

VERORDENING (EG) Nr. 322/96 VAN DE COMMISSIE

van 22 februari 1996

houdende uitvoeringsbepalingen inzake de openbare opslag van magere-melkpoeder

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese 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 zuivelprodukten⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 2931/95 van de Commissie⁽²⁾, en met name op artikel 7, lid 5, en artikel 28,

Overwegende dat Verordening (EEG) nr. 1014/68 van de Raad van 20 juli 1968 houdende vaststelling van de algemene voorschriften betreffende de openbare opslag van magere-melkpoeder⁽³⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 3577/90⁽⁴⁾, met ingang van 1 maart 1996 bij Verordening (EG) nr. 1538/95 van de Raad⁽⁵⁾ wordt ingetrokken; dat derhalve de voorschriften die niet zijn opgenomen in Verordening (EEG) nr. 804/68 dienen te worden verwerkt in de uitvoeringsbepalingen voor de openbare opslag van magere-melkpoeder, vastgesteld bij Verordening (EEG) nr. 625/78 van de Commissie⁽⁶⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 1802/95⁽⁷⁾; dat de vereiste aanpassing van die verordening zo ingrijpend is en er in die verordening reeds zoveel wijzigingen zijn aangebracht, dat ter wille van de duidelijkheid een volledige herwerking nodig is dat Verordening (EEG) nr. 625/78 derhalve moet worden ingetrokken;

Overwegende dat de interventiebureaus slechts magere-melkpoeder met een minimumgehalte aan eiwitten mogen aankopen; dat de aankoopprijs kan variëren naar gelang van het eiwitgehalte; dat moet worden bepaald via welke analysemethode het eiwitgehalte moet worden geconstateerd en hoe de aankoopprijs moet worden berekend;

Overwegende dat, om te voorkomen dat ten onrechte betalingen voor het aangekochte magere-melkpoeder worden gedaan, moet worden bepaald dat vóór de betaling moet worden nagegaan of alle gestelde voorwaarden in acht zijn genomen en het eiwitgehalte moet worden geconstateerd;

Overwegende dat een referentiemethode voor het opsporen van karnemelk is vastgesteld; dat, om een uniforme toepassing van de controlemaatregelen te garan-

deren, die analysemethode moet worden gebruikt voor de controle van het magere-melkpoeder dat door de interventiebureaus wordt aangekocht;

Overwegende dat bij Richtlijn 92/46/EEG van de Raad van 16 juni 1992 tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften voor de produktie en het in de handel brengen van rauwe melk, warmtebehandelde melk en produkten op basis van melk⁽⁸⁾, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 94/71/EG⁽⁹⁾, is bepaald dat melk met een gehalte aan antibacteriële substanties boven de bij Verordening (EEG) nr. 2377/90 van de Raad⁽¹⁰⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 282/96⁽¹¹⁾, toegestane waarde niet voor menselijke consumptie mag worden bestemd; dat het door de interventiebureaus aangekochte magere-melkpoeder moet worden onderzocht op de aanwezigheid van antibacteriële substanties die gewoonlijk worden gebruikt; dat daartoe een controlemethode moet worden vastgesteld;

Overwegende dat overigens de bepalingen betreffende de openbare opslag van magere-melkpoeder hun waarde hebben bewezen en derhalve, afgezien van bepaalde technische aanpassingen, kunnen worden gehandhaafd;

Overwegende dat de ontstaansfeiten voor de landbouwmrekeningskoers die geldt voor de regeling inzake openbare opslag zijn vastgesteld bij Verordening (EEG) nr. 1756/93 van de Commissie⁽¹²⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 693/95⁽¹³⁾;

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

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

1. De interventiebureaus kopen alleen magere-melkpoeder dat beantwoordt aan de in artikel 7, lid 1, van Verordening (EEG) nr. 804/68 vastgestelde definitie en aan de in bijlage I bedoelde kwaliteitseisen en waarvoor aan de volgende voorwaarden is voldaan:

a) de kwaliteitscontrole is verricht volgens de in de bijlagen I, V, VI en VII bedoelde analysemethoden aan de hand van monsters die op de in bijlage IV bedoelde wijze zijn genomen;

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

- b) het magere-melkpoeder voldoet aan de in de bijlagen II en III vastgestelde voorschriften inzake verpakking en aanduiding;
- c) het magere-melkpoeder bevat geen andere producten, met name karnemelk of wei;
- d) het magere-melkpoeder is niet eerder vervaardigd dan één maand vóór de dag waarop het interventiebureau de aanbieding voor verkoop ontvangt of, in het in bijlage III, onder e), tweede zin, bedoelde geval, dan vier weken vóór de week waarin de aanbieding wordt ontvangen;
- e) de mate van radioactiviteit van het magere-melkpoeder overschrijdt de in de communautaire wetgeving vastgestelde maximumniveaus niet.

De geldende niveaus zijn vastgesteld in artikel 3 van Verordening (EEG) nr. 737/90 van de Raad⁽¹⁾. Magere-melkpoeder wordt alleen als de situatie dat vereist en zolang als dat nodig blijft, gecontroleerd op de mate van radioactieve besmetting. De geldigheidsduur en de draagwijdte van de controlemaatregelen worden, zo nodig, vastgesteld volgens de procedure van artikel 30 van Verordening (EEG) nr. 804/68.

2. In deze verordening wordt verstaan onder:

- a) karnemelk: het bijproduct van boter, verkregen na het karnen van de room en na de afscheiding van het niet vloeibare vetgedeelte;
- b) wei: het bijproduct van de vervaardiging van kaas of caseïne door middel van het gebruik van zuren, stremsel en/of chemisch-fysische procédés.

3. De minimumaankoophoeveelheid bedraagt 20 ton. De Lid-Staten mogen deze minimumhoeveelheid verhogen en/of bepalen dat het magere-melkpoeder per hele ton moet worden aangeboden.

4. Het interventiebureau registreert de datum waarop de aanbieding tot verkoop wordt ontvangen, alsmede de betrokken hoeveelheden en vervaardigingsdata en de plaats waar het magere-melkpoeder is opgeslagen.

5. Een aanbieding is slechts geldig als het bewijs wordt geleverd dat de inschrijver een zekerheid van 12 ecu per ton aangeboden magere-melkpoeder heeft gesteld.

In het kader van deze verordening zijn het gestand doen van de aanbieding en de levering van het magere-melkpoeder aan de door het interventiebureau aangegeven opslagplaats primaire eisen waarvan de inachtneming door de zekerheid wordt gegarandeerd. Ingeval evenwel uit de in lid 1, onder a), bedoelde controle blijkt dat het magere-melkpoeder niet aan de in lid 1 bedoelde eisen voldoet, wordt de zekerheid niettemin voor de nog niet geleverde hoeveelheden vrijgegeven.

De zekerheid wordt gesteld in de Lid-Staat waar de aanbieding wordt ingediend.

Artikel 2

1. De in artikel 7, lid 1, van Verordening (EEG) nr. 804/68 bedoelde onderneming wordt alleen erkend, indien zij:

- a) is erkend overeenkomstig artikel 10 van Richtlijn 92/46/EEG en beschikt over adequate technische installaties;
- b) zich ertoe verbindt doorlopend de door de bevoegde instantie van iedere Lid-Staat voorgeschreven registers bij te houden en daarin de oorsprong van de grondstoffen, de behandelde hoeveelheden ondermelk, karnemelk en wei, de soort warmtebehandeling van de ondermelk, de verkregen hoeveelheden produkt, de verpakking, de identificatie en de datum van uitslag van elke geproduceerde partij magere-melkpoeder, karnemelkpoeder en weipoeder te vermelden;
- c) ermee instemt de vervaardiging van magere-melkpoeder dat voor interventie zou kunnen worden aangeboden, aan een specifieke officiële controle te onderwerpen;
- d) zich ertoe verbindt om de bevoegde controle-instantie ten minste twee werkdagen vooraf in kennis te stellen van haar voornemen om magere-melkpoeder voor openbare interventie te vervaardigen. De Lid-Staat mag evenwel een kortere termijn vaststellen.

2. Teneinde de bepalingen van deze verordening te doen naleven, voeren de bevoegde instanties onaangekondigde controles ter plaatse uit op basis van het programma van de betrokken ondernemingen voor de vervaardiging van magere-melkpoeder voor interventie.

