VERORDNUNG (EWG) Nr. 3711/86 DER KOMMISSION

vom 4. Dezember 1986

zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 625/78 über Durchführungsbestimmungen für die öffentliche Lagerhaltung von Magermilchpulver

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 804/68 des Rates vom 27. Juni 1968 über die gemeinsame Marktorganisation für Milch und Milcherzeugnisse (1), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 1335/86 (2), insbesondere auf Artikel 7 Absatz 5,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Verordnung (EWG) Nr. 1014/68 des Rates vom 20. Juli 1968 zur Festlegung der Grundregeln für die öffentliche Lagerhaltung von Magermilchpulver (3), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 1272/79 (4), legt in Artikel 3 fest, daß der Interventionspreis für zu einem Lagerhaus geliefertes Magermilchpulver gilt, das sich in einer festzulegenden Höchstentfernung von dem Ort seiner Einlagerung befindet. Falls das Lagerhaus, an das das Magermilchpulver geliefert wird, sich in einer größeren Entfernung als dieser Höchstentfernung befindet, werden die pauschal festzulegenden zusätzlichen Transportkosten von der Interventionsstelle getragen.

Die Verordnung (EWG) Nr. 625/78 der Kommission (5), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 2256/86 (6), hat die betreffende Höchstentfernung auf 100 Kilometer festgesetzt. Die Erfahrung hat gezeigt, daß diese Höchstentfernung nicht ausreichte, um es den Interventionsstellen zu ermöglichen, den Zugang zu den öffentlichen Lagerhäusern unter den bestmöglichen Bedingungen zu regeln. Folglich ist diese Entfernung auf 350 Kilometer zu erhöhen.

Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 625/78 über die Qualität des Magermilchpulvers sieht unter Ziffer 2 die Kontrollverfahren vor, die zum Nachweis bestimmter Erzeugnisse verwendet werden. Es erscheint zweckmäßig für Probenahmen die Bezugnahme auf die internationalen Normen vorzusehen.

Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 625/78 sieht die Dosierungsmethode der freien Sialinsäure für den Nachweis von Labmolke in Magermilchpulver für die öffentliche Lagerhaltung vor. Diese Methode wurde voübergehend bis zum 31. März 1986 verwendet. Folglich ist dieser Anhang zu streichen.

Der Verwaltungsausschuß für Milch und Milcherzeugnisse hat nicht innerhalb der ihm von seinem Vorsitzenden gesetzten Frist Stellung genommen —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Verordnung (EWG) Nr. 625/78 wird wie folgt geändert:

1. In Artikel 5 Absatz 1 werden die Worte „100 Kilometer" ersetzt durch die Worte „350 Kilometer".

2. In Anhang I Ziffer 2 Buchstabe a) werden die Worte „ISO-Norm" jedesmal ersetzt durch die Worte „international Norm ISO".

3. In Anhang I Ziffer 2 Buchstabe b) erhält der Text nach dem zweiten Gedankenstrich folgende Fassung:

   „Labmolke:

   Bestimmung der Glykomakropeptide mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (3)."

4. In Anhang I Ziffer 2 wird folgender Buchstabe c) hinzugefügt:

   „c) Die Probenahme erfolge nach dem von der internationalen Norm ISO 707 vorgesehenen Verfahren. Die Mitgliedstaaten können jedoch eine andere Methode der Probenahme verwenden, sofern diese den Grundsätzen der genannten Norm entpricht."

5. In Anhang I wird die Fußnote 4 gestrichen.

6. Anhang IV wird gestrichen.

7. Anhang V wird durch den Text im Anhang dieser Verordnung ersetzt.

Artikel 2

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

Die Ziffern 4 und 7 von Artikel 1 gelten ab 2. Februar 1987.

(1) ABl. Nr. L 148 vom 28. 6. 1968, S. 13.
(2) ABl. Nr. L 119 vom 8. 5. 1986, S. 19.
(3) ABl. Nr. L 173 vom 22. 7. 1968, S. 4.
(4) ABl. Nr. L 161 vom 29. 6. 1979, S. 11.
(5) ABl. Nr. L 84 vom 31. 3. 1978, S. 19.
(6) ABl. Nr. L 196 vom 18. 7. 1986, S. 41.

