KOMISSION ASETUS (EY) N:o 322/96,

annettu 22 päivänä helmikuuta 1996,

rasvattoman maitojauheen julkisen varastoinnin soveltamista koskevista yksityiskohtaisista säännöistä

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön 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 komission asetuksella (EY) N:o 2931/95 ([2]), ja erityisesti sen 7 artiklan 5 kohdan ja 28 artiklan,

sekä katsoo, että

rasvattoman maitojauheen julkista varastointia koskevista yleisistä säännöistä 20 päivänä heinäkuuta 1968 annettu neuvoston asetus (ETY) N:o 1014/68 ([3]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 3577/90 ([4]), kumotaan 1 päivästä maaliskuuta 1996 neuvoston asetuksella (EY) N:o 1538/95 ([5]); tämän vuoksi on syytä sisällyttää säännöt, jotka eivät sisälly asetukseen (ETY) N:o 804/68, rasvattoman maitojauheen julkista varastointia koskeviin yksityiskohtaisiin sääntöihin, joista säädetään komission asetuksella (ETY) N:o 625/78 ([6]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 1802/95 ([7]), kyseiseen asetukseen tehtävien mukautusten merkittävyyden ja muutosten suuren määrän vuoksi on syytä laatia kyseinen asetus uudelleen selkeyteen ja avoimuuteen liittyvistä syistä; tämän vuoksi asetus (ETY) N:o 625/78 on syytä kumota,

interventioelimet voivat ostaa ainoastaan sellaista rasvatonta maitojauhetta, jonka proteiinipitoisuus noudattaa vähimmäismäärää; lisäksi ostohinta voi vaihdella proteiinipitoisuuden mukaan; on aiheellista määritellä tutkimusmenetelmä kyseisen pitoisuuden mittaamiseksi ja täsmentää tapa, jolla ostohinta lasketaan,

sen varmistamiseksi, ettei ostetusta rasvattomasta maitojauheesta suoriteta maksua väärin perustein, olisi täsmennettävä, että kaikkien vaadittavien edellytysten täyttyminen on tarkistettava ja proteiinipitoisuus määritettävä ennen maksun suoritusta,

on kehitetty viitemenetelmä kirnupiimän havaitsemiseksi; tarkastustoimenpiteiden yhdenmukaisen soveltamisen varmistamiseksi on aiheellista turvautua tähän määritysmenetelmään interventioelinten ostaman rasvattoman maitojauheen tarkastamiseksi,

raakamaidon, lämpökäsitellyn maidon ja maitopohjaisten tuotteiden tuotantoa ja markkinoille saattamista koskevista terveyssäännöistä 16 päivänä kesäkuuta 1992 annetussa neuvoston direktiivissä 92/46/ETY ([8]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna direktiivillä 94/71/EY ([9]), säädetään, että maitoa, jonka antimikrobisten aineiden pitoisuus ylittää neuvoston asetuksessa (ETY) N:o 2377/90 ([10]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 282/96 ([11]), vahvistetut rajat, ei voida käyttää ihmisravinnoksi; on soveliasta tutkia, sisältääkö interventioelinten ostama rasvaton maitojauhe antimikrobisia aineita, joita käytetään yleisesti; tätä tarkoitusta varten on välttämätöntä säätää tarkastusmenetelmästä,

muilta osin säännöksiä, jotka koskevat rasvattoman maitojauheen julkista varastointia, voidaan pitää asianmukaisesti vakiintuneina, ja ne voidaan siten tiettyjen teknisten mukautusten jälkeen säilyttää,

julkiseen varastointijärjestelmään sovellettavaan maatalouden muuntokurssiin vaikuttavat tosiseikat määritetään komission asetuksessa (ETY) N:o 1756/93 ([12]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 693/95 ([13]), ja

tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat maidon ja maitotuotteiden hallintokomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

1. Interventioelimet saavat ostaa ainoastaan sellaista rasvatonta maitojauhetta, joka vastaa asetuksen (ETY) N:o 804/68 7 artiklan 1 kohdassa säädettyä määritelmää, liitteessä I tarkoitettuja laatuvaatimuksia ja täyttää seuraavat edellytykset:

a) laatu on tarkastettu liitteissä I, V, VI ja VII tarkoitettujen määritysmenetelmien mukaisesti ja liitteessä IV olevien yksityiskohtaisten sääntöjen mukaisesti otettujen näytteiden perusteella;

([1]) EYVL N:o L 148, 28.6.1968, s. 13
([2]) EYVL N:o L 307, 20.12.1995, s. 10
([3]) EYVL N:o L 173, 22.7.1968, s. 4
([4]) EYVL N:o L 353, 17.12.1990, s. 23
([5]) EYVL N:o L 148, 30.6.1995, s. 17
([6]) EYVL N:o L 84, 31.3.1978, s. 19
([7]) EYVL N:o L 174, 26.7.1995, s. 27
([8]) EYVL N:o L 268, 14.1.1992, s. 1
([9]) EYVL N:o L 368, 31.12.1994, s. 33
([10]) EYVL N:o L 224, 18.8.1990, s. 1
([11]) EYVL N:o L 37, 15.2.1996, s. 9
([12]) EYVL N:o L 161, 2.7.1993, s. 48
([13]) EYVL N:o L 71, 31.3.1995, s. 52

b) pakkaus ja merkinnät ovat liitteiden II ja III edellytysten mukaisia;

c) se ei sisällä muita tuotteita, erityisesti kirnupiimää tai heraa;

d) se on valmistettu sen kuukauden kuluessa, joka edeltää päivää, jona interventioelin vastaanottaa myyntitarjouksen tai liitteessä III olevan e kohdan toisessa virkkeessä tarkoitetussa tapauksessa niiden neljän viikon kuluessa, jotka edeltävät viikkoa, jolloin myyntitarjous otetaan vastaan;

e) sen radioaktiivisuus ei ylitä enimmäistasoja, joita sovelletaan yhteisön lainsäädännön perusteella.

Sovelletaan tasoja, jotka vahvistetaan neuvoston asetuksen (ETY) N:o 737/90 (1) 3 artiklassa. Tuotteen radioaktiivisen saastunnan määrä tarkastetaan ainoastaan, jos tilanne niin vaatii, ja vain tarpeellisen ajanjakson kuluessa. Valvontatoimenpiteiden kesto ja laajuus määritetään tarvittaessa asetuksen (ETY) N:o 804/68 30 artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen.

2. Tässä asetuksessa tarkoitetaan

a) 'kirnupiimällä' voin valmistuksen sivutuotetta, joka saadaan kirnuuntumisen tai kerman keskeytyksettömän voiksi tekemisen ja kiinteän rasva-aineen erottelun jälkeen

b) 'heralla' juuston tai kaseiinin valmistuksen sivutuotetta, joka saadaan happojen, juoksutteen ja/tai kemiallis-fysikaalisten prosessien avulla.

