386R3711

N:o L 342/8 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* 5.12.96

KOMISSION ASETUS (ETY) N:o 3711/86,

annettu 4 päivänä joulukuuta 1986,

rasvattoman maitojauheen julkista varastointia koskevista yksityiskohtaisista säännöistä annetun asetuksen (ETY) N:o 625/78 muuttamisesta

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon maito- ja maitotuotealan yhteisestä markkinajärjestelystä 27 päivänä kesäkuuta 1968 annetun neuvoston asetuksen (ETY) N:o 804/68([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 1335/86([2]), ja erityisesti sen 7 artiklan 5 kohdan,

sekä katsoo, että

rasvattoman maitojauheen julkista varastointia koskevista yleisistä säännöistä 20 päivänä heinäkuuta 1968 annetun neuvoston asetuksen (ETY) N:o 1014/68([3]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 1272/79([4]), 3 artiklassa säädetään, että interventiohintaa sovelletaan rasvattomaan maitojauheeseen, joka on toimitettu rasvattoman maitojauheen säilytyspaikasta määritettävän enimmäisetäisyyden päässä sijaitsevaan varastoon; jos varasto, jonne rasvaton maitojauhe toimitetaan, sijaitsee tätä enimmäisetäisyyttä kauempana, interventioelin vastaa kiinteästi määritettävistä kuljetuksesta aiheutuvista lisäkustannuksista,

komission asetuksessa (ETY) N:o 625/78([5]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 2256/86([6]), vahvistetaan kyseinen enimmäisetäisyys 100 kilometriksi; saadun kokemuksen mukaan tämä enimmäisetäisyys ei ole riittävä interventioelimille julkisiin varastoihin pääsyn hoitamiseksi parhaissa mahdollisissa olosuhteissa; tästä syystä olisi muutettava tämä etäisyys 350 kilometriksi,

asetuksen (ETY) N:o 625/78 rasvattoman maitojauheen laatua käsittelevässä liitteessä I olevassa 2 kohdassa ilmoitetaan tiettyjen tuotteiden tutkimukseen käytettävistä tarkastusmenetelmistä; on suotavaa säätää viitteestä kansainvälisiin standardeihin näytteenotossa,

asetuksen (ETY) N:o 625/78 liitteessä IV määrätään julkiseen varastointiin tarkoitetun rasvattoman maitojauheen herajuoksutetutkimuksen osalta vapaan sialihapon määritysmenetelmästä; tätä menetelmää käytettiin väliaikaisesti 31 päivään maaliskuuta 1986; mainittu liite olisi poistettava, ja

maidon ja maitotuotteiden hallintokomitea ei ole antanut lausuntoa puheenjohtajansa asettamassa määräajassa,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetus (ETY) N:o 625/78 seuraavasti:

1) Korvataan 5 artiklan 1 kohdan sanat "100 kilometriksi" sanoilla "350 kilometriksi".

2) Korvataan liitteessä I olevan 2 kohdan a alakohdan sanat "standardi ISO" joka kerta sanoilla "kansainvälinen standardi ISO".

3) Korvataan liitteessä I olevan 2 kohdan b alakohdan toinen luetelmakohta seuraavasti:

"— herajuoksutetutkimus:

glykomakropeptidien määritys korkean suorituskyvyn nestekromatografialla([3])".

4) Lisätään liitteessä I olevaan 2 kohtaan c alakohta seuraavasti:

"c) Näytteiden otto suoritetaan kansainvälisessä standardissa ISO 707 säädetyn menettelyn mukaisesti; jäsenvaltiot voivat kuitenkin käyttää jotakin muuta näytteenottomenetelmää, jos viimeksi mainittu on mainitun standardin periaatteiden mukainen."

5) Poistetaan liitteen I alaviite([4]).

6) Poistetaan liite IV.

7) Korvataan liite V tämän asetuksen liitteellä.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan päivänä, jona se julkaistaan *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä.*

Edellä 1 artiklan 4 ja 7 kohtaa sovelletaan 2 päivästä helmikuuta 1987.

