

387R4154

31.12.87

EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI

N:o L 392/19

KOMISSION ASETUS (ETY) N:o 4154/87,

annettu 22 päivänä joulukuuta 1987,

tiettyistä maataloustuotteista valmistettuihin tavaroihin
sovellettavasta kauppajärjestelmästä annetun asetuksen (ETY) N:o 3033/80
soveltamiseksi tarvittavista analyysimenetelmistä ja muista teknisistä säännöksistä

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamis-
sopimuksen,

ottaa huomioon tariffi- ja tilastonimikkeistöstä ja yhteis-
sestä tullitariffista 23 päivänä heinäkuuta 1987 annetun
neuvoston asetuksen (ETY) N:o 2658/87⁽¹⁾, sellaisena
kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY)
N:o 3985/87⁽²⁾, ja erityisesti sen 9 artiklan,

sekä katsoo, että

komission asetuksessa (ETY) N:o 1061/69⁽³⁾, sellaisena
kuin se on muutettuna asetuksella (ETY) N:o 1822/86⁽⁴⁾,
määritellään neuvoston asetuksen (ETY) N:o 1059/69⁽⁵⁾
soveltamiseksi käytettävät analyysimenetelmät; asetus
(ETY) N:o 1059/69 kumotaan ja korvataan asetuksella
(ETY) N:o 3033/80⁽⁶⁾, sellaisena kuin se on viimeksi
muutettuna asetuksella (ETY) N:o 3743/87⁽⁷⁾,

asetuksen (ETY) N:o 3033/80 soveltamista koskevat
yksityiskohtaiset säännöt vahvistetaan tuontien osalta
asetuksen (ETY) N:o 3033/80 soveltamisalaan kuuluvien
tavaroiden valmistuksessa käytettyinä pidetyistä perus-
tuotteiden määristä sekä yhteisestä tullitariffista annetun
asetuksen (ETY) N:o 950/68 muuttamisesta 11 päivänä
marraskuuta 1980 annetussa neuvoston asetuksessa
(ETY) N:o 3034/80⁽⁸⁾, sellaisena kuin se on viimeksi
muutettuna asetuksella (ETY) N:o 4091/87⁽⁹⁾

olisi kumottava ja korvattava asetus (ETY) N:o 1061/69
analyysimenetelmien tieteellisen ja teknisen kehityksen
huomioon ottamiseksi ja yhdenmukaisen kohtelun var-
mistamiseksi asetuksen (ETY) N:o 3033/80 soveltamis-
alaan kuuluvien tavaroiden yhteisöön suuntautuvan tuon-
nin osalta, ja

tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat nimikkeis-
tökomitean lausunnon mukaisia,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Tässä asetuksessa määritellään asetuksen (ETY)
N:o 3033/80 (tuonnin osalta) ja asetuksen (ETY)
N:o 3034/80 soveltamiseksi tarvittavat analyysimenetel-
mät tai analyysimenetelmän puuttuessa noudatettavien
analyysitoimenpiteiden luonne tai sovellettavan mene-
telmän periaate.

2 artikla

Asetuksen (ETY) N:o 3034/80 liitteessä III esitettyjen

- tarkkelys/glukoosipitoisuuteen, ja
 - sakkaroosi/inverttisokeri/isoglukoosipitoisuuteen
- liittyvien määritelmien mukaisesti ja mainitun asetuksen
liitteiden II ja III soveltamiseksi käytetään seuraavia
kaavoja, menettelyjä ja menetelmiä:

1. Tarkkelys/glukoosipitoisuus

(sellaisenaan olevan tavarat 100 % tarkkelys-
pitoisuutena ilmaistuna)

- a) $(Z - F) \times 0,9$,
kun glukoosipitoisuus on vähintään yhtä suuri
kuin fruktoosipitoisuus, tai
- b) $(Z - G) \times 0,9$,
kun glukoosipitoisuus on pienempi kuin frukto-
sipitoisuus

kun:

Z = glukoosipitoisuus tämän asetuksen liitteessä
I kuvatulla menetelmällä määritettynä;

F = fruktoosipitoisuus HPLC:lla määritettynä
(suuren erotuskyvyn nestekromatografia);

G = glukoosipitoisuus HPLC:lla määritettynä.

