Το παρόν έγγραφο αποτελεί απλώς βοήθημα τεκμηρίωσης και τα θεσμικά όργανα δεν αναλαμβάνουν καμία ευθύνη για το περιεχόμενό του

►**B** **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 273/2008 της Επιτροπής**

της 5ης Μαρτίου 2008

για τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 του Συμβουλίου, όσον αφορά τις μεθόδους ανάλυσης και ποιοτικής αξιολόγησης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων

(ΕΕ L 88 της 29.3.2008, σ. 1)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
►**M1**	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 565/2013 της Επιτροπής της 18ης Ιουνίου 2013	L 167	26	19.6.2013

▼B

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 273/2008 της Επιτροπής

της 5ης Μαρτίου 2008

για τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 του Συμβουλίου, όσον αφορά τις μεθόδους ανάλυσης και ποιοτικής αξιολόγησης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 του Συμβουλίου, της 17ης Μαΐου 1999, περί κοινής οργανώσεως αγοράς στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων [1], και ιδίως τα άρθρα 10 και 15, το άρθρο 26 παράγραφος 3, το άρθρο 29 παράγραφος 1 και το άρθρο 31 παράγραφος 4,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 213/2001 της Επιτροπής [2] ορίζει λεπτομερείς κανόνες εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 του Συμβουλίου, όσον αφορά τις μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και την ποιοτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Λαμβανομένων υπόψη των τεχνικών εξελίξεων στο πεδίο των αναλυτικών μεθόδων, πρέπει να επέλθουν νέες ουσιαστικές τροποποιήσεις. Για λόγους σαφήνειας και αποτελεσματικότητας και με δεδομένα το πλήθος και τον τεχνικό χαρακτήρα των τροποποιήσεων, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 213/2001 πρέπει να καταργηθεί και να αντικατασταθεί από νέο κανονισμό.

(2) Η σύνθεση και η ποιότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων πρέπει να ελέγχονται, ώστε να εξασφαλίζεται η αυστηρή τήρηση των σχετικών απαιτήσεων, οι οποίες έχουν καθοριστεί στο πλαίσιο των ρυθμίσεων που προβλέπει ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1255/1999.

(3) Οι μέθοδοι αναφοράς που χρησιμοποιούνται για τους εν λόγω ελέγχους είναι συχνά μέθοδοι που δημοσιεύονται από διεθνείς οργανισμούς, όπως η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (CEN), η Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος (IDF), ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) και η Ένωση Αναγνωρισμένων Αναλυτικών Χημικών (AOAC International), και επικαιροποιούνται κατά τακτά χρονικά διαστήματα από τους οργανισμούς αυτούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει θεσπιστεί κοινοτική μέθοδος αναφοράς, ενώ σε άλλες, δεν καθορίζεται μέθοδος αναφοράς στις κοινοτικές διατάξεις. Για να εξασφαλιστεί η ενιαία εφαρμογή των μεθόδων αναφοράς, πρέπει να καταρτιστεί πίνακας μεθόδων αναφοράς και να προβλεφθεί η προσαρμογή του πίνακα αυτού από την Επιτροπή, όταν κρίνεται απαραίτητο.

(4) Δεν πρέπει να αποκλειστεί η χρήση των συνήθων μεθόδων. Πρέπει, ως εκ τούτου, να καθοριστούν ελάχιστοι όροι χρήσης τους.

(5) Πρέπει επίσης να θεσπιστούν κοινές διαδικασίες για να εξασφαλιστεί μια ενιαία πρακτική κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων, την οργανοληπτική αξιολόγηση των σχετικών προϊόντων και την επανεξέταση των αποτελεσμάτων που έχουν αμφισβητηθεί.

[1] ΕΕ L 160 της 26.6.1999, σ. 48. Κανονισμός όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1152/2007 (ΕΕ L 258 της 4.10.2007, σ. 3). Από την 1η Ιουλίου 2008 ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 θα αντικατασταθεί από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1234/2007 (ΕΕ L 299 της 16.11.2007, σ. 1).

[2] ΕΕ L 37 της 7.2.2001, σ. 1.

▼B

(6) Για ορισμένες αναλύσεις δεν υφίστανται επί του παρόντος επικυρωμένες, διεθνώς αποδεκτές μέθοδοι αναφοράς, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν στοιχεία όσον αφορά τη διεργαστηριακή μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων των αναλύσεων. Πρέπει επομένως να θεσπιστούν κοινοτικές μέθοδοι, οι οποίες έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τους διεθνείς κανόνες, και να εφαρμόζονται ως μέθοδοι αναφοράς.

(7) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1898/2005 της Επιτροπής [1] ορίζει λεπτομερείς κανόνες εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999, όσον αφορά τα μέτρα διάθεσης κρέμας γάλακτος, βουτύρου και συμπυκνωμένου βουτύρου στην αγορά της Κοινότητας και προβλέπει ιχνηθέτηση της κρέμας γάλακτος, του βουτύρου και του συμπυκνωμένου βουτύρου σε ορισμένες περιπτώσεις, ώστε να εξασφαλίζεται η ορθή τελική χρήση των προϊόντων αυτών. Η ιχνηθέτηση έχει σημασία για την εύρυθμη λειτουργία του καθεστώτος. Για να εξασφαλιστεί η ίση μεταχείριση των εμπορευόμενων που συμμετέχουν στο καθεστώς, πρέπει να θεσπιστούν κοινές μέθοδοι προσδιορισμού ορισμένων από τους εν λόγω ιχνηθέτες.

(8) Το άρθρο 9 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 επιτρέπει τη χορήγηση ενίσχυσης για ιδιωτική αποθεματοποίηση τυριών από πρόβειο γάλα. Για τα ίδια προϊόντα μπορεί να χορηγηθεί ειδική επιστροφή κατά την εξαγωγή, δυνάμει του άρθρου 31 του ίδιου κανονισμού. Προβλέπεται η εισαγωγή στην Κοινότητα από ορισμένες τρίτες χώρες, υπό προτιμησιακούς όρους, τυριών από γάλα προβάτων, αιγών ή βουβάλων και μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων. Λαμβανομένων υπόψη των ανωτέρω, είναι αναγκαίο να εξακριβώνεται με κατάλληλους ελέγχους ότι δεν έχει ενσωματωθεί αγελαδινό γάλα στα σχετικά προϊόντα. Κατά συνέπεια, πρέπει να θεσπιστεί κοινοτική μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος, με την επιφύλαξη της χρήσης συνήθων μεθόδων, υπό τον όρο ότι πληρούν ορισμένα κριτήρια.

(9) Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90 της Επιτροπής, της 10ης Οκτωβρίου 1990, περί της χορήγησης ενισχύσεων για το αποκορυφωμένο γάλα το οποίο μεταποιείται για παρασκευή καζεΐνης και καζεϊνικών αλάτων [2], πρέπει να διαπιστώνεται η απουσία κολοβακτηριδίων. Η διεθνώς αποδεκτή μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση κολοβακτηριδίων στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι το διεθνές πρότυπο ISO 4831. Έχει καθοριστεί κοινοτική μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση κολοβακτηριδίων, η οποία βασίζεται στο πρότυπο αυτό.

(10) Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2658/87 του Συμβουλίου, της 23ης Ιουλίου 1987, για τη δασμολογική και στατιστική ονοματολογία και το κοινό δασμολόγιο [3] διαφοροποιεί το ύψος των δασμών για τις σύνθετες ζωοτροφές που υπάγονται στη δασμολογική κλάση 2309, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητά τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Για να εξασφαλιστεί η ενιαία εφαρμογή των σχετικών διατάξεων, πρέπει να θεσπιστεί προς υποχρεωτική χρήση σε όλα τα κράτη μέλη μία γενικώς αναγνωρισμένη μέθοδος ανάλυσης της περιεκτικότητας σε λακτόζη.

---

[1] ΕΕ L 308 της 25.11.2005, σ. 1. Κανονισμός όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1546/2007 (ΕΕ L 337 της 21.12.2007, σ. 68).

[2] ΕΕ L 279 της 11.10.1990, σ. 22. Κανονισμός όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1487/2006 (ΕΕ L 278 της 10.10.2006, σ. 8).

[3] ΕΕ L 256 της 7.9.1987, σ. 1. Κανονισμός όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1352/2007 (ΕΕ L 303 της 21.11.2007, σ. 3).

▼B

(11) Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1255/1999, το βούτυρο και το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που προορίζονται για την παρέμβαση ή, στην περίπτωση του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη, για τη διατροφή των ζώων, πρέπει να ανταποκρίνονται σε ορισμένες ποιοτικές απαιτήσεις. Πρέπει να θεσπιστούν μέθοδοι αναφοράς για τον έλεγχο της τήρησης των εν λόγω απαιτήσεων.

(12) Ορισμένες μέθοδοι καθιερώνονται για πρώτη φορά με τον παρόντα κανονισμό. Πρέπει να προβλεφθεί επαρκές χρονικό διάστημα από την ημερομηνία έναρξης της ισχύος του παρόντος κανονισμού, ώστε να δοθεί στα εργαστήρια η δυνατότητα να καθιερώσουν και να εφαρμόσουν σωστά τις εν λόγω νέες μεθόδους. Οσάκις μέθοδος αναφοράς που περιλαμβάνεται στο παράρτημα Ι αναθεωρείται και δημοσιεύεται από τον οργανισμό τυποποίησης, τα εργαστήρια πρέπει να έχουν στη διάθεση τους έξι μήνες για να επικαιροποιήσουν τις οικείες αναλυτικές διαδικασίες, ώστε να συμμορφωθούν με το νέο πρότυπο.

(13) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής διαχείρισης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Άρθρο 1

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

1. Με τον παρόντα κανονισμό θεσπίζονται ορισμένες μέθοδοι αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη χημική, φυσική και μικροβιολογική ανάλυση, καθώς και για την οργανοληπτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων στο πλαίσιο των ρυθμίσεων που προβλέπονται από την κοινή οργάνωση της αγοράς στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, η οποία συνεστήθη με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1255/1999, καθώς και οι κανόνες εφαρμογής των μεθόδων αυτών.

2. Ο πίνακας των μεθόδων αναφοράς που εφαρμόζονται στις αναφερόμενες στην παράγραφο 1 αναλύσεις παρατίθεται στο παράρτημα Ι του παρόντος κανονισμού.

3. Η Επιτροπή επικαιροποιεί τον ανωτέρω πίνακα με τη διαδικασία του άρθρου 42 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999.

Άρθρο 2

Συνήθεις μέθοδοι

Για τις αναλύσεις που επιβάλλονται από τις κοινοτικές διατάξεις μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις μέθοδοι, υπό τον όρο ότι οι τελευταίες έχουν βαθμονομηθεί σωστά και ελέγχονται τακτικά ως προς τη μέθοδο αναφοράς. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με γνώμονα το σταθερό συστηματικό σφάλμα, την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα.

Σε περίπτωση διαφοράς, οριστικό είναι το αποτέλεσμα που προκύπτει από τη μέθοδο αναφοράς.

Τα κράτη μέλη ενημερώνουν την Επιτροπή σχετικά με τη χρήση συνήθων μεθόδων στις αναλύσεις που αναφέρονται στο άρθρο 1.

▼B

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

METHODS OF ANALYSIS

Άρθρο 3

Αξιολόγηση της συμμόρφωσης φορτίου με νομοθετικά κατοχυρωμένο όριο

Για τον προσδιορισμό της τήρησης των νομοθετικών απαιτήσεων που αφορούν τη σύσταση, εξαιρουμένης της ανάλυσης ιχνηθετών, εφαρμόζεται το παράρτημα II του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 4

Οργανοληπτική αξιολόγηση

1. Για την οργανοληπτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων πλην του βουτύρου που προορίζεται για δημόσια αποθεματοποίηση, τα κράτη μέλη χρησιμοποιούν ως μέθοδο αναφοράς είτε το πρότυπο IDF 99C:1997 είτε άλλες συγκρίσιμες μεθόδους, τις οποίες κοινοποιούν στην Επιτροπή.

Οι διαδικασίες του παραρτήματος III εφαρμόζονται για τον έλεγχο των επιδόσεων των δοκιμαστών και της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων των οργανοληπτικών αναλύσεων.

2. Όσον αφορά το βούτυρο που προορίζεται για δημόσια αποθεματοποίηση, εφαρμόζονται οι διαδικασίες του παραρτήματος III για τον έλεγχο των επιδόσεων των δοκιμαστών και της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων των οργανοληπτικών αναλύσεων.

Η διαδικασία που καθορίζεται στο παράρτημα IV εφαρμόζεται ως μέθοδος αναφοράς για την οργανοληπτική αξιολόγηση.

Άρθρο 5

Ιχνηθέτες

1. Η αναλυτική μέθοδος που καθορίζεται στο παράρτημα V χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του βουτύρου, του βουτυρελαίου και της κρέμας γάλακτος σε τριγλυκερίδιο του οινανθικού (κ-επτανικού) οξέος.

2. Η αναλυτική μέθοδος που καθορίζεται στο παράρτημα VI χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της βανιλίνης στο συμπυκνωμένο βούτυρο, το βούτυρο και την κρέμα γάλακτος.

3. Η αναλυτική μέθοδος που καθορίζεται στο παράρτημα VII χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του συμπυκνωμένου βουτύρου και του βουτύρου σε αιθυλεστέρα του β-απο-8'-καροτενικού οξέος.

4. Η αναλυτική μέθοδος που καθορίζεται στο παράρτημα VIII χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του βουτύρου και του συμπυκνωμένου βουτύρου σε β-σιτοστερόλη ή στιγμαστερόλη.

5. Η ιχνηθέτηση του συμπυκνωμένου βουτύρου, του βουτύρου και της κρέμας γάλακτος θεωρείται σύμφωνη με τις σχετικές κοινοτικές διατάξεις, εάν τα αποτελέσματα που προκύπτουν ανταποκρίνονται στις προδιαγραφές των σημείων 10 και 11 του παραρτήματος V και του σημείου 8 των παραρτημάτων VI, VII και VIII.

Άρθρο 6

Ανίχνευση της καζεΐνης αγελαδινού γάλακτος

1. Εφαρμόζεται η αναλυτική μέθοδος αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα IX για να εξασφαλιστεί ότι το τυρί που παρασκευάζεται αποκλειστικά από γάλα προβάτων, αιγών ή βουβάλων και μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων δεν περιέχει καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος.

▼B

Η καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος θεωρείται παρούσα, εάν η περιεκτικότητα του αναλυθέντος δείγματος σε καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος είναι ίση ή μεγαλύτερη από την περιεκτικότητα του δείγματος αναφοράς που περιέχει αγελαδινό γάλα σε αναλογία 1 %, όπως προβλέπεται στο παράρτημα IX.

2. Για την ανίχνευση της καζεΐνης αγελαδινού γάλακτος στα τυριά που αναφέρονται στην παράγραφο 1 επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθεις μέθοδοι υπό τους εξής όρους:

α) το μέγιστο όριο ανίχνευσης είναι 0,5 % και

β) δεν προκύπτουν ψευδοθετικά αποτελέσματα και

γ) η καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος είναι ανιχνεύσιμη με την απαιτούμενη ευαισθησία, ακόμη και μετά από μακρές περιόδους ωρίμασης, οι οποίες μπορεί να παρατηρηθούν στις συνήθεις συνθήκες εμπορίας.

Εάν δεν ικανοποιείται οποιαδήποτε από τις προαναφερόμενες απαιτήσεις, χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι αναφοράς που καθορίζονται στο παράρτημα IX.

