

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 1459/98,
annettu 8 päivänä heinäkuuta 1998,
voiöljyn, voin tai kerman vanilliinipitoisuuden määrittämisen vertailumenetelmästä

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 asetuksella (EY) N:o 1587/96⁽²⁾, ja erityisesti sen 6 artiklan 6 kohdan ja 12 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo, että

voin myynnistä alennettuun hintaan sekä konditoriatuotteiden, jäätelöiden ja muiden elintarvikkeiden valmistukseen tarkoitettulle kermalle, voille ja voiöljylle myönnettävästä tuesta 15 päivänä joulukuuta 1997 annetussa komission asetuksessa (EY) N:o 2571/97⁽³⁾ säädetään merkkiaineiden lisäämisestä kermaan, voihin ja voiöljyyn tietyissä olosuhteissa sen varmistamiseksi, että kyseisiä tuotteita käytetään lopputuotteisiin oikealla tavalla,

järjestelmän moitteettoman toiminnan ja siihen osallistuvien toimijoiden yhtäläisen kohtelun varmistamiseksi on aiheellista ottaa käyttöön asetuksessa (EY) N:o 2571/97 säädettyjen merkkiaineiden määrittämistä koskevat yhteiset menetelmät,

tällaisen vertailumenetelmien vahvistaminen samanaikaisesti kaikille merkkiaineille on vaikeaa; voiöljyn, voin ja

kerman vanilliinipitoisuuden määrittämisessä sovellettavan vertailumenetelmän vahvistaminen on kehitysaskel tähän suuntaan, ja

tässä asetuksessa säädetty toimenpiteet ovat maito- ja maitotuotealan hallintokomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Liitteessä kuvattua määritysmenetelmää sovelletaan vertailumenetelmänä määritettäessä voiöljyn, voin ja kerman vanilliinipitoisuutta asetuksen (EY) N:o 2571/97 mukaisesti.

Voiöljy, voi ja kerma on merkitty asetuksen (EY) N:o 2571/97 mukaisesti, jos saadut tulokset vastaavat liitteen 8 kohdan vaatimuksia.

2 artikla

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

Sitä sovelletaan 1 päivästä syyskuuta 1998.

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

Tehty Brysselissä 8 päivänä heinäkuuta 1998.

Komission puolesta

Franz FISCHLER

Komission jäsen

⁽¹⁾ EYVL L 148, 28.6.1968, s. 13

⁽²⁾ EYVL L 206, 16.8.1996, s. 21

⁽³⁾ EYVL L 350, 20.12.1997, s. 3

LIITE

Voiöljyn, voin tai kerman vanilliinipitoisuuden määrittäminen HPLC-menetelmällä

1. *Tarkoitus ja soveltamisala*

Tässä kuvataan menetelmä vanilliinin kvantitatiiviseksi määrittämiseksi voiöljystä, voista tai kermasta. Sitä voidaan soveltaa asetuksen (EY) N:o 2571/97 mukaisesti otettuihin näytteisiin.
2. *Periaate*

Tietynsuuruinen näyte uutetaan isopropanoli/etanoli/asetonitrili -seoksella (1:1:2). Pääosa rasvasta saostetaan jäädyttämällä -15°C — -20°C :een välillä, minkä jälkeen näyte sentrifugoidaan. Laimennetaan vedellä, minkä jälkeen määritetään vanilliinipitoisuus HPLC-menetelmällä.
3. *Välineet*

Tavalliset laboratoriovälineet ja erityisesti seuraavat:

 - 3.1 Pakastin, lämpötilansäätö välillä -15°C — -20°C
 - 3.2 2 ml:n kertakäyttöruiskuja
 - 3.3 Kalvosuodattimia, huokoskoko $0,45\ \mu\text{m}$, joka kestää 5 % uuttoliuosta (4.4) sisältävää liuosta.
 - 3.4 Nestekromatografi, johon kuuluu pumppu (virtaus $1,0\ \text{ml/min}$), injektio- (tilavuus $20\ \mu\text{l}$, käsikäyttöinen tai automaattinen), UV-detektori (aallonpituus $306\ \text{nm}$, $0,01\ \text{AU}$ täysi asteikko), piirturi tai integraattori ja 25°C :een termostoitu kolonni.
 - 3.5 HPLC-kolonni (pituus $250\ \text{mm}$, sisähalkaisija $4,6\ \text{mm}$) pakattu LiChrosper RP 18:lla (Merck, $5\ \mu\text{m}$) tai vastaavalla
 - 3.6 Esikolonni (pituus noin $20\ \text{mm}$, sisähalkaisija $3\ \text{mm}$) kuivapakattu Perisorb RP 18:lla ($30-40\ \mu\text{m}$) tai vastaavalla.
4. *Reagenssit*

Kaikkien käytettävien reagenssien on oltava analyysipuhtausluokkaa.

 - 4.1 Isopropanoli
 - 4.2 Etanoli 96 % (v/v)
 - 4.3 Asetonitrili
 - 4.4 Uuttoliuos

Sekoitetaan isopropanoli (4.1), etanoli (4.2) ja asetonitrili (4.3) suhteessa 1:1:2 (V/V).

 - 4.5 Vanilliini (4-hydroksi-3-metoksibentsaldehydi)
 - 4.5.1 Vanilliinin kantaliuos (= $500\ \mu\text{g/ml}$)

Punnitaan $0,1\ \text{mg:n}$ tarkkuudella noin $50\ \text{mg}$ (CM mg) vanilliinia (4.5) $100\ \text{ml:n}$ mittapulloon, lisätään $25\ \text{ml}$ uuttoliuosta (4.4) ja täytetään merkkiin vedellä.
 - 4.5.2 Vanilliinin standardiliuos (= $10\ \mu\text{g/ml}$)

Pipetoidaan $5\ \text{ml}$ vanilliinin kantaliuosta (4.5.1) $250\ \text{ml:n}$ mittapulloon ja täytetään merkkiin vedellä.
 - 4.6 Metanoli, HPLC-laatu
 - 4.7 Jäätikka
 - 4.8 Vesi, HPLC-laatu
 - 4.9 HPLC-liikkuva faasi

Sekoitetaan $300\ \text{ml}$ metanolia (4.6), noin $500\ \text{ml}$ vettä (4.8) ja $20\ \text{ml}$ etikkahappoa (4.7) $1\ 000\ \text{ml:n}$ mittapullossa ja täytetään merkkiin vedellä (4.8). Suodatetaan $0,45\ \mu\text{m:n}$ suodattimen läpi.
5. *Menettely*
 - 5.1 Testinäytteen valmistelu
 - 5.1.1 Voi

Lämmitetään näytettä kunnes se alkaa sulaa. Varotaan lämpötilan kohoamista paikallisesti yli 40°C :een. Kun näyte on tarpeeksi juokseva, homogenoidaan ravistamalla. Sekoitetaan voita $15\ \text{sekunnin}$ ajan ennen näytteen ottamista. Punnitaan $1\ \text{mg:n}$ tarkkuudella noin $5\ \text{g}$ (SM g) voita $100\ \text{ml:n}$ mittapulloon.

5.1.2 Voiöljy

Juuri ennen näytteenottoa pidetään voiöljyä sisältävää astiaa 40–50 °C:ssa lämpökaapissa kunnes öljy on sulanut täysin. Sekoitetaan näyte pyörittävällä liikkeellä tai sekoittamalla välttämättä liian voimakkaasta sekoittamisesta aiheutuvia ilmakuplia. Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 4 g (SM g) voiöljyä 100 ml:n mittapulloon.

5.1.3 Kerma

Lämmitetään näyte vesihauteessa tai lämpökaapissa 35–40 °C lämpötilassa. Sekoitetaan tasaiseksi pyörittävällä liikkeellä tai sekoittamalla. Jäähdytetään näyte nopeasti 20 ± 2 °C:seen. Jos näyte ei ole homogeeninen, toistetaan sama menettely. Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 10 g (SM g) kermaa 100 ml:n mittapulloon.