Kun laktoosihydrolysaatin esiintyminen on 1 kohdan
a alakohdan mukaisesti ilmeinen ja/tai havaitaan
galaktoosimääriä, galaktoosipitoisuutta (HPLC:lla
määritettynä) vastaava glukoosipitoisuus (HPLC:lla
määritettynä) vähennetään glukoosin kokonaispitoi-
suudesta (Z) ennen muita laskutoimenpiteitä.

⁽¹⁾ EYVL N:o L 256, 7.9.1987, s. 1

⁽²⁾ EYVL N:o L 376, 31.12.1987, s. 1

⁽³⁾ EYVL N:o L 141, 12.6.1969, s. 24

⁽⁴⁾ EYVL N:o L 158, 13.6.1986, s. 1

⁽⁵⁾ EYVL N:o L 141, 12.6.1969, s. 1

⁽⁶⁾ EYVL N:o L 323, 29.11.1980, s. 1

⁽⁷⁾ EYVL N:o L 352, 15.12.1987, s. 29

⁽⁸⁾ EYVL N:o L 323, 29.11.1980, s. 7

⁽⁹⁾ EYVL N:o L 382, 31.12.1987, s. 27

2. Sakkarooosi/inverttisokeri/isoglukoosipitoisuus

(sellaisenaan olevan tavaran sakkarooosipitoisuutena ilmaistuna)

a) $S + (2F) \times 0,95$,
kun glukoosipitoisuus on vähintään yhtä suuri kuin fruktoosipitoisuus;

b) $S + (G + F) \times 0,95$,
kun glukoosipitoisuus on pienempi kuin fruktoosipitoisuus

kun:

S = sakkarooosipitoisuus HPLC:lla määritettynä;

F = fruktoosipitoisuus HPLC:lla määritettynä;

G = glukoosipitoisuus HPLC:lla määritettynä.

Kun laktoosihydrolysaatin esiintyminen on ilmeinen ja /tai havaitaan laktoosi- ja galaktoosimääriä, galaktoosipitoisuutta vastaava glukoosipitoisuus (HPLC:lla määritettynä) vähennetään glukoosipitoisuudesta (G) ennen muita laskutoimenpiteitä.

3. Maitorasvapitoisuus

a) Jollei jäljempänä alakohdan säännöksistä muuta johdu, sellaisenaan olevan tavaran maitorasvapitoisuus on määritettävä vetykloridihapolla tapahtuvan hydrolyysin jälkeen tapahtuvalla uuttomenetelmällä.

b) Kun tavaran koostumuksesta ilmoitetaan myös muita rasvoja kuin maitorasvoja, sovelletaan seuraavaa menettelyä:

- määritetään edellä a alakohdan mukaisesti sellaisenaan olevan tavaran kokonaisrasvapitoisuus painoprosentteina,
- lasketaan kokonaisrasvapitoisuuden voi happopitoisuus painoprosentteina IUPAC N:o 2310 -menetelmällä (viite: Pure and applied Chemistry N:o 58/1986, N:o 10, s. 1419–1428),
- lasketaan sellaisenaan olevan tavaran maitorasvapitoisuus painoprosentteina kertomalla kokonaisrasvapitoisuuden voi happopitoisuus painoprosentteina tekijällä 27 ja näin saatu arvo sellaisenaan olevan tavaran kokonaisrasvapitoisuuden painoprosentilla ja jaetaan tulos sadalla.

4. Maitovalkuaispitoisuus

a) Jollei b alakohdan säännöksistä muuta johdu, sellaisenaan olevan tavaran maitovalkuaispitoisuus lasketaan kertomalla typpipitoisuus (Kjeldahlin menetelmällä määritetty) tekijällä 6,38.

b) Kun tavaran koostumuksesta ilmoitetaan myös muita kuin maitovalkuaisista sisältäviä ainesosia:

- (i) kokonaistyyppipitoisuus määritetään Kjeldahlin menetelmällä,

- (ii) maitovalkuaispitoisuus lasketaan edellä a alakohdan mukaisesti vähentämällä kokonaistyyppipitoisuudesta muita kuin maitovalkuaisista vastaava typpipitoisuus.