Άρθρο 7

Ανίχνευση κολοβακτηριδίων

Τα κολοβακτηρίδια ανιχνεύονται στο βούτυρο, το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, την καζεΐνη και τα καζεϊνικά άλατα με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα X.

Άρθρο 8

Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λακτόζη

Η περιεκτικότητα σε λακτόζη των προϊόντων που υπάγονται στον κωδικό 2309 της συνδυασμένης ονοματολογίας (ΣΟ) προσδιορίζεται με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XI.

Άρθρο 9

Ανίχνευση γλυκού ορού γάλακτος

1. Ο γλυκός ορός γάλακτος (τυρόγαλα πυτιάς) ανιχνεύεται στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, που προορίζεται για δημόσια αποθεματοποίηση, με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XII.

2. Ο γλυκός ορός γάλακτος ανιχνεύεται στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη και στα μείγματα που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων, με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XII. Εφόσον ανιχνευθεί γλυκός ορός γάλακτος, εφαρμόζεται το παράρτημα XIII.

Άρθρο 10

Ανίχνευση βουτυρογάλακτος

Το βουτυρόγαλα ανιχνεύεται στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XIV.

Άρθρο 11

Ανίχνευση καταλοίπων αντιμικροβιακών

Τα κατάλοιπα αντιμικροβιακών ανιχνεύονται στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XV.

▼B

Άρθρο 12

Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε σκόνη αποκορυφωμένου γάλακτος

Η περιεκτικότητα των σύνθετων ζωοτροφών σε σκόνη αποκορυφωμένου γάλακτος προσδιορίζεται με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XVI.

Άρθρο 13

Ανίχνευση αμύλου

Το άμυλο ανιχνεύεται στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, το μετουσιωμένο γάλα σε σκόνη και τις σύνθετες ζωοτροφές με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XVII.

Άρθρο 14

Προσδιορισμός της υγρασίας της ξηρής κρέμας γάλακτος

Η υγρασία της ξηρής κρέμας γάλακτος προσδιορίζεται με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XVIII.

Άρθρο 15

Προσδιορισμός της υγρασίας του όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη

Η υγρασία του όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στις ζωοτροφές προσδιορίζεται με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XIX.

Άρθρο 16

Προσδιορισμός της καθαρότητας του λίπους γάλακτος

Η καθαρότητα του λίπους γάλακτος προσδιορίζεται με τη μέθοδο αναφοράς που καθορίζεται στο παράρτημα XX.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΓΕΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Άρθρο 17

Διασφάλιση ποιότητας

Οι αναλύσεις εκτελούνται σε εργαστήρια που διαθέτουν σύστημα διασφάλισης της αναλυτικής ποιότητας, το οποίο περιλαμβάνει διαδικασίες εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου. Τα εργαστήρια που δεν είναι διαπιστευμένα συμμετέχουν σε σχήματα ελέγχου ικανότητας τουλάχιστον μία φορά ετησίως και η απόκλιση των αποτελεσμάτων τους από τη συναινετική τιμή δεν υπερβαίνει το $2\sigma_R$ (τυπική απόκλιση της μεθόδου αναφοράς σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας). Στο εργαστήριο πρέπει να είναι διαθέσιμη λεπτομερής περιγραφή των εφαρμοζόμενων συστημάτων.

Τα εργαστήρια που είναι διαπιστευμένα κατά τα πρότυπα του άρθρου 12 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, για τη διενέργεια επισήμων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και

▼B

τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων ([1]) απαλλάσσονται από την υποχρέωση συμμετοχής σε ελέγχους ικανότητας.

Άρθρο 18

Δειγματοληψία και αμφισβήτηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων

1. Η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με τη σχετική νομοθετική ρύθμιση για το εξεταζόμενο προϊόν. Εάν δεν υπάρχουν διατάξεις περί δειγματοληψίας, εφαρμόζονται οι διατάξεις του προτύπου ISO 707IDF 50 «Γάλα και προϊόντα γάλακτος — Καθοδήγηση για δειγματοληψία».

2. Οι εκθέσεις του εργαστηρίου σχετικά με τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να περιέχουν επαρκή στοιχεία για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με το παράρτημα II και το παράρτημα XXI.

3. Για τις αναλύσεις που απαιτούνται βάσει των κοινοτικών διατάξεων πρέπει να λαμβάνονται διπλά δείγματα.

4. Στις περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης δεν γίνονται δεκτά από τον εμπορευόμενο εφαρμόζεται η διαδικασία του παραρτήματος XXI.

5. Εάν ο παραγωγός μπορεί να αποδείξει, εντός πέντε εργάσιμων ημερών από τη δειγματοληψία, ότι η διαδικασία δειγματοληψίας δεν εφαρμόστηκε σωστά, αυτή πρέπει να επαναλαμβάνεται, εφόσον είναι δυνατόν. Εάν δεν είναι δυνατόν να επαναληφθεί η δειγματοληψία, το φορτίο πρέπει να γίνεται δεκτό.

▼M1

———————

Άρθρο 19α

Κοινοποιήσεις

Οι κοινοποιήσεις που προβλέπονται στο άρθρο 2, στο άρθρο 4 παράγραφος 1 και στο παράρτημα III μέρος Γ πραγματοποιούνται σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 792/2009 της Επιτροπής ([2]).

▼B

Άρθρο 20

Κατάργηση

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 213/2001 καταργείται.

Οι αναφορές στον καταργούμενο κανονισμό νοούνται ως αναφορές στον παρόντα κανονισμό και διαβάζονται σύμφωνα με τον πίνακα αντιστοιχίας του παραρτήματος XXII.

Άρθρο 21

Έναρξη ισχύος

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Εφαρμόζεται από τις 31 Μαρτίου 2008.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

([1]) ΕΕ L 165 της 30.4.2004, σ. 1.
([2]) ΕΕ L 228 της 1.9.2009, σ. 3.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

(Άρθρο 1)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ευρετήριο Ελάχ. = ελάχιστο, Μέγ. = μέγιστο, Παράρτημα = Παράρτημα του κανονισμού στον οποίο γίνεται αναφορά, ΣΥΑΛ = στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος, ΑΥ = αριθμός υπεροξειδίων, Ο = όψη, Γ = γεύση, Σ = σύσταση, ΣΑΒ = συνολικός αριθμός βακτηριδίων, Θερμ. = αριθμός θερμόφιλων βακτηριδίων, ΚΜ = κράτος μέλος, IDF = Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος, ISO = Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης, IUPAC = Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας, ADPI = Αμερικανικό Ινστιτούτο Γαλακτοκομικών Προϊόντων, ΖΣΓ = ζαχαρούχο συμπυκνωμένο γάλα, ΑΓΚ = αφυδατωμένο γάλα ή κρέμα γάλακτος (εβαπορέ)

ΜΕΡΟΣ Α

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο [1]	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
(ΕΚ) αριθ. 2771/1999 — Δημόσια αποθεματοποίηση	Ανάλατο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 82 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Νερό	Έως 16 % m/m	ISO 3727-1: 2001IDF 80-1: 2001	
		ΣΥΑΛ	Έως 2 % m/m	ISO 3727-2: 2001IDF 80-2: 2001	
		Οξύτητα λίπους	1,2 mmole/100g λίπους	ISO 1740: 2004IDF 6: 2004	
		ΑΥ (μέγ.)	0,3 meq οξυγόνου/ 1 000 g λίπους	ISO 3976: 2006IDF 74: 2006	Σημείωση 1
		Κολοβακτηρίδια	Μη ανιχνεύσιμα σε 1 g	Παράρτημα X	Σημείωση 3
		Λίπος πλην του λίπους γάλακτος	Μη ανιχνεύσιμο με ανάλυση τριγλυκεριδίων	Παράρτημα XX	
		Στερολικοί ιχνηθέτες	Μη ανιχνεύσιμοι, β-σιτοστερόλη ≤ 40 mg/kg	Παράρτημα VIII	
		Άλλοι ιχνηθέτες			
		— βανιλίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Παράρτημα VI	
		— αιθυλεστέρας του καροτενικού οξέος	≤ 6 mg/kg	Παράρτημα VII	
		— τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος	Μη ανιχνεύσιμα	Παράρτημα V	
		Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	Βαθμολογία τουλάχιστον 4 στα 5 για τα Ο, Γ και Σ	Παράρτημα IV	
		Διασπορά σε νερό	Βαθμολογία τουλάχιστον 4	ISO 7586: 1985 — IDF 112A: 1989	
(ΕΚ) αριθ. 2771/1999, ιδιωτική αποθεματοποίηση	Ανάλατο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 82 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Νερό	Έως 16 % m/m	ISO 3727-1: 2001IDF 80-1:2001	

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο ([1])	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
		ΣΥΑΛ	Έως 2 % m/m	ISO 3727-2: 2001IDF 80-2:2001	
(ΕΚ) αριθ. 2771/1999, ιδιωτική αποθεματοποίηση	Αλατισμένο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 80 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Νερό	Έως 16 % m/m	ISO 3727-1: 2001IDF 80-1: 2001	
		ΣΥΑΛ (εξαιρουμένου του αλατιού)	Έως 2 % m/m	ISO 3727-2: 2001IDF 80-2:2001	
		Αλάτι	Έως 2 % m/m	ISO 15648: 2004IDF 179: 2004	
(ΕΚ) αριθ. 1898/2005, κεφάλαιο II	Ανάλατο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 82 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Λίπος πλην του λίπους γάλακτος		Παράρτημα XX	
		Νερό	Έως 16 % m/m	ISO 3727-1 2001IDF 80-1: 2001	
		ΣΥΑΛ	Έως 2 % m/m	ISO 3727-2: 2001IDF 80-2: 2001	
		Ιχνηθέτες			
		— στερόλες	Βλέπε παράρτημα VIII	Παράρτημα VIII	
		— βανιλίνη	Βλέπε παράρτημα VI	Παράρτημα VI	
		— αιθυλεστέρας του καροτενικού οξέος	Βλέπε παράρτημα VII	Παράρτημα VII	
		— τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος	Βλέπε παράρτημα V	Παράρτημα V	
(ΕΚ) αριθ. 1898/2005, κεφάλαιο II	Αλατισμένο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 80 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Λίπος πλην του λίπους γάλακτος		Παράρτημα XX	
		Νερό	Έως 16 % m/m	ISO 3727-1: 2001IDF 80-1: 2001	
		ΣΥΑΛ (εξαιρουμένου του αλατιού)	Έως 2 % m/m	ISO 3727-2: 2001IDF 80-2: 2001	
		Αλάτι	Έως 2 % m/m	ISO 15648: 2004IDF 179: 2004	
		Ιχνηθέτες			
		— στερόλες	Βλέπε παράρτημα VIII	Παράρτημα VIII	
		— βανιλίνη	Βλέπε παράρτημα VI	Παράρτημα VI	
		— αιθυλεστέρας του καροτενικού οξέος	Βλέπε παράρτημα VII	Παράρτημα VII	
		— τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος	Βλέπε παράρτημα V	Παράρτημα V	
(ΕΚ) αριθ. 1898/2005, κεφάλαιο II	Συμπυκνωμένο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο ([1])	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
		Νερό και ΣΥΑΛ	Έως 0,2 % m/m	ISO 5536: 2002IDF 23:2002 (υγρασία) IDF 24: 1964 (ΣΥΑΛ)	
		Οξύτητα λίπους	1,2 mmole/100g λίπους	ISO 1740: 2004IDF 6: 2004	
		ΑΥ (μέγ.)	0,5 meq οξυγόνου/ 1 000 g λίπους	ISO 3976: 2006IDF 74: 2006	Σημείωση 1
		Λίπος πλην του λίπους γάλακτος	Απουσία	Παράρτημα XX	
		Γεύση	Σαφής		
		Οσμή	Απουσία ξένων οσμών		
		Άλλες	Απουσία μέσων εξουδετέρωσης, αντιοξειδωτικών και συντηρητικών		
		Ιχνηθέτες:			
		— στερόλες	Βλέπε παράρτημα VIII	Παράρτημα VIII	
		— βανιλίνη	Βλέπε παράρτημα VI	Παράρτημα VI	
		— αιθυλεστέρας του καροτενικού οξέος	Βλέπε παράρτημα VII	Παράρτημα VII	
		— τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος	Βλέπε παράρτημα V	Παράρτημα V	
(ΕΚ) αριθ. 1898/2005, κεφάλαιο II	Κρέμα γάλακτος	Λίπος	Ελάχ. 35 % m/m	ISO 2450: 1999 — IDF 16 C: 1987	
		Λίπος πλην του λίπους γάλακτος		Παράρτημα XX	
		Ιχνηθέτες:			
		— στερόλες	Βλέπε παράρτημα VIII		Σημείωση 2
		— βανιλίνη	Βλέπε παράρτημα VI	Παράρτημα VI	
		— αιθυλεστέρας του καροτενικού οξέος	Βλέπε παράρτημα VII		Σημείωση 2
		— τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος	Βλέπε παράρτημα V	Παράρτημα V	
(ΕΚ) αριθ. 1898/2005, κεφάλαιο III	Συμπυκνωμένο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 96 % m/m		Σημείωση 2
		Λίπος πλην του λίπους γάλακτος		Παράρτημα XX	
		ΣΥΑΛ	Έως 2 % m/m		Σημείωση 2

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο ([1])	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
		Ιχνηθέτες:			
		— στιγμαστερόλη (95 % m/m)	15 g/100 kg συμπυκνωμένου βουτύρου	Παράρτημα VIII	
		— στιγμαστερόλη (85 % m/m)	17 g/100 kg συμπυκνωμένου βουτύρου	Παράρτημα VIII	
		— τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος	10,34 kg/t συμπυκνωμένου βουτύρου	Παράρτημα V	
		— αιθυλεστέρας του βουτυρικού οξέος και στιγμαστερόλη		— αιθυλεστέρας του βουτυρικού οξέος — στιγμαστερόλη: παράρτημα VIII	Σημείωση 2
		— αιθυλεστέρας του βουτυρικού οξέος και τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος		— αιθυλεστέρας του βουτυρικού οξέος — τριγλυκερίδια του οινανθικού οξέος: παράρτημα V	Σημείωση 2
		λεκιθίνη (E 322)	Έως 0,5 % m/m		Σημείωση 2
		NaC1	Έως 0,75 % m/m	ISO 15648: 2004IDF 179: 2004	
		Οξύτητα λίπους	1,2 mmole/100g λίπους	ISO 1740: 2004IDF 6: 2004	
		ΑΥ (μέγ.)	Έως 0,5 meq οξυγόνου/ 1 000 g λίπους	ISO 3976: 2006IDF 74: 2006	Σημείωση 1
		Γεύση	Σαφής		
		Οσμή	Απουσία ξένων οσμών		
		Άλλες	Απουσία μέσων εξουδετέρωσης, αντιοξειδωτικών και συντηρητικών		
(ΕΚ) αριθ. 1898/2005, κεφάλαιο IV	Ανάλατο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 82 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Νερό	Έως 16 % m/m	ISO 3727-1: 2001IDF 80-1: 2001	
		ΣΥΑΛ	Έως 2 % m/m	ISO 3727-2: 2001IDF 80-2: 2001	
(ΕΚ) αριθ. 1898/2005, κεφάλαιο IV	Αλατισμένο βούτυρο	Λίπος	Ελάχ. 80 % m/m	ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Νερό	Έως 16 % m/m	ISO 3727-1: 2001IDF 80-1: 2001	
		ΣΥΑΛ (εξαιρουμένου του αλατιού)	Έως 2 % m/m	ISO 3727-2: 2001IDF 80-2: 2001	
		Αλάτι	Έως 2 % m/m	ISO 15648: 2004IDF 179: 2004	

