VERORDNUNG (EG) Nr. 322/96 DER KOMMISSION

vom 22. Februar 1996

über die Durchführungsbestimmungen für die öffentliche Lagerhaltung von Magermilchpulver

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

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 (EG) Nr. 2931/95 der Kommission [2], insbesondere auf Artikel 7 Absatz 5 und Artikel 28,

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. 3577/90 [4], wird mit Wirkung vom 1. März 1996 durch die Verordnung (EG) Nr. 1538/95 des Rates [5] aufgehoben. Daher sollten die Bestimmungen, die nicht in die Verordnung (EWG) Nr. 804/68 haben aufgenommen werden können, in die Durchführungsvorschriften für die öffentliche Lagerhaltung von Magermilchpulver gemäß der Verordnung (EG) Nr. 625/78 der Kommission [6], zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1802/95 [7], aufgenommen werden. Aufgrund der Bedeutung der geplanten Anpassungen der genannten Verordnung und der Vielzahl der bereits daran vorgenommenen Änderungen empfiehlt es sich, der Klarheit und Transparenz halber eine Neufassung vorzunehmen. Daher sollte die Verordnung (EWG) Nr. 625/78 aufgehoben werden.

Interventionsfähig ist nur Magermilchpulver mit einem bestimmten Mindesteiweißgehalt. Außerdem kann der Ankaufspreis je nach Eiweißgehalt schwanken. Es ist das zur Feststellung dieses Gehalts anzuwendende Analyseverfahren sowie das Verfahren zur Berechnung des Ankaufspreises festzulegen.

Um sicherzustellen, daß für angekauftes Magermilchpulver keine Zahlungen geleistet werden, auf die kein Anspruch besteht, ist klarzustellen, daß vor Bezahlung die Erfüllung sämtlicher Bedingungen überprüft und der Eiweißgehalt festgestellt wird.

Es wurde ein Referenzverfahren zur Feststellung von Buttermilch ausgearbeitet. Um eine einheitliche Anwendung der Kontrollmaßnahmen zu gewährleisten, ist für die Kontrolle des von den Interventionsstellen angekauften Magermilchpulvers auf dieses Analyseverfahren zurückzugreifen.

In der Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992 mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis [8], zuletzt geändert durch die Richtlinie 94/71/EG [9], ist vorgesehen, daß Milch, deren Gehalt an antimikrobiellen Stoffen über dem zulässigen Wert gemäß der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates [10], zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 282/96 [11], liegt, nicht für den menschlichen Verzehr verwendet werden darf. Es empfiehlt sich, das von den Interventionsdienststellen angekaufte Magermilchpulver auf das Vorhandensein antimikrobieller Stoffe zu kontrollieren, die in der Praxis häufig eingesetzt werden. Zu diesem Zweck ist ein Kontrollverfahren vorzusehen.

Im übrigen haben sich die Bestimmungen über die öffentliche Lagerhaltung von Magermilchpulver bewährt und können folglich, abgesehen von einigen technischen Anpassungen, beibehalten werden.

Die maßgeblichen Tatbestände für den landwirtschaftlichen Umrechnungskurs, der im Zusammenhang mit der Regelung über die öffentliche Lagerhaltung anzuwenden ist, sind in der Verordnung (EWG) Nr. 1756/93 der Kommission [12], zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 693/95 [13], festgelegt.

Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Milch und Milcherzeugnisse —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

(1) Die Interventionsstellen kaufen nur solches Magermilchpulver an, das der Begriffsbestimmung des Artikels 7 Absatz 1 der Verordnung (EWG) Nr. 804/68 und den Qualitätsanforderungen des Anhangs I entspricht und folgende Bedingungen erfüllt:

a) Die Qualitätskontrolle wurde mit Hilfe der Analyseverfahren gemäß den Anhängen I, V, VI und VII mit den gemäß Anhang IV entnommenen Proben durchgeführt;

[1] ABl. Nr. L 148 vom 28. 6. 1968, S. 13.
[2] ABl. Nr. L 307 vom 20. 12. 1995, S. 10.
[3] ABl. Nr. L 173 vom 22. 7. 1968, S. 4.
[4] ABl. Nr. L 353 vom 17. 12. 1990, S. 23.
[5] ABl. Nr. L 148 vom 30. 6. 1995, S. 17.
[6] ABl. Nr. L 84 vom 31. 3. 1978, S. 19.
[7] ABl. Nr. L 174 vom 26. 7. 1995, S. 27.
[8] ABl. Nr. L 268 vom 14. 1. 1992, S. 1.
[9] ABl. Nr. L 368 vom 31. 12. 1994, S. 33.
[10] ABl. Nr. L 224 vom 18. 8. 1990, S. 1.
[11] ABl. Nr. L 37 vom 15. 2. 1996, S. 9.
[12] ABl. Nr. L 161 vom 2. 7. 1993, S. 48.
[13] ABl. Nr. L 71 vom 31. 3. 1995, S. 52.

b) es entspricht in Qualität, Verpackung und Kennzeichnung den in den Anhängen II und III aufgeführten Bedingungen;

c) es enthält keine anderen Erzeugnisse, namentlich keine Buttermilch oder Molke;

d) es wurde innerhalb eines Monats vor dem Tag des Eingangs des Verkaufsangebots bei der Interventionsstelle bzw. in dem in Anhang III Buchstabe e) zweiter Satz genannten Fall innerhalb von vier Wochen vor der Woche, in der das Angebot eingegangen ist, hergestellt;

e) es überschreitet nicht die nach der Gemeinschaftsregelung anwendbaren zulässigen Radioaktivitätswerte.

Die Höchstwerte sind die mit Artikel 3 der Verordnung (EWG) Nr. 737/90 des Rates (1) festgesetzten Werte. Das Ausmaß der radioaktiven Kontamination des Erzeugnisses wird nur kontrolliert, wenn dies nach der Sachlage notwendig ist, und nur in dem erforderlichen Zeitraum. Erforderlichenfalls werden Dauer und Umfang der Kontrollmaßnahmen nach dem Verfahren des Artikels 30 der Verordnung (EWG) Nr. 804/68 bestimmt.