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

Brüssel, den 4. Dezember 1986

Für die Kommission

Frans ANDRIESSEN

Vizepräsident

ANHANG

„ANHANG V

NACHWEIS VON LABMOLKE IN MAGERMILCHPULVER FÜR DIE ÖFFENTLICHE LAGERHALTUNG DURCH DIE BESTIMMUNG DER GLYKOMAKROPEPTIDE MITTELS DER HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

1. Gegenstand und Anwendungsbereich

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

2. Referenzen

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

3. Definition

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

4. Prinzip

— Rekonstitution des Magermilchpulvers in warmem Wasser, Entfernen des Fettanteils und der Proteine durch Ausfällung mit Trichloressigsäure und Zentrifugation oder Filtration.

— Bestimmung der im Filtrat über Überstand vorhandenen Glykomakropeptidmenge (GMP) durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

— Beurteilung des Ergebnisses durch den Vergleich mit Standardproben aus Magermilchpulver, ohne oder mit Zusatz eines bekannten Anteils an Labmolkenpulver.

5. Reagenzien

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

5.1. *Trichloressigsäurelösung*

240 g Trichloressigsäure ($C1_3CCOOH$) werden in Wasser aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.

5.2. *Elutionsmittel, pH 6,0*

1,74 g Di-Kaliumphosphat (K_2HPO_4), 12,37 g Mono-Kaliumphosphat (KH_2PO_4) und 21,41 g Natriumsulfat (Na_2SO_4) werden in ungefähr 700 ml Wasser gelöst.

Falls erforderlich, ist der pH-Wert mit Phosporsäure- oder Kaliumhydroxidlösung auf 6,0 zu berichtigen.

Die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt und gut durchmischt. Das Elutionsmittel ist vor Gebrauch durch einen Membranfilter mit 0,45 µm Porendurchmesser zu filtrieren.

5.3. *Waschlösung für die Säulen*

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

Anmerkung: Jede andere Waschlösung mit bakterizider Wirkung, die die Trennleistung der Säulen nicht beeinträchtigt, kann verwendet werden.

5.4. *Standardproben*

5.4.1. Magermilchpulver gemäß den Anforderungen der Verordnung (EWG) Nr. 625/78, d. h. [0].

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

6. **Geräte**

6.1. Analytische Waage.

6.2. Zentrifuge mit einer Zentrifugalkraft von 2 200 g, versehen mit verschließbaren Zentrifugenröhrchen mit ungefähr 25 ml Fassungsvermögen.

6.3. Schüttelgerät.

6.4. Magnetrührer.

6.5. Glastrichter mit ungefähr 7 cm Durchmesser.

6.6. Filterpapier, mittlere Filtriergeschwindigkeit, ungefähr 12,5 cm Durchmesser.

6.7. Filtrationsgestell aus Glas mit Membranfilter von 0,45 µm Porendurchmesser.

6.8. Graduierte Pipette für 10 ml, gemäß ISO 648, Klasse A oder ISO/R 835.

6.9. Thermostatisiertes Wasserbad, Einstellung 25 ± 0,5 °C.

6.10. HPLC-Ausrüstung mit:

6.10.1. Pumpe;

6.10.2. manuellem oder automatischem Injektionsventil mit einer Probenschleife von 15 µl bis 30 µl Fassungsvermögen;

6.10.3. zwei Säulen TSK 2 000 SW (30 cm Länge, 0,75 cm Innendurchmesser) in Serie geschaltet oder Säulen mit gleichwertiger Trennleistung und einer Vorsäule (3 cm × 0,3 cm), gefüllt mit I 125 oder mit einem Material von gleichwertiger Wirksamkeit;

6.10.4. thermostatisiertem Säulenofen, temperiert auf 35 ± 1 °C;

6.10.5. UV-Detektor mit variabler Wellenlänge für Messungen bei 205 nm mit einer Empfindlichkeit von 0,008 A;

6.10.6. Integrator mit der Möglichkeit der „valley-to-valley"-Integration.

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

7. **Probenahme**

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

7.2. Die Probe ist unter Bedingungen aufzubewahren, die jeden Verderb oder Änderung der Zusammensetzung verhindern.

8. **Verfahren**

8.1. *Probenvorbereitung*

Magermilchpulver in einen Behälter geben, der ungefähr das doppelte Fassungsvermögen wie das Pulvervolumen hat und luftdicht verschlossen werden kann.

Den Behälter sofort verschließen.