3 artikla

Asetuksen (ETY) N:o 3034/80 liitteen I täytäntöönpanoa varten käytetään seuraavia menetelmiä ja/tai menettelyjä:

1. Yhdistetyn nimikkeistön nimikkeisiin 0403 10 51–0403 10 59, 0403 10 91–0403 10 99, 0403 90 71–0403 90 79 ja 0403 90 91–0403 90 99 kuuluvien tavaroiden luokitustarkoituksiin määritetään maitorasvapitoisuus 2 artiklan 3 kohdassa tarkoitetulla menetelmällä;
2. Yhdistetyn nimikkeistön nimikkeisiin 1704 10 11–1704 10 99 ja 1905 20 10–1905 20 90 kuuluvien tavaroiden luokitustarkoituksiin määritetään sakkarooosipitoisuus, sakkarooosina ilmaistu inverttisokeri mukaanlukien, HPLC-menetelmällä; (sakkarooosina ilmaistu inverttisokeri tarkoittaa yhtä suurten glukoosi- ja fruktoosimäärien summaa kerrottuna luvulla 0,95);
3. Yhdistetyn nimikkeistön nimikkeisiin 1806 10 10–1806 10 90 kuuluvien tavaroiden luokitustarkoituksiin määritetään sakkarooosi/inverttisokeri/isoglukoosi – pitoisuus 2 artiklan 2 kohdassa annetun kaavan, menetelmän ja menettelyjen mukaisesti;
4. Yhdistetyn nimikkeistön nimikkeisiin 3505 20 10–3505 20 90 kuuluvien tavaroiden luokitustarkoituksiin määritetään tärkkelyksen, dekstriinin tai muiden muunnettujen tärkkelysten pitoisuus tämän asetuksen liitteessä II annetulla menetelmällä;
5. Yhdistetyn nimikkeistön nimikkeisiin 3809 10 10–3809 10 90 kuuluvien tavaroiden luokitustarkoituksiin määritetään amylaasiset aineet tämän asetuksen liitteessä II annetulla menetelmällä;
6. Joko yhdistetyn nimikkeistön nimikkeeseen 1901 90 11 tai nimikkeeseen 1901 90 19 kuuluvien tavaroiden luokitustarkoituksiin tehdään ero kuiva-aineeseen perustuen määritettynä kuivauksella 103 ± 2 °C lämpötilassa vakiopainoon;
7. Yhdistetyn nimikkeistön nimikkeisiin 1902 19 10 ja 1902 19 90 kuuluvien tavaroiden luokitustarkoituksiin käytetään tämän asetuksen liitteessä III annettua menetelmää makaronivalmisteissa esiintyvien tavallista vehnästä valmistettujen jauhojen ja suurimoiden esiintymisen testaamiseksi;

8. Yhdistetyn nimikkeistön alanimikkeisiin 2905 44 11–2905 44 599 ja 3823 60 11–3823 60 99 kuuluvien tavaroiden sisältämän mannitolin ja D-glusitolin (sorbitolin) osuus määritetään suuren erotuskyvyn nestekromatografiaan perustuvan menetelmän (HPLC) perusteella.

4 artikla

1. Laaditaan analyysiseloste.
2. Analyysiselosteessa on oltava erityisesti:
 - kaikki näytteen tunnistamiseen liittyvät tiedot,
 - käytetty yhteisön menetelmä ja tarkka viittaus oikeudelliseen asiakirjaan, jossa siitä on säädetty tai tarvittaessa viittaus yksityiskohtaiseen menetelmään, jossa

on eritelty tässä asetuksessa esitettyjen noudatettavien analyysitoimenpiteiden luonne tai sovellettavan menetelmän periaate,

- tuloksiin mahdollisesti vaikuttaneet tekijät,
- analyysitulokset ottaen huomioon käytetyssä menetelmässä sovellettu ilmaisumuoto sekä analyysiä pyytäneiden tulli- tai hallintoviranomaisten tarpeiden saneleman ilmaisumuoto.

5 artikla

Kumotaan asetus (ETY) N:o 1061/69.

6 artikla

Tämä asetus tulee voimaan 1 päivänä tammikuuta 1988.