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο ([1])	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
Άρθρο 9 και τίτλος II του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999	Τυρί από πρόβειο ή/και αίγειο γάλα	Αγελαδινό γάλα	< 1 % m/m	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX	
(ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα I — Όξινη καζεΐνη	Νερό	Έως 12,00 % m/m	ISO 5550: 2006IDF 78: 2006	
		Λίπος	Έως 1,75 % m/m	ISO 5543: 2004IDF127: 2004	
		Ελεύθερα οξέα	Έως 0,30 ml διαλύματος NaOH 0,1 N/g	ISO 5547: 1978 — IDF 91: 1979	
(ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα I — Καζεΐνη πυτιάς	Νερό	Έως 12,00 % m/m	ISO 5550: 2006IDF 78: 2006	
		Λίπος	Έως 1,00 % m/m	ISO 5543: 2004IDF 127: 2004	
		Τέφρα	Ελάχ. 7,50 % m/m	ISO 5545: 1978 — IDF 90: 1979	
(ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα I — Καζεϊνικά άλατα	Νερό	Έως 6,00 % m/m	ISO 5550: 2006IDF 78: 2006	
		Γαλακτικές πρωτεΐνες	Ελάχ. 88,00 % m/m	ISO 5549: 1978 — IDF 92: 1979	
		Λίπος και τέφρα	Έως 6,00 % m/m	ISO 5543: 2004IDF 127: 2004	
		Δεσμευμένη τέφρα		ISO 5544: 1978 — IDF 89: 1979	
		Τέφρα		ISO 5545: 1978 — IDF 90: 1979	
(ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα II — Όξινη καζεΐνη	Νερό	Έως 10,00 % m/m	ISO 5550: 2006IDF 78: 2006	
		Λίπος	Έως 1,50 % m/m	ISO 5543: 2004IDF 127: 2004	
		Ελεύθερα οξέα	Έως 0,20 ml διαλύματος NaOH 0,1 N/g	ISO 5547: 1978 — IDF 91: 1979	
		ΣΑΒ (μέγ.)	30 000/g	ISO 4833: 2003	Σημείωση 3
		Κολοβακτηρίδια	Απουσία σε 0,1 g	Παράρτημα X	Σημείωση 3
		Θερμ. (μέγ.)	5 000/g	ISO 4833: 2003	Σημειώσεις 3 και 4
(ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα II – Καζεΐνη πυτιάς	Νερό	Έως 8,00 % m/m	ISO 5550: 2006IDF 78: 2006	
		Λίπος	Έως 1,00 % m/m	ISO 5543: 2004IDF 127: 2004	
		Τέφρα	Ελάχ. 7,50 % m/m	ISO 5545: 1978 — IDF 90: 1979	
		ΣΑΒ (μέγ.)	30 000/g	ISO 4833: 2003	Σημείωση 3
		Κολοβακτηρίδια	Απουσία σε 0,1 g	Παράρτημα X	Σημείωση 3
		Θερμ. (μέγ.)	5 000/g	ISO 4833: 2003	Σημειώσεις 3 και 4

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο [1]	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
(ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα II — Καζεϊνικά άλατα	Νερό	Έως 6,00 % m/m	ISO 5550: 2006IDF 78: 2006	
		Γαλακτικές πρωτεΐνες	Ελάχ. 88,00 % m/m	ISO 5549: 1978 — IDF 92: 1979	
		Λίπος και τέφρα	Έως 6,00 % m/m	ISO 5543: 2004IDF 127: 2004 ISO 5544: 1978 — IDF 89:1979 ή ISO 5545: 1978 — IDF 90: 1979	
		ΣΑΒ (μέγ.)	30 000/g	ISO 4833: 2003	Σημείωση 3
		Κολοβακτηρίδια	Απουσία σε 0,1 g	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ X	Σημείωση 3
		Θερμ. (μέγ.)	5 000/g	ISO 4833: 2003	Σημειώσεις 3 και 4
(ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα III — Καζεϊνικά άλατα	Νερό	Έως 6,00 % m/m	ISO 5550: 2006IDF 78: 2006	
		Γαλακτικές πρωτεΐνες	Ελάχ. 85,00 % m/m	ISO 5549: 1978 — IDF 92: 1979	
		Λίπος	Έως 1,50 % m/m	ISO 5543: 2004IDF 127: 2004	
		Λακτόζη	Έως 1,00 % m/m	ISO 5548: 2004IDF 106: 2004	
		Τέφρα	Έως 6,50 % m/m	ISO 5544: 1978 — IDF 89: 1979 ή ISO 5545: 1978 — IDF 90: 1979	
		ΣΑΒ (μέγ.)	30 000/g	ISO 4833: 2003	Σημείωση 3
		Κολοβακτηρίδια	Απουσία σε 0,1 g	Παράρτημα X	Σημείωση 3
		Θερμ. (μέγ.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Σημειώσεις 3 και 4
(ΕΟΚ) αριθ. 2799/1999	Σύνθετες ζωοτροφές και αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη (ΑΓΣ) (για χρήση σε ζωοτροφές)	Νερό (όξινο βουτυρόγαλα σε σκόνη)	Έως 5 % m/m	Παράρτημα XIX	
		Πρωτεΐνες	31,4 % m/m (ελάχ.) επί της ξηράς ουσίας χωρίς λίπος	ISO 8968-123: 2001IDF 20-123: 2001	
		Νερό (ΑΓΣ)	Έως 5 % m/m	ISO 5537: 2004IDF 26: 2004	
		Λίπος (ΑΓΣ)	Έως 11 % m/m	ISO 1736: 2000 — IDF 9C: 1987	
		Γλυκός ορός γάλακτος (ΑΓΣ)	Απουσία	Παράρτημα XIII	Σημείωση 6
		Άμυλο (ΑΓΣ)	Απουσία	Παράρτημα XVII	
		Νερό (μείγματα)	Έως 5 % m/m επί της ουσίας χωρίς λίπος	ISO 5537: 2004IDF 26: 2004	

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο (1)	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
		Λίπος (μείγματα)		Οδηγία 84/4/ΕΟΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 15 της 18.1.1984, σ. 29)	
		Γλυκός ορός γάλακτος (μείγματα)	Απουσία	Παράρτημα XIII	
		Περιεκτικότητα σε ΑΓΣ (του τελικού προϊόντος)	Ελάχ. 50 % m/m	Παράρτημα XVI	
		Λίπος (στο τελικό προϊόν)	Ελάχ. 2,5 % m/m ή 5 % m/m	Οδηγία 84/4/ΕΟΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 15 της 18.1.1984, σ. 29)	Σημείωση 7
		Άμυλο (στο τελικό προϊόν)	Ελάχ. 2 % m/m	Παράρτημα XVII	Σημείωση 8
		Χαλκός (στο τελικό προϊόν)	25 ppm	Οδηγία 78/633/ΕΟΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 206 της 26.7.1987, σ. 43)	
(ΕΚ) αριθ. 214/2001	ΑΓΣ (spray)	Λίπος	Έως 1,0 % m/m	ISO 1736: 2000 — IDF 9C: 1987	
		Πρωτεΐνες	31,4 % (2)m/m (ελάχ.) επί της ξηράς ουσίας χωρίς λίπος	ISO 8968-1/2: 2001IDF 20-1/2: 2001	
		Νερό	Έως 3,5 % m/m	ISO 5537: 2004IDF 26: 2004	
		Οξύτητα	Έως 19,5 ml, διάλυμα NaOH 0,1N, 10g στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος	ISO 6091: 1980 — IDF 86: 1981	
		Ενώσεις του γαλακτικού οξέος	Έως 150 mg/100g στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος	ISO 8069: 2005IDF 69: 2005	
		Φωσφατάση	Αρνητική δοκιμή	ISO 11816-1: 2006IDF 155-1: 2006	
		Δείκτης αδιαλυτότητας	Έως 0,5 ml στους 24 °C	ISO 8156: 2005IDF 129: 2005	
		Καμένα σωματίδια	Δίσκος Α ή Β (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		ΣΑΒ	40 000/g	ISO 4833: 2003	Σημείωση 3
		Κολοβακτηρίδια	Αρνητική δοκιμή/0,1 g	Παράρτημα X	Σημείωση 3
		Βουτυρόγαλα	Αρνητική δοκιμή	Παράρτημα XIV	
		Γλυκός ορός γάλακτος	Αρνητική δοκιμή	Παράρτημα XII	
		Όξινος ορός γάλακτος	Αρνητική δοκιμή		Σημείωση 2
		Αντιμικροβιακά		Παράρτημα XV	

(1) Με την επιφύλαξη των απαιτήσεων του συγκεκριμένου κανονισμού.
(2) Από την 1η Σεπτεμβρίου 2009, η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες θα είναι 34 %.

▼B

ΜΕΡΟΣ Β

Οι μέθοδοι αναφοράς του μέρους Β μπορούν να χρησιμοποιούνται για την ανάλυση προϊόντων τα οποία καλύπτονται από οποιονδήποτε κανονισμό απαριθμούμενο στη στήλη 1.

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Κωδικός ΣΟ	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
(ΕΟΚ) αριθ. 2658/87 (ΕΚ) αριθ. 2535/2001 (ΕΚ) αριθ. 1282/2006	Γάλα και κρέμα γάλακτος (ανθόγαλα) που δεν είναι συμπυκνωμένα και δεν περιέχουν ζάχαρη ή άλλα γλυκαντικά	0401	Λίπος (≤6 % m/m)	Τα όρια καθορίζονται στην περιγραφή εμπορευμάτων που αντιστοιχεί στον κωδικό ΣΟ του συγκεκριμένου προϊόντος και εξειδικεύονται περαιτέρω, κατά περίπτωση, στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3846/87 (ΕΕ L 366 της 24.12.1987, σ. 1), τομέας 9 της ονοματολογίας για τις επιστροφές κατά την εξαγωγή, ή στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2535/2001 (ΕΕ L 341 της 22.12.2001, σ. 29)	ISO 1211: 2001 — IDF 1D: 1996	
			Λίπος (>6 % m/m)		ISO 2450: 1999 — IDF 16C:1987	
	Γάλα και κρέμα γάλακτος (ανθόγαλα), συμπυκνωμένα ή με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών	0402	Λίπος (υγρή μορφή)		ISO 1737: 1999 — IDF 13C: 1987	
			Λίπος (στερεή μορφή)		ISO 1736: 2000 — IDF 9C: 1987	
			Πρωτεΐνες		ISO 8968-123: 2001IDF20-123: 2001	
			Σακχαρόζη (κανονική περιεκτικότητα)		ISO 2911: 2004 IDF 35: 2004	
			Σακχαρόζη (χαμηλή περιεκτικότητα)			Σημείωση 2
			Στερεό υπόλειμμα (ΖΣΓ)		ISO 6734: 1989 — IDF 15B: 1991	
			Στερεό υπόλειμμα (ΑΓΚ)		ISO 6731: 1989 — IDF 21B: 1987	
			Νερό (γάλα σε σκόνη)		ISO 5537: 2004/IDF 26: 2004	
			Νερό (κρέμα γάλακτος σε σκόνη)		Παράρτημα XVIII	

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Κωδικός ΣΟ	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
	Βουτυρόγαλα, γάλατα και κρέμες που έχουν υποστεί ζύμωση ή έχουν καταστεί όξινα, έστω και συμπυκνωμένα, με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών	0403	Λίπος		ISO 1211: 2001 — IDF 1D: 1996 ISO 1736: 2000 — IDF 9C: 1987 ISO 2450: 1999 — IDF 16 C: 1987 ISO 7208: 1999 — IDF 22B: 1987 ISO 8262-3: 2005 — IDF 124-3: 2005	
			Πρωτεΐνες		ISO 8968-123: 2001IDF 20-123: 2001	
			Σακχαρόζη (κανονική περιεκτικότητα)		ISO 2911: 2004IDF 35:2004	
			Σακχαρόζη (χαμηλή περιεκτικότητα)			Σημείωση 2
			Νερό (όξινο βουτυρόγαλα σε σκόνη)		Παράρτημα XIX	
			Νερό (γλυκό βουτυρόγαλα σε σκόνη)		ISO 5537: 2004IDF26: 2004	
			Στερεό υπόλειμμα (λοιπά προϊόντα)		Εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή μέθοδοι	
	Ορός γάλακτος, έστω και συμπυκνωμένος ή με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών. Προϊόντα που αποτελούνται από φυσικά συστατικά του γάλακτος	0404	Λίπος		ISO 1736: 2000 — IDF 9C: 1987 ISO 2450: 1999 — IDF 16C: 1987 ISO 7208: 1999 — IDF 22B: 1987	
			Πρωτεΐνες		ISO 8968-123: 2001IDF 20-123: 2001	
			Σακχαρόζη (κανονική περιεκτικότητα)		ISO 2911: 2004IDF 35: 2004	
			Σακχαρόζη (χαμηλή περιεκτικότητα)			Σημείωση 2
		0404 90	Πρωτεΐνες		ISO 8968 1/2 2001IDF 20-1/2: 2001	
			Νερό		IDF 21B: 1987	
			Στερεό υπόλειμμα		ISO 6734: 1989 — IDF 15B: 1991	

▼B

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Κωδικός ΣΟ	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Παρατήρηση
			(Συμπυκνωμένα προϊόντα)		ISO 6731: 1989 — IDF 21B: 1987	
	Βούτυρο και άλλες λιπαρές ύλες προερχόμενες από το γάλα. Γαλακτικές λιπαρές ύλες για επάλειψη	0405	Λίπος (εάν ≤85 % m/m)		ISO 17189: 2003IDF 194: 2003	
		Βούτυρο	Νερό		ISO 3727-1: 2001IDF 80-1: 2001	
			ΣΥΑΛ		ISO 3727-2: 2001IDF 80-2: 2001	
			NaCl		ISO 15648: 2004IDF 179:2004	
			Λίπος (εάν >99 % m/m)		IDF 24: 1964	
	Βουτυρέλαιο		Νερό (εάν λίπος <99 % m/m		ISO 5536: 2002IDF 23: 2002	
	Τυριά και πηγμένο γάλα για τυρί	0406	Λίπος		ISO 1735: 2004IDF 5: 2004	
			Στερεό υπόλειμμα		ISO 5534: 2004IDF 4: 2004	
			Στερεό υπόλειμμα (Ricotta)		ISO 2920: 2004IDF 58: 2004	
			NaCl		ISO 5943: 2006IDF 88: 2006	
			Λακτόζη		ISO 5765-1/2: 2002IDF 79-1/2: 2002	
(ΕΟΚ) αριθ. 2658/87	Σύνθετες ζωοτροφές	2309	Λακτόζη		Παράρτημα XI	

Σημειώσεις του πίνακα μεθόδων αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης:

Σημείωση 1: Απομόνωση του λίπους γάλακτος όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO 1740:1991 (προστασία από το φως).

Σημείωση 2: Δεν έχει καθοριστεί μέθοδος αναφοράς. Εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή μέθοδοι.

Σημείωση 3: Προετοιμασία του δείγματος σύμφωνα με το πρότυπο ISO 8261:2001IDF 122:2001.

Σημείωση 4: Επώαση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία 55 °C, με μέριμνα για την αποφυγή της ξήρανσης του θρεπτικού υλικού.

Σημείωση 5: % m/m ΣΥΑΛ = % m/m στερεού υπολείμματος — % m/m λίπους.

Σημείωση 6: Οδηγία 84/4/ΕΟΚ της Επιτροπής.

Σημείωση 7: Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2799/1999 της Επιτροπής (ΕΕ L 340 της 31.12.1999, σ. 3 έως 27).