Het minimumaantal controles is:

- voor de verificatie van de in lid 1, onder b), bedoelde elementen, één controle per periode van 28 vóór de levering aan het interventiebureau gewerkte dagen en in ieder geval één controle per halfjaar;
- wat het toezicht op de inachtneming van de in lid 1 bedoelde voorwaarden voor erkenning betreft, één controle per halfjaar.

3. De erkenning wordt ingetrokken als niet meer wordt voldaan aan de in lid 1 vastgestelde vooraf te vervullen voorwaarden. Zes maanden daarna kan op verzoek van de betrokken onderneming de erkenning na grondige controle opnieuw worden verleend.

Als wordt geconstateerd dat een onderneming één van haar verbintenissen als bedoeld in lid 1, onder b), c) en d), niet is nagekomen, wordt, behalve in geval van overmacht, de erkenning geschorst voor een periode die naar gelang van de ernst van de onregelmatigheid wordt vastgesteld op ten minste één maand en ten hoogste twaalf maanden.

De Lid-Staat kan besluiten de schorsing niet toe te passen indien vast is komen te staan dat de onregelmatigheid niet opzettelijk of door ernstige onachtzaamheid is begaan en dat de invloed ervan op de doeltreffendheid van de in lid 2 bedoelde controles zeer gering is.

⁽¹⁾ PB nr. L 82 van 29. 3. 1990, blz. 1.

4. Over de controles op grond van de leden 2 en 3 wordt een verslag opgesteld, waarin worden vermeld:

- de datum van de controle,
- de duur ervan,
- de verrichte controlewerkzaamheden.

Het controleverslag moet door de verantwoordelijke functionaris worden ondertekend.

5. De door de Lid-Staten voor de uitvoering van de in de leden 2 en 3 bedoelde controles genomen maatregelen worden, binnen een maand na de vaststelling ervan, aan de Commissie meegedeeld.

Artikel 3

De instantie die zorgt voor de controle op de inachtneming van de in artikel 1, lid 1, vastgestelde bepalingen registreert, met vermelding van elk van de in punt 1 van bijlage I genoemde kenmerken van het produkt, de analysesresultaten van elke aangeboden partij, die later worden vermeld in een op aanvraag afgegeven certificaat, met name in geval van handelsverkeer tussen Lid-Staten of uitvoer.

Artikel 4

1. Na verificatie van de gegevens van de aanbieding geeft het interventiebureau onverwijld een gedateerde en genummerde leveringsbon af, waarin zijn vermeld:

- a) de te leveren hoeveelheid;
- b) de uiterste datum voor levering van het magere-melkpoeder;
- c) de opslagplaats waar het magere-melkpoeder moet worden geleverd.

2. Het magere-melkpoeder moet worden geleverd binnen 28 dagen na de datum van ontvangst van de in artikel 1, lid 1, onder d), bedoelde aanbieding tot verkoop. De levering mag worden gespreid.

3. In de zin van deze verordening wordt het magere-melkpoeder door het interventiebureau overgenomen op de dag van inslag in de opslagplaats, maar ten vroegste op de dag na die van afgifte van de in lid 1 bedoelde leveringsbon.

4. Het door het interventiebureau gekochte magere-melkpoeder wordt betaald tussen de honderdtwintigste en de honderdveertigste dag na de datum van overname van het magere-melkpoeder door het interventiebureau, voor zover is gebleken dat aan de in artikel 1 bedoelde eisen is voldaan.

5. De aankoopprijs van het magere-melkpoeder wordt als volgt berekend:

- als het eiwitgehalte van de vetvrije droge stof, geconstateerd volgens de in bijlage I aangegeven methode, gelijk is aan of hoger is dan 35,6 %, is de aankoopprijs gelijk aan de interventieprijs,

— als dit gehalte 31,4 % of meer doch minder dan 35,6 % bedraagt, is de aankoopprijs gelijk aan de interventieprijs verminderd met een als volgt berekend bedrag: $\text{interventieprijs} \times [(0,356 - \text{eiwitgehalte}) \times 1,75]$.

6. Door zijn aanbieding verbindt de verkoper zich ertoe om, ingeval uit de controle zou blijken dat het magere-melkpoeder niet aan de in artikel 1, lid 1, gestelde eisen voldoet:

- de betrokken goederen terug te nemen,
- de kosten van opslag van de betrokken hoeveelheden te betalen vanaf de dag van overname tot en met de dag van uitslag.

Deze opslagkosten worden als volgt forfaitair per ton vastgesteld:

- a) 21 ecu voor de vaste kosten;
- b) 0,10 ecu per opslagdag voor de eigenlijke opslagkosten.

De rekening van het EOGFL, afdeling Garantie, wordt voor de betrokken bedragen gecrediteerd.

Artikel 5

1. De in artikel 7, lid 1, vierde alinea, van Verordening (EEG) nr. 804/68 bedoelde opslagplaatsen moeten aan de volgende voorwaarden voldoen:

- a) droog, in een goede staat van onderhoud en vrij van ongedierte zijn;
- b) geen enkele vreemde geur hebben;
- c) goed te ventileren zijn;
- d) beschikken over voldoende capaciteit en over een uitrusting die in verhouding is met deze capaciteit.

De opslagrisico's worden gedekt door een verzekering in de vorm van hetzij een contractuele verplichting van de opslaghouders, hetzij een globale verzekering van het interventiebureau. De Lid-Staat kan ook zijn eigen verzekeraar zijn.

2. De interventiebureaus eisen dat het magere-melkpoeder op laadborden in gemakkelijk te identificeren en gemakkelijk bereikbare partijen wordt in- en opgeslagen.

3. De bevoegde controle-instantie verricht de in artikel 4 van Verordening (EEG) nr. 618/90 van de Commissie (1) bedoelde controle op de aanwezigheid van de produkten in het pakhuis.

Artikel 6

1. Het interventiebureau kiest de opslagplaats met beschikbare ruimte die het dichtst bij de plaats ligt waar het magere-melkpoeder is opgeslagen.

(1) PB nr. L 67 van 15. 3. 1990, blz. 21.

Voor zover de keuze van een andere opslagplaats geen extra opslagkosten meebrengt, kan het interventiebureau evenwel:

- a) een andere opslagplaats kiezen die niet verder ligt dan de in lid 2 vastgestelde afstand;
- b) een andere opslagplaats kiezen die verder ligt dan die afstand, wanneer deze keuze, rekening houdend met de betrokken opslag- en vervoerkosten, tot geringere uitgaven leidt. In dit geval stelt het interventiebureau de Commissie onverwijld van zijn keuze in kennis.

2. De in artikel 7, lid 1, derde alinea, van Verordening (EEG) nr. 804/68 bedoelde maximumafstand wordt vastgesteld op 350 km. In geval van een grotere afstand worden de door het interventiebureau gedragen extra vervoerkosten vastgesteld op 0,05 ecu per ton en per kilometer.

Indien het kopende interventiebureau resorteert onder een andere Lid-Staat dan die waar het aangeboden magere-melkpoeder is opgeslagen, wordt echter voor de berekening van de in de eerste alinea bedoelde maximumafstand geen rekening gehouden met de afstand tussen de opslagplaats van de verkoper en de grens van de Lid-Staat waaronder het kopende interventiebureau resorteert.

Artikel 7

Bij de uitslag stelt het interventiebureau, in geval van levering af opslagplaats, het magere-melkpoeder ter beschikking:

- op de kade van de opslagplaats, geladen op een transportmiddel, met uitzondering van het vastbinden, indien het een vrachtwagen of een spoorwegwagen betreft,
- op de kade van de opslagplaats, indien het een ander transportmiddel, met name een container, betreft.

De eventuele kosten voor het vastbinden van de produkten en het afladen van de laadborden zijn voor rekening van de koper van het magere-melkpoeder. Deze kosten worden forfaitair vastgesteld door de Lid-Staat, die ze op verzoek aan elke belanghebbende meedeelt.

Artikel 8

Verordening (EEG) nr. 625/78 wordt ingetrokken.

Verwijzingen naar Verordening (EEG) nr. 625/78 moeten als verwijzingen naar deze verordening worden beschouwd.