(2) Im Sinne dieser Verordnung ist

a) „Buttermilch" das Nebenerzeugnis der Butterherstellung, das nach dem Ausbuttern des Rahms und Abtrennen der festen Fettphase gewonnen worden ist;

b) „Molke" das unter Verwendung von Säuren, Lab und/oder chemisch-physikalischen Verfahren bei der Käse- und Kaseinherstellung gewonnene Erzeugnis.

(3) Die Mindestangebotsmenge beträgt 20 Tonnen. Die Mitgliedstaaten können die Mindestmenge erhöhen und/oder vorsehen, daß nur Mengen von ganzen Tonnen Magermilchpulver angeboten werden.

(4) Die Interventionsstelle registriert den Tag des Eingangs des Verkaufsangebots, die entsprechenden Mengen und Herstellungsdaten sowie den Ort, an dem das Magermilchpulver auf Lager gehalten wird.

(5) Verkaufsangebote sind nur gültig, wenn der Nachweis erbracht wird, daß der Bieter eine Sicherheit in Höhe von 12 ECU je angebotene Tonne Magermilchpulver geleistet hat.

Im Rahmen dieser Verordnung sind die Aufrechterhaltung des Angebots und die Lieferung des Magermilchpulvers an das von der Interventionsstelle bezeichnete Lagerhaus die wichtigsten Anforderungen, deren Erfüllung durch diese Sicherheit gewährleistet wird. Stellt sich bei der Kontrolle gemäß Absatz 1 Buchstabe a) heraus, daß das Magermilchpulver nicht den Anforderungen von Absatz 1 entspricht, so wird die Sicherheit jedoch für die noch nicht gelieferten Mengen freigegeben.

Die Sicherheit ist in dem Mitgliedstaat zu leisten, in dem das Angebot gemacht wird.

Artikel 2

(1) Ein Betrieb gemäß Artikel 7 Absatz 1 der Verordnung (EWG) Nr. 804/68 wird nur zugelassen, wenn er:

a) auch gemäß Artikel 10 der Richtlinie 92/46/EWG des Rates zugelassen ist und über geeignete technische Einrichtungen verfügt;

b) sich verpflichtet, die von der zuständigen Stelle des betreffenden Mitgliedstaats bestimmten Wareneinund -ausgangsbücher fortlaufend zu führen, in denen die behandelten Magermilch-, Buttermilch- und Molkemengen, die Art der Hitzebehandlung der Magermilch, die gewonnenen Erzeugnisse, die Verpakkung, die Kennzeichnung und das Datum des Verlassens jeder Partie Magermilchpulver, Buttermilchpulver und Molkepulver vermerkt sind;

c) sich einverstanden erklärt hat, das Magermilchpulver, das zur Intervention angeboten werden soll, einer amtlichen Sonderkontrolle zu unterwerfen;

d) sich verpflichtet, die für die Kontrolle zuständige Stelle mindestens zwei Arbeitstage im voraus von seiner Absicht zu unterrichten, Magermilchpulver für die öffentliche Intervention zu erzeugen. Der Mitgliedstaat kann allerdings einen kürzeren Zeitraum dafür vorschreiben.

(2) Die zuständigen Stellen vergewissern sich der Befolgung der Vorschriften dieser Verordnung durch unangemeldete Kontrollen vor Ort entsprechend dem Herstellungsprogramm für zur öffentlichen Intervention vorgesehenes Magermilchpulver der betreffenden Herstellungsbetriebe.

Diese Kontrollen umfassen mindestens

— eine Kontrolle je Zeitraum von 28 Tagen der Produktion für die Intervention und mindestens einmal je Halbjahr eine Kontrolle der Anforderungen gemäß Absatz 1 Buchstabe b);

— eine Kontrolle je Halbjahr zur Prüfung der Erfüllung der Zulassungsbedingungen gemäß Absatz 1.

(3) Werden die Voraussetzungen gemäß Absatz 1 nicht erfüllt, wird die Zulassung entzogen. Auf Antrag des betreffenden Betriebes und nach eingehender Kontrolle kann nach einer Mindestfrist von sechs Monaten eine Wiederzulassung erfolgen.

Erweist sich, daß ein Betrieb eine seiner Pflichten gemäß Absatz 1 Buchstaben b), c) und d) nicht erfüllt hat, so wird, außer im Fall höherer Gewalt, die Zulassung für einen Zeitraum von einem bis zwölf Monaten, je nach Schwere der Unregelmäßigkeit, ausgesetzt.

Der Mitgliedstaat kann jedoch davon absehen, wenn erwiesen ist, daß die Unregelmäßigkeit nicht mutwillig oder grob fahrlässig begangen wurde und die Behinderung der Kontrollen gemäß Absatz 2 geringfügig war.

(1) ABl. Nr. L 82 vom 29. 3. 1990, S. 1.

(4) Die Kontrollen gemäß den Absätzen 2 und 3 sind Gegenstand eines Berichts, der Aufschluß gibt über

— den Zeitpunkt der Kontrolle,

— die Dauer der Kontrolle,

— durchgeführte Prüfungsmaßnahmen.

Der Kontrollbericht ist vom zuständigen Bediensteten zu unterschreiben.

(5) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission die hinsichtlich der Kontrollen gemäß den Absätzen 2 und 3 getroffenen Anweisungen innerhalb eines Monats nach ihrem Erlaß mit.

Artikel 3

Die Stelle, die die Kontrolle über die Einhaltung des Artikels 1 Absatz 1 durchführt, zeichnet unter genauer Angabe aller in Absatz 1 des Anhangs I aufgeführten Erzeugnismerkmale die Analysenergebnisse jeder angebotenen Warenpartie auf, die später Gegenstand einer besonderen im Handel zwischen den Mitgliedstaaten oder im Fall der Ausfuhr auf Antrag ausgestellten Bescheinigung sein können.

Artikel 4

(1) Nach Prüfung der Angebotsangaben stellt die Interventionsstelle unverzüglich einen datierten, numerierten Lieferschein aus, der folgende Angaben enthält:

a) Liefermenge,

b) Lieferfrist für das Magermilchpulver,

c) anzuliefernde Lager.

(2) Das Magermilchpulver muß innerhalb von 28 Tagen nach dem Tag des Eingangs des Verkaufsangebots gemäß Artikel 1 Absatz 1 Buchstabe d) geliefert werden. Die Lieferung kann in Teilmengen erfolgen.