Σημείωση 8: Οδηγία 78/633/ΕΟΚ της Επιτροπής.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

(Άρθρο 3)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΜΟΡΦΩΣΗΣ ΦΟΡΤΙΩΝ ΜΕ ΤΟ ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΚΑΤΟΧΥΡΩΜΕΝΟ ΟΡΙΟ

1. ΓΕΝΙΚΗ ΑΡΧΗ

Στις περιπτώσεις όπου η σχετική νομοθεσία προβλέπει λεπτομερείς διαδικασίες δειγματοληψίας, εφαρμόζονται αυτές οι διαδικασίες. Σε κάθε άλλη περίπτωση, χρησιμοποιείται δείγμα αποτελούμενο από τρεις τουλάχιστον μονάδες δείγματος οι οποίες έχουν ληφθεί τυχαία από το προς έλεγχο φορτίο. Επιτρέπεται η παρασκευή σύνθετου δείγματος. Το λαμβανόμενο αποτέλεσμα συγκρίνεται με τα όρια που επιβάλλει η νομοθεσία, με υπολογισμό διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % ως του διπλάσιου της τυπικής απόκλισης, η τιμή της οποίας εξαρτάται από το κατά πόσον 1. η μέθοδος έχει επικυρωθεί με διεθνή συνεργασία και έχουν προσδιοριστεί τιμές σ_r και σ_R ή 2. προκειμένου για εσωτερική (in-house) επικύρωση, έχει υπολογιστεί εσωτερική αναπαραγωγιμότητα. Το εν λόγω διάστημα εμπιστοσύνης ισούται με την αβεβαιότητα μέτρησης του αποτελέσματος.

2. Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΧΕΙ ΕΠΙΚΥΡΩΘΕΙ ΜΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ

Στην περίπτωση αυτή έχουν καθοριστεί η τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας σ_r και η τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας σ_R και το εργαστήριο μπορεί να αποδείξει ότι ανταποκρίνεται στα χαρακτηριστικά επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου.

Υπολογίζεται ο αριθμητικός μέσος $\bar{x}$ των αποτελεσμάτων του πλήθους μετρήσεων n.

Υπολογίζεται η διευρυμένη αβεβαιότητα ($k = 2$) του $\bar{x}$ ως

$$U = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n}\sigma_r^2}$$

Εάν το τελικό αποτέλεσμα x της μέτρησης υπολογίζεται με τη βοήθεια τύπου της μορφής $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ ή $x = y_1 / y_2$, πρέπει να εφαρμόζονται οι συνήθεις στις περιπτώσεις αυτές διαδικασίες συνδυασμού των τυπικών αποκλίσεων.

Το φορτίο θεωρείται μη σύμφωνο με το νομοθετικά κατοχυρωμένο ανώτατο όριο *UL* εάν

$$\bar{x} - U > UL$$

σε αντίθετη περίπτωση, θεωρείται σύμφωνο με το *UL*.

Το φορτίο θεωρείται μη σύμφωνο με το νομοθετικά κατοχυρωμένο κατώτατο όριο *LL*, εάν

$$\bar{x} + U < LL$$

σε αντίθετη περίπτωση, θεωρείται σύμφωνο με το *LL*.

3. ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ, ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΗΣ ΤΥΠΙΚΗΣ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑΣ

Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται μέθοδοι που δεν καθορίζονται στον παρόντα κανονισμό και δεν έχουν προσδιοριστεί μέτρα ακρίβειας, πρέπει να διενεργείται εσωτερική επικύρωση. Στους τύπους υπολογισμού της διευρυμένης αβεβαιότητας U, πρέπει να χρησιμοποιούνται η τυπική απόκλιση σε συνθήκες εσωτερικής επαναληψιμότητας s_{ir} και η τυπική απόκλιση σε συνθήκες εσωτερικής αναπαραγωγιμότητας s_{iR} αντί των τιμών σ_r και σ_R, αντιστοίχως.

Η απόφαση λαμβάνεται σύμφωνα με τους κανόνες του σημείου 1. Εάν ωστόσο κριθεί ότι το φορτίο δεν είναι σύμφωνο με το νομοθετικά κατοχυρωμένο όριο, πρέπει να επαναληφθούν οι μετρήσεις με τη μέθοδο που καθορίζεται στον παρόντα κανονισμό και να ληφθεί απόφαση σύμφωνα με το σημείο 1.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

(Άρθρο 4)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Οι κατωτέρω διαδικασίες εφαρμόζονται εφόσον χρησιμοποιούνται μέθοδοι βαθμολόγησης (πρότυπο IDF 99 C:1997).

Α. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ «δΔΕΙΚΤΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑΣ»

Πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον δέκα δείγματα ως διπλά τυφλά πειράματα από έναν δοκιμαστή σε χρονικό διάστημα 12 μηνών. Η ανάλυση αυτή εκτελείται συνήθως σε περισσότερες από μία συνεδρίες. Τα αποτελέσματα για τα επιμέρους χαρακτηριστικά του προϊόντος αξιολογούνται με τη βοήθεια του ακόλουθου τύπου:

$$w_1 = 1 + \left(\left(\sum \left(x_{i1} - x_{i2}\right)^2\right)/n\right)$$

όπου:

w_I: δείκτης επαναληψιμότητας

x_{i1}: βαθμολογία από την πρώτη αξιολόγηση του δείγματος x_i

x_{i2}: βαθμολογία από τη δεύτερη αξιολόγηση του δείγματος x_i

n: αριθμός δειγμάτων

Τα δείγματα που πρόκειται να αξιολογηθούν πρέπει να αντιπροσωπεύουν ευρύ ποιοτικό φάσμα. Ο δείκτης w_I δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1,5 (πεντάβαθμες κλίμακες).

Β. ΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ «ΔΕΙΚΤΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ»

Ο δείκτης αυτός πρέπει να χρησιμοποιείται για να εξακριβώνεται αν ένας δοκιμαστής χρησιμοποιεί την ίδια κλίμακα για ποιοτική αξιολόγηση όπως μια έμπειρη ομάδα δοκιμαστών. Οι βαθμολογίες του δοκιμαστή συγκρίνονται με τον μέσο όρο των βαθμολογιών που έχουν δοθεί από την ομάδα δοκιμαστών.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$D_1 = 1 + \left(\sum \left[\left(x_{i1} - \overline{x}_{i1}\right)^2 + \left(x_{i2} - \overline{x}_{i2}\right)^2\right]\right)/\left(2n\right)$$

όπου:

x_{i1}, x_{i2}: βλέπε τμήμα Α

$\overline{x}_{i1}$, $\overline{x}_{i2}$: μέσος όρος βαθμολογίας της ομάδας δοκιμαστών για την πρώτη και τη δεύτερη αξιολόγηση του δείγματος x_i, αντιστοίχως

n: αριθμός δειγμάτων (τουλάχιστον 10 ανά δωδεκάμηνο)

Τα δείγματα που πρόκειται να αξιολογηθούν πρέπει να αντιπροσωπεύουν ευρύ ποιοτικό φάσμα. Ο δείκτης D_I δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1,5 (πεντάβαθμες κλίμακες).

Τα κράτη μέλη πρέπει να αναφέρουν κάθε δυσκολία που αντιμετωπίζουν κατά την εφαρμογή της διαδικασίας αυτής.

Εφόσον διαπιστωθεί υπέρβαση του ορίου 1,5 για τον δείκτη απόκλισης ή τον δείκτη επαναληψιμότητας από μεμονωμένους δοκιμαστές, ο ή οι εμπειρογνώμονες της επίσημης αρχής οφείλουν να διενεργήσουν, τις αμέσως προσεχείς εβδομάδες, έναν ή περισσότερους τυχαίους ελέγχους «επανεκτέλεσης» σε δείγματα που κατατάχθηκαν ποιοτικά από τους εν λόγω δοκιμαστές ή έναν ή περισσότερους ελέγχους «με συνοδεία» μαζί με τους δοκιμαστές. Είναι αναγκαίο να παρακολουθούνται στενά, προκειμένου να αποφασιστεί αν θα συνεχίσουν να προσφέρουν τις υπηρεσίες τους. Οι διαπιστώσεις πρέπει να τεκμηριώνονται και να φυλάσσονται ως αποδεικτικά στοιχεία για μετέπειτα μέτρα.

▼B

Γ. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΕΣ ΚΡΑΤΟΥΣ ΜΕΛΟΥΣ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΚΡΑΤΗ ΜΕΛΗ

Όπου έχει εφαρμογή, πρέπει να οργανώνεται δοκιμή, τουλάχιστον ετησίως, με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από δοκιμαστές διαφορετικών περιφερειών. Εάν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές, πρέπει να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα για τον προσδιορισμό των αιτίων και την επίτευξη συγκρίσιμων αποτελεσμάτων.

Τα κράτη μέλη μπορούν να οργανώνουν δοκιμές για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τους οικείους δοκιμαστές και από δοκιμαστές γειτονικών κρατών μελών. Σημαντικές διαφορές επιτάσσουν διεξοδική διερεύνηση, με στόχο την επίτευξη συγκρίσιμων αποτελεσμάτων.

Τα κράτη μέλη πρέπει να κοινοποιούν στην Επιτροπή τα αποτελέσματα των συγκρίσεων αυτών.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

(Άρθρο 4)

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΟΥΤΥΡΟΥ

1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Με την παρούσα διαδικασία οργανοληπτικής αξιολόγησης του βουτύρου επιδιώκεται η παροχή ενιαίας μεθόδου που να εφαρμόζεται σε όλα τα κράτη μέλη.

Περισσότερες λεπτομέρειες παρατίθενται στο ισχύον διεθνές πρότυπο για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, IDF 99 — Μέρη 1,2,3 σχετικά με την οργανοληπτική αξιολόγηση.

2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ως *οργανοληπτική αξιολόγηση* (εκτίμηση) νοείται η εξέταση των χαρακτηριστικών ενός προϊόντος με τη βοήθεια των αισθητήριων οργάνων.

Ως *ομάδα δοκιμαστών* νοείται ομάδα επιλεγμένων δοκιμαστών οι οποίοι, κατά τη διάρκεια της εκτίμησης, εργάζονται χωρίς να επικοινωνούν μεταξύ τους και χωρίς να αλληλοεπηρεάζονται.

Ως *δοκιμαστής* νοείται άτομο που έχει επιλεγεί για την ικανότητα του να διεξάγει οργανοληπτικές δοκιμές. Ο δοκιμαστής αυτής της κατηγορίας μπορεί να έχει περιορισμένη πείρα.

Ως *δοκιμαστής-εμπειρογνώμονας* νοείται άτομο που διαθέτει μεγάλη αισθητηριακή ευαισθησία και πείρα στις μεθόδους οργανοληπτικής ανάλυσης και είναι ικανό να διενεργεί συνεπείς και αξιόπιστες οργανοληπτικές αξιολογήσεις διαφόρων προϊόντων. Ο δοκιμαστής αυτής της κατηγορίας διαθέτει καλή μακροχρόνια αισθητηριακή μνήμη.

Ως *βαθμολόγηση* νοείται η οργανοληπτική αξιολόγηση από ομάδα δοκιμαστών με χρήση αριθμητικής κλίμακας. Πρέπει να χρησιμοποιείται ονοματολογία ελαττωμάτων.

Ως *κατάταξη* νοείται η ποιοτική ταξινόμηση με βάση τη βαθμολογία.

Δελτία ελέγχου: έγγραφα που χρησιμοποιούνται για την καταγραφή της επιμέρους βαθμολογίας για κάθε χαρακτηριστικό και της τελικής κατάταξης του προϊόντος. (Το έγγραφο αυτό μπορεί να χρησιμοποιείται και για την καταγραφή της χημικής σύστασης.)

3. ΘΑΛΑΜΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

Για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε πρότυπα ISO 8589 και ISO/DIS 22935-2 IDF 99-2 παράγραφος 7.

Πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις ώστε οι δοκιμαστές να μην επηρεάζονται από εξωτερικούς παράγοντες στον θάλαμο δοκιμών.

Ο θάλαμος δοκιμών πρέπει να είναι απαλλαγμένος από ξένες οσμές και να καθαρίζεται εύκολα. Οι τοίχοι πρέπει να είναι ανοικτού χρώματος και να μην ανακλούν το φως.

Ο θάλαμος δοκιμών και ο φωτισμός του πρέπει να μην επηρεάζουν τις ιδιότητες των προς βαθμολόγηση προϊόντων.

Ο θάλαμος πρέπει να είναι εξοπλισμένος με κατάλληλο όργανο θερμοστατικού ελέγχου, ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία του βουτύρου. Κατά την κατάταξη, η θερμοκρασία του βουτύρου πρέπει να είναι 12 °C (± 2 °C).

4. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΤΩΝ

Ο δοκιμαστής πρέπει να είναι εξοικειωμένος με τα προϊόντα βουτύρου και ικανός να διεξάγει οργανοληπτική κατάταξη. Η ικανότητά του θα πρέπει να ελέγχεται από την αρμόδια αρχή σε τακτά χρονικά διαστήματα (τουλάχιστον ετησίως).

4.1. Για λεπτομέρειες σχετικά με τις γενικές απαιτήσεις και τις εξετάσεις διαλογής που μπορούν να χρησιμοποιούνται πριν από την επίσημη απασχόληση ενός νέου δοκιμαστή, βλέπε πρότυπο ISO/DIS 22935-1 IDF 99-1 παράγραφος 4 (πρόσληψη) και παράγραφος 5 σημείο 1.

Η διαρκής επιμόρφωση είναι ουσιώδους σημασίας και, για το λόγο αυτό, πρέπει να οργανώνονται τακτικά γενικοί κύκλοι μαθημάτων. Για πληροφορίες σχετικά με την κατάρτιση της ομάδας δοκιμαστών, βλέπε πρότυπο ISO 8586-1.

▼B

4.2. Η αρχική κατάρτιση πρέπει να καλύπτει τα ακόλουθα:

— γενική θεωρία και πρακτική σημασία της οργανοληπτικής αξιολόγησης·

— μεθόδους, κλίμακες και περιγραφή των αισθητηριακών εντυπώσεων·

— ανίχνευση και αναγνώριση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και συγκεκριμένων αισθητηριακών όρων·

— βασική κατάρτιση στην παραγωγή βουτύρου·

— επικυρωμένα υλικά αναφοράς και δείγματα που θα βοηθήσουν τον δοκιμαστή να αναγνωρίζει συγκεκριμένες γεύσεις και την ένταση της γεύσης του προϊόντος.

5. ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΤΩΝ

Ο αριθμός των δοκιμαστών της ομάδας πρέπει να είναι περιττός, με ελάχιστο τους τρεις. Στην πλειονότητά τους πρέπει να είναι υπάλληλοι της αρμόδιας αρχής ή εξουσιοδοτημένα άτομα τα οποία δεν απασχολούνται στη γαλακτοβιομηχανία.

Υπεύθυνος για το σύνολο της διαδικασίας είναι ο επικεφαλής της ομάδας δοκιμαστών, ο οποίος μπορεί να είναι μέλος της.

Πριν από την αξιολόγηση πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ορισμένοι παράγοντες, ώστε να επιτυγχάνονται οι βέλτιστες δυνατές επιδόσεις εκ μέρους των δοκιμαστών:

— Οι δοκιμαστές δεν πρέπει να πάσχουν από καμία ασθένεια που θα μπορούσε να επηρεάσει τις επιδόσεις τους. Σε αντίθετη περίπτωση, τη θέση τους στην ομάδα πρέπει να καταλαμβάνει άλλο άτομο.