3. Tarjouksen vähimmäismäärä on 20 tonnia. Jäsenvaltiot voivat lisätä vähimmäismäärää ja/tai määrätä, että rasvatonta maitojauhetta on tarjottava täysinä tonneina.

4. Interventioelimen on kirjattava päivämäärä, jona se vastaanottaa myyntitarjouksen, vastaavat määrät ja valmistuspäivät, sekä paikka, johon tarjottu rasvaton maitojauhe on varastoitu.

5. Tarjous on voimassa ainoastaan, jos on olemassa todiste siitä, että tarjouksen tekijä on antanut takuun, joka vastaa 12:ta ecua tarjottua rasvatonta maitojauhetonnia kohden.

Tässä asetuksessa interventioelimen määräämässä varastossa olevan rasvattoman maitojauheen tarjouksen ja toimituksen voimassa pitäminen muodostaa ensisijaisen vaatimuksen, jonka täyttäminen varmistetaan tämän takuun avulla. Jos 1 kohdan a alakohdassa tarkoitettu tarkastus kuitenkin osoittaa, että rasvaton maitojauhe ei ole 1 kohdan vaatimusten mukaista, vielä toimittamattomat määrät vapautetaan takuusta.

Takuu annetaan jäsenvaltiossa, jonne tarjous on annettu.

2 artikla

1. Asetuksen (ETY) N:o 804/68 7 artiklan 1 kohdassa tarkoitettu yritys hyväksytään ainoastaan, jos

a) se hyväksytään neuvoston direktiivin 92/46/ETY 10 artiklan mukaisesti ja sen käytettävissä on asianmukainen tekninen laitteisto

b) se sitoutuu pitämään kunkin jäsenvaltion toimivaltaisen viranomaisen määräämiä rekistereitä, joissa säilytetään tiedot raaka-aineiden alkuperästä, käsitellyn rasvattoman maidon, kirnupiimän ja heran määristä, rasvattoman maidon lämpökäsittelystä, tuotettujen tuotteiden määristä ja pakkaamisesta sekä kunkin rasvattoman maitojauhe-, kirnupiimäjauhe- ja herajauhe-erän tunniste ja poistumispäivämäärä

c) se sitoutuu siihen, että rasvattoman maitojauheen, jota voidaan tarjota julkiseen interventioon, valmistus joutuu erityiseen viralliseen valvontaan

d) sitoutuu vähintään kaksi työpäivää etukäteen ilmoittamaan valvonnasta vastaavalle toimivaltaiselle elimelle aikomuksestaan valmistaa rasvatonta maitojauhetta julkista interventiota varten; jäsenvaltio voi kuitenkin asettaa lyhyemmän määräajan.

2. Tämän asetuksen säännösten noudattamisen varmistamiseksi toimivaltaisten elinten on järjestettävä tarkastuksia paikalla ilman ennakkoilmoitusta kyseisten tuotantolaitosten interventioon tarkoitetun rasvattoman maitojauheen valmistusohjelman mukaan.

Näihin tarkastuksiin on sisällyttävä vähintään

— yksi tarkastus 28:aa valmistuspäivää kohden, kun on kyse valmistuksesta interventioon, ja vähintään kerran vuosipuoliskon aikana 1 kohdan b alakohdassa tarkoitettujen tietojen tarkastamiseksi

— yksi tarkastus vuosipuoliskoa kohden 1 kohdassa tarkoitettujen hyväksymisedellytysten täyttymisen tarkastamiseksi.

3. Hyväksyminen peruutetaan, jos 1 kohdassa säädetyt alkuedellytykset eivät enää täyty. Asianomaisen yrityksen pyynnöstä hyväksyminen voidaan palauttaa aikaisintaan kuuden kuukauden kuluttua ja perusteellisen tarkastuksen jälkeen.

Jos todetaan, että yritys on muusta syystä kuin ylivoimaisen esteen vuoksi laiminlyönyt 1 kohdan b, c tai d alakohdassa tarkoitettujen velvoitteidensa noudattamisen, hyväksyminen peruutetaan väliaikaisesti 1—12 kuukaudeksi sen mukaan, miten vakavasta sääntöjen vastaisuudesta on kyse.

Jäsenvaltio voi päättää luopua edellä tarkoitetusta hyväksymisen tilapäisestä peruuttamisesta, jos todetaan, että sääntöjen vastaisuus ei ole aiheutunut tahallisesta menettelystä eikä törkeästä huolimattomuudesta ja sen merkitys 2 kohdassa säädettyjen tarkastusten tehokkuuden kannalta on vähäinen.

(1) EYVL N:o L 82, 29.3.1990, s. 1

4. Edellä 2 ja 3 kohdan mukaisesti tehdyistä tarkastuksista on laadittava kertomus, jossa on mainittava

— tarkastuksen päivämäärä

— tarkastuksen kesto

— tehdyt toimet.

Vastaavan virkailijan on allekirjoitettava tarkastuskertomus.

5. Jäsenvaltioiden on annettava 2 ja 3 kohdassa säädettyjä tarkastuksia koskevat toteutetut toimenpiteet tiedoksi komissiolle yhden kuukauden kuluessa toimenpiteiden vahvistamisesta.

3 artikla

Edellä 1 artiklan 1 kohdassa säädettyjen säännösten noudattamisen valvonnasta huolehtiva toimielin, joka täsmentää kaikki liitteessä I olevassa 1 kohdassa luetellut tuotteen ominaisuudet, rekisteröi kunkin tarjotun erän analyysin tulokset, jotka myöhemmin kirjataan pyynnöstä myönnettävään todistukseen, erityisesti kun on kyse jäsenvaltioiden välisestä kaupasta tai viennistä.

4 artikla

1. Kun tarjouksen tiedot on tarkistettu, interventioelimen on viipymättä annettava päivätty ja numeroitu toimitusvahvistus, jossa on seuraavat tiedot:

a) toimitettava määrä

b) rasvattoman maitojauheen viimeinen toimituspäivä

c) varasto, johon se on toimitettava.

2. Rasvattoman maitojauheen toimituksen on tapahduttava 1 artiklan 1 kohdan d alakohdassa tarkoitetun myyntitarjouksen vastaanottopäivää seuraavien 28 päivän kuluessa. Toimitus voidaan jakaa osiin.

3. Tässä asetuksessa interventioelimen suorittama rasvattoman maitojauheen haltuunotto tapahtuu rasvattoman maitojauheen varastoonsaapumispäivänä, kuitenkin aikaisintaan seuraavana päivänä siitä päivästä, jolloin 1 kohdassa tarkoitettu toimitusvahvistus annetaan.

