

KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) Nr. 3711/86

af 4. december 1986

om ændring af forordning (EØF) nr. 625/78 om gennemførelsesbestemmelser for offentlig oplagring af skummetmælkspulver

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 804/68 af 27. juni 1968 om den fælles markedsordning for mælk og mejeriprodukter⁽¹⁾, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1335/86⁽²⁾, særlig artikel 7, stk. 5, og

ud fra følgende betragtninger:

I artikel 3 i Rådets forordning (EØF) nr. 1014/68 af 20. juli 1968 om fastsættelse af almindelige regler om offentlig oplagring af skummetmælkspulver⁽³⁾, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1272/79⁽⁴⁾, er det fastsat, at interventionsprisen gælder for skummetmælkspulver, som er blevet leveret til et oplagringssted, som ligger inden for en maksimal afstand, der skal fastsættes, fra det sted, hvor skummetmælkspulveret opbevares; er afstanden til det oplagringssted, til hvilket skummetmælkspulveret leveres, større end denne maksimale afstand, bærer interventionsorganet de herved opståede ekstra transportomkostninger, der skal bestemmes som et fast beløb;

ved Kommissionens forordning (EØF) nr. 625/78⁽⁵⁾, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 2256/86⁽⁶⁾, blev den maksimale afstand fastsat til 100 km; erfaringerne viser, at denne maksimale afstand ikke er tilstrækkelig stor til, at interventionsorganerne kan forvalte adgangen til de offentlige lagre på de bedst mulige betingelser; afstanden bør derfor udvides til 350 km;

i bilag I, nr. 2, til forordning (EØF) nr. 625/78 vedrørende skummetmælkspulverets kvalitet fastsættes kontrolmetoderne til undersøgelse af visse produkter; der bør fastsættes en henvisning til de internationale standarder for udtagning af prøver;

i bilag IV til forordning (EØF) nr. 625/78 fastsættes metoden til måling af fri sialinsyre med henblik på påvis-

ning af løbevalle i skummetmælkspulver til offentlig oplagring; denne metode blev anvendt midlertidigt indtil den 31. marts 1986; det pågældende bilag bør derfor ophæves;

Forvaltningskomiteen for Mælk og Mejeriprodukter har ikke afgivet udtalelse inden for den af formanden fastsatte frist —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

I forordning (EØF) nr. 625/78 foretages følgende ændringer:

1. I artikel 5, stk. 1, ændres udtrykket »100 km« til »350 km«.
2. I bilag I, nr. 2, litra a), ændres udtrykket »Standard ISO« i alle tilfælde til »International standard ISO«.
3. Bilag I, nr. 2, litra b), andet led, affattes således:
— Løbevalle:
bestemmelse af glycomakropeptidindholdet ved hjælp af højtryksvæske-kromatografi⁽⁷⁾.
4. I bilag I, nr. 2, indsættes som litra c):
»c) Prøverne udtages i overensstemmelse med den internationale standard ISO 707; medlemsstaterne kan dog anvende en anden metode til udtagning af prøver, hvis denne opfylder principperne i nævnte standard.«
5. I bilag I udgår fodnote⁽⁸⁾.
6. Bilag IV udgår.
7. Bilag V erstattes med bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på dagen for offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Punkt 4 og 7 i artikel 1 anvendes fra den 2. februar 1987.

⁽¹⁾ EFT nr. L 148 af 28. 6. 1968, s. 13.

⁽²⁾ EFT nr. L 119 af 8. 5. 1986, s. 19.

⁽³⁾ EFT nr. L 173 af 22. 7. 1968, s. 4.

⁽⁴⁾ EFT nr. L 161 af 29. 6. 1979, s. 11.

⁽⁵⁾ EFT nr. L 84 af 31. 3. 1978, s. 19.

⁽⁶⁾ EFT nr. L 196 af 18. 7. 1986, s. 41.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 4. december 1986.

På Kommissionens vegne

Frans ANDRIESSEN

Næstformand

BILAG

»BILAG V

PÅVISNING AF LØBEVALLE I SKUMMETMÆLKSPULVER TIL OFFENTLIG OPLAGRING VED HJÆLP AF HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRAPHISK BESTEMMELSE AF GLYCOMAKROPEPTIDINDHOLDET (HPLC-metode)**1. Formål og anvendelsesområde**

Med denne metode kan det ved bestemmelse af glycomakropeptider påvises, om der er løbevalle til stede i skummetmælkspulver.

2. Reference

International standard ISO 707 — Mælk og mejeriprodukter — Prøveudtagningsmetoder i overensstemmelse med bestemmelser omhandlet i sidste afsnit under 2 c) i bilag I.

3. Definition

Skummetmælkspulvers indhold af glycomakropeptider : indholdet af sådanne stoffer bestemt ved den nedenfor beskrevne metode og udtrykt i vægtprocent.