— Οι δοκιμαστές πρέπει να βρίσκονται εγκαίρως επιτόπου, προκειμένου να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση, και να βεβαιώνονται ότι έχουν στη διάθεσή τους επαρκή χρόνο για τη διενέργεια της αξιολόγησης.

— Οι δοκιμαστές πρέπει να μη χρησιμοποιούν προϊόντα με έντονη οσμή, όπως αρώματα, λοσιόν ξυρίσματος, αποσμητικά κ.λπ. και να μην καταναλώνουν τροφές με έντονη γεύση (π.χ. παρασκευασμένες με πολλά καρυκεύματα) κ.λπ.

— Οι δοκιμαστές δεν επιτρέπεται να καπνίζουν ούτε να καταναλώνουν τροφή ή ποτό εκτός από νερό κατά τη διάρκεια του ημιώρου που προηγείται της αξιολόγησης.

6. ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ

Όλοι οι δοκιμαστές πρέπει να συμμετέχουν σε ομάδες τακτικής οργανοληπτικής αξιολόγησης, ώστε να διατηρούν τις ικανότητές τους. Η συχνότητα συμμετοχής εξαρτάται από τη διακινούμενη ποσότητα βουτύρου και, εφόσον είναι δυνατόν, πρέπει να είναι τουλάχιστον μία αξιολόγηση μηνιαίως.

Οι έμπειροι δοκιμαστές πρέπει επίσης να συμμετέχουν σε έναν αριθμό ομάδων ετησίως, τουλάχιστον δε ανά τρίμηνο, εφόσον είναι δυνατόν.

7. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Είναι απαραίτητη η απόκρυψη της ταυτότητας των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της εκτίμησης, ώστε να μην υπάρχει πιθανότητα μεροληψίας. Τα δείγματα πρέπει να είναι κωδικοποιημένα.

Η κωδικοποίηση αυτή πρέπει να οργανώνεται πριν από την αξιολόγηση. Πρέπει να καθορίζεται η απαιτούμενη θερμοκρασία του βουτύρου κατά τη μεταφορά του στον θάλαμο δοκιμών (6 °C ± 2 °C).

Όταν η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιείται σε ψυχρό χώρο αποθήκευσης, το δείγμα λαμβάνεται με τη βοήθεια δειγματολήπτη βουτύρου. Εάν η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιείται σε άλλο τόπο, τότε πρέπει να λαμβάνεται δείγμα τουλάχιστον 500 g. Κατά τη διάρκεια της αξιολόγησης, το βούτυρο πρέπει να έχει θερμοκρασία 12 °C (± 2 °C) (βλέπε: κατά το πρότυπο ISO/DIS 22935-2 IDF 99-2, η θερμοκρασία αξιολόγησης του βουτύρου είναι 14 °C ± 2 °C). Οι μεγάλες αποκλίσεις θα πρέπει να αποφεύγονται πάση θυσία.

8. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΞΙΑΣ ΚΑΘΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟΥ

8.1. Η οργανοληπτική αξιολόγηση πρέπει να πραγματοποιείται σε σχέση με τα ακόλουθα τρία χαρακτηριστικά: όψη, σύσταση και γεύση

Η *όψη* καλύπτει τα ακόλουθα στοιχεία: χρώμα, ορατή καθαρότητα, απουσία ξένων σωμάτων και ανάπτυξης μυκήτων και ομοιόμορφη διασπορά νερού. Η διασπορά νερού ελέγχεται σύμφωνα με το πρότυπο IDF 112A/1989.

▼B

Η *σύσταση* καλύπτει τα ακόλουθα στοιχεία: σώμα, υφή και πυκνότητα. Είναι δυνατόν να ελέγχεται η επαλειψιμότητα με φυσικά μέσα, εφόσον ένα κράτος μέλος το επιθυμεί για να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Η Επιτροπή μπορεί να αποφασίσει μελλοντικά να εναρμονίσει τη σχετική μεθοδολογία.

Σώμα είναι ο όρος που αναφέρεται στη συνεκτικότητα του προϊόντος, όπως αυτό καταναλώνεται. Συσχετίζεται συνήθως με την πυκνότητα και την επαλειψιμότητα και πρέπει να είναι ομοιόμορφο σε όλη τη μάζα του προϊόντος. Συνδέεται στενά με την υφή και είναι η ικανότητα του προϊόντος να στέκεται υπό την επίδραση του βάρους του. Καταδεικνύεται από την αντίσταση του προϊόντος στην κοπή και μπορεί να μετρηθεί με μηχανικά μέσα καθώς και με την αίσθηση στο στόμα και στην αφή.

Γεύση είναι το χαρακτηριστικό που γίνεται αντιληπτό στο στόμα, κυρίως μέσω των γευστικών καλύκων της γλώσσας.

Άρωμα είναι το χαρακτηριστικό που γίνεται αντιληπτό μέσω της μύτης και με την αίσθηση της όσφρησης.

Τυχόν σημαντική απόκλιση από τη συνιστώμενη θερμοκρασία παρεμποδίζει την αξιόπιστη αξιολόγηση της σύστασης και της γεύσης. Η θερμοκρασία έχει ύψιστη σημασία.

Εάν η θερμοκρασία δεν περικλείεται στο συνιστώμενο εύρος τιμών, η κατάταξη του βουτύρου πρέπει να αναβάλλεται.

8.2. Κάθε χαρακτηριστικό πρέπει να αξιολογείται χωριστά από οργανοληπτικής πλευράς. Η βαθμολόγηση πρέπει να είναι σύμφωνη με τον πίνακα 1.

8.3. Για την επίτευξη ομοιομορφίας μπορεί να είναι σκόπιμο να βαθμολογήσουν οι δοκιμαστές από κοινού την όψη, τη σύσταση και τη γεύση ενός ή περισσότερων δειγμάτων αναφοράς, πριν αρχίσει η εκτίμηση.

8.4. Η βαθμολογία για την αποδοχή είναι η εξής:

Κατά τη βαθμολόγηση, βλέπε μέρος 7 — Ονοματολογία, καθώς και την περιγραφή των κριτηρίων που ισχύουν για τη βαθμολογία.

	Ανώτατη	Απαιτούμενη
Όψη	5	4
Σύσταση	5	4
Γεύση/Άρωμα	5	4

— Στις περιπτώσεις όπου δεν επιτυγχάνεται η απαιτούμενη βαθμολογία, πρέπει να περιγράφεται το ελάττωμα.

— Η βαθμολογία που δίδεται από κάθε δοκιμαστή για κάθε χαρακτηριστικό πρέπει να καταγράφεται στο δελτίο ελέγχου.

— Το προϊόν γίνεται δεκτό ή απορρίπτεται με απόφαση κατά πλειοψηφία.

— Οι περιπτώσεις όπου οι επιμέρους βαθμολογίες για κάθε χαρακτηριστικό διαφέρουν περισσότερο από έναν βαθμό δεν πρέπει να είναι συχνές (όχι περισσότερες από μία ανά 20 δείγματα). Άλλως, ο επικεφαλής της ομάδας δοκιμαστών πρέπει να ελέγχει την ικανότητά της.

9. ΕΠΙΒΛΕΨΗ

Ο επικεφαλής της ομάδας δοκιμαστών, ο οποίος πρέπει να είναι μόνιμος υπάλληλος της αρμόδιας αρχής, ενώ μπορεί να είναι και μέλος της ομάδας, πρέπει να έχει τη γενική ευθύνη για το σύνολο της διαδικασίας. Οφείλει να καταγράφει τις επιμέρους βαθμολογίες για κάθε χαρακτηριστικό στο δελτίο ελέγχου και να πιστοποιεί αν το προϊόν είναι αποδεκτό ή απορρίπτεται.

10. ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Βλέπε προσαρτημένο πίνακα 2.

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

FIL-IDF 99C:1997 Sensory evaluation of dairy products by scoring — Reference method

ISO/DIS 22935 IDF 99 International Standard for Milk and Milk Products — Sensory analysis — Parts 1-3

▼B

ISO 8586-1 Sensory analysis- General guidance for selection, training and monitoring of assessors- Part 1

ISO 8589 sensory analysis- General guidance for the design of test rooms

FIL-IDF 112A:1989 Butter- Determination of water dispersion value

Πίνακας 1

Βαθμολόγηση βουτύρου

Όψη			Σύσταση			Γεύση + Άρωμα		
Βαθμοί	Αριθμός [1]	Παρατηρήσεις	Βαθμοί (ποιοτική κατηγορία)	Αριθμός [1]	Παρατηρήσεις	Βαθμοί (ποιοτική κατηγορία)	Αριθμός [1]	Παρατηρήσεις
5		*Πολύ καλή* ιδεώδης τύπος ύψιστη ποιότητα (όμοιο με ξηρό)	5		*Πολύ καλή* ιδεώδης τύπος ύψιστη ποιότητα (ευχερώς επαλείψιμο)	5		*Πολύ καλά* ιδεώδης τύπος ύψιστη ποιότητα (τελείως καθαρό ευγενέστατο άρωμα)
4		*Καλή* [2] Χωρίς εμφανή ελαττώματα	4	 17 18	*Καλή* [2] σκληρό μαλακό	4		*Καλά* [2] Χωρίς εμφανή ελαττώματα
3	 1 2 3 4 5 6 7 8	*Ικανοποιητική (ελαφρά ελαττώματα)* ελεύθερη υγρασία μη ομοιόμορφο, δίχρωμο ραβδωτό με έγχρωμα στίγματα, με νερά κηλιδωμένο αποχωρισμός ελαίου έντονα χρωματισμένο πορώδες, χαλαρή υφή	3	 14 15 16 17 18	*Ικανοποιητική (ελαφρά ελαττώματα)* εύθρυπτο πολτώδες, γλοιώδες κολλώδες σκληρό μαλακό	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Ικανοποιητικά (ελαφρά ελαττώματα)* ασαφές ξένη γεύση όξινο γεύση μαγειρεμένου, καμένου γεύση ζωοτροφής δριμεία, πικρή γεύση πολύ αλατισμένο
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Κακή (εμφανή ελαττώματα)* ελεύθερη υγρασία ραβδωτό με έγχρωμα στίγματα, με νερά, κηλιδωμένο αποχωρισμός ελαίου ξένα σώματα μουχλιασμένο αδιάλυτο αλάτι	2	 14 15 16 17 18	*Κακή (εμφανή ελαττώματα)* εύθρυπτο πολτώδες, γλοιώδες κολλώδες σκληρό μαλακό	2	 21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Κακά (εμφανή ελαττώματα)* ασαφές ξένη γεύση μπαγιάτικο όξινο γεύση οξειδωμένου, μεταλλική γεύση ζωοτροφής δριμεία, πικρή γεύση πολύ αλατισμένο σάπιο, δύσοσμο χημική γεύση
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Πολύ κακή (σοβαρά ελαττώματα)* ελεύθερη υγρασία ραβδωτό με έγχρωμα στίγματα, με νερά, κηλιδωμένο αποχωρισμός ελαίου έντονα χρωματισμένο κοκκώδες ξένα σώματα μουχλιασμένο αδιάλυτο αλάτι	1	 14 15 16 17 18	*Πολύ κακή (σοβαρά ελαττώματα)* εύθρυπτο πολτώδες, γλοιώδες κολλώδες σκληρό μαλακό	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Πολύ κακή (σοβαρά ελαττώματα)* ξένη γεύση τυρώδες, γεύση όξινου τυριού όξινο σαν μαγιά γεύση μούχλας ταγγό ελαιώδες, γεύση ιχθυελαίου στεατώδες γεύση οξειδωμένου, μεταλλική δριμεία, πικρή γεύση πολύ αλατισμένο σάπιο, δύσοσμο σαν βύνη χημική γεύση

([1]) Πίνακας 2.

([2]) Τα ελαττώματα που αναφέρονται υπό «Καλή(-ά)» αποτελούν απλώς πολύ μικρές αποκλίσεις από τον ιδεώδη τύπο.

▼B

Πίνακας 2

Ελαττώματα του βουτύρου

I.	Όψη
1.	ελεύθερη υγρασία
2.	μη ομοιόμορφο, δίχρωμο
3.	ραβδωτό
4.	με έγχρωμα στίγματα, με νερά
5.	κηλιδωμένο
6.	αποχωρισμός ελαίου
7.	έντονα χρωματισμένο
8.	πορώδες (χαλαρή υφή)
9.	κοκκώδες
10.	ξένα σώματα
11.	μουχλιασμένο
12.	αδιάλυτο αλάτι
II.	Σύσταση
14.	εύθρυπτο
15.	πολτώδες, γλοιώδες
16.	κολλώδες
17.	σκληρό
18.	μαλακό
III.	Γεύση και άρωμα
20.	άγευστο
21.	ασαφές ([1])
22.	ξένη γεύση
23.	μπαγιάτικο
24.	τυρώδες, γεύση όξινου τυριού
25.	όξινο
26.	σαν μαγιά
27.	α) γεύση μαγειρεμένου
	β) γεύση καμένου
28.	γεύση μούχλας
29.	ταγγό
30.	ελαιώδες, γεύση ιχθυελαίου
31.	στεατώδες
32.	α) γεύση οξειδωμένου
	β) μεταλλική γεύση
33.	γεύση ζωοτροφής
34.	δριμεία, πικρή γεύση
35.	πολύ αλατισμένο
36.	σάπιο, δύσοσμο
37.	σαν βύνη
38.	χημική γεύση

([1]) Ο χαρακτηρισμός αυτός θα πρέπει να χρησιμοποιείται όσο το δυνατόν σπανιότερα και μόνον όταν το ελάττωμα δεν μπορεί να περιγραφεί ακριβέστερα.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

(Άρθρο 5)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ, ΤΟΥ ΒΟΥΤΥΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΡΕΜΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΟ ΤΟΥ ΟΙΝΑΝΘΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ

1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η παρούσα μέθοδος συνίσταται σε μέθοδο προσδιορισμού της περιεκτικότητας του βουτυρελαίου, του βουτύρου και της κρέμας γάλακτος σε τριγλυκερίδιο του οινανθικού (κ-επτανικού) οξέος.

2. ΟΡΟΙ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

Περιεκτικότητα σε οινανθικό οξύ: Η περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδιο του οινανθικού οξέος, η οποία προσδιορίζεται με τη διαδικασία που καθορίζεται στην παρούσα μέθοδο.

Σημείωση: Η περιεκτικότητα σε οινανθικό οξύ εκφράζεται σε kg ανά τόνο προϊόντος, προκειμένου για βουτυρέλαιο και βούτυρο, και σε kg ανά τόνο λίπους γάλακτος στην περίπτωση της κρέμας γάλακτος.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το λίπος γάλακτος εκχυλίζεται από τα διάφορα προϊόντα σύμφωνα με το πρότυπο ISO 14156 IDF 172:2001. Η περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδιο του οινανθικού οξέος προσδιορίζεται ποσοτικά στο εκχυλισμένο λίπος με αεριοχρωματογραφία (GC) τριχοειδούς στήλης. Το αποτέλεσμα που προκύπτει για το δείγμα αξιολογείται με βάση το τριγλυκερίδιο του καπρονικού οξέος ως εσωτερικό πρότυπο.

Σημείωση: Έχει διαπιστωθεί ότι και η τριβουτυρίνη αποτελεί ικανοποιητικό εσωτερικό πρότυπο.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας.