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

Tehty Brysselissä 22 päivänä joulukuuta 1987.

Komission puolesta

COCKFIELD

Varapuheenjohtaja

LIITE I

TÄRKKELYSBITOISUUDEN JA SEN GLUKOOSIA SISÄLTÄVIEN HAJOAMISTUOTTEIDEN MÄÄRITYS

1 Tarkoitus ja soveltamisala

- a) Menetelmällä on mahdollista määrittää tärkkelyspitoisuus, sen glukoosia sisältävät hajoamistuotteet, jäljempänä "tärkkelys".
- b) Edellä 1 a kohdassa tarkoitettu "tärkkelys" pitoisuus on yhtä suuri kuin Earvo laskettuna tämän menetelmän 6 kohdan mukaisesti.

2 Periaate

Näyte hajotetaan natriumhydroksidilla ja tärkkelys jaetaan glukoosiyksiköihin amyloglukosidaasin avulla. Glukoosi määritetään entsymaattisesti.

3 Reagenssit

(Käytetään kahdesti tislattua vettä.)

3.1 0,5 N Natriumhydroksidiliuos (0,5 mol/l).

3.2 (vähintään) 96 % jääetikka.

3.3 Amyloglukosidaasiliuos:

Välittömästi ennen käyttöä liuotetaan noin 10 mg amyloglukosidaasia (EC 3.2.1.3) (6 U/mg) 1 millilitraan vettä ⁽¹⁾.

3.4 Trietanoliamiinipuskuriliuos:

Liuotetaan 14,0 g trietanoliamiinihydrokloridia [tris(2-hydroksietyyli)ammoniumkloridi] ja 0,25 g magnesiumsulfaattia ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 80 ml:aan vettä, lisätään noin 5 ml 5 N natriumhydroksidiliuosta (5 mol/l) ja säädetään pH:ksi 7,6 1 N natriumhydroksidiliuosta (1 mol/l) käyttäen. Täytetään 100 ml:ksi vedellä. Puskuriliuosta voidaan säilyttää vähintään 4 viikkoa 4 °C:ssa.

3.5 NADP (nikotinamidiadeniininidinukleotidifosfaatti, dinatriumsuola) -liuos:

Liuotetaan 60 mg NADP 6 ml:aan vettä. Tätä liuosta voidaan säilyttää ainakin neljä viikkoa 4 °C:ssa.

3.6 ATP (adenosiini-5'-trifosfaatti, dinatriumsuola) -liuos:

Liuotetaan 300 mg ATP, $3\text{H}_2\text{O}$ ja 300 mg natriumvetykarbonaattia (NaHCO_3) 6 ml:aan vettä. Liuosta voidaan säilyttää vähintään 4 viikkoa 4 °C:ssa.

3.7 HK/G6P-DH [Heksokinaasi (EC 2.7.1.1) ja glukoosi-6-fosfaatti-dehydrogenaasi (EC 1.1.1.49)]-suspensio:

suspendoidaan 280 U HK ja 140 U G6P-DH 1 ml:ssa 3,2 M ammoniumsulfaattiliuosta. Suspensiota voidaan säilyttää vähintään vuosi 4 °C:ssa.

4 Välineistö

4.1 Magneettisekoittaja vesihauteessa 60 °C:ssa.

4.2 Magneettisauvoja.

4.3 UV-spektrofotometri 1 cm optisin kyvetein.

4.4 Pipettejä entsymaattista määrittystä varten.

5 Menetelmä

5.1 Näyte pestään etanolilla, uutetaan lämmittäen natriumhydroksidilla ja "tärkkelys" hydrolysoidaan entsymaattisesti:

5.1.1 Näytteen paino valitaan seuraavasti oletetun tärkkelyspitoisuuden (tärkkelyspitoisuus saa olla enintään 0,4 g näytettä kohden) mukaisesti:

⁽¹⁾ U on entsyymiaktiivisuuden kansainvälinen yksikkö.