Das Magermilchpulver durch intensives Schütteln des Behälters gut durchmischen.

8.2. *Probenentnahme*

Wiege 2,000 g ± 0,001 g Probe in ein Zentrifugenröhrchen ein (6.2).

8.3. *Entfernen von Fett und Protein*

8.3.1. 20 g warmes Wasser (50 °C) zur Probe geben. Das Pulver durch fünfminutiges Bewegen auf dem Schüttelgerät (6.3) rekonstituieren.

Das Zentrifugenröhrchen auf 25 °C abkühlen.

8.3.2. Innerhalb von 2 Minuten 10 ml Trichloressigsäure (5.1) unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer (6.4) hinzugeben. Das Röhrchen für 60 Minuten in das Wasserbad (6.9) stellen.

8.3.3. Danach die Probe bei 2 200 g 10 Minuten zentrifugieren (6.2) oder durch Filterpapier (6.6) filtrieren.

Die ersten 5 ml des Filtrats verwerfen.

8.4. *Chromatographische Bestimmung*

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

Anmerkung:

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

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

8.4.2. Die Ergebnisse der chromatographischen Analyse der Proben [E] werden in Form eines Chromatogramms gewonnen, in dem jeder Peak durch seine Retentionszeit RT identifiziert wird, d. h.:

Peak II: zweiter Peak des Chromatogramms mit einer RT von etwa 12,5 Minuten;

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

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

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

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

A_{II}: Fläche von Peak II,

A_{III}: Fläche von Peak III,

A_{IV}: Fläche von Peak IV.

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

Im Zweifelsfalle ist die Analyse zu wiederholen.

8.5. *Eichung*

8.5.1. Für die Standardproben (5.4) ist das unter den Punkten 8.2 bis 8.4.2 beschriebene Verfahren genau einzuhalten.

Es sind frisch zubereitete Lösungen zu verwenden, da die GMP im 8 %igen Trichloressigsäure-Milieu abgebaut werden. Der Verlust wird bei 30 °C auf 0,2 % pro Stunde geschätzt.

8.5.2. Vor jeder chromatographischen Bestimmung der Proben sind die Säulen durch wiederholte Injektionen der Lösung (8.5.1) der Standardproben (5.4.2) zu konditionieren, bis die Fläche und die Retentionszeit des dem GMP entsprechenden Peaks konstant bleibt.

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

9. Darstellung der Ergebnisse

9.1. *Art der Berechnung und Formeln*

9.1.1. Berechnung der Eichfaktoren:

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

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

wobei:

R_{II} und R_{IV}: die Eichfaktoren der Peaks II und IV sind;

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

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

wobei:

R_{III}: der Eichfaktor von Peak III ist;

$A_{III}\,[0]$ und $A_{III}\,[5]$: die Flächen des Peaks III der Standardproben [0] bzw. [5], gewonnen gemäß 8.5.3, sind;

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

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

S_{II} [E] = R_{II} × A_{II} [E]
S_{III} [E] = R_{III} × A_{III} [E]
S_{IV} [E] = R_{IV} × A_{IV} [E]

wobei:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E]: die relativen Flächen der Peaks II, III und IV der Probe [E] sind;

A_{II} [E], A_{III} [E], A_{IV} [E]: die Flächen der Peaks II, III und IV der Probe [E], gewonnen nach 8.4.2, sind;

R_{II}, R_{III}, R_{IV}: die Eichfaktoren, berechnet nach 9.1.1, sind.

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

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

wobei:

RRT_{III} [E]: die relative Retentionszeit für Peak III der Probe [E] ist;

RT_{III} [E]: die Retentionszeit für Peak III der Probe [E], gewonnen gemäß 8.4.2, ist;

RT_{III} [5]: die Retentionszeit für Peak III der Standardprobe [5], gewonnen gemäß 8.5.3, ist.

9.1.4. In Versuchen ist nachgewiesen worden, daß zwischen der relativen Retentionszeit von Peak III, d. h. RRT_{III} [E], und der zugesetzten Menge an Labmolkenpulver bis zu einer Konzentration von 10 % eine lineare Abhängigkeit besteht:

— Die RRT_{III} [E] ist < 1,000, wenn der Gehalt an Labmolke > 5 % ist;

— die RRT_{III} [E] ist ⩾ 1,000, wenn der Gehalt an Labmolke ⩽ 5 % ist.