4.1. κ-εξάνιο

4.2. Πρότυπο τριγλυκερίδιο του καπρονικού οξέος, καθαρότητας τουλάχιστον 99 %

4.3. Πρότυπο τριγλυκερίδιο του οινανθικού οξέος, καθαρότητας τουλάχιστον 99 %

4.4. Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4)

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

5.1. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 1 mg

5.2. Ογκομετρικές φιάλες των 10 ml και των 20 ml

5.3. Σωλήνες φυγοκέντρου των 30 ml

5.4. Περιστροφικός εξατμιστήρας

5.5. Κλίβανος με δυνατότητα διατήρησης της θερμοκρασίας στους 50 °C ± 5 °C

5.6. Χάρτινος ηθμός, μέσου πορώδους, διαμέτρου 15 cm περίπου.

5.7. Εξοπλισμός αέριας χρωματογραφίας

5.7.1. Αεριοχρωματογράφος, εξοπλισμένος με σύστημα έγχυσης με διαμοιραστή ροής (split/splitless) ή σύστημα απευθείας έγχυσης στη στήλη και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID)

5.7.2. Στήλη GC με στατική φάση που έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον διαχωρισμό τριγλυκεριδίων (100 % διμεθυλοπολυσιλοξάνιο ή 5 % φαινυλο- και 95 % μεθυλο-πολυσιλοξάνιο). Η στατική φάση, το μήκος της στήλης (μεταξύ 4 και 15 μέτρων), η εσωτερική διάμετρος (μεταξύ 0,22 mm και 0,50 mm) και το πάχος του υμενίου (0,12 μm ή μεγαλύτερο) επιλέγονται με γνώμονα την πείρα του εργαστηρίου και το χρησιμοποιούμενο σύστημα έγχυσης. Σε κάθε περίπτωση, η επιλεγόμενη στήλη επιτυγχάνει, αφενός πλήρη διαχωρισμό μεταξύ των κορυφών που αντιστοιχούν στον διαλύτη και στο τριγλυκερίδιο του καπρονικού οξέος και, αφετέρου, διαχωριστική ικανότητα μέχρι τη γραμμή βάσης μεταξύ των κορυφών που αντιστοιχούν στα τριγλυκερίδια του καπρονικού και του οινανθικού οξέος. Παραδείγματα εφαρμοστέων συνθηκών παρατίθενται κατωτέρω.

▼B

5.7.2.1. Παράδειγμα εφαρμοστέων συνθηκών όταν χρησιμοποιείται σύστημα έγχυσης split

— Φέρον αέριο: ήλιο.

— Πίεση στην κορυφή της στήλης: 100 kPa.

— Στήλη: στήλη από άμορφο χαλαζία, μήκους 12 μέτρων, εσωτερικής διαμέτρου 0,5 mm, με πάχος υμενίου 0,1 μm.

— Στατική φάση: 100 % διμεθυλοπολυσιλοξάνιο ή 5 % φαινυλο- και 95 % διμεθυλο-πολυσιλοξάνιο (π.χ. HT5).

— Θερμοκρασία στήλης: αρχική θερμοκρασία 130 °C, η οποία διατηρείται επί 1 λεπτό και στη συνέχεια αυξάνεται στους 260 °C με ταχύτητα 20 °C/min και έπειτα στους 360 °C με ταχύτητα 30 °C/min· διατηρείται στους 360 °C επί 10 λεπτά.

— Θερμοκρασία ανιχνευτή: 370 °C.

— Θερμοκρασία συστήματος έγχυσης: 350 °C.

— Λόγος διαμερισμού δείγματος 1:30.

— Εισαγόμενη ποσότητα δείγματος: 1 μl.

5.7.2.2. Παράδειγμα εφαρμοστέων συνθηκών όταν χρησιμοποιείται σύστημα απευθείας έγχυσης στη στήλη

— Φέρον αέριο: υδρογόνο (σύστημα σταθερής ροής).

— Πίεση στην κορυφή της στήλης: 89 kPa.

— Στήλη: στήλη από άμορφο χαλαζία, μήκους 4 μέτρων, εσωτερικής διαμέτρου 0,32 mm, με πάχος υμενίου 0,25 μm.

— Στατική φάση: 5 % φαινυλο-, 95 % διμεθυλο-πολυσιλοξάνιο.

— Θερμοκρασία στήλης: αρχική θερμοκρασία 60 °C, η οποία διατηρείται επί 2 λεπτά και στη συνέχεια αυξάνεται στους 340 °C με ταχύτητα 35 °C/min, διατηρούμενη στην τιμή αυτή επί 5 λεπτά.

— Θερμοκρασία ανιχνευτή: 350 °C.

— Εισαγόμενη ποσότητα δείγματος: 1 μl.

5.8. Σύριγγα έγχυσης των 5 μl

6. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Είναι σημαντικό να φθάνει στο εργαστήριο ένα πραγματικά αντιπροσωπευτικό δείγμα, το οποίο δεν έχει φθαρεί ούτε μεταβληθεί κατά τη μεταφορά ή την αποθήκευση.

Η δειγματοληψία δεν αποτελεί μέρος της μεθόδου που καθορίζεται στο παρόν διεθνές πρότυπο. Το πρότυπο IDF 50C: 1995 και το πρότυπο ISO 707-1997 — Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα — Μέθοδοι δειγματοληψίας, παρέχουν συνιστώμενη μέθοδο δειγματοληψίας.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

7.1. **Προετοιμασία του δείγματος και του τμήματος δείγματος δοκιμής**

Εφαρμόζεται το πρότυπο ISO 14156 IDF 172:2001

7.1.1. *Βουτυρέλαιο, βούτυρο*

7.1.1.1. Τήκονται στον κλίβανο (5.5) 50 g έως 100 g δείγματος δοκιμής.

7.1.1.2. Φέρεται σε πτυχωτό χάρτινο ηθμό 0,5 g έως 1,0 g άνυδρου θειικού νατρίου (5.4).

7.1.1.3. Διηθείται το λίπος μέσω του χάρτινου ηθμού που περιέχει άνυδρο θειικό νάτριο και συλλέγεται το διήθημα σε ποτήρι ζέσεως που παραμένει στον κλίβανο (5.5). Κατά τη μετάγγιση του τηγμένου βουτύρου στον χάρτινο ηθμό λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην μεταφερθεί ορός.

7.1.2. *Κρέμα γάλακτος*

7.1.2.1. Το δείγμα δοκιμής φέρεται σε θερμοκρασία 20 °C ± 2 °C.

7.1.2.2. Αναμιγνύεται ή αναδεύεται πλήρως.

7.1.2.3. Κατάλληλη ποσότητα του δείγματος δοκιμής αραιώνεται τόσο ώστε να ληφθεί τμήμα δείγματος 100 ml με κλάσμα μάζας λίπους 4 % περίπου.

▼B

7.1.2.4. Εκχυλίζεται το λίπος από την κρέμα γάλακτος με την ίδια διαδικασία όπως στην περίπτωση του ακατέργαστου και του ομογενοποιημένου γάλακτος (βλέπε πρότυπο ISO 14156 IDF 172:2001, σημείο 8.3).

7.1.2.5. Σε ογκομετρική φιάλη (5.2) των 10 ml ζυγίζεται 1 g εκχυλισμένου λίπους με ακρίβεια 1 mg. Προστίθεται 1 ml του διαλύματος 7.2.2, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 ml με κ-εξάνιο (4.1) και το μείγμα ομογενοποιείται.

7.1.2.6. Σε ογκομετρική φιάλη (5.2) των 10 ml φέρεται 1 ml του διαλύματος 7.1.1.2 και αραιώνεται μέχρι τα 10 ml με κ-εξάνιο (4.1).

7.2. **Παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης**

7.2.1. Διαλύονται 100 mg τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος (4.3) σε 10 ml κ-εξανίου (4.1).

7.2.2. Διαλύονται 100 mg τριγλυκεριδίου του καπρονικού οξέος (4.2) σε 10 ml κ-εξανίου (4.1).

7.2.3. Σε ογκομετρική φιάλη (5.2) των 10 ml φέρεται 1 ml του διαλύματος 8.2.2 και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 ml με κ-εξάνιο (4.1).

7.2.4. Σε ογκομετρική φιάλη (5.2) των 10 ml φέρονται 1 ml του διαλύματος 7.2.1 και 1 ml του διαλύματος 7.2.2 και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 ml με κ-εξάνιο (4.1).

7.2.5. Σε ογκομετρική φιάλη (5.2) των 10 ml φέρεται 1 ml του διαλύματος 7.2.4 και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 ml με κ-εξάνιο (4.1).

7.3. **Χρωματογραφικός προσδιορισμός**

7.3.1. Εισάγεται δύο φορές 1 μl του προτύπου διαλύματος 7.2.5.

7.3.2. Εισάγεται 1 μl από κάθε διάλυμα δείγματος.

Σημείωση: Εφόσον χρησιμοποιείται σύστημα απευθείας έγχυσης του δείγματος στη στήλη, απαιτείται μεγαλύτερη αραίωση, τόσο του προτύπου διαλύματος όσο και των διαλυμάτων δείγματος.

7.3.3. Ανά τρία δείγματα επαναλαμβάνεται η εργασία 7.3.1, ώστε τα δείγματα να πλαισιώνονται από τις εισαγόμενες εις διπλούν ποσότητες προτύπου διαλύματος. Τα αποτελέσματα βασίζονται στους μέσους συντελεστές απόκρισης που προκύπτουν από τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων.

8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για κάθε χρωματογράφημα, ολοκληρώνεται το εμβαδόν των κορυφών που αντιστοιχούν στα τριγλυκερίδια του οινανθικού και του καπρονικού οξέος.

Εφαρμόζονται οι κατωτέρω υποδείξεις για κάθε πλαισιωμένη ακολουθία, δηλαδή για κάθε σειρά πλαισιωμένων δειγμάτων· το πρότυπο διάλυμα που εισάγεται εις διπλούν αμέσως πριν από τα δείγματα είναι το STD_1, ενώ το εκείνο που εισάγεται εις διπλούν αμέσως μετά από αυτά είναι το STD_2.

8.1. **Βαθμονόμηση**

8.1.1. Υπολογίζεται ο συντελεστής απόκρισης, $Rf_1(a)$ και $Rf_1(b)$, για καθένα από τα διπλά STD_1.

Rf_1 (a) ή (b) = (εμβαδόν της κορυφής του τριγλυκεριδίου του καπρονικού οξέος/εμβαδόν της κορυφής του τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος) × 100

Υπολογίζεται ο μέσος συντελεστής απόκρισης, Rf_1

$$Rf_1 = (Rf_1(a) + Rf_1(b)) / 2$$

8.1.2. Ομοίως, υπολογίζεται για το STD_2 ο μέσος συντελεστής απόκρισης, Rf_2

8.1.3. Υπολογίζεται ο μέσος συντελεστής απόκρισης, Rf

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) /2$$

8.2. **Δείγματα δοκιμής**

Για κάθε χρωματογράφημα δείγματος που λαμβάνεται μεταξύ των προτύπων STD_1 και STD_2, υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε οινανθικό οξύ, C (kg/t):

C = (εμβαδόν της κορυφής του τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος × Rf × 100)/(εμβαδόν της κορυφής του τριγλυκεριδίου του καπρονικού οξέος × Wt × 1 000)

όπου:

— Wt = βάρος του ληφθέντος λίπους σε g,

— 100 = όγκος αραίωσης του δείγματος,

— 1 000 = συντελεστής μετατροπής (από μg/g σε kg/t).

▼B

Για τα δείγματα βουτύρου, λαμβάνεται υπόψη η περιεκτικότητα του βουτύρου σε λίπος και υπολογίζεται διορθωμένη τιμή συγκέντρωσης, C_{butter} (kg/t βουτύρου)

$$C_{butter} = C_{fat} \times F$$

όπου F είναι η περιεκτικότητα του βουτύρου σε λίπος.

9. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Λεπτομέρειες σχετικά με διεργαστηριακή δοκιμή για το βούτυρο, σύμφωνα με τα πρότυπα ISO 5725-1 και ISO 5725-2 για την ακρίβεια των μεθόδων, παρατίθενται στο σημείο 12.

Οι τιμές των ορίων επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας δίδονται για πιθανότητα 95 % και ενδέχεται να μην ισχύουν για πεδία τιμών συγκέντρωσης και υλικά διαφορετικά από τα αναφερόμενα.

9.1. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, στο ίδιο εργαστήριο από τον ίδιο χειριστή με τον ίδιο εξοπλισμό, σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων την τιμή 0,35 kg/t.

9.2. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, σε διαφορετικά εργαστήρια από διαφορετικούς χειριστές με διαφορετικό εξοπλισμό, δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων την τιμή 0,66 kg/t.

10. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ: ΚΑΤΩΤΕΡΑ ΟΡΙΑ (ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΑΝΕΠΑΡΚΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ)

10.1. **Πρέπει να λαμβάνονται τρία δείγματα από το ιχνηθετημένο προϊόν, ώστε να ελέγχεται η ορθή ιχνηθέτησή του.**

10.2. **Βούτυρο και συμπυκνωμένο βούτυρο**

10.2.1. Η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 11 kg τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος καθαρότητας τουλάχιστον 95 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 10,45 kg/t.

10.2.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσ*ης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια*:

— 9,51 kg/t (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος καθαρότητας 95 %, εφάπαξ προσδιορισμός),

— 6,89 kg/t (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος καθαρότητας 95 %, εφάπαξ προσδιορισμός),

— Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 9,51 kg/t και 6,89 kg/t.

10.3. **Κρέμα γάλακτος**

10.3.1. Η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 10 kg τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος καθαρότητας τουλάχιστον 95 % ανά τόνο λίπους γάλακτος, δηλαδή 9,50 kg/t ιχνηθετημένου λίπους γάλακτος.

10.3.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 8,60 kg/t (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος καθαρότητας 95 %, εφάπαξ προσδιορισμός),

— 6,23 kg/t (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης τριγλυκεριδίου του οινανθικού οξέος καθαρότητας 95 %, εφάπαξ προσδιορισμός),

▼B

— η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 8,60 kg/t και 6,23 kg/t.

11. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ: ΑΝΩΤΑΤΑ ΟΡΙΑ (ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΥΠΕΡΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΟ ΑΠΟ 20 %)

11.1. **Πρέπει να λαμβάνονται τρία δείγματα από το ιχνηθετημένο προϊόν, ώστε να ελέγχεται η ορθή ιχνηθέτησή του.**

11.2. **Βούτυρο και συμπυκνωμένο βούτυρο**

11.2.1. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων αυτών συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— Το ανώτατο όριο ισούται με 12,96 kg/t.

11.3. **Κρέμα γάλακτος**

11.3.1. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων αυτών συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— Το ανώτατο όριο ισούται με 11,82 kg/t.

12. ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΤΗΓΜΕΝΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ ΣΕ ΤΡΙΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΟΙΝΑΝΘΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ

Διεξήχθησαν τέσσερις ομαδικές δοκιμές για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας ιχνηθετημένου βουτύρου σε τριεστέρα του οινανθικού οξέος.

Στην πρώτη κυκλική δοκιμή (ring test) συμμετείχαν εννέα εργαστήρια, χωρίς καθορισμό εφαρμοστέων αναλυτικών μεθόδων.

Στη δεύτερη κυκλική δοκιμή συμμετείχαν δέκα εργαστήρια και εφαρμόστηκαν τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι:

— ποσοτικός προσδιορισμός επτανικού μεθυλεστέρα με κ-εννεάνιο ή εννεανικό μεθυλεστέρα ως εσωτερικό πρότυπο·

— ποσοτικός προσδιορισμός οινανθικού τριεστέρα με καπρονικό τριεστέρα ως εσωτερικό πρότυπο·

— ποσοτικός προσδιορισμός επτανικού μεθυλεστέρα με χρήση δείγματος/μείγματος βαθμονόμησης·

— ποσοτικός προσδιορισμός επτανικού μεθυλεστέρα με χρήση μείγματος βαθμονόμησης.