Artikel 9

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

Zij is van toepassing met ingang van 1 maart 1996.

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

Gedaan te Brussel, 22 februari 1996.

Voor de Commissie

Franz FISCHLER

Lid van de Commissie

BIJLAGE I

KWALITEIT VAN HET MAGERE-MELKPOEDER

1. Kenmerken

a) Eiwitgehalte:	minimaal 31,4 % van de vetvrije droge stof.
b) Vetgehalte:	maximaal 1,00 %.
c) Watergehalte:	maximaal 3,5 %.
d) Titreerbare zuurtegraad, uitgedrukt in 0,1 N natriumhydroxide:	maximaal 19,5 ml.
e) Gehalte aan lactaten:	maximaal 150 mg/100 g.
f) Additieven:	geen.
g) Fosfataseproef:	negatief, d. w. z. gelijk aan of minder dan 4 microgram fenol per gram gereconstitueerde melk.
h) Onoplosbaarheidscoëfficiënt:	maximaal 0,5 ml (24 °C).
i) Gehalte aan verbrande deeltjes:	maximaal 15,0 mg; dit betekent ten minste monster B.
j) Gehalte aan micro-organismen:	maximaal 40 000 per gram.
k) Colibacterieproef:	negatief in 0,1 g.
l) Onderzoek op karnemelk:	negatief.
m) Onderzoek op wei:	negatief.
n) Smaak en geur:	onberispelijk.
o) Uiterlijk:	wit of enigermate gelige kleur, vrij van vuile en gekleurde deeltjes.
p) Antibacteriële substanties:	negatief (!).

2. Controlemethodes

- a) Onverminderd de voorschriften met betrekking tot harmonisatie van de analysemethodes moeten in het kader van deze verordening de onderstaande referentiemethodes worden gevolgd:
- | | |
|--|-------------------------------------|
| — eiwitgehalte ($N \times 6,38$): | internationale norm FIL 20B: 1993; |
| — vetgehalte: | internationale norm FIL 9C: 1987; |
| — watergehalte: | internationale norm FIL 26A: 1993; |
| — zuurtegraad: | internationale norm FIL 86: 1981; |
| — gehalte aan lactaten: | internationale norm FIL 69B: 1987; |
| — fosfataseproef: | internationale norm ISO 3356: 1975; |
| — onoplosbaarheidscoëfficiënt: | internationale norm FIL 129A: 1988; |
| — bepaling van het gehalte aan verbrande deeltjes: | ADPI, standaardmethodes 1990; |
| — gehalte aan micro-organismen: | internationale norm FIL 100B: 1991; |
| — onderzoek op colibacteriën: | internationale norm FIL 73A: 1985. |
- b) Voor het onderzoek op:
- | | |
|-------------------------------|---|
| — lebwei: | bepaling van de hoeveelheid glycomacropeptiden met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografie volgens de analysemethode in bijlage V; |
| — zure wei: | methodes vastgesteld door de Lid-Statens; |
| — karnemelk: | de afwezigheid van karnemelk kan worden vastgesteld door een onverwachte controle in het productiebedrijf, die ten minste eenmaal per week plaatsvindt, of door laboratoriumanalyse — volgens de methode in bijlage VI — van het eindproduct; maximaal 69,31 mg PEDP per 100 g; |
| — antibacteriële substanties: | de methode beschreven in bijlage VII. |
- c) De monsters worden genomen op de in internationale norm ISO 707 beschreven wijze; de Lid-Statens kunnen evenwel een andere bemonsteringsmethode gebruiken zover deze in overeenstemming is met de beginselen die aan de genoemde norm ten grondslag liggen.

(¹) De voor de vervaardiging van het magere-melkpoeder gebruikte rauwe melk moet voldoen aan de eisen van bijlage A, hoofdstuk III, deel D, van Richtlijn 92/46/EEG.

*BIJLAGE II***VERPAKKING**

1. De verpakkingen moeten nieuw, schoon, droog en onbeschadigd zijn met een inhoud van 25 kg netto. Zij moeten voorts beantwoorden aan een van de volgende formules:
 - a) Vier zakken van kraftpapier, papierstevigheid ten minste 70 g per m²,
één tussenzak van teerpapier, papierstevigheid ten minste 140 g per m²,
één binnenzak van polyethyleen van ten minste 0,08 mm dikte, dichtgelast of met dubbel stiksel.
 - b) Één zak van kraftpapier, papierstevigheid ten minste 70 g per m²,
één zak van kraftpapier met een polyethyleenlaag, stevigheid ten minste 80 g + 15 g per m²,
drie zakken van kraftpapier, papierstevigheid ten minste 70 g per m²,
één binnenzak van polyethyleen van ten minste 0,08 mm dikte, dichtgelast of met dubbel stiksel.
 - c) Één buitenzak van kraftpapier, papierstevigheid ten minste 85 g per m²,
één zak van kraftpapier met een polyethyleenlaag, stevigheid ten minste 70 g + 15 g per m²,
twee zakken van kraftpapier, papierstevigheid ten minste 70 g per m²,
één binnenzak van polyethyleen van ten minste 0,12 mm dikte, dichtgelast of met dubbel stiksel.
 - d) Één buitenzak van semi-extensibel kraftpapier, papierstevigheid ten minste 95 g per m²,
één zak van semi-extensibel kraftpapier met aan de binnenkant een polyethyleenlaag, stevigheid ten minste 95 g + 15 g per m²,
één zak in semi-extensibel kraftpapier, papierstevigheid ten minste 85 g per m²,
één binnenzak in polyethyleen van ten minste 0,12 mm dikte, dichtgelast of met dubbel stiksel.

2. Vulling

Bij het vullen moet het poeder in de zak goed worden aangedrukt. Het binnendringen van los poeder tussen de verschillende lagen moet absoluut worden vermeden.

3. Testmethode

De in punt 1 bedoelde verpakking moet, in een samenstelling met minimaal drie lagen papier, bestand zijn tegen een gemiddelde spanning die overeenkomt met de absorptie van 420 joule/m² volgens de methode ISO 1924-2-1985.

*BIJLAGE III***AANDUIDING**

Op de verpakking moeten, eventueel in codevorm, ten minste de volgende aanduidingen worden aangebracht:

- a) de vermelding in een van de talen van de Gemeenschap „volgens het sprayprocédé bereid magere-melkpoeder”;
- b) het nettogewicht;
- c) het vervaardigingsnummer van de partij;
- d) het erkenningsnummer ter identificatie van de fabriek en de Lid-Staat van produktie;
- e) de datum van vervaardiging. Indien het magere-melkpoeder wordt opgeslagen in silo's, wordt de datum van vervaardiging vervangen door de week van vervaardiging.

*BIJLAGE IV***MONSTERING BIJ HET AANGEBODEN MAGERE-MELKPOEDER EN ANALYSE DAARVAN**

1. Steekproefsgewijze uit te kiezen aantal zakken waaruit monsters worden genomen:
 - partijen tot 800 zakken van 25 kg: minstens acht,
 - partijen van meer dan 800 zakken van 25 kg: minstens acht plus één voor elke extra hoeveelheid van 800 zakken of gedeelte daarvan.
2. Gewicht van het monster: ten minste 200 g per zak.
3. Groepering van de monsters: hoogstens negen monsters worden samengevoegd tot één verzamelmonster.
4. Analyse van de monsters: elk verzamelmonster wordt geanalyseerd om na te gaan of het aan alle in bijlage I vermelde kwaliteitskenmerken beantwoordt.
5. Aan te houden richtlijnen bij een falend monster:
 - a) als een samengesteld monster voor één parameter faalt, wordt van de aangeboden hoeveelheid de door dat samengestelde monster vertegenwoordigde hoeveelheid afgekeurd;
 - b) als een samengesteld monster faalt voor meerdere parameters, wordt de door dat monster vertegenwoordigde hoeveelheid afgekeurd en wordt de resterende van dezelfde fabriek afkomstige hoeveelheid een tweede maal bemonsterd voor analyse. In dat geval
 - wordt het in punt 1 vastgestelde aantal monsters verdubbeld,
 - wordt, indien een samengesteld monster voor een of meer parameters faalt, de door dat monster vertegenwoordigde hoeveelheid afgekeurd.