(3) Im Sinne dieser Verordnung erfolgt die Übernahme des Magermilchpulvers durch die Interventionsstelle am Tag des Eingangs des Magermilchpulvers im Lager, frühestens jedoch am Tag nach der Ausstellung des in Absatz 1 genannten Lieferscheins.

(4) Die Zahlung des von der Interventionsstelle angekauften Magermilchpulvers erfolgt zwischen dem 120. und 140. Tag nach der Übernahme des Magermilchpulvers, wenn überprüft wurde, daß die Anforderungen gemäß Artikel 1 erfüllt sind.

(5) Der Ankaufspreis von Magermilchpulver wird wie folgt berechnet:

— wenn der nach dem Verfahren gemäß Anhang I festgestellte, auf die fettfreie Trockenmasse bezogene Eiweißgehalt mindestens 35,6 % beträgt, entspricht der Ankaufspreis dem Interventionspreis;

— wenn dieser Gehalt mindestens 31,4 %, aber weniger als 35,6 % beträgt, entspricht der Ankaufspreis dem Interventionspreis abzüglich eines wie folgt berechneten Betrages: Interventionspreis × [(0,356 − Eiweißgehalt) × 1,75].

(6) Stellt sich bei der Kontrolle heraus, daß das Magermilchpulver nicht den Vorschriften des Artikels 1 Absatz 1 entspricht, so verpflichtet sich der Verkäufer mit seinem Angebot:

— die betreffende Ware zurückzunehmen,

— die Lagerkosten für die betreffenden Mengen ab dem Tag der Übernahme bis zum Zeitpunkt der Auslagerung zu erstatten.

Diese Lagerkosten werden pauschal je Tonne wie folgt festgesetzt:

a) 21 ECU für die Fixkosten,

b) 0,10 ECU je Lagertag für die Lagerungskosten.

Die Beträge werden dem Europäischen Ausrichtungs- und Garantiefonds für die Landwirtschaft (EAGFL), Abteilung Garantie, gutgeschrieben.

Artikel 5

(1) Die in Artikel 7 Absatz 1 vierter Unterabsatz der Verordnung (EWG) Nr. 804/68 genannten Lagerhäuser haben folgende Bedingungen zu erfüllen:

a) Sie müssen trocken, gut erhalten und frei von Ungeziefer sein;

b) sie dürfen keine fremden Gerüche nachweisen;

c) sie müssen eine gute Belüftung ermöglichen und

d) genügend Lagerraum besitzen und diesem Raum entsprechende Einrichtungen aufweisen.

Die mit der Lagerung des Magermilchpulvers verbundenen Risiken werden durch eine Versicherung in Form einer vertraglichen Verpflichtung der Lagerhalter oder einer Globalversicherung der Interventionsstelle abgedeckt; der Mitgliedstaat kann auch sein eigener Versicherer sein.

(2) Die Interventionsstellen schreiben vor, daß das Magermilchpulver so auf Paletten eingelagert und gelagert wird, daß es leicht identifizierbare und zugängliche Partien bildet.

(3) Die für die Kontrolle zuständige Stelle kontrolliert das Vorhandensein der Erzeugnisse im Lager gemäß Artikel 4 der Verordnung (EWG) Nr. 618/90 der Kommission (1).

Artikel 6

(1) Die Interventionsstelle wählt das dem Lagerort des Magermilchpulvers nächstgelegene verfügbare Lagerhaus.

(1) ABl. Nr. L 67 vom 15. 3. 1990, S. 21.

Sofern die Wahl eines anderen Kühlhauses keine zusätzlichen Lagerkosten zur Folge hat, kann die Interventionsstelle wählen:

a) ein anderes Kühlhaus innerhalb des in Absatz 2 genannten Umkreises;

b) ein außerhalb dieses Umkreises gelegenes Lager, wenn dieses bei Berücksichtigung der Lager- und Transportkosten kostengünstiger ist; in diesem Fall teilt die Interventionsstelle der Kommission ihre Wahl unverzüglich mit.

(2) Der in Artikel 7 Absatz 1 Unterabsatz 3 der Verordnung (EWG) Nr. 804/68 genannte Umkreis beträgt höchstens 350 km. Außerhalb dieses Umkreises werden die von der Interventionsstelle zu tragenden zusätzlichen Kosten für den Transport auf 0,05 ECU je Tonne und Kilometer festgesetzt.

Gehört die ankaufende Interventionsstelle jedoch zu einem anderen Mitgliedstaat als demjenigen, in dessen Hoheitsgebiet das Magermilchpulver gelagert ist, so bleibt bei der Berechnung des Umkreises gemäß vorstehendem Absatz die Entfernung zwischen dem Lager des Verkäufers und der Grenze des Mitgliedstaats, zu dem die ankaufende Interventionsstelle gehört, unberücksichtigt.

Artikel 7

Wird bei der Auslagerung das Magermilchpulver ab Lagerhaus geliefert, so stellt es die Interventionsstelle wie folgt bereit:

— handelt es sich um einen Lastwagen oder Eisenbahnwaggon, an der Lagerhausrampe auf das Transportmittel verladen, jedoch ohne Transportsicherung;

— handelt es sich um ein anderes Transportmittel, vornehmlich um einen Container, am Ausgang des Lagerhauses.

Etwaige Kosten für das Stauen und Entpalettieren gehen zu Lasten des Magermilchpulverkäufers. Diese Kosten werden pauschal vom Mitgliedstaat festgesetzt, der jeden Beteiligten auf Anfrage hierüber unterrichtet.

Artikel 8

Die Verordnung (EWG) Nr. 625/78 wird aufgehoben.

Hinweise auf die Verordnung (EWG) Nr. 625/78 gelten als Hinweise auf die vorliegende Verordnung.

Artikel 9

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

Sie gilt ab 1. März 1996.