([1]) EYVL N:o L 148, 28.6.1968, s. 13
([2]) EYVL N:o L 119, 8.5.1986, s. 19
([3]) EYVL N:o L 173, 22.7.1968, s. 4
([4]) EYVL N:o L 161, 29.6.1979, s. 11
([5]) EYVL N:o L 84, 31.3.1978, s. 19
([6]) EYVL N:o L 196, 18.7.1986, s. 41

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 4 päivänä joulukuuta 1986.

Komission puolesta
Frans ANDRIESSEN
Varapuheenjohtaja

LIITE

"LIITE V

JULKISEEN VARASTOINTIIN TARKOITETUN RASVATTOMAN MAITOJAUHEEN HERAJUOKSUTETUTKIMUS GLYKOMAKROPEPTIDIEN MÄÄRITYKSEN AVULLA SUUREN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIAA (HPLC) KÄYTTÄEN

1 **Tavoite ja soveltamisala**

Tämän menetelmän avulla voidaan todeta herajuoksutteen esiintyminen julkiseen varastointiin tarkoitetussa rasvattomassa maitojauheessa glykomakropeptidien määritystä käyttäen.

2 **Viitteet**

Kansainvälinen standardi ISO 707 — "Maito ja maitotuotteet — Näytteenottomenetelmät" liitteessä I olevan 2 kohdan c alakohdan viimeisen luetelmakohdan mukaisesti.

3 **Määritelmä**

Rasvattoman maitojauheen glykomakropeptidipitoisuus: jäljempänä kuvatun menetelmän mukaisesti määritetty aineiden pitoisuus massaprosentteina ilmaistuna.

4 **Periaate**

— Rasvattoman maitojauheen ennastus, rasvojen ja proteiinien poisto trikloorietikkahapolla, ja sentrifugointi,

— kelluvassa liuoksessa esiintyvien glykomakropeptidien (GMP) määrän määritys suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC),

— saadun tuloksen arviointi suhteessa rasvattoman maitojauheen standardinäytteisiin, joissa ei ole tai joihin on lisätty tunnettu prosenttimäärä herajauhetta.

5 **Reagenssit**

Kaikkien reagenssien on oltava hyväksyttävää analyysilaatua. Käytettävän veden on oltava tislattua vettä tai puhtaudeltaan vähintään sitä vastaavaa.

5.1 Trikloorietikkahappoliuos

Liuotetaan 240 g trikloorietikkahappoa (Cl_3CCOOH) veteen ja täytetään 1 000 ml:ksi.

5.2 *Eluointiliuos, pH 6,0*

Liuotetaan 1,74 g dikaliumfosfaattia (K_2HPO_4), 12,37 g monokaliumfosfaattia (KH_2PO_4) ja 21,41 g natriumsulfaattia (Na_2SO_4) noin 700 ml:aan vettä.

Tarvittaessa säädetään pH 6,0:ksi fosforihappo- tai kaliumhydroksidiliuoksen avulla.

Täytetään 1 000 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan.

Eluointiliuos suodatetaan ennen käyttöä huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi.

5.3 *Pesuliuos ja kolonnien säilytys*

Sekoitetaan yksi tilavuusosa asetonitriiliä (CH_3CN) 9 tilavuusosaan vettä. Suodatetaan seos ennen käyttöä huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi.

Huom: Mitä tahansa pesuliuosta, jolla on bakteereja tappava vaikutus ja joka ei heikennä kolonnien erotuskykyä, voidaan käyttää.

5.4 *Standardinäytteet*

5.4.1 Asetuksen (ETY) N:o 625/78 vaatimuksia vastaava rasvaton maitojauhe, eli [0].

5.4.2 Sama rasvaton maitojauhe sekoitettuna 5 %:ksi (m/m) juoksutetyyppisellä, koostumukseltaan standardilla herajauheella, eli [5].