BIJLAGE V

OPSPORING VAN LEBWEI IN MAGERE-MELKPOEDER BESTEMD VOOR OPENBARE OPSLAG DOOR BEPALING VAN GLYCOMACROPEPTIDEN MET BEHULP VAN HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE (HPLC)**1. Doel en toepassingsgebied**

Met deze methode kan de aanwezigheid van lebwei in magere-melkpoeder, bestemd voor openbare opslag, worden aangetoond door middel van de bepaling van glycomacropetiden.

2. Referenties

Internationale norm ISO 707 — Melk en zuivelprodukten — Monstermethoden, overeenkomstig de in bijlage I, punt 2, onder c), vermelde voorschriften.

3. Definitie

Gehalte aan glycomacropetiden in magere-melkpoeder: het gehalte aan bestanddelen, bepaald volgens onderstaande methode en uitgedrukt in massaprocenten.

4. Beginsel

- Reconstitutie van het magere-melkpoeder, verwijdering van vetten en eiwitten door neerslaan met trichloorazijnzuur en afcentrifugeren;
- bepaling van de hoeveelheid glycomacropetiden (GMP) in het supernatant met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC);
- beoordeling van het verkregen resultaat aan de hand van standaardmonsters bestaande uit magere-melkpoeder waaraan al dan niet een bekend percentage weipoeder is toegevoegd.

5. Reagentia

Alle reagentia dienen van analysekwaliteit te zijn. Onder water wordt verstaan gedistilleerd water of water van ten minste dezelfde zuiverheid.

5.1. Trichloorazijnzuuroplossing

Los 240 g trichloorazijnzuur (Cl_3CCOOH) op in water en vul aan tot 1 000 ml.

5.2. Loopvloeistof, pH 6,0

In ongeveer 700 ml water wordt 1,74 g dikaliumfosfaat (K_2HPO_4), 12,37 g monokaliumfosfaat (KH_2PO_4) en 21,41 g natriumsulfaat (Na_2SO_4) opgelost. Zo nodig wordt de pH met een fosforzuuroplossing dan wel met een kaliumhydroxideoplossing op 6,0 gebracht. De oplossing wordt met water tot 1 000 ml aangevuld en gehomogeniseerd. Vóór gebruik wordt de loopvloeistof door een membraanfilter met poriëngrootte van 0,45 μm gefiltreerd.

5.3. Oplossing voor het spoelen en conserveren van de kolommen

Eén deel acetonitril (CH_3CN) wordt met negen delen water gemengd. Vóór gebruik wordt het mengsel over een membraanfilter met poriëngrootte van 0,45 μm gefiltreerd.

Opmerking: Voor het spoelen van de kolom kan elke andere oplossing worden gebruikt die een bacteriëndodende werking heeft en het scheidend vermogen van de kolom niet aantast.

5.4. Standaardmonsters

5.4.1. Magere-melkpoeder dat voldoet aan de eisen van deze verordening of wel [0].

5.4.2. Hetzelfde magere-melkpoeder dat is vermengd met 5 % (m/m) weipoeder type leb van gemiddelde samenstelling, of wel [5].

6. Apparatuur

- 6.1. Analytische balans.
- 6.2. Centrifuge, centrifugaalkracht tot 2 200 g, voorzien van centrifugebuizen met stop met een inhoud van ongeveer 25 ml.
- 6.3. Mechanisch schudapparaat.
- 6.4. Magneetroerder.
- 6.5. Glazen trechters, doorsnede ongeveer 7 cm.
- 6.6. Filtreerpapier, normaal, doorsnede ongeveer 12,5 cm.
- 6.7. Glazen filtreerapparaat met filtermembraan met poriëngrootte van 0,45 μm .
- 6.8. Meetpipet geschikt voor 10 ml, overeenkomstig de norm ISO 648, klasse A, of ISO/R 835.
- 6.9. Waterbad met thermostaat, ingesteld op $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- 6.10. HPLC-apparatuur bestaande uit:
 - 6.10.1. pomp;
 - 6.10.2. injector, al of niet automatisch, capaciteit 15 tot 30 μl ;
 - 6.10.3. twee kolommen TSK 2000 SW (lengte 30 cm, inwendige doorsnede 0,75 cm) of gelijkwaardige kolommen in serie en een voorgeschakelde kolom (3 cm \times 0,3 cm) gepakt met I 125 of gelijkwaardig materiaal;
 - 6.10.4. kolomoven met thermostaat, ingesteld op $35 \pm 1^\circ\text{C}$;
 - 6.10.5. UV-detector met variabele golflengte, instelbaar op 205 nm, en een gevoeligheid van 0,008 A;
 - 6.10.6. Integrator waarmee van dal tot dal kan worden geïntegreerd.

Opmerking: Zo nodig kan met kolommen op kamertemperatuur worden gewerkt, maar het scheidend vermogen daarvan is iets lager. In dergelijke gevallen mogen de temperatuurschommelingen binnen een analyseserie niet meer dan $\pm 5^\circ\text{C}$ bedragen.

7. Monsterneming

- 7.1. Internationale norm ISO 707 — Melk en zuivelprodukten — Monstermethoden, overeenkomstig de in bijlage I, punt 2, onder c), vermelde voorschriften.
- 7.2. Het monster wordt zodanig bewaard dat geen bederf of wijziging van samenstelling kan optreden.

8. Werkwijze

8.1. Bereiding van het testmonster

Het melkpoeder wordt overgebracht in een vat met een inhoud van ongeveer het dubbele van het volume van het poeder, voorzien van een luchtdicht deksel. Het vat wordt onmiddellijk gesloten. Meng het melkpoeder grondig door herhaald omkeren van het vat.

8.2. Testhoeveelheid

In een centrifugebuis (punt 6.2) wordt 2,000 g testmonster tot op ca. 0,001 g afgewogen.

8.3. Verwijdering van vetten en eiwitten

- 8.3.1. Voeg aan de testhoeveelheid 20,0 g warm water (50°C) toe. Los het poeder op door gedurende vijf minuten te schudden op het schudapparaat (punt 6.3). Breng de buis op 25°C .
- 8.3.2. In twee minuten wordt onder magnetisch roeren (punt 6.4) 10,0 ml trichloorazijnzuuroplossing (punt 5.1) toegevoegd. De buis wordt vervolgens gedurende één uur in het waterbad (punt 6.9) gehouden.
- 8.3.3. De buis wordt gedurende tien minuten bij 2 200 g gecentrifugeerd (punt 6.2). In plaats daarvan kan worden gefiltreerd door papier (punt 6.6), waarbij de eerste 5 ml filtraat wordt weggeworpen.

8.4. *Chromatografische bepaling*

- 8.4.1. Bij een snelheid van 1,0 ml loopvloeistof (punt 5.2) per minuut wordt in het HPLC-apparaat (punt 6.10) een nauwkeurig afgemeten hoeveelheid tussen 15 en 30 µl van de bovenstaande vloeistof of het filtraat (punt 8.3.3) geïnjecteerd.

Opmerkingen.

1. De temperatuur van de loopvloeistof (punt 5.2) wordt gedurende de gehele chromatografische analyse op 85 °C gehouden om de vloeistof te ontgassen en bacteriegroei te voorkomen. Andere maatregelen met hetzelfde effect mogen ook worden toegepast.
2. Bij elke onderbreking worden de kolommen met water gespoeld. De kolommen mogen nooit met de loopvloeistof (punt 5.2) blijven staan.

Voordat de apparatuur langer dan 24 uur buiten gebruik wordt gesteld, worden de kolommen eerst met water en vervolgens gedurende ten minste drie uur met een snelheid van 0,2 ml per minuut met de wasoplossing (punt 5.3) gespoeld.

- 8.4.2. De resultaten van de chromatografische analyse van het testmonster [E] worden verkregen in de vorm van een chromatogram, waarin elke piek wordt geïdentificeerd door zijn retentietijd en wel:

piek II: tweede piek van het chromatogram met een RT van ongeveer 12,5 min.,

piek III: derde piek van het chromatogram overeenkomend met de GMP, met een RT van $15,5 \pm 1,0$ min.,

piek IV: vierde piek van het chromatogram met een RT van ongeveer 17,5 min.

De kwaliteit van de kolommen is van invloed op de verschillende retentietijden.