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

Brüssel, den 22. Februar 1996

Für die Kommission

Franz FISCHLER

Mitglied der Kommission

ANHANG I

QUALITÄT DES MAGERMILCHPULVERS

1. **Merkmale:**

a) Eiweißgehalt:	mindestens 31,4 %, bezogen auf die fettfreie Trockenmasse
b) Gehalt an Milchfett:	höchstens 1,00 %
c) Gehalt an Wasser:	höchstens 3,5 %
d) titrierbarer Säuregehalt, in ml dezinormaler Natriumhydroxidlösung ausgedrückt:	höchstens 19,5 ml
e) Laktatgehalt:	höchstens 150 mg/100 g
f) Zusatzstoffe:	keine
g) Phosphataseprobe:	Nachweis negativ, d. h. 4 Mikrogramm Phenol je Gramm rekonstituierte Milch
h) Unlöslichkeit:	höchstens 0,5 ml (24 °C)
i) Gehalt an verbrannten Teilchen:	höchstens 15,0 mg, d. h. mindestens Musterscheibe B
j) Gehalt an Mikroorganismen:	höchstens 40 000 je g
k) Nachweis der coliformen Bakterien:	in 0,1 g negativ
l) Buttermilchnachweis:	negativ
m) Molkenachweis:	negativ
n) Geschmack und Geruch:	einwandfrei
o) Aussehen:	weiß oder leicht gelblich, ohne Verunreinigung oder farbige Teilchen
p) antimikrobielle Stoffe:	negativ (1)

2. **Kontrollverfahren:**

a) Unbeschadet der Bestimmungen über die Angleichung der Analyseverfahren sind für die Anwendung dieser Verordnung die unten genannten Referenzverfahren verbindlich:

— Eiweißgehalt (N × 6,38):	Internationale Norm FIL 20B: 1993
— Fettgehalt:	Internationale Norm FIL 9C: 1987
— Wassergehalt:	Internationale Norm FIL 26A: 1993
— Säuregehalt:	Internationale Norm FIL 86: 1981
— Laktatgehalt:	Internationale Norm FIL 69B: 1987
— Phosphataseprobe:	Internationale ISO-Norm 3356: 1975
— Unlöslichkeit:	Internationale Norm FIL 129A: 1988
— Bestimmung des Gehalts an verbrannten Teilchen:	ADPI Standard Methods 1990
— Bestimmung der Mikroorganismen:	Internationale Norm FIL 100B: 1991
— Nachweis der coliformen Bakterien:	Internationale Norm FIL 73A: 1985.

b) Nachweis von:

— Labmolke:	Bestimmung der Glykomakropeptiden mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach dem Analyseverfahren des Anhangs V
— Sauermolke:	von den Mitgliedstaaten festgelegte Verfahren
— Buttermilch:	das Fehlen von Buttermilch kann entweder durch eine mindestens einmal wöchentlich durchzuführende unangemeldete Betriebskontrolle an Ort und Stelle oder durch Laboranalysen des Enderzeugnisses nach dem Verfahren des Anhangs VI festgestellt werden, wobei sich ein Höchstwert von 69,31 mg PEDP/100 g ergeben darf
— antimikrobiellen Stoffen:	nach dem Verfahren des Anhangs VII.

c) Die Probenahme erfolgt 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 entspricht.

---

(1) Die für die Herstellung von Magermilchpulver verwendete Rohmilch muß den Anforderungen gemäß Anhang A, Kapitel III Teil D, der Richtlinie 92/46/EWG genügen.

ANHANG II

VERPACKUNG

1. **Verpackung**

Die Verpackung muß neu, sauber, trocken und unversehrt sein; sie ist für ein Eigengewicht von 25 kg bestimmt und entspricht einer der folgenden Ausführungen:

a) — 4 Kraftpapiersäcke mit einer Papierstärke von mindestens 70 g je m^2,
   — 1 bituminierter Papiersack als Zwischenlage mit einer Papierstärke von mindestens 140 g je m^2,
   — 1 Polyäthylen-Innenbeutel, mindestens 0,08 mm dick, verschweißt oder zweifach gebunden;

b) — 1 Kraftpapiersack mit einer Papierstärke von mindestens 70 g je m^2,
   — 1 Kraftpapiersack mit Polyäthylen-Schicht mit einer Stärke von mindestens 80 g + 15 g je m^2,
   — 3 Kraftpapiersäcke mit einer Stärke von mindestens 70 g je m^2,
   — 1 Polyäthylen-Innenbeutel, mindestens 0,08 mm dick, verschweißt oder zweifach gebunden;

c) — 1 Außenbeutel aus Kraftpapier mit einer Stärke von mindestens 85 g je m^2,
   — 1 Kraftpapiersack mit Polyäthylen-Schicht mit einer Stärke von mindestens 70 g + 15 g je m^2,
   — 2 Kraftpapiersäcke mit einer Stärke von mindestens 70 g je m^2,
   — 1 Polyäthylen-Innenbeutel, mindestens 0,12 mm dick, verschweißt oder zweifach gebunden;

d) — 1 Außenbeutel aus dehnbarem Kraftsackpapier mit einer Stärke von mindestens 95 g je m^2,
   — 1 Sack aus dehnbarem Kraftsackpapier mit einer Polyäthylen-Innenschicht mit einer Stärke von mindestens 95 g + 15 g je m^2,
   — 1 Sack aus dehnbarem Kraftsackpapier mit einer Stärke von mindestens 85 g je m^2,
   — 1 Polyäthylen-Innenbeutel, mindestens 0,12 mm dick, verschweißt oder zweifach gebunden.

2. **Füllen**

Beim Füllen ist auf gutes Einsacken zu achten. Das Eindringen von losem Pulver zwischen die einzelnen Säcke ist unbedingt zu verhindern.

3. **Prüfungsverfahren**

Die Verpackung gemäß Ziffer 1 entspricht einem Arbeitsaufnahmevermögen von 420 Joule/m^2 für mindestens drei Papierschichten, gemessen nach Methode ISO 1924-2-1985.

ANHANG III

KENNZEICHNUNG

Die Verpackung trägt mindestens folgende, gegebenenfalls verschlüsselte Angaben:

a) Beschriftung in einer der Gemeinschaftssprachen mit der Angabe „Spray-Magermilchpulver",

b) Eigengewichtsangabe,

c) Nummer der Herstellungspartie,

d) Zulassungsnummer, mit der sich der Betrieb des Mitgliedstaates der Herstellung feststellen läßt,

e) Herstellungsdatum. Lagert das Magermilchpulver in Silos, so wird das Herstellungsdatum durch die Herstellungswoche ersetzt.