4. Siltä osin kuin 1 artiklassa tarkoitettujen vaatimusten noudattaminen varmistetaan, maksu interventioelimen ostamasta rasvattomasta maitojauheesta suoritetaan ajanjaksona, joka alkaa 120 päivää ja päättyy 140 päivää rasvattoman maitojauheen haltuunoton jälkeen.

5. Rasvattoman maidon ostohinta lasketaan seuraavasti:

— jos rasvattoman kuiva-aineen proteiinipitoisuus, joka on määritetty liitteessä I tarkoitetulla menetelmällä, on vähintään 35,6 prosenttia, ostohinta on sama kuin interventiohinta

— jos kyseinen pitoisuus on vähintään 31,4 prosenttia, mutta vähemmän kuin 35,6 prosenttia, ostohinta on sama kuin interventiohinta, josta on vähennetty seuraavasti laskettu määrä: interventiohinta x [(0,356 – proteiinipitoisuus) × 1,75].

6. Tarjouksellaan myyjä sitoutuu, jos tarkastus osoittaa, ettei rasvaton maitojauhe ole 1 artiklan 1 kohdassa säädettyjen vaatimusten mukaista

— ottamaan kyseisen kauppatavaran takaisin

— maksamaan kyseisten määrien varastointikustannukset haltuunottopäivästä poistumispäivään.

Nämä varastointikustannukset vahvistetaan kiinteästi tonnia kohden seuraavasti:

a) 21 ecua kiinteiden kulujen osalta

b) 0,10 ecua varastointipäivää kohden varastoinnin kulujen osalta.

Nämä määrät kirjataan hyvityksinä Euroopan maatalouden ohjaus- ja tukirahaston (EMOTR) tukiosaston tilille.

5 artikla

1. Asetuksen (ETY) N:o 804/68 7 artiklan 1 kohdan neljännessä alakohdassa tarkoitettujen varastojen on täytettävä seuraavat edellytykset:

a) ne ovat kuivia, hyvässä kunnossa eikä niissä ole tuhoeläimiä

b) niissä ei ole mitään vieraita hajuja

c) ne voidaan tuulettaa hyvin

d) ne ovat riittävän tilavia, ja niissä on oltava tähän tilavuuteen suhteutettu varustus.

Rasvattoman maitojauheen varastointiin liittyvät vaarat katetaan vakuutuksella, joka voi olla muodoltaan sopimukseen perustuva varastoijan velvoite tai interventioelimen yleinen vakuutus. Jäsenvaltio voi myös toimia omana vakuutuksenantajanaan.

2. Interventioelinten on vaadittava, että rasvaton maitojauhe viedään varastoon ja varastoidaan kuormalavoille siten, että erät on helppo tunnistaa ja niitä on helppo käsitellä.

3. Tarkastuksista vastaavan toimivaltaisen elimen on myös toteutettava komission asetuksen (ETY) N:o 618/90 [1] 4 artiklassa säädetty tarkastus sen varmistamiseksi, että tuotteet ovat varastossa.

6 artikla

1. Interventioelimen on valittava käytettävissä olevista varastoista se, joka sijaitsee lähinnä rasvattoman maitojauheen varastointipaikkaa.

[1] EYVL N:o L 67, 15.3.1990, s. 21

Jos muun varaston valinta ei aiheuta varastoinnin lisäkustannuksia, elin voi kuitenkin

a) valita muun varaston, joka sijaitsee enintään 2 kohdassa tarkoitetulla etäisyydellä

b) valita muun, edellä mainittua etäisyyttä kauempana sijaitsevan varaston, jos sen valinta vähentää kustannuksia, kun otetaan huomioon kyseisistä varastoinnista ja kuljetuksesta aiheutuvat kustannukset; tällöin interventioelimen on viipymättä ilmoitettava valintansa komissiolle.

2. Asetuksen (ETY) N:o 804/68 7 artiklan 1 kohdan kolmannessa alakohdassa tarkoitetuksi enimmäisetäisyydeksi vahvistetaan 350 kilometriä. Tämän etäisyyden ylittävältä osalta vahvistetaan interventioelimelle aiheutuviksi kuljetuksen lisäkustannuksiksi 0,05 ecua tonnia ja kilometriä kohden.

Jos ostava interventioelin kuuluu muun jäsenvaltion kuin sen alaisuuteen, johon rasvaton maitojauhe on varastoitu, ensimmäisessä alakohdassa tarkoitettua enimmäisetäisyyttä laskettaessa ei kuitenkaan oteta huomioon myyjän varaston ja sen jäsenvaltion rajan välistä etäisyyttä, jonka alaisuuteen interventioelin kuuluu.

7 artikla

Varastoa purettaessa, kun on kyse vapaasti varastossa toimituksesta, interventioelin toimittaa rasvattoman maitojauheen

— varastolaiturille kuljetusvälineeseen lastattuna, lukuun ottamatta ahtausta, jos on kyse rekka-autosta tai junavaunusta

— varastolaiturille, jos on kyse muusta kuljetusvälineestä, erityisesti kontista.

Rasvattoman maitojauheen ostaja vastaa mahdollisen ahtauksen tai kuormalavoilta nostamisen kustannuksista. Nämä maksut vahvistaa kiinteästi jäsenvaltio, joka ilmoittaa siitä pyynnöstä kaikille asianomaisille.

8 artikla

Kumotaan asetus (ETY) N:o 625/78.

Viittauksia asetukseen (ETY) N:o 625/78 on pidettävä viittauksina tähän asetukseen.

9 artikla

Tämä asetus tulee voimaan seitsemäntenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä.*

Sitä sovelletaan 1 päivästä maaliskuuta 1996.

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

Tehty Brysselissä 22 päivänä helmikuuta 1996.

Komission puolesta

Franz FISCHLER

Komission jäsen

LIITE I

RASVATTOMAN MAITOJAUHEEN LAATU

1. **Ominaisuudet**

a) proteiinipitoisuus:	vähintään 31,4 % rasvattomasta kuiva-aineesta
b) rasvapitoisuus:	enintään 1,00 %
c) vesipitoisuus:	enintään 3,5 %
d) titrautuva happoisuus millilitroina kymmennormaalista natriumhydroksidiliuoksesta:	enintään 19,5 ml
e) laktaattipitoisuus:	enintään 150 mg/100 g
f) lisäaineet:	ei ole
g) fosfataasikoe:	negatiivinen, toisin sanoen enintään 4 mikrogrammaa fenolia grammaa ennastettua maitoa kohden
h) liukenemattomuusindeksi:	enintään 0,5 ml (24 °C)
i) palaneiden osasten pitoisuus:	enintään 15,0 mg, eli vähintään B-levy
j) mikro-organismien pitoisuus:	enintään 40 000/g
k) koliformitutkimus:	negatiivinen 0,1 g:ssa
l) kirnupiimätutkimus:	negatiivinen
m) heratutkimus:	negatiivinen
n) maku ja haju:	puhtaat
o) ulkonäkö:	valkoinen tai hieman kellertävä väri, ei epäpuhtauksia eikä värjäytyneitä hiukkasia
p) mikrobienestoaineet:	negatiivinen (1)

