

## I

(Besluiten waarvan de publikatie voorwaarde is voor de toepassing)

VERORDENING (EEG) Nr. 2188/81 VAN DE COMMISSIE

van 28 juli 1981

tot wijziging van Verordening (EEG) nr. 625/78 houdende uitvoeringsbepalingen voor de openbare opslag van magere-melkpoeder

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE  
GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 804/68 van de Raad van 27 juni 1968 houdende een gemeenschappelijke ordening der markten in de sector melk en zuivelproducten <sup>(1)</sup>, laatstelijk gewijzigd bij de Akte van Toetreding van Griekenland, en met name op artikel 7, lid 5,

Overwegende dat bijlage I van Verordening (EEG) nr. 625/78 van de Commissie <sup>(2)</sup>, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 2937/80 <sup>(3)</sup>, waarin de kwaliteitseisen zijn bepaald waaraan magere-melkpoeder moet voldoen om voor interventie te kunnen worden aangeboden, met name bepaalde voorschriften bevat betreffende analysemethodes voor het opsporen van wei door het bepalen van sommige bestanddelen van het magere-melkpoeder; dat voetnoot <sup>(2)</sup> van genoemde bijlage bepaalt dat de voor genoemde bestanddelen in aanmerking te nemen communautaire grenswaarden zullen worden vastgesteld na een proefperiode in de Lid-Staten;

Overwegende dat het momenteel mogelijk is om voor de gehele Gemeenschap een analysemethode vast te stellen voor het bepalen van de lebwei in magere-melkpoeder door het bepalen van het vrije sialinezuur; dat het evenwel wenselijk is deze controlemethode slechts verplicht te stellen na een periode die nodig is om de controle-instanties en het bedrijfsleven met deze analyse-methode vertrouwd te maken;

Overwegende dat de in deze verordening vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Comité van beheer voor melk en zuivelproducten,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

1. Bijlage I van Verordening (EEG) nr. 625/78 wordt als volgt gewijzigd:

a) In punt 2, sub b), wordt het tweede streepje als volgt gelezen:

„— wei:

bepaling van het vrije sialinezuur <sup>(2)</sup> en/of van het cysteïne-cystine complex voor zover één van de drie verplichte proeven, te weten die van de glycomacropetiden van wei (bepaald door middel van een vereenvoudigde proef), die van de lactaten of die van de as, een waarde geeft die hoger is dan respectievelijk 3 %, 150 mg/100 g en 8 %.”.

b) Voetnoot <sup>(2)</sup> wordt als volgt gelezen:

„<sup>(2)</sup> Voor het onderzoek op lebwei door bepaling van vrij sialinezuur dient met ingang van 1 januari 1982 de in bijlage IV vastgestelde analysemethode te worden toegepast.”.

2. De bijlage van deze verordening wordt als bijlage IV toegevoegd aan Verordening (EEG) nr. 625/78.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

<sup>(1)</sup> PB nr. L 148 van 28. 6. 1968, blz. 13.

<sup>(2)</sup> PB nr. L 84 van 31. 3. 1978, blz. 19.

<sup>(3)</sup> PB nr. L 305 van 14. 11. 1980, blz. 13.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke Lid-Staat.

Gedaan te Brussel, 28 juli 1981.

*Voor de Commissie*

*De Voorzitter*

Gaston THORN

## BIJLAGE

## „BIJLAGE IV

ONDERZOEK OP WEI IN MAGERE-MELKPOEDER BESTEMD VOOR OPENBARE OPSLAG  
DOOR MIDDEL VAN BEPALING VAN DE HOEVEELHEID VRIJ SIALINEZUUR

## 1. Doel en toepassingsgebied

Op grond van deze methode kan de aanwezigheid van leibwei in magere-melkpoeder bestemd voor openbare opslag worden aangetoond.