ANHANG IV

PROBENAHME VON ZUR INTERVENTION ANGEBOTENEM MAGERMILCHPULVER MIT ANALYSE DER PROBEN

1. Anzahl der mit jeder Stichprobe zu erfassenden Verpackungen:
   — Angebote für bis zu 800 Säcke zu je 25 kg: mindestens 8,
   — Angebote für mehr als 800 Säcke zu je 25 kg: mindestens 8 + 1 für jeweils 800 Säcke oder weniger.
2. Probengewicht: je Verpackung mindestens 200 g.
3. Probengruppen: eine Gesamtprobe besteht aus höchstens 9 Einzelproben.
4. Probenanalyse: jede Gesamtprobe wird einer Analyse unterzogen, mit der sich alle Qualitätsmerkmale gemäß Anhang I überprüfen lassen.
5. Leitlinien für den Fall der Beanstandung von Proben:
   a) Bei der Analyse von Sammelproben ist im Fall einer beanstandeten Probe die Menge, für die die Sammelprobe jeweils repräsentativ ist, aus der angebotenen Menge zurückzuweisen.
   b) Bei der Analyse von Sammelproben ist im Fall mehrerer beanstandeter Proben die Menge, für die die Sammelprobe jeweils repräsentativ ist, zurückzuweisen, und der Rest der Angebotsmengen aus demselben Betrieb ist einer zweiten Stichprobenahme zu unterziehen, die den Ausschlag für die Analyse gibt. In diesem Fall
      — ist die Zahl der unter Ziffer 1 genannten Proben zu verdoppeln,
      — ist bei der Analyse von Sammelproben im Fall einer beanstandeten Probe oder mehrerer beanstandeter Proben die Menge, für die die Sammelprobe jeweils repräsentativ ist, aus der angebotenen Menge zu entfernen.

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 (Cl_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 Phosphorsäure- 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 Porendurchmessser 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 vorliegenden Verordnung 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 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]:

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

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} [S]	die Retentionszeit für Peak III der Standardprobe [S], 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 pro 100 g Labmolke, 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] ≤ 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.

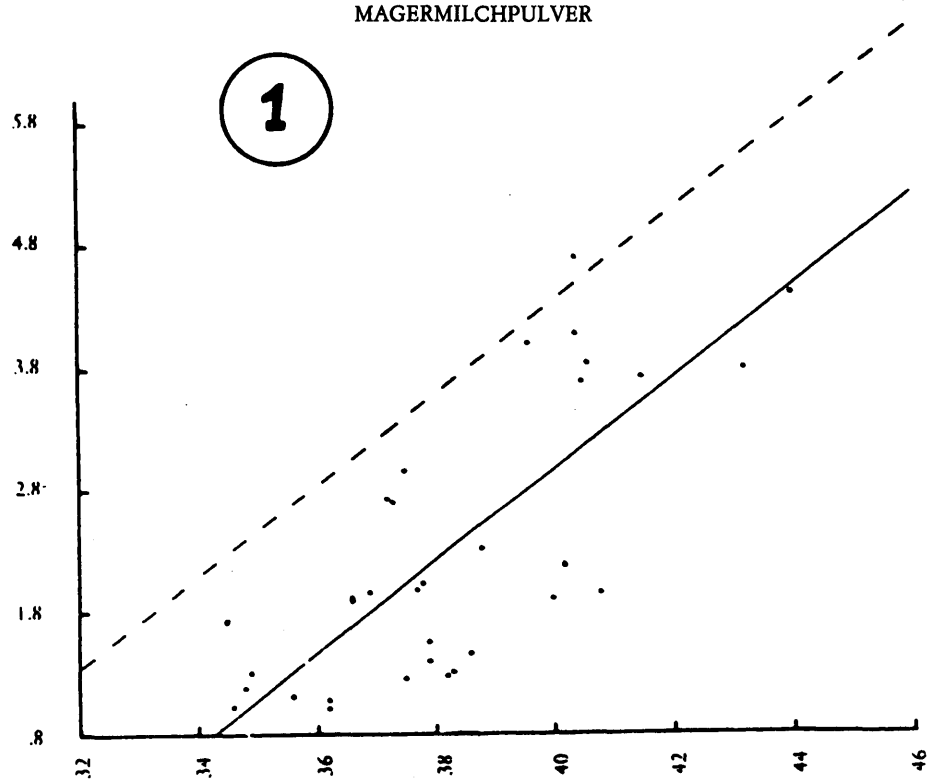
Der Gehalt an Labmolke wird nach der folgenden Formel errechnet:

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

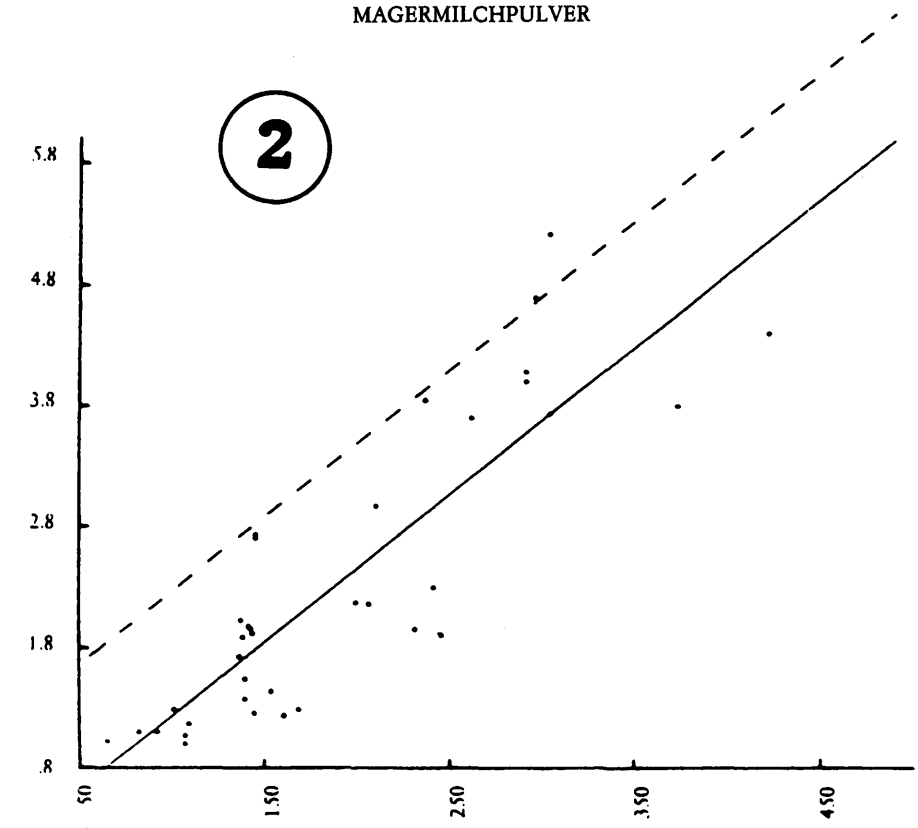
wobei

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

MAGERMILCHPULVER



MAGERMILCHPULVER



ANHANG VI

MAGERMILCHPULVER: BESTIMMUNG DES GEHALTS AN PHOSPHATIDYLSERIN UND PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN

UMKEHRPHASEN-HPLC-METHODE

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) in Magermilchpulver (SMP) und ist auch für den Nachweis von Buttermilch-Feststoffen in Magermilchpulver geeignet.