6 **Laitteisto**

6.1 Analyysivaaka.

6.2 Sentrifugi, jonka keskipakovoimaksi saadaan 2 200 g, varustettuna noin 25 ml:n suljettavilla sentrifugiputkilla.

6.3 Mekaaninen sekoitin.

6.4 Magneettisekoittaja.

6.5 Halkaisijaltaan noin 7 cm:n lasisuppiloita.

6.6 Halkaisijaltaan noin 12,5 cm:n keskinopeita suodatinpapereita.

6.7 Lasinen suodatuslaite, varustettuna huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvosuodattimella.

6.8 Mittapipetti, jolla voidaan annostella 10 ml (ISO 648, luokka A tai ISO/R 835).

6.9 Vesihaude, jonka lämpötila on säädetty termostaatilla 25 ± 0,5 °C:seen.

6.10 HPLC-laitteisto, johon kuuluu:

6.10.1 pumppu,

6.10.2 käsikäyttöinen tai automaattinen injektori, jonka tilavuus on 15–30 µl,

6.10.3 kaksi TSK 2 000 SW -kolonnia sarjassa (pituus 30 cm, sisähalkaisija 0,75 cm) tai tehokkuudeltaan vastaavat kolonnit ja yksi esikolonni ylävirran puolella (3 cm × 0,3 cm) pakattuna I 125:llä tai tehokkuudeltaan vastaavalla materiaalilla,

6.10.4 kolonniuuni, jonka lämpötila on säädetty termostaatilla 35 ± 1 °C:seen,

6.10.5 aaltopituudeltaan säädettävissä oleva UV-detektori, jolla voidaan suorittaa mittauksia 205 nm:ssä 0,008 A:n herkkyydellä,

6.10.6 integraattori, jolla voidaan integroida piikin kannan käännepisteestä käännepisteeseen.

Huom: Huoneen lämpötilassa olevilla kolonneilla voidaan työskennellä, mutta niiden erotuskyky on hieman heikompi. Tässä tapauksessa lämpötilan muutosten saman analyysisarjan aikana täytyy olla alle ± 5 °C.

7 **Näytteenotto**

7.1 Kansainvälinen standardi ISO 707 — "Maito ja maitotuotteet — Näytteenottomenetelmät" liitteessä I olevan 2 kohdan c alakohdassa esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

7.2 Näyte säilytetään sellaisissa olosuhteissa, ettei koostumuksessa pääse tapahtumaan mitään pilaantumista eikä muuttumista.

8 **Menettely**

8.1 *Koenäytteen esikäsittely*

Maitojauhe siirretään sitä tilavuudeltaan noin kaksi kertaa suurempaan astiaan, joka on varustettu ilmatiiviillä kannella. Astia suljetaan välittömästi.

Sekoitetaan maitojauhe hyvin kääntelemällä astiaa ylösalaisin.

8.2 *Näyte*

Punnitaan 2,000 ± 0,001 g koenäytettä sentrifugiputkeen (6.2).

8.3 *Rasvojen ja proteiinien poisto*

8.3.1 Lisätään 20 g haaleaa vettä (50 °C) näytteeseen. Liuotetaan jauhe sekoittaen 5 minuutin ajan sekoittimella (6.3). Jäähdytetään putki 25 °C:n lämpötilaan.

8.3.2 Lisätään 10,0 ml trikloorietikkahappoliuosta (5.1) kahden minuutin aikana magneettisekoittajalla (6.4) sekoittaen. Asetetaan putki vesihauteeseen (6.9) ja pidetään siellä 60 minuuttia.

8.3.3 Sentrifugoidaan (6.2) kiihtyvyydellä 2 200 g 10 minuutin ajan tai suodatetaan paperin (6.6) läpi heittäen ensimmäiset 5 ml suodosta pois.

8.4 *Kromatografinen määritys*

8.4.1 Injektoidaan tarkasti mitattuna 15–30 µl kelluvaa liuosta tai suodosta (8.3.3) HPLC-laitteistoon (6.10) virtausnopeudella 1,0 ml eluointiliuosta (5.2) minuutissa.