4. Princip

- Opløsning af skummetmælkspulveret, fjernelse af fedtstoffer og proteiner ved hjælp af trichloreddikesyre og centrifugering.
- Bestemmelse af mængden af glycomakropeptider (GMP) i centrifugatet ved HPLC.
- Vurdering af resultatet i forhold til standardprøver af skummetmælkspulver, som ikke indeholder eller er tilsat en kendt mængde vallepulver.

5. Reagenser

Alle reagenser skal være af analysekvalitet. Der anvendes destilleret vand eller vand af tilsvarende renhed.

5.1. Opløsning af trichloreddikesyre

240 g trichloreddikesyre (Cl_3CCOOH) opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml.

5.2. Elueringsvæske med pH 6,0

1,74 g kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), 12,37 g kaliumdihydrogenphosphat (H_2KPO_4) og 21,41 g natriumsulfat (Na_2SO_4) opløses i ca. 700 ml vand.

Om nødvendigt indstilles pH til 6,0 ved hjælp af fortyndet phosphorsyre eller en kaliumhydroxidopløsning.

Der fyldes op til 1 000 ml med vand og blandes. Før brugen filtreres elueringsvæsken gennem et membranfilter med porestørrelse 0,45 μm .

5.3. Opløsning til skylning og opbevaring af kolonnerne

En volumendel acetonitril (CH_3CN) blandes med ni volumendele vand. Før brugen filtreres opløsningen gennem et membranfilter med porestørrelse 0,45 μm .

Bemærk : Der kan til skylning anvendes andre opløsninger, der har baktericid virkning, og som ikke ændrer kolonnernes adskillelsesevne.

5.4. Standardprøver

5.4.1. Skummetmælkspulver, der opfylder kravene i forordning (EØF) nr. 625/78, benævnt [0].

5.4.2. Samme pulver tilsat 5 % (v/v) løbevallepulver med normal sammensætning, benævnt [5].

6. Apparat**6.1. Analysevægt.**

6.2. Centrifuge, der kan præstere en centrifugalkraft på 2 200 g, med tilhørende lukkede centrifugeglas på ca. 25 ml.

6.3. Mekanisk omrører.

6.4. Magnetomrører.

6.5. Glastragte med diameter ca. 7 cm.

6.6. Filtrepapir, mellemfint, med diameter ca. 12,5 cm.

6.7. Filtreringsudstyr af glas med tilhørende membranfiltre med porestørrelse 0,45 µm.

6.8. Målepipette på 10 ml, som opfylder kravene i ISO 648, klasse A, eller ISO/R 835.

6.9. Termostatstyret vandbad på $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

6.10. HPLC-udstyr bestående af:

6.10.1. Pumpe;

6.10.2. Manuel eller automatisk injektionsenhed på 15-30 µl;

6.10.3. To serieforbundne kolonner, TSK 2000 SW (længde 30 cm, indvendig diameter 0,75 cm) eller kolonner af tilsvarende effektivitet, og en forkolonne (3 cm × 0,3 cm) pakket med I 125 eller et lige så effektivt materiale;

6.10.4. Termostatstyret kolonneovn indstillet på $35 \pm 1^\circ \text{C}$;

6.10.5. UV-detektor med variabel bølgelængde, hvormed der ved 205 nm kan måles med en følsomhed på 0,008 A;

6.10.6. Integrator, der kan integrere over de enkelte toppe.

Bemærk: Der kan arbejdes med kolonner ved stuetemperatur, men adskillelseevnen bliver i så fald lidt mindre.

Temperatursvingningerne gennem en analyserække må her ikke overstige $\pm 5^\circ \text{C}$.

7. Stikprøveudtagning

7.1. International standard ISO 707 — Mælk og mejeriprodukter — Prøveudtagningsmetoder i overensstemmelse med bestemmelser omhandlet i sidste afsnit under 2 c).

7.2. Stikprøven opbevares under sådanne forhold, at der hverken kan ske ødelæggelse eller ændring af sammensætningen.

8. Fremgangsmåde**8.1. Forberedelse af analyseprøven**

Mælkepulveret overføres til en beholder, der er ca. dobbelt så stor som pulverets volumen, og som har et lufttæt låg.

Beholderen lukkes straks.

Mælkepulveret blandes omhyggeligt ved flere gange at vende rundt på beholderen.

8.2. Udtagning af analyseprøve

I et centrifugeglas (6.2) afvejes $2,000 \pm 0,001 \text{ g}$.

8.3. Fjernelse af fedtstoffer og proteiner.

8.3.1. Der sættes 20 ml 50°C varmt vand til analyseprøven. Pulveret opløses ved omrøring i 5 min med omrøreren (6.3). Glasset afkøles til 25°C .