De integrator (punt 6.10.6) rekent de oppervlakte A van elke piek automatisch uit:

A_{II} : oppervlakte van piek II,

A_{III} : oppervlakte van piek III,

A_{IV} : oppervlakte van piek IV.

Om eventuele onregelmatigheden als gevolg van slecht werkende apparatuur of kolommen, dan wel als gevolg van de herkomst of de gesteldheid van het geanalyseerde monster op te sporen, moet, voordat tot kwantitatieve interpretatie wordt overgegaan, worden nagegaan of het algemene beeld van het chromatogram klopt. In geval van twijfel wordt de analyse herhaald.

8.5. *Ijking*

- 8.5.1. Op de standaardmonsters (punt 5.4) wordt nauwgezet de werkwijze van de punten 8.2 tot en met 8.4.2 toegepast.

Er worden versbereide oplossingen gebruikt omdat de GMP in 8 % trichloorazijnzuur niet stabiel zijn: het gehalte loopt namelijk per uur bij 30 °C met ongeveer 0,2 % terug.

- 8.5.2. Voorafgaand aan de chromatografische bepaling van de monsters worden de kolommen geconditioneerd door herhaald inspuiten van de oplossing (punt 8.5.1) van het standaardmonster (punt 5.4.2) totdat de oppervlakte en de retentietijd van de GMP-piek constant zijn.

- 8.5.3. De responsfactoren R worden bepaald door injectie van hetzelfde volume filtraat (punt 8.5.1) als er van de monsters wordt geïnjecteerd.

9. **Weergave van de resultaten**9.1. *Berekeningswijze en formules*

- 9.1.1. Berekening van de responsfactoren R:

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

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

waarin:

R_{II} en R_{IV} = respectievelijk de responsfactoren voor de pieken II en IV,

$A_{II} [0]$ en $A_{IV} [0]$ = respectievelijk de oppervlakten voor de pieken II en IV van het standaardmonster [0] verkregen bij punt 8.5.3;

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

waarin:

R_{III} = de responsfactor voor piek III,

$A_{III} [0]$ en $A_{III} [5]$ = respectievelijk de oppervlakten van piek III in de standaardmonsters [0] en [5] verkregen bij punt 8.5.3,

W = de hoeveelheid wei aanwezig in het standaardmonster [5] of wel 5.

9.1.2. Berekening van de relatieve oppervlakten van de pieken van het monster [E]:

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

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

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

waarin:

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = respectievelijk de relatieve oppervlakten van de pieken II, III en IV van het monster [E],

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = respectievelijk de oppervlakten van de pieken II, III en IV van het monster [E] verkregen bij punt 8.4.2,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = respectievelijk de responsfactoren berekend bij punt 9.1.1.

9.1.3. Berekening van de relatieve retentietijd van piek III van het monster [E]:

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

waarin:

$RRT_{III} [E]$ = de relatieve retentietijd van piek III van het monster [E],

$RT_{III} [E]$ = de retentietijd van piek III van het monster [E], verkregen bij punt 8.4.2,

$RT_{III} [5]$ = de retentietijd van piek III van het standaardmonster [5], verkregen bij punt 8.5.3.

9.1.4. Experimenteel is aangetoond dat er tussen de relatieve retentietijd van piek III, of wel $RRT_{III} [E]$, en het toegevoegde percentage weipoeder tot 10 % een rechtlijnig verband bestaat:

— bij een gehalte $> 5 \%$, is $RRT_{III} [E] < 1,000$;

— bij een gehalte $\leq 5 \%$, is $RRT_{III} [E] \geq 1,000$.

De toegestane onzekerheid voor de waarde RRT_{III} is $\pm 0,002$.

Doorgaans verschilt de waarde $RRT_{III} [0]$ weinig van 1,034. Naar gelang van de toestand van de kolommen kan deze waarde in de richting van 1,000 gaan, maar zij moet daar wel altijd boven blijven.

9.2. Bereken het percentage lebweipoeder in het monster uit:

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

waarin:

W = het massapercentage lebwei in het monster [E],

$S_{III} [E]$ = het relatieve oppervlak van piek III van het monster [E], verkregen in punt 9.1.2,

1,3 = het gemiddelde relatieve oppervlak van piek III, uitgedrukt in g wei per 100 g, bepaald in onverdachte magere-melkpoeders van verschillende herkomst. Deze waarde is experimenteel vastgesteld,

$S_{III} [0]$ = het relatieve oppervlak van piek III dat gelijk is aan $R_{III} \times A_{III} [0]$. Deze waarden zijn verkregen respectievelijk in punt 9.1.1 en punt 8.5.3,

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = de aan te brengen correctie voor het gemiddelde relatieve oppervlak van 1,3 indien de waarde $S_{III} [0]$ afwijkt van 0,9. Het gemiddelde relatieve oppervlak van piek III van standaardmonster [0] is experimenteel vastgesteld op 0,9.

9.3. Nauwkeurigheid van de methode

9.3.1. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen gelijktijdig of kort na elkaar door dezelfde persoon met dezelfde apparatuur op hetzelfde monster verkregen, mag niet groter zijn dan 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproduceerbaarheid

Het verschil tussen twee afzonderlijke en onafhankelijke resultaten verkregen door twee verschillende laboratoria op hetzelfde monster mag niet groter zijn dan 0,4 % m/m.

9.4. *Interpretatie*

9.4.1. Wei wordt geacht afwezig te zijn indien het relatieve oppervlak van piek III, S_{III} [E], uitgedrukt in gram lebwei per 100 g, $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ is,

waarin:

2,0 = de maximaal toelaatbare waarde voor het relatieve oppervlak van piek III, rekening houdende met het relatieve oppervlak van piek III, zijnde 1,3, met de onzekerheid veroorzaakt door de variatie in de samenstelling van magere-melkpoeders, en met de reproduceerbaarheid van de methode (punt 9.3.2),

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = de aan te brengen correctie indien de waarde van $S_{III} [0]$ afwijkt van 0,9 (punt 9.2).

9.4.2. Wanneer het relatieve oppervlak van piek III, S_{III} [E] $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ is en het relatieve oppervlak van piek II, S_{II} [E] ≤ 160 is, bepaal dan het lebweigehalte zoals aangegeven in punt 9.2.

9.4.3. Wanneer het relatieve oppervlak van piek III, S_{III} [E] $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ is en het relatieve oppervlak van piek II, S_{II} [E] > 160 is, bepaal dan het totaal eiwitgehalte (P %); daarna de grafieken 1 en 2 bestuderen.

9.4.3.1. De resultaten van de ontleding van de monsters magere-melkpoeder van goede kwaliteit en met een hoog totaal eiwitgehalte, worden weergegeven in de grafieken 1 en 2.

De volle lijn stelt de lineaire regressielijn voor, waarvan de coëfficiënten worden berekend aan de hand van de methode van de kleinste kwadraten.

De streeplijn is de bovengrens van het relatieve oppervlak van piek III (waarschijnlijkheidsdrempel 90 %).

De respectieve vergelijkingen van de streeplijnen in de grafieken 1 en 2 zijn:

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

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

waarin:

S_{III} = het relatieve oppervlak van piek III, berekend aan de hand van het totale eiwitgehalte van het relatieve oppervlak van piek S_{II} [E],

P % = totale eiwitgehalte, uitgedrukt in gewichtspercenten,

S_{II} [E] = het in punt 9.1.2 berekende relatieve oppervlak van het monster.

Deze vergelijkingen zijn gelijkwaardig met het in punt 9.2 vermelde getal 1,3.

De afwijking (T_1 en T_2) tussen het relatieve oppervlak S_{III} [E] en het relatieve oppervlak S_{III} wordt weergegeven door de volgende betrekkingen:

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

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

9.4.3.2. Wanneer T_1 en/of T_2 negatief of gelijk aan nul zijn, kan de aanwezigheid van lebwei niet worden vastgesteld.

Wanneer T_1 en T_2 positief zijn, dan is lebwei aanwezig.