Huom:

1. Eluointiliuos (5.2) on pidettävä koko kromatografisen määrityksen ajan 85 °C:ssa eluaatin pitämiseksi kaasuttomana ja kaiken bakteerikasvun estämiseksi. Mitä tahansa saman vaikutuksen tuottavaa varotoimea voidaan käyttää.
2. Jokaisen keskeytyksen aikana kolonnit on huuhdeltava vedellä. Eluointiliuosta (5.2) ei saa koskaan jättää niihin.

Ennen jokaista yli 24 tunnin keskeytystä kolonnit on huuhdeltava vedellä ja pestävä sitten liuoksella (5.3) vähintään kolmen tunnin ajan virtausnopeudella 0,2 ml/minuutti.

8.4.2 Koenäytteen [E] kromatografisen määrityksen tulokset saadaan kromatogrammin muodossa, jossa jokainen piikki tunnistetaan sen retentioajasta RT seuraavasti:

piikki II: kromatogrammin toinen piikki, jonka RT on noin 12,5 minuuttia,

piikki III: kromatogrammin kolmas piikki, vastaten GMP:jä, joiden RT on 15,5 ± 1,0 minuuttia,

piikki IV: kromatogrammin neljäs piikki, jonka RT on noin 17,5 minuuttia.

Kolonnien laatu voi vaikuttaa eri piikkien retentioaikoihin.

Integraattori (6.10.6) laskee automaattisesti jokaisen piikin pinta-alan A, eli:

A_{II}: piikin II pinta-ala

A_{III}: piikin III pinta-ala

A_{IV}: piikin IV pinta-ala.

Laitteiston tai kolonnien huonosta toiminnasta tai määritetyn näytteen luonteesta ja alkuperästä johtuvien mahdollisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi on välttämätöntä tutkia jokainen kromatogrammi ennen kvantitatiivista tulkintaa.

Jos esiintyy epäilyjä, määritys toistetaan.

8.5 *Kalibrointi*

8.5.1 Standardinäytteille (5.4) sovelletaan täsmälleen 8.2–8.4.2 kohdassa kuvattua menettelyä.

On käytettävä juuri valmistettuja liuoksia, sillä GMP:t hajoavat 8 % trikloorisetaatti -ympäristössä. Itse asiassa niiden pitoisuus pienenee noin 0,2 %/tunti 30 °C:ssa.

8.5.2 Ennen näytteiden kromatografiseen määritykseen siirtymistä kolonnit on valmisteltava injektoimalla toistuvasti standardinäytteen (5.4.2) liuosta (8.5.1), kunnes GMP:jä vastaavan piikin pinta-ala ja retentioaika pysyvät vakiona.

8.5.3 Määritetään vasteen R kertoimet injektoimalla sama tilavuusmäärä suodoksia (8.5.1) kuin näytteitä.

9 Tulosten esittäminen

9.1 **Laskutapa ja kaavat**

9.1.1 *Vasteen R kertoimien laskeminen:*

piikki II: $R_{II} = \frac{100}{A_{II}\,[0]}$

piikki IV: $R_{IV} = \frac{100}{A_{IV}\,[0]}$

jossa:

R_{II} ja R_{IV} = piikkien II ja IV vastekertoimet

$A_{II}[0]$ ja $A_{IV}[0]$ = edellä 8.5.3 kohdassa saadut standardinäytteen piikkien II ja IV pinta-alat

piikki III: $R_{III} = \frac{W}{A_{III}\,[5] - A_{III}\,[0]}$

jossa

R_{III} = piikin III vastekerroin

$A_{III}[0]$ ja $A_{III}[5]$ = edellä 8.5.3 kohdassa saadut standardinäytteiden [0] ja [5] piikin III pinta-alat

W = standardinäytteessä [5] esiintyvän heran määrä, eli 5.