Επιπλέον, στην περίπτωση της ανάλυσης FAME (μεθυλεστέρας λιπαρού οξέος), εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές διαδικασίες μεθυλίωσης (De Francesco και Christopherson & Glass).

Λόγω των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, επιλέχθηκαν δύο μέθοδοι για τη διεξαγωγή της τρίτης κυκλικής δοκιμής:

— ποσοτικός προσδιορισμός επτανικού μεθυλεστέρα με κ-εννεάνιο ή εννεανικό μεθυλεστέρα ως εσωτερικό πρότυπο·

— ποσοτικός προσδιορισμός οινανθικού τριεστέρα με καπρονικό τριεστέρα ως εσωτερικό πρότυπο.

Τα αποτελέσματα επτά εργαστηρίων έδειξαν ότι η μέθοδος FAME συνεπάγεται μεγαλύτερη μεταβλητότητα και, για τον λόγο αυτό, αποφασίστηκε να εφαρμοστεί μόνο ο προσδιορισμός του οινανθικού οξέος ως τριγλυκεριδίου με τη διαδικασία του ποσοτικού προσδιορισμού οινανθικού τριεστέρα με καπρονικό τριεστέρα ως εσωτερικό πρότυπο. Επιπλέον, για την ανάλυση τριγλυκεριδίων πρέπει να χρησιμοποιείται τριχοειδής στήλη.

Στην τέταρτη κυκλική δοκιμή κυκλοφόρησαν τέσσερα δείγματα (A, B, C, D) και ελήφθησαν αποτελέσματα από εννέα εργαστήρια (πίνακες 1 και 2).

▼B

Δύο εργαστήρια (DE και UE) ανέλυσαν τα δείγματα με τη μέθοδο FAME.

Λόγω του περιορισμένου αριθμού εργαστηρίων, ο στατιστικός υπολογισμός έγινε και με την πλήρη σειρά δεδομένων (σχήματα 1 και 2), η οποία περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της μεθόδου FAME, και με τα δεδομένα από την ανάλυση τριγλυκεριδίων (TG).

Δοκιμές για ακραίες τιμές:

— δείγμα Α. Από δοκιμές Dixon, Cochran και Grubbs στα επίπεδα 1 και 5 %, προέκυψε ακραία τιμή σε ένα εργαστήριο.

— δείγμα Β. Από δοκιμή Grubbs στο επίπεδο 5 %, προέκυψε ακραία τιμή σε ένα εργαστήριο,

— δείγμα Γ. Από δοκιμές Dixon και Grubbs στα επίπεδα 1 και 5 %, προέκυψε ακραία τιμή σε ένα εργαστήριο,

— δείγμα Δ. Από δοκιμές Dixon και Grubbs στα επίπεδα 1 και 5 %, προέκυψε ακραία τιμή σε ένα εργαστήριο.

Η ακραία τιμή αποκλείστηκε από τον υπολογισμό.

Ας σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο FAME δεν θεωρήθηκαν σε καμία περίπτωση ακραίες τιμές από τις διεξαχθείσες δοκιμές.

Παράμετροι ακρίβειας

Στους πίνακες 1 και 2 παρατίθενται τα αποτελέσματα όλων των εργαστηρίων και οι παράμετροι ακρίβειας, οι οποίες υπολογίστηκαν επί αποδεκτού αριθμού εργαστηρίων (8), αλλά δυστυχώς δεν προκύπτουν από την ίδια αναλυτική μέθοδο.

Στους πίνακες 3 και 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μόνο με τη μέθοδο ανάλυσης TG και οι αντίστοιχες παράμετροι ακρίβειας. Η αποδοχή των παραμέτρων αυτών εξαρτάται από την αποδοχή του μικρού αριθμού εργαστηρίων (6).

Τα σχήματα 3 και 4 δείχνουν την τάση των τιμών Sr και SR, οι οποίες υπολογίστηκαν επί των τεσσάρων δειγμάτων των δύο σειρών δεδομένων που περιγράφονται ανωτέρω.

Στον πίνακα 5 παρατίθενται οι τιμές Sr και SR, καθώς και οι αντίστοιχες συγχωνευμένες τιμές και οι συνολικές παράμετροι r και R.

Τέλος, υπολογίστηκε η κρίσιμη διαφορά για πιθανότητα 95 % (CrD95).

Πίνακας 1

Στατιστικά αποτελέσματα για τις μεθόδους TG + FAME*

Δείγμα Α		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Ακραίες τιμές	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Μέση τιμή	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Αληθής τιμή	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	0,80
ËÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Σχετική επαναληψιμότητα r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,23
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	2,04
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,84
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	5,71

▼B

Δείγμα Β		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Ακραίες τιμές	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Μέση τιμή	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Αληθής τιμή	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Σχετική επαναληψιμότητα r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,35
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	2,61
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,99
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	7,31

Πίνακας 2

Στατιστικά αποτελέσματα για τις μεθόδους TG + FAME*

Δείγμα Γ		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Ακραίες τιμές	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Μέση τιμή	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Αληθής τιμή	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Σχετική επαναληψιμότητα r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,17
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	1,82
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,47
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	5,10
Δείγμα Δ		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Ακραίες τιμές	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Μέση τιμή	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Αληθής τιμή	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Σχετική επαναληψιμότητα r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,24
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	11,43
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,67
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	32,00

▼B

Πίνακας 3

Στατιστικά αποτελέσματα για τις μεθόδους TG + FAME*

Δείγμα Α		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Ακραίες τιμές	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Μέση τιμή	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Αληθής τιμή	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,09
ËÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,25
					Σχετική επαναληψιμότητα r %	2,24
					Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,13
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	1,16
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,36
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	3,25
Δείγμα Β		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Ακραίες τιμές	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Μέση τιμή	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Αληθής τιμή	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,42
					Σχετική επαναληψιμότητα r %	3,16
					Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,33
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	2,48
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,93
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	6,94

Πίνακας 4

Στατιστικά αποτελέσματα για τη μέθοδο TG

Δείγμα Γ		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Ακραίες τιμές	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Μέση τιμή	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Αληθής τιμή	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,15
ËÈLA	FI	9,4	9,6	9,5	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,42
					Σχετική επαναληψιμότητα r %	4,51
					Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,19
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	2,04
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,53
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	5,71

▼B

Δειγμα δ		R_1	R_2	Μέσος όρος	Αριθμός εργαστηρίων που παρέμειναν μετά τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Αριθμός ακραίων τιμών	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Ακραίες τιμές	DK
					Μέση τιμή	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Αληθής τιμή	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Επαναληψιμότητα r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Σχετική επαναληψιμότητα r %	12,01
					Τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (SR)	0,25
					Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSDR %)	11,90
					Αναπαραγωγιμότητα R (95 %)	0,69
					Σχετική αναπαραγωγιμότητα R %	33,32

Πίνακας 5

Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα (με FAME)

	Αριθμός εργαστηρίων	Ακραίες τιμές	Επαναληψιμότητα Sr (95 %)	Αναπαραγωγιμότητα SR (95 %)
Δείγμα A	8	1	0,09	0,23
Δείγμα B	8	1	0,14	0,35
Δείγμα Γ	8	1	0,14	0,17
Δείγμα Δ	8	1	0,08	0,24
Συγχωνευμένη τιμή			0,116	0,256
			R	**R**
Συγχωνευμένη τιμή* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 =0,40
Δηλούμενη ελάχιστη καθαρότητα του οινανθικού τριεστέρα = 95 %
Δηλούμενη ελάχιστη περιεκτικότητα του τηγμένου βουτύρου σε οινανθικό τριεστέρα = 11 kg/t
Λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε πιθανότητα 95 %, ο μέσος όρος των δύο αποτελεσμάτων δεν είναι μικρότερος από:

10,05 kg/t, εφόσον έχει ενσωματωθεί οινανθικός τριεστέρας καθαρότητας 95 %.

Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα (χωρίς FAME)

	Αριθμός εργαστηρίων	Ακραίες τιμές	Επαναληψιμότητα Sr (95 %)	Αναπαραγωγιμότητα SR (95 %)
Δείγμα A	6	1	0,09	0,13
Δείγμα B	6	1	0,15	0,33
Δείγμα Γ	6	1	0,15	0,19
Δείγμα Δ	6	1	0,09	0,25
Συγχωνευμένη τιμή			0,124	0,237
			r	**R**
Συγχωνευμένη τιμή * 2,8			**0,347**	**0,663**

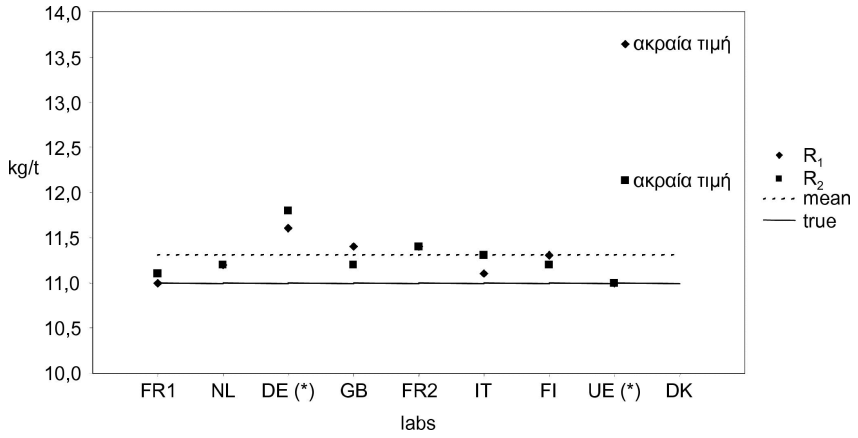
CrD95 = 0,36
Δηλούμενη ελάχιστη καθαρότητα του οινανθικού τριεστέρα = 95 %
Δηλούμενη ελάχιστη περιεκτικότητα του τηγμένου βουτύρου σε οινανθικό τριεστέρα = 11 kg/t
Λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε πιθανότητα 95 %, ο μέσος όρος των δύο αποτελεσμάτων δεν είναι μικρότερος από:

10,09 kg/t, εφόσον έχει ενσωματωθεί οινανθικός τριεστέρας καθαρότητας 95 %.

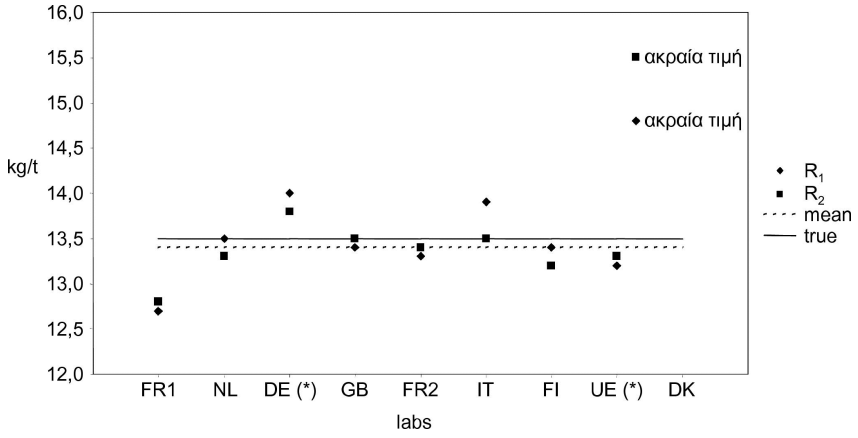
▼B

Σχήμα 1 (*)

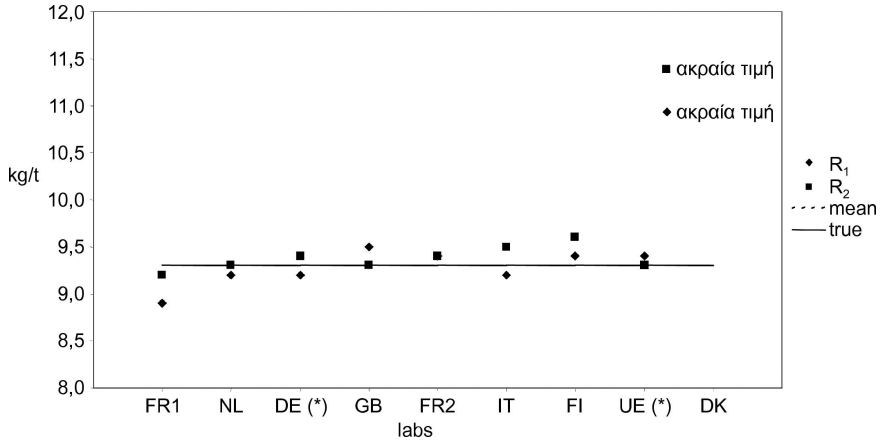
Πειραματικά αποτελέσματα: Δείγμα Α



Πειραματικά αποτελέσματα: Δείγμα Β



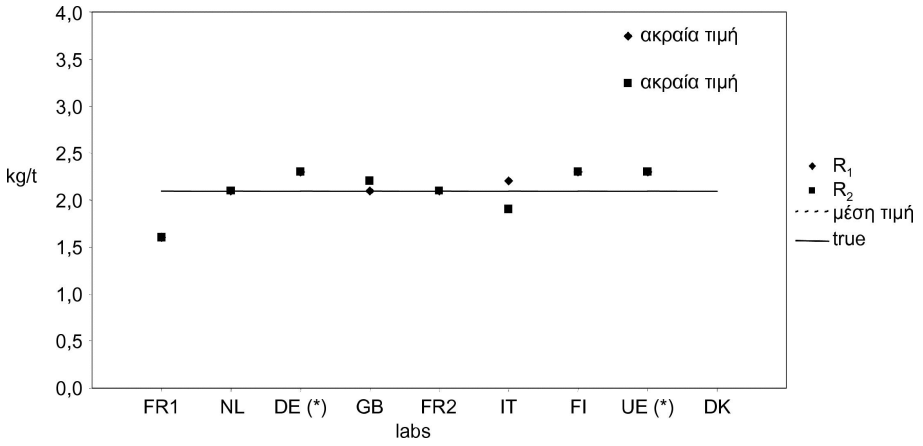
Πειραματικά αποτελέσματα: Δείγμα Γ



(*) = μέθοδος FAME

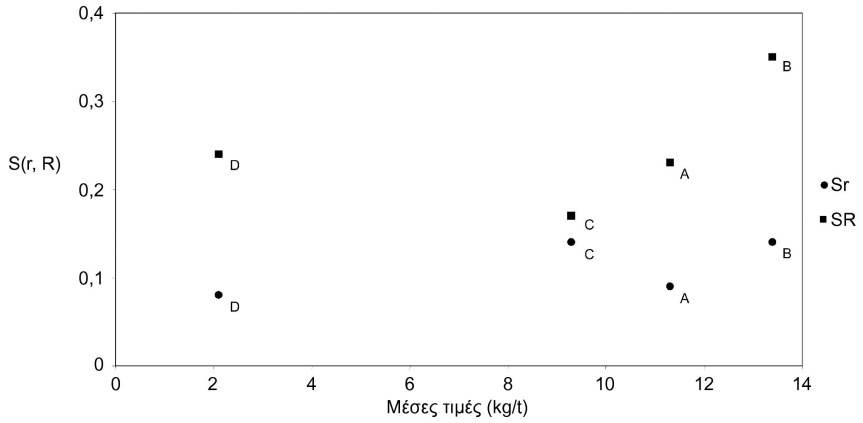
▼B

Πειραματικά αποτελέσματα: Δείγμα Δ



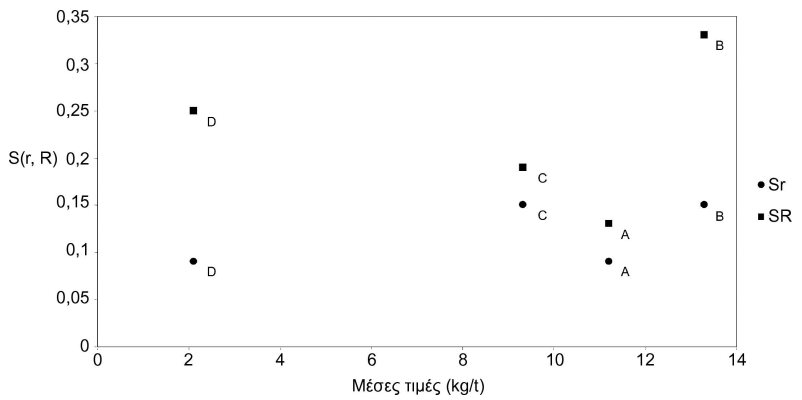
Σχήμα 2

Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας σε διαφορετικά επίπεδα (TG+FAME)