2. Definition

Gehalt an PS + PE: Die Massenfraktion der mit dieser Methode festgestellten Substanz. Das Ergebnis wird in Milligramm Phosphatidylethanolamin-Dipalmitoyl (PEDP) je 100 g Pulver ausgedrückt.

3. Prinzip

Extraktion von Aminophospholipiden aus dem rekonstituierten Milchpulver mit Hilfe von Methanol. Bestimmung von PS und PE als o-Phthaldialdehyd (OPA)-Derivat durch Umkehrphasen(RP)-HPLC und Fluoreszenzdetektion. Quantifizierung des PS- und PE-Gehalts in der Testprobe anhand einer Referenzstandardprobe mit einem bekannten PEDP-Gehalt.

4. Reagenzien

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Wasser muß destilliert oder von mindestens gleicher Reinheit sein, sofern nichts anderes angegeben ist.

4.1. *Standardmaterial: PEDP, Reinheit mindestens 99 %*

Anmerkung: Das Standardmaterial ist bei − 18 °C zu lagern.

4.2. *Reagenzien zur Vorbereitung der Standard- und der Testproben*

4.2.1. Methanol für HPLC

4.2.2. Chloroform für die HPLC

4.2.3. Tryptamin-monohydrochlorid

4.3. *Reagenzien für die Derivatisierung des o-Phthaldialdehyds*

4.3.1. Natriumhydroxid, 12 M wäßrige Lösung

4.3.2. Borsäure, 0,4 M wäßrige Lösung, mit Natriumhydroxyd (4.3.1) auf pH 10,0 eingestellt

4.3.3. 2-Mercaptoethanol

4.3.4. o-Phthaldialdehyd (OPA)

4.4. *HPLC-Elutionsmittel*

Die Elutionsmittel müssen mit HPLC-reinen Reagenzien zubereitet werden.

4.4.1. Wasser für die HPLC

4.4.2. Methanol für die fluorimetrische Messung

4.4.3. Tetrahydrofuran

4.4.4. Natriumdihydrogenphosphat

4.4.5. Natriumacetat

4.4.6. Essigsäure

5. Geräte

5.1. *Analysenwaage*

5.2. *Bechergläser, 25 und 100 ml*

5.3. *Pipetten, 1 und 10 ml*

5.4. *Magnetrührer*

5.5. *Meßpipetten, 0,2, 0,5 und 5 ml*

5.6. *Meßkolben, 10, 50 und 100 ml*

5.7. *Spritzen, 20 und 100 µl*

5.8. *Ultraschallbad*

5.9. *Zentrifuge mit 27 000 × g*

5.10 *Glasfläschchen, rund 5 ml*

5.11. *Meßzylinder, 25 ml*

5.12. *pH-Meter*

5.13. *HPLC-Ausrüstung*

5.13.1. Gradientenpumpe für 1,0 ml/min bei 200 bar

5.13.2. Automatischer Probengeber mit Derivatisierungsmöglichkeit

5.13.3. Säulenofen, auf 30 °C eingestellt

5.13.4. Fluoreszenzdetektor mit 330 nm Anregungs- und 440 nm Emissionswellenlänge

5.13.5. Integrator oder Datenverarbeitungs-Software für Peakflächenmessungen

5.13.6. Lichrosphere-100-Säule (250 × 4,6 mm) oder äquivalente mit Octadecylsilan (C18) gepackte Säule, Partikelgröße 5 µm

6. Probenahme

Die Probenahme ist nach dem IDF-Standard 50B.1985 durchzuführen.

7. Verfahren

7.1. *Zubereitung des internen Standards*

Es werden 30,0 mg (± 0,1 mg) Tryptamin-monohydrochlorid (4.2.3) in einen 100-ml-Meßkolben (5.6) eingewogen und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt. Von dieser Lösung wird 1 ml in einen 10-ml-Meßkolben (5.6) einpipettiert (5.3) und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt, um eine Tryptaminkonzentration von 0,15 mM zu erhalten.

7.2. *Zubereitung der Testprobenlösung*

Es werden 1 000 g (± 0,001 g) der SNP-Probe in einen 25-ml-Becher (5.2) gegeben, 10 ml destilliertes Wasser bei 40 °C mit einer Pipette (5.3) zugegeben und mit einem Magnetrührer (5.4) 30 Minuten lang gemischt, um etwaige Klümpchen aufzulösen. Danach werden 0,2 ml der rekonstituierten Milch (5.5) in einen 10-ml-Meßkolben (5.6) einpipettiert und 100 µl der 0,15 mM-Tryptaminlösung (7.1) mit einer Spritze (5.7) zugegeben und mit Methanol (4.2.1) bis zur Marke aufgefüllt. Sorgfältig durch Umdrehen des Kolbens mischen und 15 Minuten ins Ultraschallbad (5.8) geben. Bei 27 000 × g 10 Minuten zentrifugieren (5.9) und den Überstand in einem Glasfläschchen (5.10) auffangen.

Anmerkung: Die Testprobenlösung wird bis zur HPLC-Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

7.3. *Zubereitung des externen Standards*

Es werden 55,4 mg PEDP (4.1) in einen 50-ml-Meßkolben (5.6) eingewogen und rund 25 ml Chloroform (4.2.2) mit einem Meßzylinder (5.11) zugegeben. Der verschlossene Kolben wird auf 50 °C erhitzt und der Inhalt sorgfältig gemischt, bis sich das PEDP aufgelöst hat. Danach wird der Kolben auf 20 °C gekühlt, mit Methanol (4.2.1) bis zur Marke aufgefüllt und durch Umdrehen des Kolbens gemischt. 1 ml dieser Lösung werden in einen 100-ml-Meßkolben (5.6) einpipettiert (5.3) und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt. Von dieser Lösung wird 1 ml in einen 10-ml-Meßkolben (5.6) einpipettiert (5.3), mit 100 µl (5.7) der 0,15-mM-Tryptaminlösung (7.1) versetzt und bis zur Marke mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt. Durch Umdrehen des Kolbens mischen.