5.2 Testiliuoksen valmistus

Lisätään noin 75 ml uuttoliuosta (4.4) testiannokseen (5.1.1, 5.1.2 tai 5.1.3), sekoitetaan tai ravistellaan voimakkaasti noin 15 minuutin ajan ja täytetään merkkiin uuttoliuoksella (4.4). Siirretään noin 10 ml tätä uutetta tulpalla varustettuun koeputkeen. Sijoitetaan koeputki pakastimeen (3.1) noin 30 minuutiksi. Sentrifugoidaan kylmää uutetta 5 minuuttia noin 2 000 kierrosta minuutissa ja dekantoidaan viipymättä. Annetaan dekantoidun liuoksen jäähtyä huoneenlämpöiseksi. Pipetoidaan 5 ml dekantoitunutta liuosta 100 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin vedellä. Suodatetaan osa siitä kalvosuodatimen läpi (3.3). Suodos on valmis HPLC-määrittelyyn.

5.3 Kalibrointi

Pipetoidaan 5 ml vanilliinin standardiliuosta (4.5.2) 100 ml:n mittapulloon. Lisätään 5 ml uuttoliuosta (4.4) ja täytetään merkkiin vedellä. Tämä liuos sisältää 0,5 µg/ml vanilliinia.

5.4 Määrittäminen HPLC-menetelmällä

Annetaan kromatografialaitteen stabiiloitua noin 30 minuutin ajan. Injisoidaan standardiliuos (5.3). Toistetaan kunnes kahden perättäisen injektoinnin piikin pinta-alan tai korkeuden välinen ero on alle 2 %. Edellä kuvatuissa olosuhteissa vanilliinin retentioaika on noin 9 minuuttia. Analysoidaan standardiliuos (5.3) kahdesti injisoimalla 20 µl. Injisoidaan 20 µl testiliuosta (5.2). Määritetään saadun vanilliinipiikin pinta-ala tai korkeus. Toistetaan standardiliuoksen (5.3) kaksoismääritys, kun testinäytettä on injisoitu 10 kertaa (5.2).

6. Tulosten laskeminen

Lasketaan vanilliinipiikkien keskimääräinen piikin pinta-ala (tai korkeus) (AC) kaksoismäärityksistä molempien testiliuossarjojen alussa ja lopussa (yhteensä 4 pinta-alaa).

Lasketaan vastekerroin (R):

$$R = AC/CM$$

jossa CM on vanilliinin massa milligrammoina (4.5.1).

Tekstinäytteen vanilliinipitoisuus (C, mg/kg) saadaan seuraavalla kaavalla:

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

jossa:

AS = testinäytteen vanilliinipiikin pinta-ala

SM = testinäytteen massa grammoina (5.1.1, 5.1.2 tai 5.1.3)

20 = kerroin, jolla otetaan huomioon standardi- ja testinäytteiden laimennokset

0,96 = korjauskerroin testinäytteen ensimmäisen laimennoksen rasvapitoisuudelle

Huomautus:

Piikin pinta-alan sijasta voidaan käyttää piikin korkeuksia (ks. 8.3)

7. Menetelmän tarkkuus

7.1 Toistettavuus (r)

Kahden mahdollisimman lyhyellä aikavälillä saman suorittajan samaa laitteistoa käyttäen samasta testiaineistosta tekemän määrittelyksen tulosten välinen ero ei saa olla yli 16 mg/kg.

7.2 Uusittavuus (R)

Kahden eri laboratorioissa eri laitteistoa käyttäen samasta testiaineistosta suoritetun määrittelyksen tulosten välinen ero ei saa olla yli 27 mg/kg.