Tuotteen oletettu tärkkelyspitoisuus, g/100 g	Näytteen paino grammoina noin (p)	Mittapullon tilavuus, ml	Laimennuskerron yhdeksi litraksi (f)
> 70	0,35–0,4	500	2
20–70	enintään 0,5	500	2
5–20	enintään 1	250	4
< 5	enintään 2	200	5

- 5.1.2 Punnitaan näytettä räsmälleen 0,1 mg.
- 5.1.3 Lisätään 50 ml 0,5 N natriumhydroksidiliuosta (3.1) ja sekoitetaan jatkuvasti 30 minuuttia vesihauteessa (4.1) magneettisekoittajalla 60 °C:ssa.
- 5.1.4 Lisätään muutama ml väkevää etikkahappoa (3.2) ja saatetaan pH:ksi 4,6–4,8.
- 5.1.5 Asetetaan vesihauteeseen magneettisekoittajan kanssa (4.1) 60 °C:seen, lisätään 1,0 ml entsyymiliuosta (3.3) ja annetaan reagoida samalla jatkuvasti sekoittaen 30 minuuttia.
- 5.1.6 Jäähdytyksen jälkeen siirretään kvantitatiivisesti mittapulloon (5.1.1) ja täytetään merkkiin vedellä.
- 5.1.7 Tarvittaessa suodatetaan laskostetun suodattimen läpi (ks. Huomautus 1).
- 5.2. *Glukoosin kvantitatiivinen määrittäminen:*
- 5.2.1 Koeliuksessa on oltava 100–1 000 mg glukoosia litraa kohden, mikä vastaa ΔE_{340} -arvoa 0,1–1,0.
- Koeliuksen absorbanssi laimennoksena 1 + 30 veden kanssa ei saa olla suurempi kuin 0,4 (mitattuna suhteessa ilmaan) aallonpituudella 340 nm.
- 5.2.2 Saatetaan puskuriliuos (3.4) huoneenlämpöiseksi (20 °C).
- 5.2.3 Reagenssien ja näytteen lämpötilan on oltava 20–25 °C.
- 5.2.4 Mitataan absorbanssi aallonpituudella 340 nm suhteessa ilmaan (eli vertailuvälissä ei optista kyvettä).
- 5.2.5 Pipetoidaan seuraavan taulukon mukaisesti:

Kaadetaan optisiin kyvetteihin:	Kontrolli (ml)	Koe (ml)
Puskuriliuos (3.4 reagenssi)	1,00	1,00
NADP (3.5 reagenssi)	0,10	0,10
ATP (3.6 reagenssi)	0,10	0,10
Koeliuos (5.1.6 tai 5.1.7)	–	0,10
Kahdesti tislattu vesi	2,00	1,90

Sekoitetaan ja noin 3 minuutin kuluttua mitataan liuosten absorbanssi (E_1). Aloitetaan reaktio lisäämällä:

HK/G6P-DH (3.7 reagenssi)	0,02	0,02
---------------------------	------	------

Sekoitetaan, annetaan reaktion edetä loppuun (noin 15 minuuttia) ja mitataan liuosten absorbanssi (E_2). Jos reaktio ei ole pysähtynyt 15 minuutin kuluttua, absorbanssit luetaan 5 minuutin välein, kunnes nousunopeus on vakio. Tämän jälkeen ekstrapoloidaan taaksepäin suspension (3.7) lisäämishetkeen (ks. Huomautus 2).

- 5.2.6 Lasketaan absorbanssierot nolhareagenssille ja näytteelle ($E_2 - E_1$).

Vähennetään nolhareagenssin absorbanssiero ($\Delta E_{\text{nolhareagenssi}}$) näytteen vastaavasta ($\Delta E_{\text{näyte}}$):

$$\Delta E = \Delta E_{\text{näyte}} - \Delta E_{\text{nolhareagenssi}}$$

Tämä erotus antaa koeliuksen glukoosipitoisuuden:

$$\text{Gl} = \frac{\text{Koeliuksen sisältämä glukoosipitoisuus, g/l}}{6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1\,000} \times \Delta E_{340} = 0,921 \times \Delta E_{340}$$

(3,22: mitattavan liuoksen tilavuus; 1: kyvetin paksuus; 0,1: näyteliuoksen tilavuus; Glukoosin moolimassa on 180,16 (g/mol)).