## 2. Beginsel van de methode

Bij de stremming van melk door de werking van het leibferment, komen caseïneglykomacropetiden met een hoog sialinezuurgehalte vrij. De bepaling van de hoeveelheid sialinezuur (*N*-acetylneuraminezuur) biedt de mogelijkheid de eventuele aanwezigheid van leibwei in het melkpoeder vast te stellen. Na reconstitutie van melk uit poeder, worden de glykomacropetiden die het sialinezuur bevatten, neergeslagen door fosforwolframzuur, uitgaande van een trichloorazijnfuraat à 12 %. Het sialinezuur dat door zure hydrolyse wordt vrijgemaakt, vormt met het resorcinol een gekleurd complex dat met spectrofotometrie à 580 nm wordt gemeten.

## 3. Reagentia

Alle reagentia zijn van de p.a. kwaliteit. Het water is gedistilleerd of gedestilleerd.

## 3.1. Oplossing van trichloorazijnzuur (TCA)

Los 240 g trichloorazijnzuur op in water en vul aan tot 1 000 ml.

## 3.2. Oplossing van fosforwolframzuur

Los 20 g fosforwolframzuur op in water en vul aan tot 100 ml.

## 3.3. Ethanol à 95 % (v/v).

## 3.4. Zwavelzuuroplossing van ongeveer 0,1 N

Los 28,1 ml geconcentreerd zwavelzuur (95 %  $H_2SO_4$ ) op in water en vul aan tot 1 000 ml, zodat een zwavelzuuroplossing van 1 N wordt verkregen.

Los 100 ml zwavelzuur 1 N op in water en vul aan tot 1 000 ml, zodat een zwavelzuuroplossing van 0,1 N wordt verkregen.

## 3.5. Acetaatbuffer, pH 4,8

Los 19,7 g waterrij natriumacetaat op in water, voeg 9 ml glaciaal azijnzuur toe en vul met water aan tot 1 000 ml.

Controleer en corrigeer eventueel pH.

## 3.6. Kopersulfaatoplossing 0,1 M

Los 2,497 g kopersulfaat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) op in water en vul aan tot 100 ml met water.

## 3.7. Resorcine-oplossing à 2 %

Los 2 g resorcine op in water en vul aan tot 100 ml met water. Deze oplossing blijft 4 maanden stabiel bij 5-8 °C.

- 3.8. Reagens met resorcinol  
Los 10 ml resorcine-oplossing (3.7), 80 ml geconcentreerd chloorwaterstofzuur ( $d_{20}^C = 1,19 \text{ g/l}$ ) en 0,25 ml kopersulfaatoplossing (3.6) op en vul aan tot 100 ml met water. Bereid deze oplossing de dag dat ze zal worden gebruikt.
- 3.9. Isoamylalcohol.
- 3.10. Oplossing van *N*-acetylneuraminezuur (sialinezuur)  
Los 20 mg *N*-acetylneuraminezuur op in water en vul aan tot 100 ml met water. Deze oplossing kan niet langer dan een week bij +4 °C worden bewaard.
4. **Instrumenten en apparatuur**
- 4.1. Analytische balans.
- 4.2. Magnetische roerder, met teflon beklede magnetische staafjes van 2 cm lengte.
- 4.3. pH-meter.
- 4.4. Centrifuge waarmee een centrifugale kracht van 3 000 g kan worden bereikt.
- 4.5. Centrifugeertubes met een capaciteit van ongeveer 75 ml.
- 4.6. Waterbad met thermostaat, afstelbaar op 80 °C.
- 4.7. Bad met kokend water.
- 4.8. Filters (Schleicher en Schüll nr. 589<sup>2</sup>, type „Weissband”) met een diameter van 125 mm of van gelijke kwaliteit.
- 4.9. Glazen trechters met een diameter van ongeveer 7 cm.
- 4.10. Maatbekers van 100 en 150 ml.
- 4.11. Maatkolven van 50, 100 en 1 000 ml.
- 4.12. Proefbuizen met schroefstop met een capaciteit van 10 ml.
- 4.13. Spectrofotometer.
- 4.14. Glazen recipiënten voor spectrofotometer (4.13) optische baan 10 mm.
- 4.15. Maatpipetten van 1, 2, 5, 10, 20, 25 en 50 ml.
- 4.16. Glazen staafjes.
- 4.17. Droogstoof met thermostaat op 35 °C.
5. **Vorbereitung van het monster**  
Na homogenisering van het monster, wordt het volgens de aanwijzingen in punt 6 en volgende onderzocht.
6. **Uitvoering**
- 6.1. Afzondering van het vrije sialinezuur
- 6.1.1. Weeg  $5 \pm 0,005 \text{ g}$  magere-melkpoeder in een maatbeker van 150 ml.  
Voeg 50 ml water bij. Goed mengen door magnetisch roeren (4.2) tot volledige oplossing is bereikt.  
Voeg traag, al roerend, 50 ml van de trichloorazijnzuuroplossing (3.1) toe.  
Laat 30 minuten staan (bij omgevingstemperatuur).