De hoeveelheid lebwei wordt berekend aan de hand van de volgende formule:

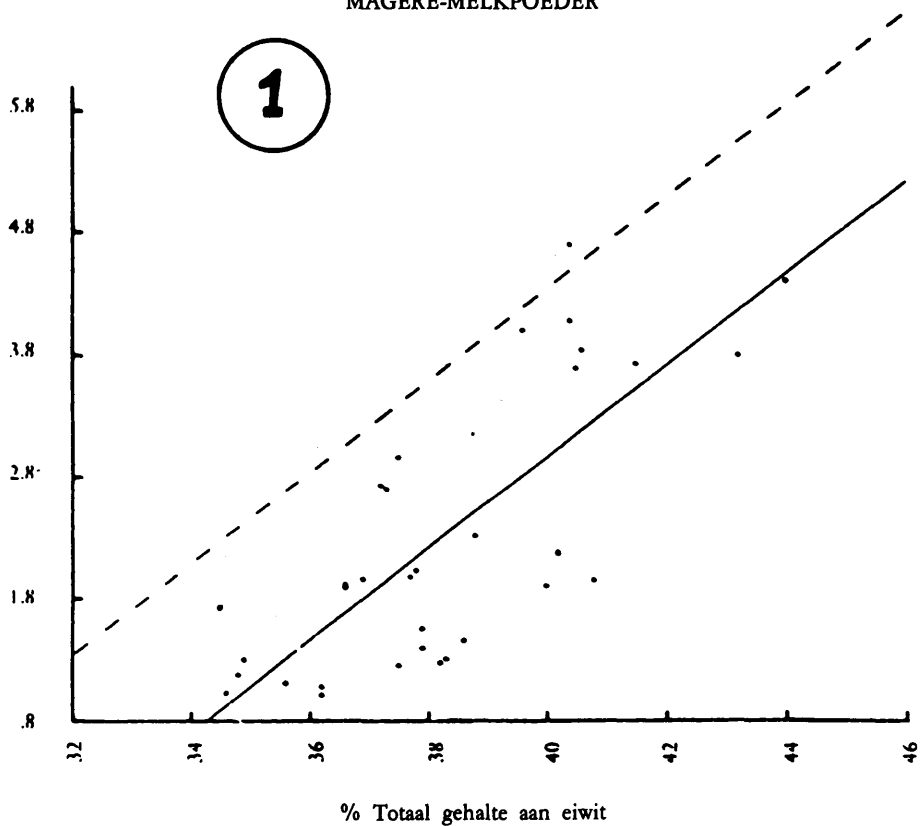
$$W = T_2 + 0,91$$

waarin:

0,91 de afstand op de verticale as tussen de volle en de streeplijn weergeeft.

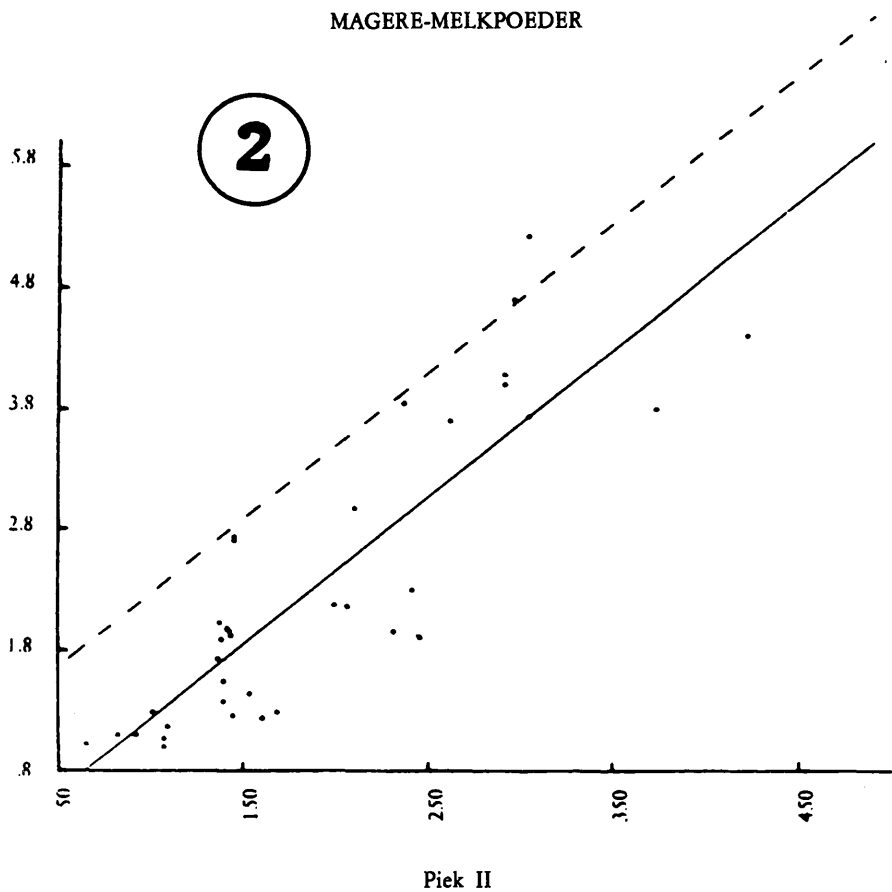
MAGERE-MELKPOEDER

Piek III



MAGERE-MELKPOEDER

Piek III



BIJLAGE VI

BEPALING VAN HET GEHALTE AAN FOSFATIDILSERINE (PS) EN FOSFATIDILETHANOLAMINE IN MAGERE-MELKPOEDER MET BEHULP VAN HOGEDRUKVLOEISTOF-CHROMATOGRAFIE

METHODE HPLC IN TEGENFASE

1. Doel en toepassingsgebieden

De methode beschrijft een procedure voor de kwantitatieve bepaling van fosfatidilserine (PS) en fosfatidilethanolamine (PE) in magere-melkpoeder (MMP) en is geschikt voor de bepaling van vaste stoffen uit karnemelk in MMP.

2. Definitie

Het gehalte aan PS + PE: de massafractie van de met de hier beschreven methode bepaalde substantie. Het resultaat wordt uitgedrukt in milligram fosfatidilethanolamine-dipalmitolie (PEDP) per 100 g poeder.

3. Beginsel

Extractie van aminofosfolipiden uit opgelost melkpoeder met behulp van methanol. Bepaling van PS en PE als o-faaldialdehyde(OPA)derivaten met behulp van HPLC in tegenfase en fluorescentiedetectie. Kwantificering van het gehalte aan PS en PE in het proefmonster door vergelijking met een standaardmonster met een bekend gehalte aan PEDP.

4. Reagentia

Alle reagentia dienen van analysekwaliteit te zijn. Onder water wordt verstaan gedestilleerd water of water van ten minste dezelfde zuiverheid.

4.1. Standaardmateriaal: PEDP met een zuiverheid van ten minste 99 %

NB: Het standaardmateriaal moet worden bewaard bij -18°C .

4.2. Reagentia voor de aanmaak van het standaardmonster en het proefmonster

4.2.1. Methanol van een zuiverheid die geschikt is voor HPLC.

4.2.2. Chloroform van HPLC-zuiverheid.

4.2.3. Tryptamine-monohydrochloride.

4.3. Reagentia voor de derivatie van o-faaldialdehyde

4.3.1. Natriumhydroxide, opgelost in water. Sterkte 12M.

4.3.2. Boorzuur, opgelost in water. Sterkte 0,4M. Aangevuld met natriumhydroxide (punt 4.3.1) tot een pH 10,0.

4.3.3. 2-Mercaptoethanol.

4.3.4. o-faaldialdehyde (OPA).

4.4. Loopvloeistoffen voor gebruik bij HPLC

Alle loopvloeistoffen moeten worden verkregen door gebruikmaking van reagentia van HPLC-zuiverheid.