2. **Tarkastusmenetelmät**

a) Sanotun kuitenkaan rajoittamatta määritysmenetelmien yhdenmukaistamisesta annettujen säännösten soveltamista jäljempänä mainitut viitemenetelmät ovat pakollisia tämän asetuksen soveltamiseksi:

— proteiinien määritys (N × 6,38):	kansainvälinen standardi FIL 20B: 1993
— rasva-aineiden määritys:	kansainvälinen standardi FIL 9C: 1987
— veden määrä:	kansainvälinen standardi FIL 26A: 1993
— happoisuuden määritys:	kansainvälinen standardi FIL 86: 1981
— laktaattien määritys:	kansainvälinen standardi FIL 69B: 1987
— fosfataasikoe:	kansainvälinen standardi ISO 3356: 1975
— liukenemattomuusindeksi:	kansainvälinen standardi FIL 129A: 1988
— palaneiden osasten pitoisuuden määritys:	ADPI Standard Methods 1990
— mikro-organismien lukumäärä:	kansainvälinen standardi FIL 100B: 1991
— koliformitutkimus:	kansainvälinen standardi FIL 73A: 1985

b) Kun on kyseessä:

— herajuoksutetutkimus:	glykomakropeptidien määritys suuren erotuskyvyn nestekromatografiaa käyttäen liitteessä V esitetyn määritysmenetelmän mukaan
— hapanheratutkimus:	jäsenvaltioiden vahvistamat kokeet
— kirnupiimätutkimus:	kirnupiimän puuttuminen voidaan varmistaa joko tuotantolaitoksessa paikan päällä ennalta ilmoittamatta suoritettavalla tarkastuksella vähintään kerran viikossa tai lopputuotteen, jossa on enintään 69,31 mg PEDP:tä 100:aa g kohden, laboratorioanalyysissä — liitteessä VI esitetyn menetelmän mukaisesti
— mikrobienestoaineet:	liitteessä VII esitetyn menetelmän mukaisesti

c) Näytteiden otto suoritetaan kansainvälisen standardin ISO 707 määräämän menetelmän mukaisesti; jäsenvaltiot voivat kuitenkin käyttää toista näytteenottomenetelmää edellyttäen, että se on edellä mainitun standardin periaatteiden mukainen.

---

(1) Rasvattoman maitojauheen valmistuksessa käytettävän raakamaidon on toteutettava direktiivin 92/46/ETY liitteessä A olevan III luvun D osassa säädetyt edellytykset.

LIITE II

PAKKAAMINEN

1. **Pakkaukset**

Pakkausten on oltava uusia, kuivia ja ehjiä, sisällön nettopainon on oltava 25 kg ja pakkaukset on valmistettava yhdellä seuraavista tavoista:

a) — 4 voimapaperisäkkiä, joiden lujuus on vähintään 70 g/m²,
— 1 tervapaperinen välisäkki, jonka lujuus on vähintään 140 g/m²,
— 1 kuumasaumattu tai kaksinkertaisesti sidottu sisäpakkaus polyeteenistä, jonka paksuus on vähintään 0,08 mm;

b) — 1 voimapaperisäkki, jonka lujuus on vähintään 70 g/m²,
— 1 polyeteenipäällysteinen voimapaperisäkki, jonka lujuus on vähintään 80 + 15 g/m²,
— 3 voimapaperisäkkiä, joiden lujuus on vähintään 70 g/m²,
— 1 kuumasaumattu tai kaksinkertaisesti sidottu sisäpakkaus polyeteenistä, jonka paksuus on vähintään 0,08 mm;

c) — 1 voimapaperinen ulkosäkki, jonka lujuus vähintään 85 g/m²,
— 1 polyeteenipäällysteinen voimapaperisäkki, jonka lujuus on vähintään 70 + 15 g/m².
— 2 voimapaperisäkkiä, joiden lujuus on vähintään 70 g/m²,
— 1 kuumasaumattu tai kaksinkertaisesti sidottu sisäpakkaus polyeteenistä, jonka paksuus on vähintään 0,12 mm;

d) — 1 puolivenyvä ulkosäkki voimapaperista, jonka lujuus on vähintään 95 g/m²,
— 1 sisäpuolelta polyeteenillä päällystetty puolivenyvä voimapaperisäkki, jonka lujuus on vähintään 95 + 15 g/m²,
— 1 puolivenyvä voimapaperisäkki, jonka lujuus on vähintään 85 g/m²,
— 1 kuumasaumattu tai kaksinkertaisesti sidottu sisäpakkaus polyeteenistä, jonka paksuus on vähintään 0,12 mm.

2. **Täyttö**

Täytön aikana säkin kerrosten on oltava hyvin yhteen puristettuja. Pakkaamattoman jauheen joutuminen eri kerrosten väliin on ehdottomasti estettävä.

3. **Testausmenettely**

Edellä 1 kohdan mukaisen pakkauksen on vastattava standardin ISO 1924-2-1985 menetelmän mukaisesti keskimäärin 420 J/m²:n vetomurtotyötä vähintään kolmikerroksiselle paperille.

LIITE III

MERKINNÄT

Pakkauksessa on oltava ainakin seuraavat merkinnät tarvittaessa koodina:

a) maininta "sumutuskuivattu rasvaton maitojauhe" yhdellä yhteisön kielellä

b) nettopaino

c) valmistuserän numero

d) hyväksymisnumero, joka yksilöi tuotantolaitoksen ja tuottajavaltion

e) valmistuspäivämäärä; jos rasvaton maitojauhe varastoidaan siiloissa, valmistuspäivä korvataan valmistusviikolla.

LIITE IV

TARJOTUN RASVATTOMAN MAITOJAUHEEN NÄYTTEENOTTO JA TUTKIMINEN

1. Pakkausten määrä, joka valitaan kartoittaen näytteenottoa varten:
   — tarjoukset, joihin sisältyy enintään 800 25 kg:n säkkiä: vähintään 8,
   — tarjoukset, joihin sisältyy yli 800 25 kg:n säkkiä: 8 + 1 vähintään jokaisen 800 säkin lisäerän osan tai kokonaisuuden osalta.
2. Näytteen paino: vähintään 200 g otetaan jokaisesta pakkauksesta.
3. Näytteiden ryhmittely: enintään 9 näytettä yhdistetään kokonaisnäytteeksi.
4. Näytteiden tutkiminen: jokaiselle kokonaisnäytteelle tehdään tutkimus, jolla on mahdollista todeta kaikki liitteessä I esitetyt laatuominaisuudet.
5. Suuntaviivat, joita seurataan näytteen ollessa puutteellinen:
   a) jos yhdistetty näyte on puutteellinen jonkin muuttujan osalta, tämän näytteen edustama määrä hylätään,
   b) jos yhdistetty näyte on puutteellinen usean muuttujan osalta, tämän näytteen edustama määrä hylätään ja lopulle tarjouksen sisältämästä määrästä, joka on peräisin samasta tehtaasta, suoritetaan toinen tutkimuksen kannalta määräävä näytteenotto; tässä tapauksessa
      — edellä 1 kohdassa tarkoitettujen näytteiden määrä kaksinkertaistuu
      — jos yhdistetty näyte on puutteellinen usean muuttujan osalta, tämän näytteen edustama määrä hylätään.