- 5.2.7 Jos mittausta ei jostakin syystä voida tehdä aallonpituudella 340 nm, se voidaan tehdä aallonpituudella 365 nm tai 334 nm, luku 6,3 edellisessä Gl:n kaavassa on sitten korvattava luvulla 3,5 tai vastaavasti luvulla 6,18.

6 **Laskutapa ja tulosten ilmaiseminen**

- a) E = Tärkkelyspitoisuus ilmaistuna g/100 g:

$$E = \frac{100 \times 0,9 \times Gl}{p \times f}$$

- b) Z = "Glukoosi" pitoisuus ilmaistuna g/100 g:

$$Z = \frac{100 \times Gl}{p \times f}$$

joissa

Gl = glukoosi ilmaistuna g/l (5.2.6),

f = laimennoskerroin (5.1.1),

p = näytteen paino grammoina;

0,9 = glukoosin muunnoskerroin tärkkelykseksi.

Huomautukset:

- 1) Jos koeliuosta ei voida suodattaa 5.1.7 kohdan mukaisesti, on tehtävä asianmukaiset toimenpiteet kirkkaan liuoksen saamiseksi.
 - 2) Jos esiintyy entsyymien inhibitiota, suositellaan käytettäväksi menetelmää, jossa lisätään tunnettuja määriä puhdasta tärkkelystä.
-

LIITE II

**YHDISTETYN NIMIKKEISTÖN NIMIKKEISIIN 3505 20 10–3505 20 90 KUULUVIEN
TAVAROIDEN TÄRKKELYSTEN TAI DEKSTRIINIEN TAI MUIDEN MUUNNETTUIJEN
TÄRKKELYSTEN PITOISUUDEN JA YHDISTETYN NIMIKKEISTÖN NIMIKKEISIIN
3809 10 10–3809 10 90 KUULUVIEN TAVAROIDEN AMYLAASISTEN AINEIDEN
PITOISUUDEN MÄÄRITYS**

I Periaate

Tärkkelys muutetaan happohydrolyysillä pelkistäviksi sokereiksi, jotka määritetään tilavuuteen perustuen Fehlingin liuosta käyttäen.

II Välineistö ja reagenssit

1. 250 ml pullo;
2. 200 ml mittapullo;
3. 25 ml mittabyretti;
4. Vetykloridihappo, tiheys 1,19;
5. Kaliumhydroksidiliuos;
6. Väriä poistava puuhiili;
7. Fehlingin liuos;
8. Metyleenisininen liuos (1 %).

III Menetelmä

Noin 1 g tärkkelystä sisältävä näyte laitetaan 250 ml:n pulloon. Lisätään 100 ml tislattua vettä ja 2 ml vetykloridihappoa. Saatetaan kiehuvaaksi ja refluksoidaan 3 tuntia.

Sirretään pullon sisältö ja huuhtelunesteet 200 ml:n mittapulloon. Jäähdytetään ja tehdään lähes neutraaliksi kaliumhydroksidiliuoksella. Lisätään tislattua vettä 200 ml:ksi ja suodatetaan pienen määrän väriä poistavan puuhiilen läpi.

Tämän jälkeen liuos kaadetaan mittabyrettiin ja pelkistetään 10 ml Fehlingin liuosta seuraavalla menetelmällä:

Noin 250 ml:n tasapohjaiseen pulloon kaadetaan 10 ml Fehlingin liuosta (5 ml liuosta A ja 5 ml liuosta B). Ravistetaan, kunnes liuos on kirkas ja lisätään 40 ml tislattua vettä ja pieni määrä kvartsia tai hohkakiveä.

Asetetaan pullo neliön muotoiselle asbestilevyille, jossa on halkaisijaltaan noin 6 cm pyöreä reikä keskellä, asbestin ollessa puolestaan metallilankaverkkopalan päällä. Kuumennetaan pulloa sellaisella nopeudella, että neste alkaa kiehua noin 2 minuutin kuluttua.

Byretistä lisätään kiehuvaan nesteeseen vähitellen sokeriliuosta, kunnes Fehlingin liuoksen sininen väri tulee tuskin havaittavaksi; sitten lisätään 2 tai 3 pisaraa metyleenisinistä liuosta indikaattoriksi ja titrataan loppuun lisäämällä edelleen sokeriliuosta tipoitain, kunnes indikaattorin sininen väri häviää.