Anmerkung: Die Standard-Probenlösung wird bis zur HPLC-Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

7.4. *Vorbereitung des Derivatisierungsreagens*

Es werden 25,0 mg (± 0,1 mg) OPA (4.3.4) in einen 10-ml-Meßkolben (5.6) gegeben, mit 0,5 ml (5.5) Methanol (4.2.1) versetzt und sorgfältig gemischt, bis sich das OPA gelöst hat. Bis zur Marke mit der Borsäurelösung (4.3.2) auffüllen und mit einer Spritze (5.7) 20 µl 2-Mercaptoethanol (4.3.3) zugeben.

Anmerkung: Das Derivatisierungsreagens wird bei 4 °C in einer dunklen Glasflasche aufbewahrt und bleibt eine Woche stabil.

7.5. *HPLC-Bestimmung*

7.5.1. Elutionslösungen (4.4)

Lösungsmittel A:

0,3 mM Natriumdihydrogenphosphat und 3 mM Natriumacetatlösung (mit Essigsäure auf pH 6,5 eingestellt) : Methanol : Tetrahydrofuran = 558 : 440 : 2 (v/v/v)

Lösungsmittel B:

Methanol

7.5.2. Vorschlag für Elutionsgradienten:

Zeit (min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)	Durchflußgeschwindigkeit (ml/min)
Anfang	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

Anmerkung: Der Elutionsgradient muß unter Umständen geringfügig verändert werden, damit die in Abbildung 1 gezeigte Auflösung erreicht wird.

Säulentemperatur: 30 °C

7.5.3. Einspritzvolumen: 50 µl Derivatisierungsmittel und 50 µl Probelösung.

7.5.4. Säulenäquilibrierung.

Wird die Säule täglich neu gestartet, so muß sie 15 Minuten lang mit Lösungsmittel B (100 %) gespült, dann bei einem Verhältnis A : B von 40 : 60 eingestellt und bei 1 ml/min 15 Minuten lang äquilibriert werden. Danach wird ein Blindlauf durch Aufgabe von Methanol (4.2.1) durchgeführt.

Anmerkung: Bevor die Säule für längere Zeit gelagert wird, sollte sie mit einer Mischung von Methanol und Chloroform im Verhältnis 80 : 20 (v/v) 30 Minuten lang gespült werden.

7.5.5. Bestimmung des PS- + PE-Gehalts in der Testprobe.

Die chromatographische Analyse wird in der entsprechenden Reihenfolge durchgeführt, wobei die Intervalle zwischen den Durchläufen konstant bleiben müssen, um konstante Retentionszeiten zu erhalten. Der externe Standard (7.3) wird alle 5—10 Testproben aufgegeben, damit der Responsefaktor bewertet werden kann.

Anmerkung: Die Säule ist nach ungefähr 20—25 Durchläufen 30 Minuten lang mit Lösung B (7.5.1, 100 %) zu spülen.

7.6. *Integration*

7.6.1. PEDP-Peak

Das PEDP wird als einzelner Peak (siehe Abbildung 1) eluiert. Die Peakfläche wird durch Integration von Tal zu Tal ermittelt.

7.6.2. Tryptamin-Peak

Das Tryptamin wird als einzelner Peak (siehe Abbildung 1) eluiert. Die Peakfläche wird durch Integration von Tal zu Tal ermittelt.

7.6.3. PS- und PE-Peakgruppen.

Unter den beschriebenen Bedingungen (Abbildung 1) ergibt PS zwei teilweise getrennte Hauptpeaks, denen ein kleinerer Peak vorausgeht. PE ergibt drei teilweise getrennte Hauptpeaks. Die Gesamtfläche des jeweiligen Peakbündels wird ermittelt, indem die Basislinie wie in Abbildung 1 zu sehen gezogen wird.

8. **Berechnung und Ausdruck der Ergebnisse**

Der PS- und PE-Gehalt der Testprobe wird wie folgt berechnet:

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

wobei gilt:

C = PS- oder PE-Gehalt (mg/100 g Pulver in der Testprobe)

A_1 = PEDP-Peakfläche der Standard-Probenlösung (7.3)

A_2 = PS- oder PE-Peakfläche der Testprobe (7.2)

T_1 = Tryptamin-Peakfläche der Standard-Probenlösung (7.3)

T_2 = Tryptamin-Peakfläche der Testprobe (7.2).

9. **Genauigkeit**

Anmerkung: Die Werte für die Wiederholbarkeit wurden nach dem Internationalen Standard des IDF berechnet (1). Die vorläufige Vergleichbarkeitsschwelle wurde gemäß den „Richtlinien für die Bewertung von Analyseergebnissen und die Anwendung sensorischer Bewertungen für Milch und Milcherzeugnisse der gemeinsamen Marktorganisation" (Dok. VI/2721/95 der Kommission) ermittelt.

9.1. *Wiederholbarkeit*

Die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit beschreibt die Variabilität der Ergebnisse, die von der gleichen Person mit den gleichen Geräten unter den gleichen Bedingungen mit der gleichen Probe in kurzen Zeitabständen unabhängig voneinander erzielt wurden; ein Relativwert von 2 % sollte nicht überschritten werden. Werden zwei Bestimmungen unter diesen Bedingungen durchgeführt, so sollte der relative Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen nicht mehr als 6 % des arithmetischen Mittels der Ergebnisse betragen.

9.2. *Vergleichbarkeit*

Werden zwei Bestimmungen von Personen in unterschiedlichen Laboratorien mit unterschiedlichen Geräten unter unterschiedlichen Bedingungen mit der gleichen Testprobe durchgeführt, so sollte der relative Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen nicht mehr als 11 % des arithmetischen Mittels der Ergebnisse betragen.

10. **Literatur**

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).

(1) Internationaler IDF-Standard 135 B/1991. Milch und Milcherzeugnisse. Genauigkeit analytischer Methoden. Konzept für einen Ringversuch.