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 — Näytteenotto-menetelmät" 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 Tämän asetuksen 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: Huoneenlämpötilassa 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 astiaan, joka on siihen nähden tilavuudeltaan noin kaksinkertainen ja jossa on ilmatiivis kansi. 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 20,0 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 Standardinäytteisiin (5.4) sovelletaan täsmälleen 8.2—8.4.2 kohdassa kuvattua menettelyä.

On käytettävä juuri valmistettuja liuoksia, sillä GMP:t hajoavat 8 %:n triklooriasetaatti-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} et 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} × A_{II} [E]

S_{III} [E] = R_{III} × A_{III} [E]

S_{IV} [E] = R_{IV} × 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} [0]-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:*

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

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:aa grammaa herajuoksutetta kohti, joka on määritetty alkuperältään erilaisista muuntamattomista rasvattomista maitojauheista; tämä luku on saatu kokeellisesti,

S_{III} [0] = piikin III suhteellinen pinta-ala, joka on yhtä suuri kuin kuin R_{III} × A_{III} [0]; nämä arvot on saatu 9.1.1 ja 8.5.3 kohdasta,

(S_{III} [0] − 0,9) = suoritettava korjaus keskimääräiseen suhteelliseen pinta-alaan 1,3, kun S_{III} [0]-arvo poikkeaa 0,9:stä; kokeellisesti standardinäytteen [0] 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 tehdyn 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:aa tuotegrammaa kohti ilmaistuna, on $\leq 2{,}0 + (S_{III}\ [0] - 0{,}9)$

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),

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

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

9.4.3 Jos piikin III suhteellinen pinta-ala S_{III} [E] on $> 2{,}0 + (S_{III}\ [0] - 0{,}9)$ ja piikin II suhteellinen pinta-ala S_{II} [E] > 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 suuri, 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:

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

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

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.

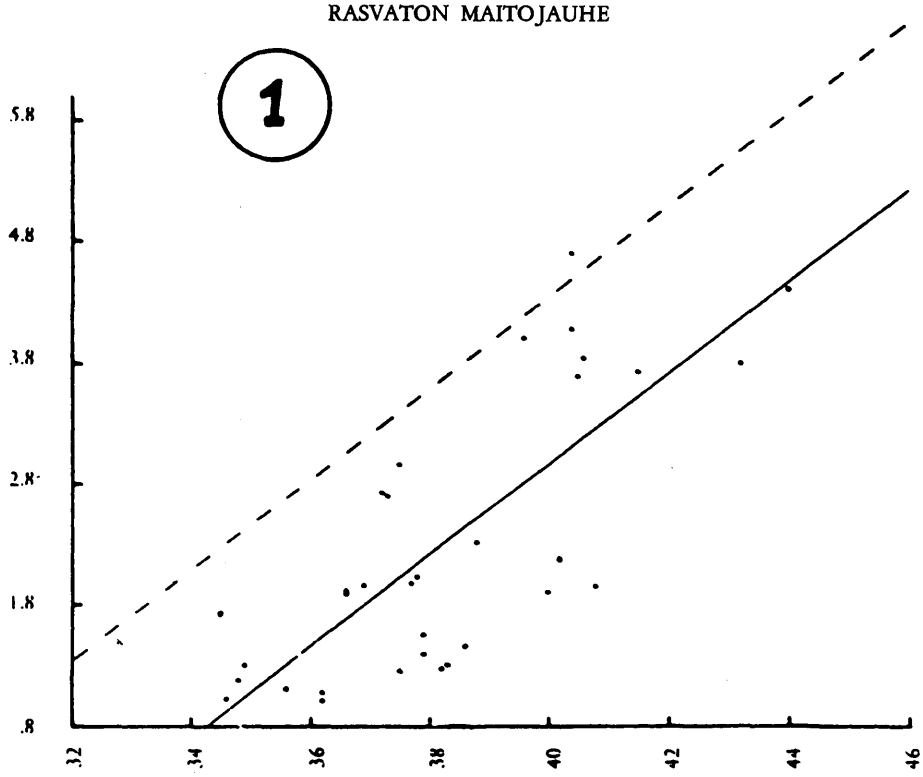
Herajuoksutteen pitoisuus lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa

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

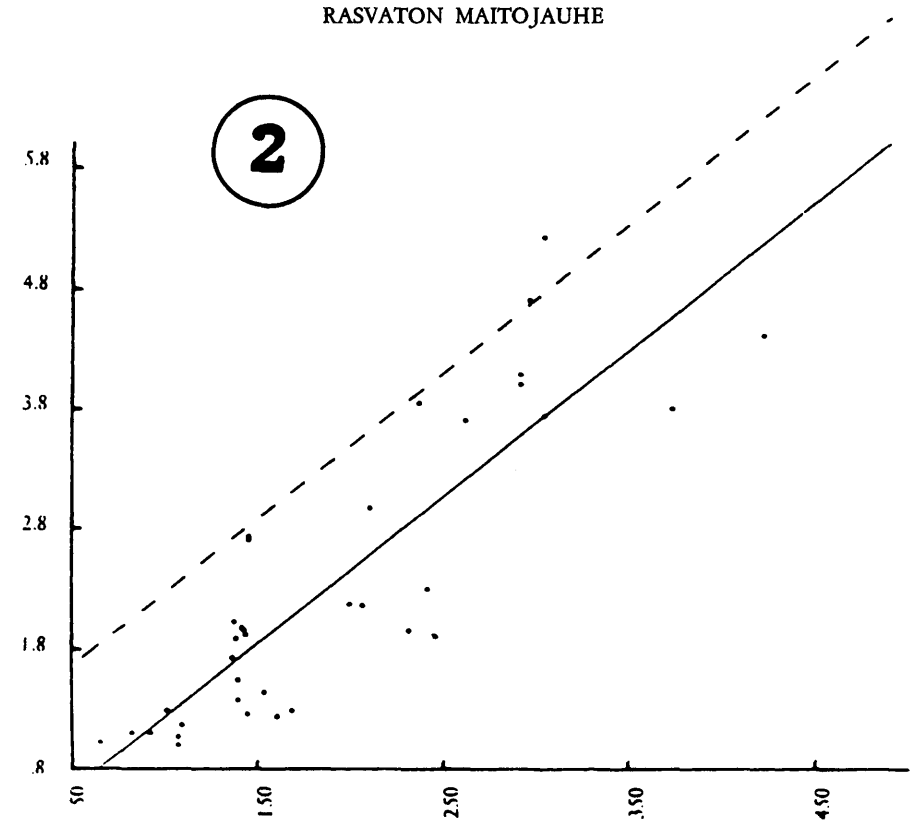
RASVATON MAITOJAUHE



Piikki III

kokonaisproteiinipitoisuus, %

RASVATON MAITOJAUHE



Piikki III

Piikki II

LIITE VI

RASVATON MAITOJAUHE: FOSFATIDYYLISERIININ JA FOSFATIDYYLIETANOLIAMIININ PITOISUUSMÄÄRITYS

KÄÄNTEISEN FAASIN HPLC-MENETELMÄ

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmässä kuvataan rasvattomassa maitojauheessa (RMJ) olevan fosfatidyyliseriinin (FS) ja fosfatidyylietanoliamiinin (FE) kvantitatiivinen määritysmenetelmä, ja sen avulla voidaan havaita RMJ:ssä esiintyvät kirnupiimän kiintoaineet.

2. Määritelmä

FS + FE-pitoisuus: massaosuus määritellystä aineesta tässä esitettyä menetelmää käyttäen. Tulos ilmaistaan milligrammoina fosfatidyylietanoliamiinidipalmitoyyliä (FEDP) 100 grammassa jauhetta.

3. Periaate

Aminofosfolipidien uuttaminen metanolilla ennastetusta maitojauheesta. FS:n ja FE:n määritys o-ftaalidialdehydi (OFA)-johdannaisina käänteisen faasin (RP) HPLC:n ja fluoresenssihavainnon avulla. Koenäytteen FS- ja FE-pitoisuuden kvantitatiivinen määritys vertaamalla standardinäytteeseen, joka sisältää tunnetun määrän FEDP:tä.

4. Reagenssit

Kaikkien reagenssien on oltava hyväksyttyä analyysilaatua. Veden on oltava tislattua vettä tai puhtaudeltaan vähintään sitä vastaavaa, ellei toisin määritellä.

4.1 *Standardiaine: FEDP, puhtaus vähintään 99 %.*

Huom.: Standardiaine on säilytettävä – 18 °C:n lämpötilassa.

4.2 *Reagenssit standardinäytteen ja koenäytteen valmistamiseksi*

4.2.1 HPLC-laatua oleva metanoli

4.2.2 HPLC-laatua oleva kloroformi

4.2.3 Tryptamiini-monohydrokloridi

4.3 *Reagenssit o-ftaalidialdehydi-johdannaisiin*

4.3.1 Natriumhydroksidi, 12 M:n vesiliuos

4.3.2 Boorihappo, 0,4 M:n vesiliuos, pH säädettynä arvoon 10 natriumhydroksidin (4.3.1) avulla

4.3.3 2-merkaptoetanoli

4.3.4 o-ftaalidialdehydi (OFA)

4.4 *HPLC-eluutioliuottimet*

Eluutioliuottimet on valmistettava HPLC-laatuisia reagensseja käyttäen

4.4.1 HPLC-laatua oleva vesi

4.4.2 Metanoli, puhtaus tutkittu fluorometrillä

4.4.3 Tetrahydrofuraani

4.4.4 Natriumdivetyfosfaatti

4.4.5 Natriumasetaatti

4.4.6 Etikkahappo

5. Välineistö

5.1 *Analyysivaaka*

5.2 *Dekantterilaseja, tilavuus 25 ja 100 ml*

5.3 *Pipettejä, annokset 1 ja 10 ml*

5.4 *Magneettisekoittaja*

5.5 *Mittapipettejä, annokset 0,2, 0,5 ja 5 ml*

5.6 *Mittapulloja, tilavuus 10, 50 ja 100 ml*

5.7 *Injektioruiskuja, tilavuus 20 ja 100 µl*

5.8 *Ultraäänikylpy*

5.9 *Sentrifugi, kiihtyvyys 27 000 × g*

5.10 *Pieniä lasipulloja, tilavuus noin 5 ml*

5.11 *Mittalasi, tilavuus 25 ml*

5.12 *pH-mittari*

5.13 *HPLC-laitteisto*

5.13.1 Gradientin pumppausjärjestelmä, joka pystyy toimimaan nopeudella 1,0 ml/min 200 bar:n paineessa

5.13.2 Automaattinen näytteenotin, joka pystyy derivoimaan

5.13.3 Kolonnin lämmitin säädettynä 30 °C:n lämpötilaan

5.13.4 Fluoresenssidetektori säädettynä heräteaallonpituudelle 330 nm ja emissioaallonpituudelle 440 nm

5.13.5 Integraattori tai tietojenkäsittelyohjelmisto, jolla pystytään mittaamaan piikkien pinta-aloja

5.13.6 Lichrosphere-100-kolonni (250 × 4,6 mm) tai vastaava kolonni, joka on pakattu oktadekyylisilaanilla (C 18), hiukkaskoko 5 µm

6. Näytteenotto

Näytteenotto tapahtuu IDF-standardin 50B.1985 mukaisesti

7. Menettely

7.1 *Sisäisen standardiliuoksen valmistus*

Punnitaan 30,0 ± 0,1 mg tryptamiini-monohydrokloridia (4.2.3) 100 ml:n mittapulloon (5.6) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1). Pipetoidaan 1 ml (5.3) tätä liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.6) ja täytetään merkkiin metanolilla (4.2.1), jotta saadaan 0,15 mM:n tryptamiinipitoisuus.

7.2 *Koenäyteliuoksen valmistus*

Punnitaan 1000 ± 0,001 g RMJ:ta 25 ml:n dekantterilasiin (5.2). Lisätään 10 ml lämpötilaltaan 40 °C tislattua vettä pipetillä (5.3) ja sekoitetaan magneettisekoittajalla (5.4) 30 minuutin ajan mahdollisten paakkujen liuottamiseksi. Pipetoidaan 0,2 ml (5.5) tätä ennastettua maitoa 10 ml:n mittapulloon (5.6), lisätään 100 µl 0,15 mM:n tryptamiiniliuosta (7.1) injektioruiskua (5.7) käyttäen ja täytetään tilavuuteensa metanolilla (4.2.1). Sekoitetaan huolellisesti käännellen ja käsitellään ultraäänellä (5.8) 15 minuutin ajan. Sentrifugoidaan (5.9) kiihtyvyydellä 27 000 × g 10 minuutin ajan ja kerätään kelluva neste pieneen lasipulloon (5.10).