9.1.2 Näytteen [E] piikkien suhteellisen pinta-alan laskeminen

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

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

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

jossa:

$S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = näytteen [E] piikkien II, III ja IV suhteelliset pinta-alat,

$A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$, $A_{IV}[E]$ = edellä 8.4.2 kohdassa saadut näytteen [E] piikkien II, III ja IV pinta-alat,

R_{II}, R_{III}, R_{IV} = edellä 9.1.1 kohdassa lasketut vastekertoimet.

9.1.3 Näytteen [E] piikin III suhteellisen retentioajan laskeminen:

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

jossa:

$RRT_{III}[E]$ = näytteen [E] piikin III suhteellinen retentioaika,

$RT_{III}[E]$ = edellä 8.4.2 kohdassa saatu näytteen [E] piikin III retentioaika,

$RT_{III}[5]$ = edellä 8.5.3 kohdassa saatu standardinäytteen [5] piikin III retentioaika.

9.1.4 Kokeet ovat osoittaneet, että on olemassa lineaarinen riippuvuus piikin III suhteellisen retentioajan eli $RRT_{III}[E]$:n ja aina 10 %:iin asti lisätyn herajauheen prosenttiosuuden välillä:

— pitoisuudella < 5 % $RRT_{III}[E]$ on > 1,000,

— pitoisuudella ≥ 5 % $RRT_{III}[E]$ on ≤ 1,000.

Sallittu epätarkkuus RRT_{III} -arvoille on ± 0,002.

Tavallisesti $RRT_{III}[O]$ -arvo eroaa vähän arvosta 1,034. Kolonnien kunnosta riippuen tämä arvo voi lähestyä arvoa 1,000, mutta sen on oltava aina tätä suurempi.

9.2 *Näytteessä esiintyvän herajuoksutejauheen prosenttiosuuden laskeminen:*

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

jossa:

W = näytteessä [E] esiintyvän herajuoksutteen prosenttiosuus m/m,

$S_{III}[E]$ = edellä 9.1.2 kohdassa saatu koenäytteen [E] piikin III suhteellinen pinta-ala,

1,3 = piikin III keskimääräinen suhteellinen pinta-ala, ilmaistuna grammoina 100 grammaa herajuoksutetta kohti, joka on määritetty alkuperältään erilaisista muuntamattomista rasvattomista maitojauheista. Tämä luku on saatu kokeellisesti,

$S_{III}[O]$ = piikin III suhteellinen pinta-ala, joka on yhtä suuri kuin $R_{III} \times A_{III}[O]$. Nämä arvot on saatu 9.1.1 ja 8.5.3 kohdasta,

$(S_{III}[O] - 0,9)$ = suoritettava korjaus keskimääräiseen suhteelliseen pinta-alaan 1,3, kun $S_{III}[O]$ -arvo poikkeaa 0,9:stä. Kokeellisesti standardinäytteen [O] piikin III keskimääräinen suhteellinen pinta-ala on 0,9.

9.3 *Menetelmän tarkkuus*

9.3.1 Toistettavuus

Kahden samanaikaisesti tai lyhyellä aikavälillä suoritetun, saman henkilön samalla laitteistolla samasta näytteestä tekemän määrityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 0,2 %:a m/m.

9.3.2 Uusittavuus

Kahden yksittäisen ja toisistaan riippumattoman, kahdessa eri laboratoriossa samasta näytteestä saadun tuloksen välinen ero ei saa ylittää 0,4 %:a m/m.

9.4 *Tulkinta*

9.4.1 Todetaan herattomuus, jos piikin III suhteellinen pinta-ala, $S_{III}[E]$, grammoina herajuoksutetta 100 tuotegrammaa kohti ilmaistuna, on $\leq 2{,}0 + (S_{III}[O] - 0{,}9)$

jossa

2,0 = suurin sallittu arvo piikin III suhteelliselle pinta-alalle ottaen huomioon piikin III suhteellisen pinta-alan eli 1,3:n epätarkkuus, joka johtuu rasvattomien maitojauheiden koostumuksen vaihteluista ja menetelmän uusittavuudesta (9.3.2),

$(S_{III}[O] - 0{,}9)$ = suoritettava korjaus, kun pinta-ala $S_{III}[O]$ eroaa 0,9:stä (ks. 9.2 kohta).