Suurempaa tarkkuutta varten toistetaan titraus samoissa olosuhteissa, mutta lisäämällä katkoitta lähes koko määrä Fehlingin liuoksen pelkistämiseksi tarvittavasta sokeriliuoksesta. Tässä toisessa titrauksessa Fehlingin liuos olisi pelkistytävä 3 minuutissa.

Jatketaan kiehuttamista edelleen täsmälleen 2 minuuttia lisäten reagenssi minuutissa tipoitain kiehuvaan liuokseen, kunnes sininen väri katoaa.

Näytteen sisältämän tärkkelyksen painoprosentti määritetään seuraavalla kaavalla:

$$\% \text{ tärkkelystä} = \frac{T \times 200 \times 100}{n \times p} \times 0,95$$

jossa:

T = on vedettömän dekstroosin määrä grammoina, joka vastaa 10 ml Fehlingin liuosta (5 ml liuosta A ja 5 ml liuosta B). Tämä tiitteri vastaa 0,04945 g vedetöntä dekstroosia, kun liuos A sisältää 17,636 g kuparia litraa kohden;

- n = on titraukseen käytetyn sokeriliuoksen ml-määrä;
p = on näytemäärän paino;
0,95 = on vedettömän dekstroosin muunnostekijä tärkkelykseksi.

IV Fehlingin liuosten valmistus

Liuos A: Mittapullossa liuotetaan 69,278 g puhdasta kiteistä kuparisulfaattia – analyysilaatua ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) – jossa ei ole rautaa, veteen ja täytetään tilavuudeksi 1 litra tislattulla vedellä. Tämän liuoksen täsmällinen pitoisuus on tarkastettava kuparin kvantitatiivisella määrityksellä.

Liuos B: Mittapullossa liuotetaan 100 g natriumhydroksidia ja 346 g natriumkaliumtartraattia (Rochellen suolaa) tislattuun veteen ja täytetään tilavuudeksi 1 litra tislattulla vedellä.

Nämä kaksi liuosta A ja B sekoitetaan yhtä suurina määrinä välittömästi ennen käyttöä. 10 ml Fehlingin liuosta (5 ml liuosta A ja 5 ml liuosta B) pelkistetään täysin III kohdassa kuvatuissa olosuhteissa 0,04945 g:lla vedetöntä dekstroosia.

LIITE III

HIENOJEN TAI KARKEIDEN VEHNÄJAUHOJEN HAVAITSEMINEN MAKARONISSA, SPAGETISSA JA VASTAAVISSA TUOTTEISSA (PASTA)

(Youngin ja Gillesin menetelmän mukaisesti, Bernaertsin ja Grunerin muuttamana)

I Periaate

Määritettävän pastanäytteen uute valmistetaan käyttäen polaaritonta liuotinta.

Tämä uute kromatografoidaan silikageelin ohutkerroksesta jakeiden eri vyöhykkeissä esiintyvien sterolien erottamiseksi.

Kirkkaanväristen vyöhykkeiden määrän mukaan on mahdollista määrittää, onko tutkittava tuote valmistettu ainoastaan durumvehnästä vai hienosta vehnäjauhosta vai näiden kahden seoksesta. On myös mahdollista määrittää, onko lisätty muniä.

II Välineistö ja reagenssit

1. Homogenisaattori tai jauhin rouheen saamiseksi, joka läpäisee 0,200 mm silmäisen standardiseulan;
2. Standardiseula, jossa 0,200 mm silmäkoko;
3. Haihdutin vesihautella alennetussa paineessa haihduttamiseksi;
4. Lasilevy, alumiinilevy tai muu soveltuva tausta kooltaan 20 cm × 20 cm, päällystettynä ohuella silikageelikerroksella. Jos ohutkerros on valmistettava, olisi käytettävä silikageeliä sekoitettuna noin 13 % kipsilaastin kanssa, ja se olisi levitettävä 0,25 mm kerroksena soveltuvan laitteen avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti;
5. Mikropipetti 20 mikrolitran mittaamiseksi;
6. Kannellinen säiliö, joka soveltuu kromatogrammien kehittämiseen;
7. Sumutuskoe;
8. Petrolieetteriä, jonka kiehumispiste on välillä 40–60 °C, toistotislattuna ennen käyttöä;
9. Vedetöntä etyylicetteriä määrittystä varten;
10. Hiilitetrakloridia kromatografiaa varten, toistotislattuna ennen käyttöä;
11. Fosfomolybdeenihappoa määrittystä varten;
12. 94 ° etyylialkoholia.