Die zulässige Toleranz für die Werte von RRT_{III} liegt bei ± 0,002.

In der Regel weicht der Wert für RRT_{III} [0] kaum von 1,034 ab. Je nach dem Zustand der Säulen kann sich dieser Wert 1,000 annähern, muß jedoch immer größer sein.

9.2. *Berechnung des Gehalts an Labmolkenpulver in der Probe*

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

wobei:

W: dem prozentualen Massenanteil an Labmolke in der Probe [E] entspricht;

S_{III} [E]: die relative Fläche von Peak III der Probe [E], bestimmt nach 9.1.2, ist;

1,3: der relativen durchschnittlichen Fläche von Peak III, ausgedrückt in g Labmolke/100 g, wie sie in unverfälschtem Magermilchpulver unterschiedlicher Herkunft gefunden wurde, entspricht. Dieser Wert wurde experimentell bestimmt;

S_{III} [0]: die relative Fläche von Peak III ist; sie entspricht R_{III} × A_{III} [0]. Diese Werte wurden gemäß 9.1.1 und 8.5.3 gewonnen;

(S_{III} [0] — 0,9): der Korrektur der relativen durchschnittlichen Fläche von 1,3 entspricht, falls der Wert von S_{III} [0] größer oder kleiner als 0,9 ist. Die experimentell bestimmte relative durchschnittliche Fläche von Peak III der Standardprobe [0] ist 0,9.

9.3. *Genauigkeit der Methode*

9.3.1. Wiederholbarkeit

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

9.3.2. Reproduzierbarkeit

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

9.4. *Interpretation der Ergebnisse*

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

wobei :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

wobei

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

P % der Gesamteiweißgehalt, ausgedrückt in Gewichtsprozenten, ist ;

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

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

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

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

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

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

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

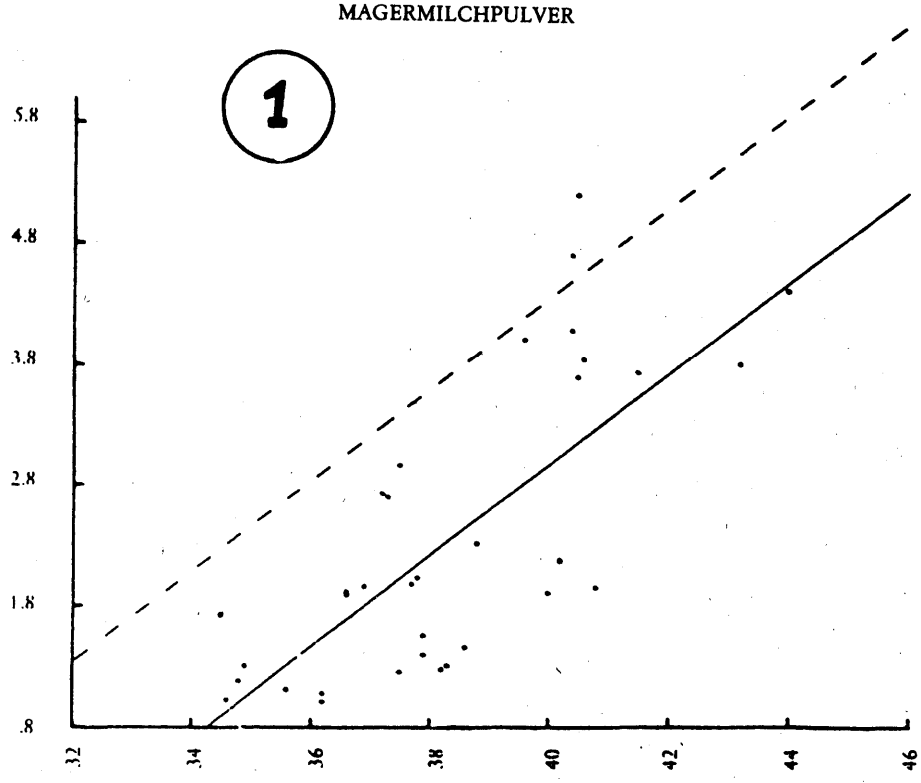
Der Gehalt an Labmolke wird nach der folgenden Formel errechnet :

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

wobei

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

MAGERMILCHPULVER



MAGERMILCHPULVER