9.4.2 Jos piikin III suhteellinen pinta-ala, $S_{III}[E]$ on $> 2{,}0 + (S_{III}[O] - 0{,}9)$ ja piikin II suhteellinen pinta-ala, $S_{II}[E] \leq 160$, lasketaan esiintyvän herajuoksutteen pitoisuus 9.2 kohdassa esitetyllä tavalla.

9.4.3 Jos piikin III suhteellinen pinta-ala, $S_{III}[E]$ on $> 2{,}0 + (S_{III}[O] - 0{,}9)$ ja piikin II suhteellinen pinta-ala, $S_{II}[E] \geq 160$, määritetään kokonaisproteiinipitoisuus (P%); sitten tutkitaan kuvat 1 ja 2.

9.4.3.1 Muuntamattomien rasvattoman maitojauheen näytteiden määrityksestä saadut tiedot, joissa proteiinien kokonaispitoisuus on korkea, on ryhmitelty kuviin 1 ja 2.

Yhtenäisellä viivalla kuvattu suora edustaa lineaarisen regression suoraa, jonka kertoimet on laskettu pienimmän neliösumman menetelmällä.

Katkoviivalla kuvattu suora määrää piikin III suhteellisen pinta-alan ylärajan, jota todennäköisyydellä 90 % tapauksista ei ylitetä.

Kuvien 1 ja 2 katkoviivalla kuvattujen suorien yhtälöt ovat:

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

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

jossa

S_{III} on piikin III suhteellinen pinta-ala laskettuna joko proteiinien kokonaispitoisuudesta tai piikin $S_{II}[E]$ suhteellisesta pinta-alasta,

P% on kokonaisproteiinipitoisuus painoprosentteina ilmaistuna,

$S_{II}[E]$ on 9.1.2 kohdassa laskettu näytteen suhteellinen pinta-ala.

Nämä yhtälöt ovat yhtä suuria kuin 9.2 kohdassa mainittu luku 1,3.

Poikkeama (T_1 ja T_2) saadun suhteellisen pinta-alan $S_{III}[E]$ ja suhteellisen pinta-alan S_{III} välillä saadaan seuraavista yhtälöistä:

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

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

9.4.3.2 Jos T_1 ja/tai T_2 ovat pienempiä tai yhtä suuria kuin nolla, herajuoksutteen esiintymistä ei voida todeta.

Jos T_1 ja T_2 ovat suurempia kuin nolla, johtopäätöksenä on herajuoksutteen esiintyminen.

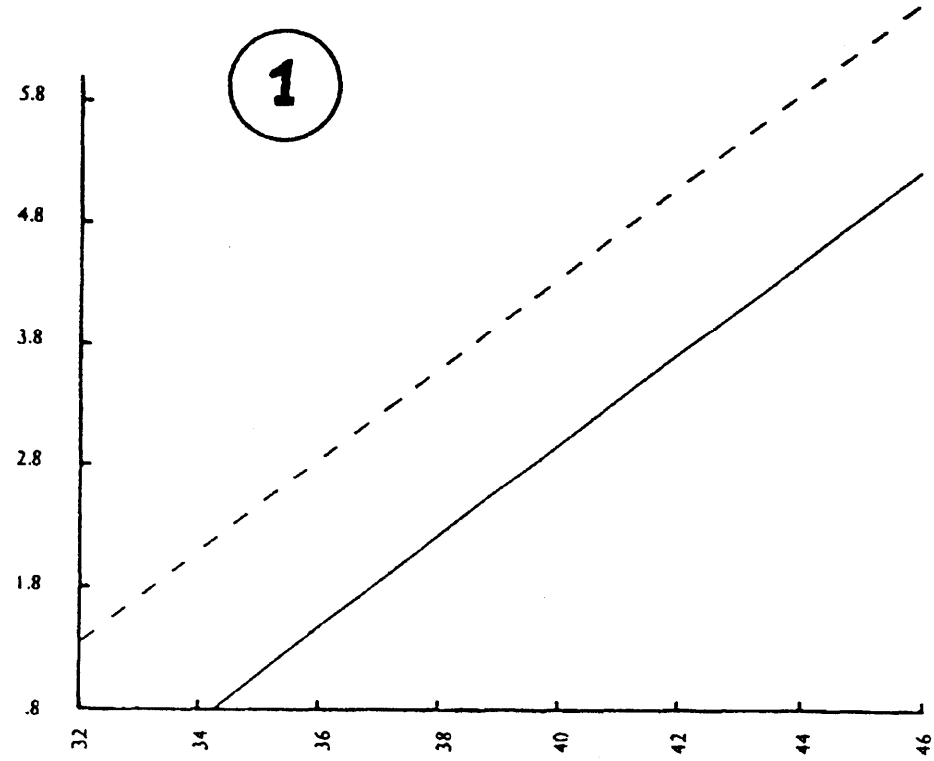
Herajuoksutteen pitoisuus lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$W = T_2 + 0{,}91$$

