturförteckning

1. Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, s. 82–85
2. Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, s. 16–17
3. Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, s. 265–270
4. Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, s. 791–797
5. ISO 707IDF 50, Milk and milk products – Guidance on sampling
6. BS 410:1988, Test sieves – Technical requirements and testing
7. Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, s. 219–242
8. Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol.*, 93, 1991, s. 538–544
9. DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis]
10. Europeiska kommissionen: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93
11. Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, s. 505–510

BILAGA XXI

(Artikel 18)

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

1. En ytterligare analys utförs på begäran av tillverkaren på ett annat laboratorium som har godkänts av den behöriga myndigheten under användning av den relevanta metoden, under förutsättning att förslutna dubbelprover av produkten finns tillgängliga och har lagrats på ett godtagbart sätt hos den behöriga myndigheten. Begäran ska göras inom 7 arbetsdagar efter det att resultaten av den första analysen har meddelats. Analysen ska utföras inom 21 arbetsdagar efter att begäran har tagits emot. Den behöriga myndigheten ska på begäran av tillverkaren, 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.

2. De expanderade osäkerheterna ($k = 2$) för medelvärdet $\bar{y}_1$ av de n_1 upprepade mätningarna i laboratorium 1 och medelvärdet $\bar{y}_2$ av de n_2 upprepade mätningarna i laboratorium 2 är

3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ respektive $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$, där σ_r är standardavvikelsen för repeterbarheten och σ_R är standardavvikelsen för reproducerbarhet för den relevanta metoden. Om det slutliga resultatet *y* för mätningen i laboratorierna beräknas med en formel enligt formen $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ eller $y = x_1/x_2$ måste i sådana fall de normala förfarandena för kombination av standardavvikelser följas för att erhålla osäkerheten.

4. För att kontrollera om resultaten från de två laboratorierna överensstämmer med standardavvikelsen för repeterbarheten σ_R för metoden, beräknas den expanderade osäkerheten för skillnaden $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$:

5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Om det absoluta värdet för skillnaden mellan laboratoriernas medelvärden, $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$, inte är större än dess osäkerhet $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$$

överensstämmer resultaten från de två laboratorierna med standardavvikelsen för reproducerbarheten σ_r och det aritmetiska medelvärdet för de två laboratoriernas medelvärden,

$$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2},$$

rapporteras som det slutliga resultatet. Dess expanderade osäkerhet är

$$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

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

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} > UL$$

i annat fall bedöms det överensstämma med *UL*.

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

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} < LL,$$

i annat fall bedöms det överensstämma med *LL*.

Om det absoluta värdet för skillnaden mellan laboratoriernas medelvärden, $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$, är större än dess osäkerhet $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$$

överensstämmer resultaten från det två laboratorierna inte med standardavvikelsen för reproducerbarheten.

I detta fall bedöms partiet inte överensstämma med kraven om den andra analysen bekräftar den första. I annat fall bedöms partiet överensstämma med kraven.

Den behöriga myndigheten måste informera tillverkaren om det slutliga resultatet så snart som möjligt. Tillverkaren ska bekosta den andra analysen om partiet inte godkänns.

BILAGA XXII

JÄMFÖRELSETABELL

Förordning (EG) nr 213/2001	Denna förordning
Artikel 1	Artikel 1
Artikel 2	Artikel 1
Artikel 3	Artikel 2
—	Artikel 3
Artikel 4	—
Artikel 5	—
Artikel 6	Artikel 4
Artikel 7	Artikel 18
Artikel 8	—
Artikel 9	Artikel 5
Artikel 10	Artikel 6
Artikel 11	Artikel 7
Artikel 12	Artikel 8
Artikel 13	Artikel 9
Artikel 14	Artikel 10
Artikel 15	Artikel 11
Artikel 16	Artikel 12
Artikel 17	Artikel 13
—	Artikel 14
Artikel 18	Artikel 15
Artikel 19	Artikel 16
	Artikel 17
	Artikel 19
Artikel 20	—
Artikel 21	—
Artikel 22	Artikel 20
Artikel 23	Artikel 21