8.3.2. I løbet af 2 min tilsættes 10,0 ml trichloreddikesyreopløsning (5.1) under omrøring med magnetomrøreren (6.4). Glasset anbringes i vandbadet (6.9), hvori det henstår i 60 min.

8.3.3. Der centrifugeres (6.2) ved 2 200 g i 10 min eller filtreres gennem papirfilter (6.6), idet de første 5 ml filtrat bortkastes.

8.4. *Chromatografisk bestemmelse*

- 8.4.1. Af centrifugatet eller filtratet (8.3.3) indsprøjtes en nøjagtigt afmålt mængde på mellem 15 og 30 µl i HPLC-apparatet (6.10) under en elueringshastighed på 1,0 ml pr. minut.

Bemærk:

1. Elueringsvæsken (5.2) holdes på 85 ° C under hele chromatograferingen for at holde den luftfri og fri for bakterievækst. Andre foranstaltninger med tilsvarende virkning er acceptable.
2. Hver gang chromatograferingen afbrydes, skylles kolonnen med vand. Den må aldrig efterlades med elueringsvæske (5.2) i.

Skal kolonnerne stå ubenyttede hen i mere end 24 timer, skylles de først med vand og dernæst med opløsning (5.3) i mindst 3 timer med en gennemløbshastighed på 0,2 ml pr. minut.

- 8.4.2. Resultaterne af chromatograferingen af analyseprøven foreligger i form af et chromatogram, hvor hver top identificeres ved sin retentionstid, RT, nemlig:

Top II: chromatogrammets anden top, hvis retentionstid er ca. 12,5 min,

Top III: chromatogrammets tredje top, der svarer til GMP, og hvis retentionstid er 15,5 ± 1,0 min,

Top IV: chromatogrammets fjerde top, hvis retentionstid er ca. 17,5 min.

Kolonnernes kvalitet kan påvirke de forskellige toppes retentionstid.

Integratoren (6.10.6) måler automatisk arealet A af hver top, nemlig:

A_{II}: arealet af top II,

A_{III}: arealet af top III,

A_{IV}: arealet af top IV.

For at afsløre eventuelle afvigelser enten som følge af, at apparaturet eller kolonnerne ikke har fungeret tilfredsstillende, eller på grund af den analyserede prøves oprindelse eller art må alle chromatogrammer bedømmes visuelt, før en kvalitativ tolkning påbegyndes.

I tvivlstilfælde gentages analysen.

8.5. *Kalibrering*

- 8.5.1. Med standardprøverne (5.4) følges den i punkt 8.2 — 8.4.2 beskrevne fremgangsmåde nøje.

Der benyttes frisk fremstillede opløsninger, da GMP nedbrydes i 8 % trichloreddikesyre-opløsning; indholdet heraf falder med ca. 0,2 % pr. time ved 30 ° C.

- 8.5.2. Før chromatografering af prøverne konditioneres kolonnerne ved gentagen indsprøjtning af opløsningen (8.5.1) af standardprøven (5.4.2), indtil den top, der svarer til GMP, har konstant areal og retentionstid.

- 8.5.3. Kalibreringsfaktorerne R bestemmes ved at indsprøjtne filtrat (8.5.1) i samme mængde som prøverne.

9. *Angivelse af resultaterne*

- 9.1.
- Formler og beregning*

- 9.1.1. Beregning af kalibreringsfaktoren R

$$\text{Top II: } R_{II} = \frac{100}{A_{II} [0]}$$

$$\text{Top IV: } R_{IV} = \frac{100}{A_{IV} [0]}$$

hvor

R_{II} et R_{IV} = kalibreringsfaktorerne for henholdsvis top II og IV og

A_{II} [0] et A_{IV} [0] = de arealer af henholdsvis top II og IV for standardprøven [0], som er bestemt under 8.5.3.

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

hvor

R_{III} = kalibreringsfaktoren for top III,

A_{III} [0] et A_{III} [5] = de arealer af top III for henholdsvis standardprøve [0] og [5], som er bestemt under 8.5.3,

W = indholdet af valde i standardprøven [5], nemlig 5 (%).

9.1.2. Beregning af de relative toparealer for prøven [E]

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

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

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

hvor

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = de relative arealer af henholdsvis top II, III og IV for prøven [E],

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = de arealer af henholdsvis top II, III og IV for prøven [E], som er bestemt under 8.4.2,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = de under 9.1.1 beregnede kalibreringsfaktorer.

9.1.3. Beregningen af de relative retentionstider for top II, III og IV for prøven [E]

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

hvor

$RRT_{III} [E]$ = den relative retentionstid for top III for prøven [E]

$RT_{III} [E]$ = retentionstiden for top III for prøven [E], som er bestemt under 8.4.2.