III Menetelmä

Jauhetaan noin 20 g määritettävää näytettä siten, että se läpäisee kokonaisuudessaan seulan. Laitetaan näyte erlenmeyerpullon ja peitetään 150 ml:lla petrolieetteriä. Jätetään normaaliin lämpötilaan seuraavaksi päiväksi. Ravistellaan silloin tällöin.

Tämän jälkeen suodatetaan Buchner-suppilon läpi, jossa on suodatuksen apuainetta tai sintrattu suodatin. Näin saatu kirkas liuos siirretään asteittain 100 ml:n kalibroituun pulloon. Haihdutetaan liuotin alennetussa paineessa kuumentamalla pulloa vesihautessa 40–50 °C:ssa. Kun liuotin on haihtunut, kuumentetaan alennetussa paineessa edelleen 10 minuuttia.

Kun pullo on jäähtynyt, määritetään uutteen paino. Laimennetaan uute etyylicetterillä suhteessa 1 ml etyylicetteriä 60 mg uutetta kohden.

Aktivoidaan ohutkerrokset nostamalla niiden lämpötila 130 °C:seen 3 tunniksi. Annetaan jäähtyä silikageeliä sisältävässä eksikaattorissa. Levyt, joita ei käytetä välittömästi voidaan säilyttää samassa eksikaattorissa.

Lisätään tipoittain 20 mikrolitraa kirkasta liuosta vakioleveyksisen vyöhykkeen muodostamiseksi, pituudeltaan 3 cm, mieluiten vasta aktivoidun kerroksen päälle. Annetaan liuottimen haihtua.

Kehitetään kromatogrammi normaalissa lämpötilassa hiilitetrakloridilla käyttäen kromatogrammisäiliötä, jonka seinämät on peitetty liuottimessa liotetulla suodatinpaperilla. Noin tunnin kuluttua liuotin saavuttaa 18 cm korkeuden. Poistetaan levy ja jätetään liuotin haihtumaan avonaisesti. Vyöhykkeiden paremmin erottamiseksi kromatogrammi kehitetään toiseen kertaan. Annetaan liuottimen jälleen haihtua avonaisesti.

Sumutetaan ohut silikageelikerros etyylialkoholissa olevalla 20 % fosfomolybdeenihappoliuoksella. Kerroksen värin on oltava tasaisen keltainen. Kehitetään vyöhykkeet kuumentamalla sumutettua levyä 110 °C:ssa 5 minuuttia.

IV Kromatogrammin tulkinta

Jos kromatogrammissa esiintyy 1 pääasiallinen kirkasvärinen vyöhyke, jonka R_f on noin 0,4–0,5, kyseisen pastan valmistukseen käytetty vehnä on durumvehnää. Toisaalta, jos esiintyy 2 pääasiallista kirkkaudeltaan yhtäläistä vyöhykettä, käytetty raaka-aine on ollut hienoa vehnäjauhoa. Durumvehnän ja hienon vehnäjauhon seokset voidaan määrittää arvioimalla 2 vyöhykkeen suhteellista kirkkautta.

Jos esiintyy 3 vyöhykettä (löydetään 2 vyöhykettä korkeudella, jossa hienon vehnäjauhon pääasialliset vyöhykkeet sijaitsevat, sekä vyöhyke näiden välissä), pastaan on lisätty muniä. Tällöin käytetty raaka-aine on durumvehnää, jos keskimäinen vyöhyke on kirkkaampi kuin ylempi vyöhyke. Toisaalta, jos ylempi vyöhyke on keskimäistä vyöhykettä kirkkaampi, käytetty raaka-aine on ollut hienoa vehnäjauhoa.