- 6.1.2. Schud alvorens te filteren (4.8).
- 6.1.3. Breng 50 ml filtraat, genomen 60 minuten na het begin van de filtratie, in een centrifugeertube (4.5).  
Voeg 1 ml fosforwolframzuur (3.2) toe. Homogeniseer door schudden en laat 10 minuten bij omgevingstemperatuur staan.  
Centrifugeer bij 3 000 g gedurende 10 minuten.
- 6.1.4. Giet het supernatans af. Was de neerslag tweemaal met 5 ml ethanol (3.3), suspendeer met behulp van een magnetische roerder of een glazen staafje (4.16). Breng in het laatste geval 2 ml ethanol in de centrifugeertube om de neerslag opnieuw te suspenderen en was de roerder met behulp van de overblijvende 3 ml ethanol). Centrifugeer telkens bij 3 000 g gedurende 10 minuten.  
Droog de aldus verkregen neerslag gedurende één nacht bij omgevingstemperatuur of gedurende 90 minuten bij 35 °C.
- 6.1.5. Voeg bij de droge neerslag 4 ml zwavelzuur 0,1 N (3.4), schud om een suspensie te verkrijgen.  
Sluit de centrifugeertubes en plaats ze ongeveer 40 minuten in een waterbad bij 80 °C en schud ze nu en dan om een goede suspensie te verkrijgen.  
Koel af tot omgevingstemperatuur en voeg 4 ml acetaatbuffer (3.5) toe.  
Meng zorgvuldig.
- 6.1.6. Centrifugeer 10 minuten bij 3 000 g. De bepaling van de hoeveelheid sialinezuur of *N*-acetylneuraminezuur geschiedt op het supernatans.
- 6.2. Spectrofotometrische bepaling van de hoeveelheid sialinezuur
- 6.2.1. Pipetteer 2 ml supernatans in een proefbuis (4.12) en voeg 2 ml reagens met resorcinol (3.8) toe.
- 6.2.2. Sluit de buizen af, meng de inhoud zorgvuldig, plaats de proefbuizen gedurende precies 15 minuten in een waterbad bij 100 °C (4.7).  
Koel af tot omgevingstemperatuur onder stromend water.
- 6.2.3. Voeg 5 ml isoamylalcohol (3.9) toe in de proefbuizen. Sluit ze af en meng de inhoud zorgvuldig door krachtig te schudden, plaats ze daarna 15 minuten in een bad met ijskoud water.
- 6.2.4. Centrifugeer bij 1 000 g gedurende 2 minuten om de twee fasen goed van elkaar te scheiden.
- 6.2.5. Pipetteer ongeveer 3 ml van de bovenste laag (alcohol-fase) in een glazen recipiënt en meet de extinctie bij 580 nm ten opzichte van de blancobepaling in de 30 minuten die volgen op de verwijdering van de buizen uit het bad met ijskoud water.
- 6.3. Blancobepaling  
Voer een blancobepaling uit overeenkomstig de punten 6.2.1 tot 6.2.5 met gebruik van 1 ml zwavelzuuroplossing 0,1 N (3.4) en 1 ml acetaatbuffer (3.5), in plaats van 2 ml filtraat, zoals bepaald onder punt 6.2.1.
- 6.4. Ijkkromme
- 6.4.1. Pipetteer precies 0, 2, 5, 10, 20 en 30 ml van de oplossing (3.10) wat overeenstemt met 0, 0,4, 1, 2, 4 en 6 mg sialinezuur in de maatkolven met een capaciteit van 50 ml, vul aan tot 50 ml met de oplossing zwavelzuur 0,1 N (3.4) en meng goed.
- 6.4.2. Pipetteer 1 ml van de inhoud van elke maatkolf in een proefbuis (4.12) en voeg 1 ml acetaatbuffer toe (3.5), om een reeks referentieoplossingen te verkrijgen met een sialinezuur-gehalte van 0 (nulwaarde), 8, 20, 40, 80 en 120 µg. Voer, na goed te hebben gemengd, de kwantitatieve bepaling uit overeenkomstig de punten 6.2.2 tot 6.2.5.
- 6.4.3. Breng de extincties vermeld sub 6.4.2 en de overeenkomstige hoeveelheden sialinezuur in microgram, aangegeven sub 6.4.2, aan op een grafiek ten einde de ijkkromme te trekken