8. *Toleranssirajat*

- 8.1 Merkitystä tuotteesta on otettava kolme näytettä homogeneisuuden tarkistamiseksi.
- 8.2 Vaniljasta tai synteettisestä vanilliinista saatu merkkiaine.
- 8.2.1 4-hydroksi-3-metoksibentsaldehydin lisäysmäärä on 250 grammaa tonnia kohden.
- 8.2.2 Otettaessa 95 %:n todennäköisyystason kriittinen ero (CrD_{95}) huomioon, kustakin kolmesta homogeenisuuden tarkistamista varten otetusta näytteestä tehtyjen rinnakkaismääritysten näytekohtainen keskiarvo ei saa olla alle 236,0 mg/kg.
- 8.2.3 Edellä 8.2.2 kohdassa annetun perusteen lisäksi alhaisinta tuotteen analyysistä saatua tulosta käytetään merkkiaineen tasaisen jakautumisen tarkastamiseksi. Tähän päästään vertaamalla seuraaviin raja-arvoihin:
- 221,5 mg/kg (95 % pienimmästä lisäysmäärästä, kun yksittäisen näytteen CrD_{95} otettu huomioon);
 - 159,0 mg/kg (70 % pienimmästä lisäysmäärästä, kun yksittäisen näytteen CrD_{95} otettu huomioon).
- Alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta käytetään interpoloinnissa välillä 221,5 mg/kg ja 159,0 mg/kg.
- 8.3 Vaniljakodista tai näiden kokonaisuutteista saatu merkkiaine.
- 8.3.1 4-hydroksi-3-metoksibentsaldehydin lisäysmäärä on 100 grammaa tonnia kohden.
- 8.3.2 Otettaessa 95 %:n todennäköisyystason kriittinen ero (CrD_{95}) huomioon, kustakin kolmesta homogeenisuuden tarkistamista varten otetusta näytteestä tehtyjen rinnakkaismääritysten näytekohtainen keskiarvo ei saa olla alle 86,0 mg/kg.
- 8.3.3 Edellä 8.3.2 kohdassa annetun perusteen lisäksi alhaisinta tuotteen analyysistä saatua tulosta käytetään merkkiaineen tasaisen jakautumisen tarkastamiseksi. Tähän päästään vertaamalla seuraaviin raja-arvoihin:
- 79,0 mg/kg (95 % pienimmästä lisäysmäärästä, kun yksittäisen näytteen CrD_{95} otettu huomioon);
 - 54,0 mg/kg (70 % pienimmästä lisäysmäärästä, kun yksittäisen näytteen CrD_{95} otettu huomioon).
- Alhaisimman tuloksen antaneen näytteen merkkiainepitoisuutta käytetään interpoloinnissa välillä 79,0 mg/kg ja 54,0 mg/kg.

9. *Huomautukset*

- 9.1 Toistettavuus r on arvo, jonka alapuolella samalla menetelmällä samasta testiaineistosta samoissa olosuhteissa (sama laitteisto, sama laboratorio ja lyhyt aikaväli) saadun kahden yksittäisen testituloksen välinen absoluuttinen ero sijaitsee tietyllä todennäköisyydellä; jollei muuta mainita, todennäköisyys on 95 %.
- 9.2 Uusittavuus R on arvo, jonka alapuolella samalla menetelmällä samasta testiaineistosta eri olosuhteissa (eri suorittaja, eri laitteisto, eri laboratorio ja/tai eri ajankohta) saadun kahden yksittäisen testituloksen välinen absoluuttinen ero sijaitsee tietyllä todennäköisyydellä; jollei muita tietoja ole, todennäköisyys on 95 %.
- 9.3 Lisätyn vanilliinin takaisinsaanto tasolla 250 mg/kg voiöljyä vaihtelee välillä 97,0–103,8. Todettu keskimääräinen pitoisuus oli 99,9 % ja sen standardipikkeama 2,7 %.
- 9.4 Standardiliuos sisältää 5 % uuttoliuosta, joka kompensoi testinäytteiden 5 %:n uuttoliuospitoisuudesta aiheutuvaa piikkien laajenemista. Tämän ansiosta kvantitatiivinen määrittäminen voidaan suorittaa piikkien korkeuden avulla.
- 9.5 Analyysi perustuu lineaariseen kalibrointikäyrään, jonka leikkauspiste on nollassa. Lineaarisuus tulisi tarkastaa käyttäen standardilioksen (4.5.2) sopivia laimennoksia ensimmäistä analyysia suoritettaessa ja sen jälkeen säännöllisin väliajoin sekä aina, kun HPLC-laitteistoon on tehty muutoksia tai sitä on korjattu.