4.4.1. Water van HPLC-zuiverheid.

4.4.2. Methanol van fluorimetrisch bepaalde zuiverheid.

4.4.3. Tetrahydrofuraan.

4.4.4. Mononatriumfosfaat.

4.4.5. Natriumacetaat.

4.4.6. Azijnzuur.

5. Apparatuur

5.1. Analytische balans

5.2. Bekerglazen met een inhoud van 25 resp. 100 ml

5.3. Pipetten met een inhoud van 1 resp. 10 ml

5.4. Magneetroerder

- 5.5. *Pipetten met maatverdeling met een inhoud van 0,2, 0,5 en 5 ml*
- 5.6. *Maatkolven van 10, 50 en 100 ml*
- 5.7. *Injectors met een inhoud van 20 resp. 100 μ l*
- 5.8. *Ultrasoon bad*
- 5.9. *Centrifuge die 27 000 g kan leveren*
- 5.10. *Glazen flesjes met een inhoud van ongeveer 5 ml*
- 5.11. *Maatcilinder met een inhoud van 25 ml*
- 5.12. *Een pH-meter*
- 5.13. *HPLC-apparatuur*
 - 5.13.1. Gradiëntpompsysteem van 1,0 ml/min. bij 200 bar.
 - 5.13.2. Automatische bemonsteraar met mogelijkheid van derivatie.
 - 5.13.3. Kolomverwarming die is afgesteld op 30 °C.
 - 5.13.4. Fluorescentiedetector die is afgesteld op een excitatiegolflengte van 330 nm en een emissiegolflengte van 440 nm.
 - 5.13.5. Integrator of software voor dataverwerking die geschikt is voor piekoppervlaktemetingen.
- 5.13.6. Een kolom Lichrosfeer-100 (250 \times 4,6 mm) of een daaraan gelijkwaardige kolom die gepakt is met octadecylsilaan (C18) met een korrelgrootte van 5 μ m.

6. **Monsterneming**

De monsterneming moet in overeenstemming zijn met de IDF-norm 50B-1985.

7. **Werkwijze**

7.1. *Bereiding van de inwendige standaardoplossing*

Weeg $30,0 \pm 0,1$ mg tryptamine-monohydrochloride (punt 4.2.3) af in een maatkolf van 100 ml (punt 5.6) en vul aan tot de merkstreep met methanol (punt 4.2.1). Pipetteer 1 ml (punt 5.3) van deze oplossing in een maatkolf van 10 ml (punt 5.6) en vul aan tot de merkstreep met methanol (punt 4.2.1) om een oplossing te maken met een sterkte van 0,15 mM tryptamine.

7.2. *Bereiding van de proefmonsteroplossing*

Weeg $1,000 \pm 0,001$ g van het MMP-monster af in een bekersglas van 25 ml (punt 5.2). Voeg met een pipet (punt 5.3) 10 ml gedestilleerd water van 40 °C toe en roer gedurende 30 minuten met een magneetroerder (punt 5.4) om eventuele klontjes op te lossen. Pipetteer 0,2 ml (punt 5.5) van de melkpoederoplossing in een maatkolf van 10 ml (punt 5.6), voeg 100 μ l toe van de 0,15 mM tryptamineoplossing (punt 7.1) met behulp van een injector (punt 5.7) en vul aan tot de merkstreep met methanol (punt 4.2.1). Zorgvuldig mengen door omkeren en gebruik van ultrageluid gedurende 15 minuten. Centrifugeer gedurende tien minuten bij 27 000 g en verzamel de bovenstaande vloeistof in een glazen flesje.

NB: De oplossing van het proefmonster moet worden bewaard bij 4 °C totdat de HPLC-bepaling wordt uitgevoerd.

7.3. *Bereiding van de uitwendige standaardoplossing*

Weeg 55,4 mg PEDP af in een maatkolf van 50 ml (punt 5.6) en voeg ongeveer 25 ml chloroform (punt 4.2.2) toe met behulp van een maatcilinder (punt 5.11). Verwarm de kolf, die nu van een stop moet zijn voorzien, tot 50 °C en meng zorgvuldig tot het PEDP oplost. Koel de kolf af tot 20 °C, vul tot de merkstreep aan met methanol (punt 4.2.1) en meng door middel van omkeren. Pipetteer 1 ml (punt 5.3) van deze oplossing in een maatkolf van 100 ml (punt 5.6) en vul het volume aan tot de merkstreep met methanol (punt 4.2.1). Pipetteer 1 ml (punt 5.3) van deze oplossing in een maatkolf van 10 ml (punt 5.6), voeg 100 μ l (punt 5.7) van de 0,15 mM tryptamine-oplossing (punt 7.1) toe en vul het volume aan tot de merkstreep met methanol (punt 4.2.1). Meng door middel van omkeren.

NB: De oplossing van het standaardmonster moet worden bewaard bij 4 °C totdat de HPLC-bepaling wordt uitgevoerd.

7.4. *Bereiding van het derivaatvormend reagens*

Weeg $25,0 \pm 0,1$ mg OPA (punt 4.3.4) af in een maatkolf van 10 ml (punt 5.6), voeg 0,5 ml (punt 5.5) methanol (punt 4.2.1) toe en meng zorgvuldig om OPA op te lossen. Vul de vloeistof tot de merkstreep aan met boorzuoeroplossing (punt 4.3.2) en voeg 20 μ l 2-mercaptoethanol (punt 4.3.3) toe met een injector (punt 5.7).

NB: Het derivaatvormend mengsel moet worden bewaard in een donkere fles bij 4 °C en is gedurende één week stabiel.

7.5. *Bepaling met behulp van HPLC*7.5.1. *Loopvloeistoffen (punt 4.4)*

Vloeistof A:

0,3 mM mononatriumfosfaat en 3 mM natriumacetaatoplossing (op een pH 6,5 gebracht met behulp van azijnzuur) methanol: tetrahydrofuraan = 558: 440: 2 (volumetrisch).

Vloeistof B:

methanol.

7.5.2. *Aanbevolen loopsnelheid:*

Tijd (min.)	Vloeistof A (%)	Vloeistof B (%)	Snelheid (ml/min.)
Begin	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

NB: De loopsnelheid moet soms enigszins gewijzigd worden om het oplossend vermogen van figuur 1 te krijgen.

De temperatuur van de kolom moet 30 °C zijn.

7.5.3. *Injectievolume: 50 µl derivaatvormend reagens en 50 µl monstervloeistof.*7.5.4. *Het kolomevenwicht*

Bij dagelijks gebruik moet iedere dag begonnen worden met spoelen van de kolom gedurende 15 minuten met 100 % oplosmiddel B; volgens wordt de verhouding A: B op 40: 60 gebracht en evenwicht gemaakt bij 1 ml/min. gedurende 15 minuten.

Voer een blancobepaling uit door het injecteren van methanol (punt 4.2.1)

NB: Voordat het toestel voor lange tijd buiten bedrijf wordt gesteld, moet de kolom gedurende 30 minuten worden gespoeld met methanol: chloroform = 80: 20 (volumetrisch).

7.5.5. *Bepaling van het gehalte aan PS en PE in het proefmonster.*

Voer de opeenvolgende chromatografische analyses uit waarbij de analysetijd constant moet worden gehouden om constante retentietijden te krijgen. Injecteer de uitwendige standaardoplossing na iedere vijf tot tien proefmonsteroplossingen om de responsfactor te kunnen beoordelen.

NB: Na iedere 20 tot 25 analyses moet de kolom worden gereinigd met 100 % oplossing B (punt 7.5.1) gedurende ten minste 30 minuten.

7.6. *Integratiegedeelte*7.6.1. *PEDP-piek*

PEDP wordt uitgespoeld met een enkele piek. Bepaal het piekoppervlak door dal-tot-dal-integratie.

7.6.2. *Tryptamine-piek*

Tryptamine wordt uitgespoeld met een enkele piek (figuur 1). Bepaal het piekoppervlak door dal-tot-dal-integratie.

7.6.3. *PS- en PE-piekgroepen*

Onder de beschreven omstandigheden (figuur 1) spoelt PS uit met twee grote, gedeeltelijk gescheiden pieken die vooraf worden gegaan door een kleine piek. PE spoelt uit met drie grote, gedeeltelijk gescheiden pieken. Bepaal het oppervlak van iedere piekenverzameling waarbij de basislijn gedefinieerd wordt zoals in figuur 1.

8. Berekening en weergave van de resultaten

Het gehalte aan PS en PE in het proefmonster moet als volgt worden berekend:

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

waarbij:

C = gehalte aan PS of PE (mg/100 g poeder) in het proefmonster;

A₁ = PEDP-piekoppervlak van de standaardoplossing (punt 7.3);

A₂ = PS- of PE-piekoppervlak van de proefmonsteroplossing (punt 7.2);

T₁ = tryptamine-piekoppervlak van de standaardoplossing (punt 7.3);

T₂ = tryptamine-piekoppervlak van de proefmonsteroplossing (punt 7.2).