Huom.: Koenäyte on säilytettävä 4 °C:n lämpötilassa, kunnes HPLC-analyysi suoritetaan.

7.3 *Ulkoisen standardiliuoksen valmistus*

Punnitaan 55,4 mg FEDP:tä (4.1) 50 ml:n mittapulloon (5.6) ja lisätään noin 25 ml kloroformia (4.2.2) mittalasia (5.11) käyttäen. Kuumennetaan suljettu pullo 50 °C:n lämpötilaan ja sekoitetaan huolellisesti, kunnes FEDP liukenee. Jäähdytetään pullo 20 °C:n lämpötilaan, täytetään tilavuuteensa metanolilla (4.2.1) ja sekoitetaan käännellen. Pipetoidaan 1 ml (5.3) tätä liuosta 100 ml:n mittapulloon (5.6) ja täytetään tilavuuteensa metanolilla (4.2.1) Pipetoidaan 1 ml (5.3) tätä liuosta 10 ml:n mittapulloon (5.6), lisätään 100 µl (5.7) 0,15 mM:n tryptamiiniliuosta (7.1) ja täytetään tilavuuteensa metanolilla (4.2.1). Sekoitetaan käännellen.

Huom.: Standardinäyteliuos on säilytettävä 4 °C:n lämpötilassa, kunnes HPLC-analyysi suoritetaan.

7.4 *Derivointireagenssin valmistus*

Punnitaan 25,0 ± 0,1 mg OFA:ta (4.3.4) 10 ml:n mittapulloon (5.6), lisätään 0,5 ml (5.5) metanolia (4.2.1) ja sekoitetaan huolellisesti OFA:n liuottamiseksi. Täytetään merkkiin boorihappoliuoksella (4.3.2) ja lisätään injektioruiskulla (5.7) 20 µl 2-merkaptoetanolia (4.3.3).

Huom.: Derivointireagenssi on säilytettävä 4 °C:n lämpötilassa pienessä tummassa pullossa, ja se pysyy stabiilina 1 viikon ajan.

7.5 *HPLC-määritys*

7.5.1 Elootioliuottimet (4.4)

Liuotin A:

0,3 mM natriumdivetyfosfaatti ja 3mM natriumasetaattiliuos (pH säädettynä etikkahapolla arvoon 6,5): metanoli:tetrahydrofuraani = 558:440:2 (v/v/v).

Liuotin B:

metanoli

7.5.2 Ehdotettu eluointigradientti:

Aika (min.)	Liuotin A (%)	Liuotin B (%)	Virtausnopeus (ml/min.)
Aloitus	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

Huom.: Eluointigradientti voi vaatia pieniä muutoksia kuvassa 1 esitetyn erotuskyvyn saamiseksi. Kolonnin lämpötila: 30 °C.

7.5.3 Injektoitava määrä: 50 µl derivointireagenssia ja 50 µl näyteliuosta.

7.5.4 Kolonnin tasapaino.

Kun järjestelmä käynnistetään päivittäin, kolonnia huuhdellaan 100 %:n liuottimella B 15 minuutin ajan, tämän jälkeen asetetaan A:B = 40:60 ja saatetaan tasapainoon nopeuden ollessa 1 ml/min 15 minuutin ajan.

Suoritetaan ajo sokeakokeeksi metanolia (4.2.1) injektoimalla.

Huom.: Ennen pitkäaikaista varastointia kolonnia huuhdellaan seoksella metanoli:kloroformi = 80:20 (v/v) 30 minuutin ajan.

7.5.5 Koenäytteen FS+FE-pitoisuuden määritys.

Suoritetaan kromatografisten analyysien sarja pitäen ajojen välinen aika vakiona vakioisten retentioaikojen saamiseksi. Ulkoista standardiliuosta (7.3) injektoidaan aina 5—10 koenäyteliuoksen välein vastatekijän arvioimiseksi.

Huom.: Kolonni on puhdistettava huuhtelemalla 100 %:n liuottimella B (7.5.1) vähintään 30 minuutin ajan aina 20—25 ajon jälkeen.

7.6 *Integrointitapa*

7.6.1 FEDP-piikki

FEDP eluoidaan yhtenä piikkinä. Määritetään piikin pinta-ala integroimalla.

7.6.2 Tryptamiinipiikki

Tryptamiini eluoidaan yhtenä piikkinä (kuva 1). Määritetään piikin pinta-ala integroimalla.

7.6.3 FS- ja FE-piikkiryhmät

Kuvatuissa olosuhteissa (kuva 1) FS eluoituu kahtena pääasiallisena, osittain erottamattomana piikkinä, jota edeltää pieni piikki. FE eluoituu kolmena pääasiallisena, osittain erottamattomana piikkinä. Määritetään jokaisen piikkiryhmän kokonaispinta-ala asettaen pohjaviiva kuvassa 1 esitetyllä tavalla.

8. **Laskeminen ja tulosten ilmaiseminen**

Koenäytteen FS- ja FE-pitoisuus lasketaan seuraavasti.

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

jossa

C: koenäytteen FS- tai FE-pitoisuus (mg/100 g jauhetta);

A_1: standardinäyteliuoksen (7.3) FEDP-piikin pinta-ala;

A_2: koenäyteliuoksen (7.2) FS- tai FE-piikin pinta-ala;

T_1: standardinäyteliuoksen (7.3) tryptamiinipiikin pinta-ala;

T_2: koenäyteliuoksen (7.2) tryptamiinipiikin pinta-ala.

9. **Luotettavuus**

Huom.: Arvot toistettavuudelle on laskettu kansainvälisen IDF-standardin (1) mukaisesti. Väliaikainen raja uusittavuudelle on laskettu "ohjeet maitoon ja maitotuotteisiin liittyvien analyyttisten tulosten tulkitsemiseksi ja aistinvaraisen arvioinnin soveltamiseksi yhteisessä markkinajärjestelyssä" (komission asiakirja VI/2721/95) mukaisesti.

9.1 *Toistettavuus*

Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama, joka ilmaisee saman työntekijän samalla laitteella samoissa olosuhteissa samasta koenäytteestä ja lyhyellä aikavälillä saatujen riippumattomien analyysitulosten vaihtelevuutta, ei saa olla yli 2 % suhteellisesti. Jos näissä olosuhteissa saadaan kaksi määritystä, näiden kahden tuloksen suhteellinen ero ei saa olla yli 6 % tulosten aritmeettisesta keskiarvosta.