7. **Uitdrukking van de resultaten**7.1. **Berekeningswijze**

Bereken het gehalte aan sialinezuur, uitgedrukt in microgram per gram, volgens de volgende formule:

$$\frac{C \cdot 8}{E}$$

waarin C de massa sialinezuur in  $\mu\text{g}$  voorstelt, afgelezen op de ijkcurve die overeenstemt met de sub 6.2.5 verkregen mate van extinctie en waarin E de massa van de inweeg (6.1.1) in g voorstelt. Geef het resultaat op 1  $\mu\text{g}$  nauwkeurig.

7.2. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van twee kwantitatieve bepalingen (resultaten verkregen door dezelfde onderzoeker voor gelijktijdig of onmiddellijk na elkaar uitgevoerde bepalingen) mag 5 % van het rekenkundig gemiddelde van de resultaten niet overschrijden.

8. **Uitlegging van de resultaten**

Deze methode maakt het mogelijk de eventuele aanwezigheid van wei in magere-melkpoeder te kwantificeren.

8.1. **Berekening van de gemiddelde waarde van vrij sialinezuur in microgram per gram van het monster, in verhouding tot het in procent uitgedrukte eiwitgehalte ervan (m/m):**

$$Y = 40 + 3 (X - 34)^2$$

waarbij:

40 = het gemiddelde sialinezuurgehalte in microgram per gram voor magere-melkpoeder met een eiwitgehalte van minstens 34 %;

X = het totale eiwitgehalte, bepaald volgens de Kieldahl-methode FIL IDF 20: 1962.

8.2. **Berekening van het eventueel aanwezige weipoederpercentage:**

$$\% \text{ wei} = \frac{Z - Y}{10}$$

waarbij:

Z = het overeenkomstig punt 7.1 bepaalde sialinezuurgehalte in microgram per gram;

Y = het overeenkomstig punt 8.1 berekende gemiddelde gehalte aan vrij sialinezuur van het monster;

10 = volgens afspraak, het gehalte aan vrij sialinezuur, uitgedrukt in microgram, van een gram lebweipoeder.

8.3. **Rekening houdende met eventuele uit de methode voortvloeiende fouten en de natuurlijke veranderingen in de samenstelling van het monster kan definitief worden uitgemaakt dat geen wei aanwezig is, wanneer de in punt 8.2 bedoelde waarde niet hoger is dan 2,0.**

Bij een hogere waarde is er wel wei voorhanden. In dat geval wordt de hoeveelheid ervan volgens de in punt 8.2 gegeven formule bepaald."