9. Nauwkeurigheid

NB: De waarden voor herhaalbaarheid werden berekend volgens de internationale IDF-norm⁽¹⁾. De voorlopige reproduceerbaarheidslimiet is berekend in overeenstemming met de „richtlijnen voor de interpretatie van de analyseresultaten en de sensorische evaluatie van melk en zuivelprodukten in het kader van de gemeenschappelijke marktordening” (document VI/2721/95 van de Commissie).

9.1. Herhaalbaarheid

De relatieve standaarddeviatie van de herhaalbaarheid, d. w. z. de variatie van onafhankelijke analyse-resultaten van dezelfde onderzoeker bij gebruik van hetzelfde apparaat onder dezelfde omstandigheden en met hetzelfde proefmonster binnen een korte tijdsperiode, mag niet groter zijn dan 2 %. Als twee bepalingen onder deze omstandigheden worden uitgevoerd, mag het relatieve verschil tussen de twee resultaten niet groter zijn dan 6 % van het rekenkundig gemiddelde van de resultaten.

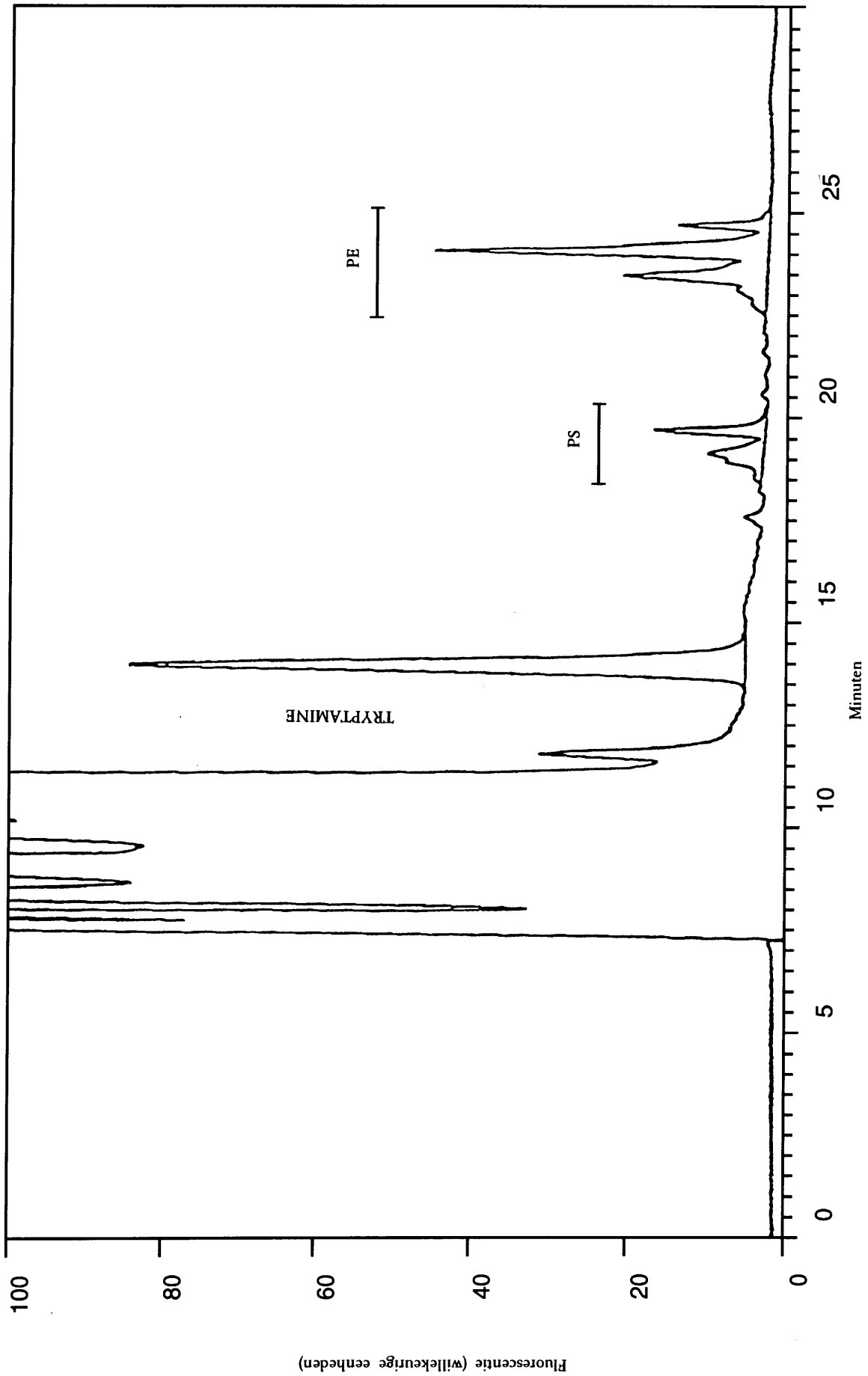
9.2. Reproduceerbaarheid

Als twee bepalingen worden uitgevoerd door twee verschillende onderzoekers die verschillende apparatuur gebruiken onder verschillende omstandigheden voor onderzoek van hetzelfde proefmonster, mag het relatieve verschil tussen de resultaten niet groter zijn dan 11 % van het rekenkundig gemiddelde van de resultaten.

10. Bibliografie

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., *Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLG quantification of aminophospholipids*, Sci. Tecn. Latt.-Cas. 39,395 (1988) (*Aantonen van vaste stoffen uit karnemelk in magere-melkpoeder door kwantitatieve bepaling van aminofosfolipiden met behulp van HPLG*).

⁽¹⁾ Internationale IDF-norm 135B/1991. Melk en melkprodukten. Nauwkeurigheid van analysemethoden. Een overzicht van een gezamenlijke studie.



Figuur 1: HPLC-patroon van OPA-derivaten van fosfatidylserine (PS) en fosfatidylethanolamine (PE) in methanol-extract van opgelost magere-melkpoeder. De integratiewijze voor de pieken van PS, PE en tryptamine (interne standaard) is vermeld

BIJLAGE VII

OPSPORING VAN ANTIBIOTISCHE EN SULFONAMIDE/DAPSON-RESIDUEN IN
MAGERE-MELKPOEDER

Er wordt een test op bacterieremmende stoffen uitgevoerd waarbij *Bacillus stearothermophilus* var. *Caldo-lactis* C953 als testorganisme wordt gebruikt en die gevoelig genoeg is om 4 µg benzylpenicilline per liter melk en 100 µg sulfadimidine per liter melk aan te tonen. Er zijn commerciële pakketten verkrijgbaar die gebruikt kunnen worden als zij de vereiste gevoeligheid voor benzylpenicilline en sulfadimidine hebben (¹).

Voor de test moet opgelost magere-melkpoeder worden gebruikt (1 g poeder en 9 ml gedestilleerd water). De test moet worden uitgevoerd als beschreven in het IDF-bulletin nr. 258/1991, deel 1, hoofdstuk 2, of volgens aanwijzingen van de fabrikant van het testpakket.

Positieve resultaten moeten als volgt worden geïnterpreteerd:

1. Herhaal de test, waarbij penicillinase aan het testsysteem wordt toegevoegd.

Positief resultaat: De remmende stof kan op deze wijze niet worden aangetoond.

Negatief resultaat: De remmende stof is een β -lactam antibioticum.

2. Herhaal de test, waarbij p-aminobenzoëzuur aan het testsysteem wordt toegevoegd.

Positief resultaat: De remmende stof kan op deze wijze niet worden aangetoond.

Negatief resultaat: De remmende stof is een sulfonamide/dapson.

3. Herhaal de test waarbij penicillinase en p-aminobenzoëzuur aan het testsysteem worden toegevoegd.

Positief resultaat: De remmende stof kan op deze wijze niet worden aangetoond.

Negatief resultaat: De remmende stoffen zijn een β -lactam antibioticum en een sulfonamide/dapson.

(¹) *Belangrijke opmerking:* Als magere-melkpoeder wordt onderzocht, kunnen valse positieve resultaten voorkomen. Het is daarom van belang om vast te stellen dat het testsysteem geen valse positieve resultaten geeft.