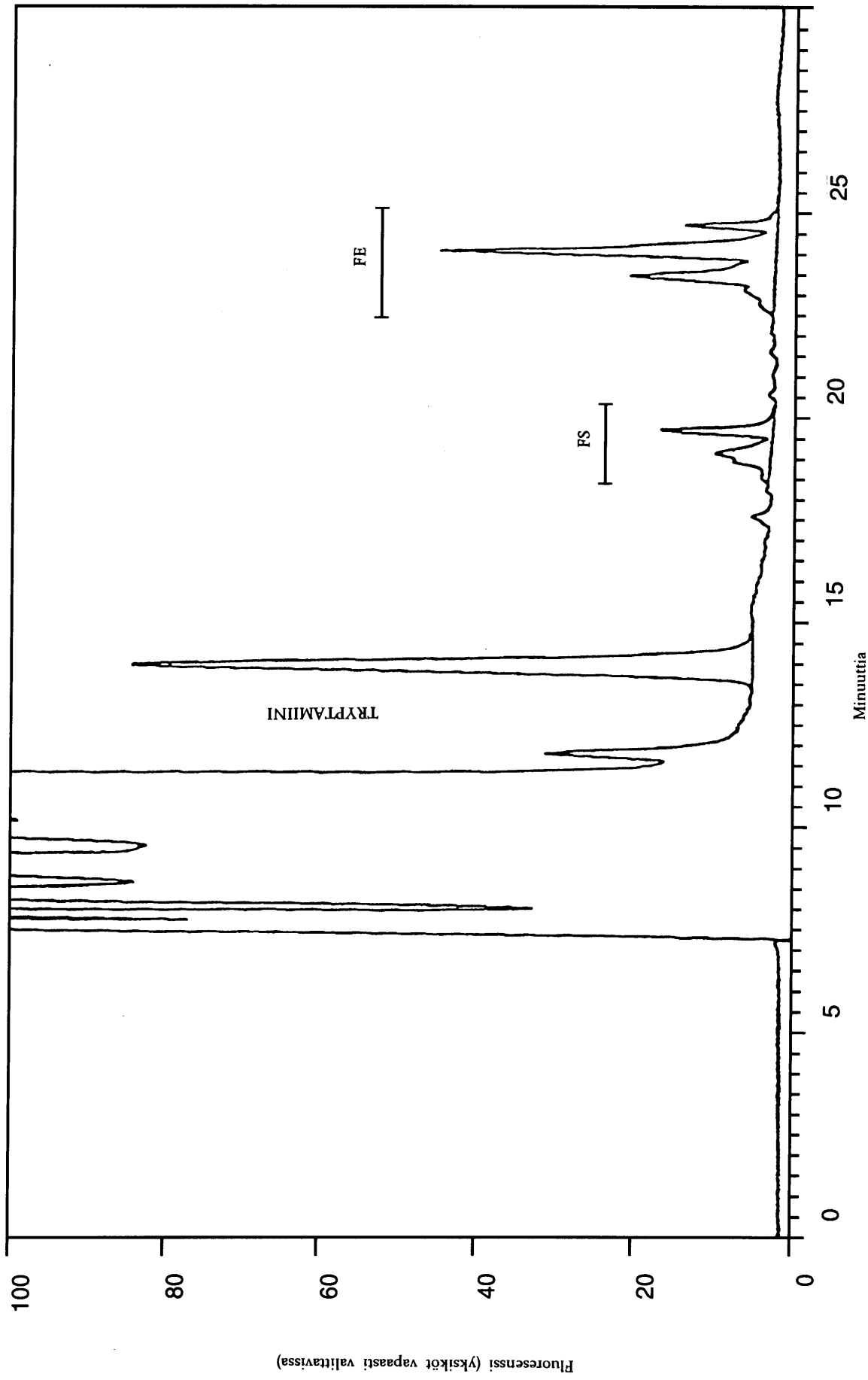
9.2 *Uusittavuus*

Jos saadaan työntekijöiden eri laboratorioissa eri laitteita käyttäen eri olosuhteissa analysoimalle samalle koenäytteelle kaksi määritystä, näiden kahden tuloksen välinen suhteellinen ero ei saa olla yli 11 % tulosten aritmeettisesta keskiarvosta.

10. **Kirjallisuus**

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

(1) Kansainvälinen IDF-standardi 135B/1991. Maito ja maitotuotteet. Tunnusmerkit analyyttisten menetelmien luotettavuudelle. Yhtenveto kollaboratiivisesta tutkimusmenettelystä.



Kuva 1: HPLC-kuvio fosfatidyyliseriinin (FS) ja fosfatidyylietanoliamiinin (FE) OFA-johdannaisista ennastetun rasvattoman maitojauheen metanoliuutteessa. Esitetään FS-, FE- ja tryptamiini- (sisäinen standardi) piikkien integrointitapa.

LIITE VII

ANTIBIOOTTI- JA SULFONAMIDI-DAPSONIJÄÄMIEN HAVAITSEMINEN RASVATTOMASSA MAITOJAUHEESSA

Käytetään mikrobi-inhibitioon perustuvaa seulontatestiä, jossa testin mikro-organismina toimiva *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 on riittävän herkkä havaitsemaan 4 µg bentsyylipenisilliiniä maitolitrassa ja 100 µg sulfadimidiiniä maitolitrassa. Kaupallisia testipakkauksia on saatavissa ja niitä voidaan käyttää, jos niillä on vaadittava herkkyys bentsyylipenisilliinille ja sulfadimidiinille (1).

Testiä varten käytetään ennastettua rasvatonta maitojauhetta (1 g jauhetta + 9 ml tislattua vettä). Testi suoritetaan kuten IDF-tiedotteen n:o 258/1991 1 osan 2 luvussa on kuvattu tai testipakkauksen valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Positiiviset tulokset tulkitaan seuraavasti:

1. Toistetaan testi lisäämällä penisillinaasia testijärjestelmään:
   — *Positiivinen tulos:* Inhiboivaa ainetta ei voida tunnistaa tällä menettelyllä.
   — *Negatiivinen tulos:* Inhiboiva aine on β-laktaamiantibiootti.
2. Toistetaan testi lisäämällä p-aminobentsoehappoa testijärjestelmään:
   — *Positiivinen tulos:* Inhiboivaa ainetta ei voida tunnistaa tällä menettelyllä.
   — *Negatiivinen tulos:* Inhiboiva aine on sulfonamidi/dapsoni.
3. Toistetaan testi lisäämällä penisillinaasia + p-aminobentsoehappoa testijärjestelmään:
   — *Positiivinen tulos:* Inhiboivaa ainetta ei voida tunnistaa tällä menettelyllä.
   — *Negatiivinen tulos:* Inhiboivat aineet ovat β-laktaamiantibiootti ja sulfonamidi/dapsoni.

(1) *Tärkeää huomata:* Kun rasvatonta maitojauhetta analysoidaan, voidaan saada vääriä positiivisia tuloksia. Siksi on tärkeää varmistaa, että käytetty testijärjestelmä ei anna vääriä positiivisia tuloksia.