$RT_{III} [5]$ = retentionstiden for top III for standardprøven [5], som er bestemt under 8.5.3.

9.1.4. Det er vist eksperimentelt, at den relative retentionstid for top III, $RRT_{III} [E]$, er ligefrem proportional med vallepulverindholdet op til 10 %.

— ved et indhold på $< 5\%$ er $RRT_{III} [E] > 1,000$;

— ved indhold på $\geq 5\%$ er $RRT_{III} [E] \leq 1,000$.

Den tilladte usikkerhed på RRT_{III} er $\pm 0,002$.

Normalt afviger $RRT_{III} [0]$ -værdien kun lidt fra 1,034. Alt efter kolonnernes tilstand kan denne værdi nærme sig, men skal altid være større end 1,000.

9.2. Beregning af det procentvise indhold af løbevallepulver i prøven nemlig:

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

hvor:

W = indholdet af løbevalle i prøven [E], i vægtprocent;

$S_{III} [E]$ = det relative areal af top III for prøven [E], som er fremkommet under 9.1.2;

1,3 = det relative middelareal af top III udtrykt i g pr. 100 g løbevalle og bestemt i uforfalsket skummetmælkspulver af forskellig oprindelse. Denne værdi er bestemt eksperimentelt;

$S_{III} [0]$ = det relative areal af top III og er lig med $R_{III} \times A_{III} [0]$; sidstnævnte størrelser er bestemt under henholdsvis 9.1.1 og 8.5.3;

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = korrektionen af det relative middelareal 1,3, når $S_{III} [0]$ -værdien afviger 0,9. Det relative middelareal af top III for standardprøven [0] er bestemt eksperimentelt til 0,9.

9.3. Metodens nøjagtighed

9.3.1. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, der er udført samtidig eller med kort tids mellemrum af samme person, med samme apparatur og på samme stikprøve, må ikke overstige 0,2 vægtprocent.

9.3.2. Reproducerbarhed

Forskellen mellem to resultater, som to forskellige laboratorier er nået frem til med samme stikprøve, må ikke overstige 0,4 vægtprocent.

9.4. Fortolkning

- 9.4.1 Der er ikke valle til stede, hvis det relative areal af top III, $S_{III}[E]$, udtrykt i gram løbevalle pr. 100 gram er $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$:

hvor:

2,0 = den højst tilladte værdi for det relative areal af top III; der er her taget hensyn til det relative areal af top III, nemlig 1,3, usikkerheden som følge af variationer i skummetmælkspulverets sammensætning og metodens reproducerbarhed (9.3.2).

$(S_{III}[0] - 0,9)$ = korrektionen, når arealet $S_{III}[0]$ afviger fra 0,9 (jf. 9.2).

- 9.4.2 Hvis det relative areal af top III, $S_{III}[E]$ er $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ og samtidig det relative areal af top II, $S_{II}[E]$ er ≤ 160 , beregnes indholdet af løbevalle som angivet i punkt 9.2.

- 9.4.3 Hvis det relative areal af top III, $S_{III}[E]$ er $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ og samtidig det relative areal af top II, $S_{II}[E]$ er > 160 , bestemmes det samlede proteinindhold (P %); herefter undersøges figur 1 og 2.

- 9.4.3.1 De tal, der fremkommer efter analyse af uforandrede prøver af skummetmælkspulver med et højt samlet proteinindhold, er anført i figur 1 og 2.

Den fuldt optrukne linje svarer til regressionslinjen, for hvilken koefficienterne beregnes ved hjælp af de mindste kvadraters metode.

Med den stiplede linje fastsættes den øvre grænse for det relative areal af top III med en sandsynlighed for ikke at blive overskredet i 90 % af tilfældene.

Ligningerne for de stiplede linjer i figur 1 og 2 er henholdsvis lig med:

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

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

hvor

S_{III} = det relative areal af top III beregnet enten på grundlag af det samlede proteinindhold eller på grundlag af det relative areal af top $S_{II}[E]$.

P % = det samlede proteinindhold udtrykt som vægtprocent.

$S_{II}[E]$ = det i punkt 9.1.2 beregnede relative areal af prøven.

Disse ligninger svarer til det i punkt 9.2 anførte tal 1,3.

Forskellen (T_1 og T_2) mellem det fundne relative areal $S_{III}[E]$ og det relative areal S_{III} fremgår af følgende ligninger:

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

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

- 9.4.3.2 Hvis T_1 er mindre end eller lig med nul, kan et indhold af løbevalle ikke påvises.

Hvis T_1 og T_2 er større end nul, kan det sluttes, at der er løbevalle til stede.

Løbevalleindholdet beregnes ved hjælp af følgende formel:

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

hvor:

0,91 svarer til den lodrette afstand mellem den fuldt optrukne linje og den stiplede linje.