jossa

0,91 edustaa poikkeamaa pystyakselilla yhtenäisellä viivalla kuvatun suoran ja katkoviivalla kuvatun suoran välillä."

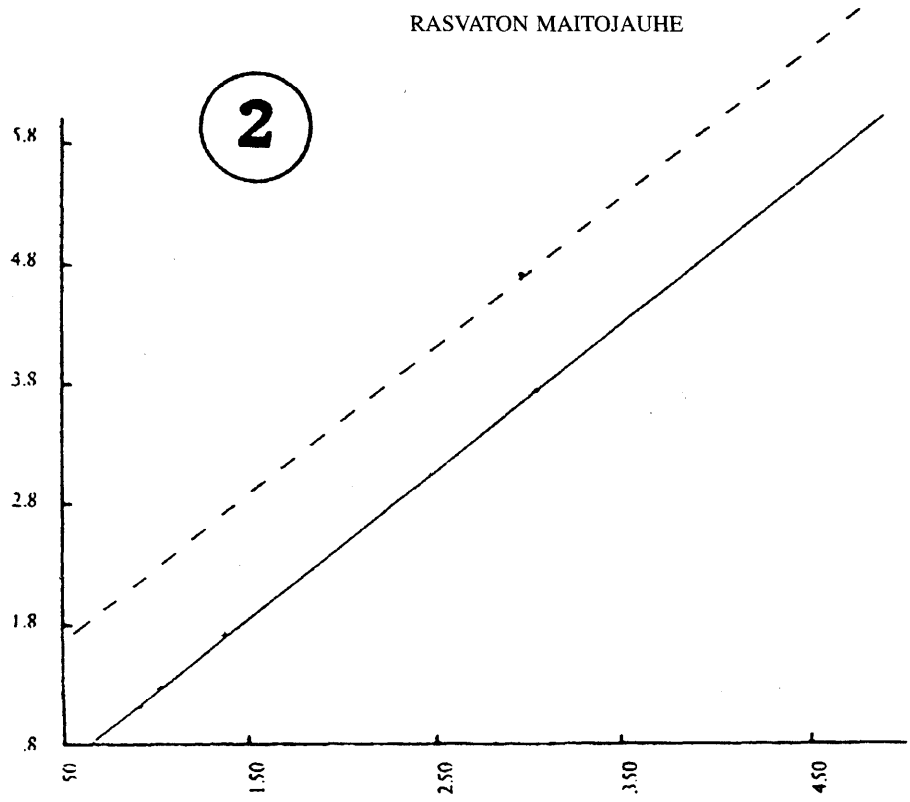
RASVATON MAITOJAUHE



Piikki III

kokonaisproteiinipitoisuus, %

RASVATON MAITOJAUHE



Piikki III

Piikki II