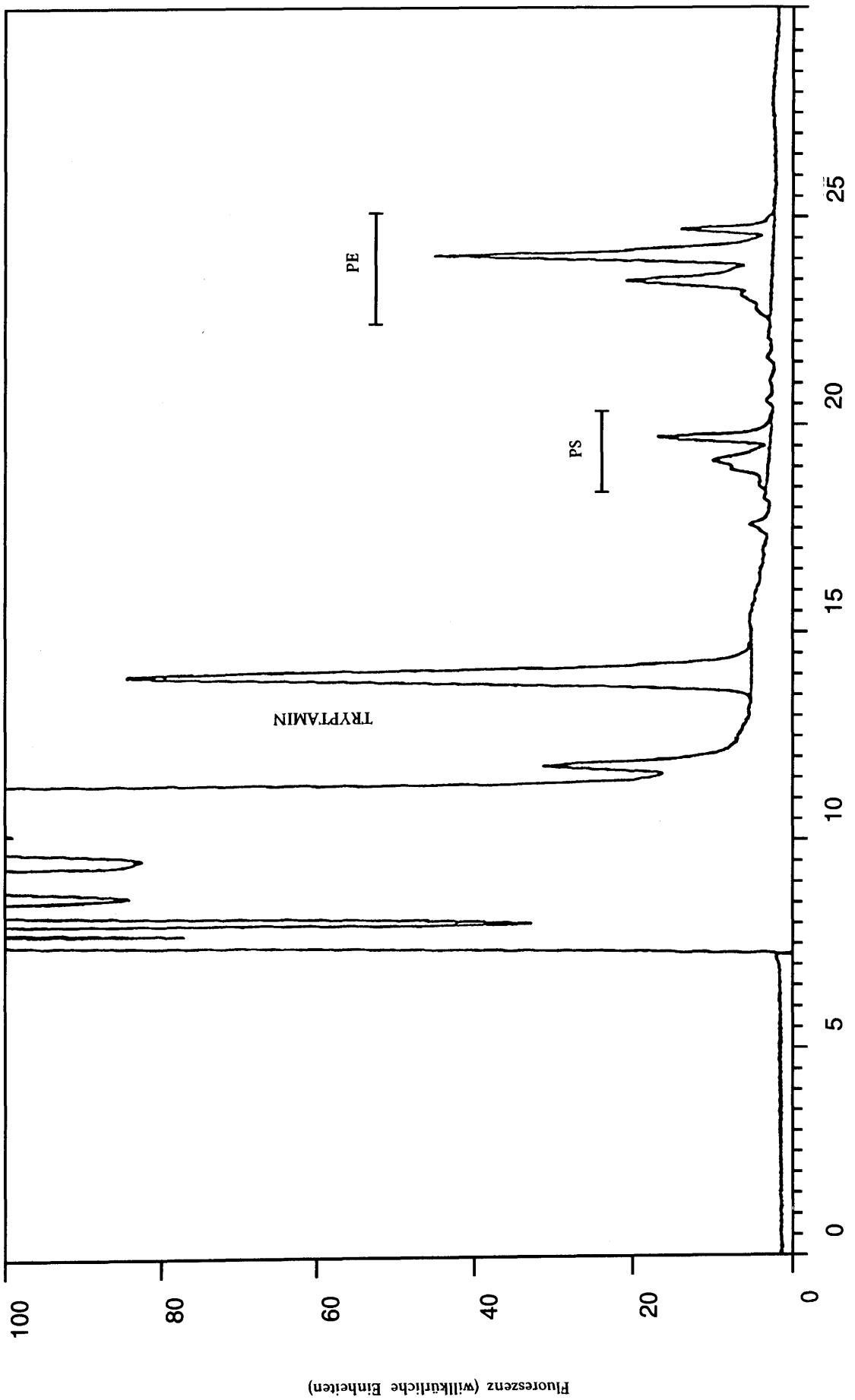


Abbildung 1: HPLC-Ergebnis für die OPA-Derivate Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) in einem Methanol-Extrakt aus rekonstituiertem Magermilchpulver. Die Integrationsform für die Peaks von PS, PE und Tryptamin (interner Standard) ist eingezeichnet.

ANHANG VII

FESTSTELLUNG DER RÜCKSTÄNDE VON ANTIBIOTIKA UND SULFONAMIDEN/ DAPSON IN MAGERMILCHPULVER

Es muß ein Hemmstoff-Screeningtest für Antibiotika mit Bacillus stearothermophilus var. calidolactis C953 als Testorganismus durchgeführt werden, der empfindlich genug ist, um 4 µg Benzylpenicillin je Liter Milch und 100 µg Sulfonamide je Liter Milch nachzuweisen. Handelsübliche Tests können verwendet werden, sofern sie für Benzylpenicillin und Sulfonamide ausreichend empfindlich sind (1).

Für den Test wird rekonstituiertes Magermilchpulver verwendet (1 g Pulver + 9 ml destilliertes Wasser). Der Test wird gemäß IDF-Bulletin Nr. 258/1991, Teil 1 Kapitel 2, oder nach den Anweisungen des Testherstellers durchgeführt.

Positive Ergebnisse sind folgendermaßen zu interpretieren:

1. Der Test wird unter Zugabe von Penicillininase wiederholt:
   - — *positives Ergebnis:* Hemmstoff kann mit diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden;
   - — *negatives Ergebnis:* Der Hemmstoff ist ein Beta-Lactam-Antibiotikum.
2. Der Test wird unter Zugabe von p-Aminobezoesäure wiederholt:
   - — *positives Ergebnis:* Hemmstoff kann mit diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden;
   - — *negatives Ergebnis:* Der Hemmstoff ist ein Sulfonamid/Dapson.
3. Der Test wird unter Zugabe von Penicillinase + p-Aminobenzoesäure wiederholt:
   - — *positives Ergebnis:* Der Hemmstoff kann mit diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden;
   - — *negatives Ergebnis:* Der Hemmstoff ist ein Beta-Lactam-Antibiotikum und ein Sulfonamid/Dapson.

(1) *Wichtiger Hinweis:* Bei der Analyse von Magermilchpulver können falsch-positive Ergebnisse auftreten. Es muß daher unbedingt sichergestellt werden, daß der Test keine falsch-positiven Ergebnisse erbringen kann.