Σχήμα 3

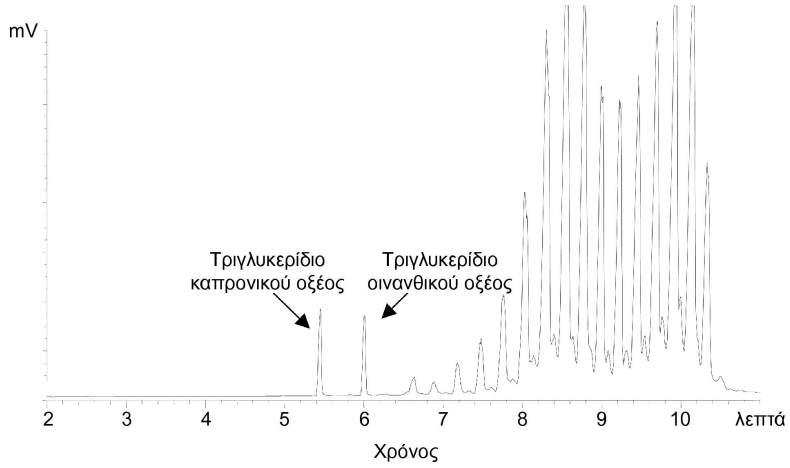
Τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας σε διαφορετικά επίπεδα (TG)



▼B

Σχήμα 4

Παράδειγμα με χρήση συστήματος απευθείας έγχυσης στη στήλη



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

(Άρθρο 5)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ, ΤΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΡΕΜΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΒΑΝΙΛΙΝΗ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού της βανιλίνης στο συμπυκνωμένο βούτυρο, το βούτυρο και την κρέμα γάλακτος.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εκχύλιση γνωστής ποσότητας δείγματος με μείγμα ισοπροπανόλης/αιθανόλης/ακετονιτριλίου (1:1:2). Καταβύθιση του μεγαλύτερου μέρους των λιπαρών υλών με ψύξη σε θερμοκρασία μεταξύ – 15 °C και – 20 °C και, στη συνέχεια, φυγοκέντρηση.

Αραίωση με νερό και προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε βανιλίνη με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθη εργαστηριακά σκεύη και όργανα και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

3.1. Καταψύκτης με εύρος θερμοκρασίας λειτουργίας – 15 °C έως – 20 °C

3.2. Σύριγγες μίας χρήσεως, των 2 ml

3.3. Μικροδιηθητικές μεμβράνες με μέγεθος πόρων 0,45 μm, ανθεκτικές σε διάλυμα που περιέχει εκχυλιστικό διάλυμα (4.4) σε αναλογία 5 %

3.4. Σύστημα υγροχρωματογραφίας αποτελούμενο από αντλία (ροή 0,1 ml/min), σύστημα έγχυσης (εισαγωγή 20 μl, αυτόματη ή χειροκίνητη), ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (λειτουργία σε μήκος κύματος 306 nm, 0,01 AU πλήρους κλίμακας) καταγραφέα ή ολοκληρωτή και θερμοστάτη στήλης που λειτουργεί στους 25 °C

3.5. Αναλυτική στήλη (μήκος 250 mm και εσωτερική διάμετρος 4,6 mm), η οποία έχει πληρωθεί με LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) ή ισοδύναμο υλικό

3.6. Προστήλη (μήκος 20 mm περίπου και εσωτερική διάμετρος 3 mm), η οποία έχει πληρωθεί σε ξηρά κατάσταση με LiChrospher RP 18 (5-10 μm) ή ισοδύναμο υλικό

3.7. Φυγόκεντρος που λειτουργεί στις 2 000 rpm

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας.

4.1. Ισοπροπανόλη

4.2. Αιθανόλη 96 % κατ' όγκο (v/v)

4.3. Ακετονιτρίλιο

4.4. Εκχυλιστικό διάλυμα

Αναμιγνύονται ισοπροπανόλη (4.1), αιθανόλη (4.2) και ακετονιτρίλιο (4.3) σε αναλογία 1:1:2 (v/v).

4.5. Βανιλίνη (4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΰδη) καθαρότητας ≥ 98 %

4.5.1. *Μητρικό διάλυμα βανιλίνης (= 500 μg/ml)*

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, περίπου 50 mg (mg CM) βανιλίνης (4.5). Προστίθενται 25 ml εκχυλιστικού διαλύματος (4.4) και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό.

4.5.2. *Πρότυπο διάλυμα βανιλίνης (= 10 μg/ml)*

Λαμβάνονται με σιφώνιο 5 ml μητρικού διαλύματος βανιλίνης (4.5.1) και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml. Συμπληρώνεται ο όγκος με νερό.

4.5.3. *Μεθανόλη, καθαρότητας HPLC*

4.5.4. *Οξικό οξύ, παγόμορφο*

4.5.5. *Νερό, καθαρότητας HPLC*

▼B

4.5.6. *Κινητή φάση HPLC*

Σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml αναμιγνύονται 300 ml μεθανόλης (4.5.3) με περίπου 500 ml νερού (4.5.5) και 20 ml οξικού οξέος (4.5.4) και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό (4.5.5). Το μείγμα διηθείται μέσω ηθμού των 0,45 μm (3.3).

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1. **Προετοιμασία του δείγματος δοκιμής**

5.1.1. *Βούτυρο*

Το δείγμα θερμαίνεται έως ότου αρχίσει να τήκεται, ενώ αποφεύγεται η κατά τόπους υπερθέρμανση άνω των 30 °C. Δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να αποχωριστούν δύο φάσεις στο βούτυρο. Όταν το δείγμα μαλακώσει αρκετά, ομογενοποιείται με ανακίνηση. Πριν από τη δειγματοληψία, το βούτυρο αναδεύεται επί 15 δευτερόλεπτα. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, περίπου 5 g (g SM) βουτύρου.

5.1.2. *Συμπυκνωμένο βούτυρο*

Το δοχείο με το συμπυκνωμένο βούτυρο τοποθετείται αμέσως πριν από τη δειγματοληψία σε κλίβανο στους 40-50 °C μέχρις πλήρους τήξεως. Το δείγμα αναμιγνύεται με περιδίνηση ή ανάδευση, ενώ αποφεύγεται ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα λόγω υπερβολικά ζωηρής ανάδευσης. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, περίπου 4 g (g SM) συμπυκνωμένου βουτύρου.

5.1.3. *Κρέμα γάλακτος*

Το δείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο ή επωαστήρα σε θερμοκρασία 35-40 °C. Το λίπος κατανέμεται ομοιογενώς με περιδίνηση και, εάν είναι αναγκαίο, με ανάδευση. Το δείγμα ψύχεται ταχέως στους 20 ± 2 °C. Πρέπει να εμφανίζει ομοιογένεια, ειδάλλως η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, περίπου 10 g (g SM) κρέμας γάλακτος.

5.2. **Παρασκευή του διαλύματος δοκιμής**

Στο τμήμα δείγματος (5.1.1, 5.1.2 ή 5.1.3) προστίθενται περίπου 75 ml εκχυλιστικού διαλύματος (4.4). Η φιάλη αναδεύεται ή ανακινείται ζωηρά επί 15 λεπτά περίπου και ο όγκος συμπληρώνεται με εκχυλιστικό διάλυμα (4.4). Από το εκχύλισμα αυτό μεταγγίζονται 10 ml περίπου σε δοκιμαστικό σωλήνα εφοδιασμένο με πώμα. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται στον καταψύκτη (3.1) και αφήνεται σε ηρεμία επί 30 λεπτά περίπου. Το ψυχρό εκχύλισμα φυγοκεντρείται επί 5 λεπτά στις 2 000 rpm περίπου και ακολουθεί αμέσως απόχυση. Το διάλυμα που αποχύνεται αφήνεται να αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml φέρονται με σιφώνιο 5 ml του διαλύματος που αποχύθηκε και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό. Λαμβάνεται με σύριγγα (3.2) κατάλληλη ποσότητα και διηθείται μέσω μικροδιηθητικής μεμβράνης (3.3). Το διήθημα είναι έτοιμο για τον προσδιορισμό με HPLC.

5.3. **Βαθμονόμηση**

Λαμβάνονται με σιφώνιο 5 ml προτύπου διαλύματος βανιλίνης (4.5.2) και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προστίθενται 5 ml εκχυλιστικού διαλύματος (4.4) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με νερό. Η περιεκτικότητα του διαλύματος αυτού σε βανιλίνη είναι 0,5 μg/ml.

5.4. **Προσδιορισμός με HPLC**

Το χρωματογραφικό σύστημα αφήνεται να σταθεροποιηθεί επί 30 λεπτά περίπου. Εισάγεται το πρότυπο διάλυμα (5.3). Η εργασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου η διαφορά μεταξύ δύο διαδοχικών εγχύσεων ως προς το εμβαδόν ή το ύψος των κορυφών να είναι μικρότερη από 2 %. Στις συγκεκριμένες συνθήκες ο χρόνος κατακράτησης της βανιλίνης είναι περίπου 9 λεπτά. Το πρότυπο διάλυμα (5.3) υποβάλλεται σε ανάλυση εις διπλούν με έγχυση 20 μl. Εισάγονται 20 μl των διαλυμάτων δοκιμής (5.2). Προσδιορίζεται το εμβαδόν ή το ύψος της λαμβανόμενης κορυφής της βανιλίνης. Η διπλή έγχυση προτύπου διαλύματος (5.3) επαναλαμβάνεται μετά από 10 εγχύσεις δειγμάτων δοκιμής (5.2).

6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίζεται ο μέσος όρος των εμβαδών (ή υψών) (AC) των κορυφών της βανιλίνης που αντιστοιχούν στις διπλές εγχύσεις προτύπου διαλύματος οι οποίες πλαισιώνουν κάθε σειρά διαλυμάτων δοκιμής (συνολικά, τέσσερα εμβαδά ή ύψη).

▼B

Υπολογίζεται ο συντελεστής απόκρισης (R):

$$R = AC/CM$$

όπου CM είναι η μάζα της βανιλίνης σε mg (4.5.1).

Η περιεκτικότητα (C) του δείγματος δοκιμής σε βανιλίνη (mg/kg) δίδεται από τον τύπο:

$$C = [(AS \times 20 \times 0,96)/(SM \times R)]$$

όπου:

AS = εμβαδόν ή ύψος της κορυφής της βανιλίνης του δείγματος δοκιμής

SM = μάζα του δείγματος δοκιμής σε g (5.1.1, 5.1.2 ή 5.1.3)

Σημείωση: Στις περιπτώσεις ανάλυσης κρέμας γάλακτος για τον προσδιορισμό της βανιλίνης, η συγκέντρωση του ιχνηθέτη πρέπει να εκφράζεται σε mg ιχνηθέτη/kg λίπους γάλακτος, με πολλαπλασιασμό της C επί 100/f, όπου f είναι η επί τοις εκατό περιεκτικότητα της κρέμας γάλακτος σε λίπος κατά μάζα (m/m).

20 = συντελεστής αραίωσης του προτύπου διαλύματος και του δείγματος δοκιμής

0,96 = διορθωτικός συντελεστής για να ληφθεί υπόψη η περιεκτικότητα σε λίπος της πρώτης αραίωσης του δείγματος δοκιμής.

Σημείωση: Αντί των εμβαδών, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τα ύψη των κορυφών (βλέπε σημείο 8.3).

7. ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

7.1. **Επαναληψιμότητα (r)**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από έναν χειριστή με τα ίδια σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 16 mg/kg.

7.2. **Αναπαραγωγιμότητα (R)**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων με διαφορετικά σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 27 mg/kg.

8. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ

8.1. Πρέπει να λαμβάνονται τρία δείγματα από το ιχνηθετημένο προϊόν, ώστε να ελέγχεται η ομοιογένεια.

8.2. Ιχνηθέτης προερχόμενος από βανίλια ή από συνθετική βανιλίνη

8.2.1. Η αναλογία ενσωμάτωσης 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΰδης είναι 250 g ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου ή βουτύρου. Στις περιπτώσεις ιχνηθέτησης κρέμας γάλακτος, η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 250 g ανά τόνο λίπους γάλακτος.

8.2.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 220,8 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης),

— 158,3 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 220,8 mg/kg και 158,3 mg/kg.

8.3. Ιχνηθέτης προερχόμενος αποκλειστικά από καρπούς βανίλιας ή από πλήρη εκχυλίσματα αυτών:

8.3.1. Η αναλογία ενσωμάτωσης 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΰδης είναι 100 g ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου ή βουτύρου. Στις περιπτώσεις ιχνηθέτησης κρέμας γάλακτος, η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 100 g ανά τόνο λίπους γάλακτος.

▼B

8.3.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 78,3 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης),

— 53,3 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 78,3 mg/kg και 53,3 mg/kg.

9. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

9.1. Η ανάκτηση της βανιλίνης που προστίθεται σε αναλογία 250 mg/kg βουτυρελαίου κυμαίνεται από 97,0 έως 103,8. Η μέση περιεκτικότητα που προσδιορίστηκε ήταν 99,9 % με τυπική απόκλιση 2,7 %.

9.2. Το πρότυπο διάλυμα περιέχει εκχυλιστικό διάλυμα σε αναλογία 5 % για να αντισταθμιστεί η διεύρυνση της κορυφής που οφείλεται στην παρουσία εκχυλιστικού διαλύματος στα δείγματα δοκιμής σε αναλογία 5 %. Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό με μέτρηση του ύψους της κορυφής.

9.3. Η ανάλυση βασίζεται σε καμπύλη βαθμονόμησης που είναι ευθεία γραμμή διερχόμενη από το μηδέν.

9.4. Πριν από την πρώτη ανάλυση θα πρέπει να ελέγχεται η γραμμικότητα της καμπύλης με χρήση κατάλληλων αραιώσεων του προτύπου διαλύματος (4.5.2). Ο έλεγχος αυτός θα πρέπει να επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, καθώς και μετά από κάθε μετατροπή ή επισκευή του εξοπλισμού HPLC. Η βανιλίνη είναι δυνατόν να αποικοδομηθεί προς βανιλινικό οξύ, διβανιλίνη και άλλες ενώσεις, λόγω της δράσης ενζύμων που ενυπάρχουν στην απαστερίωτη κρέμα γάλακτος και στα προϊόντα της.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

(Άρθρο 5)

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ β-ΑΠΟ-8'-ΚΑΡΟΤΕΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΒΟΥΤΥΡΟ ΚΑΙ ΒΟΥΤΥΡΟ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Στη μέθοδο περιγράφεται διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού του αιθυλεστέρα του β-απο-8'-καροτενικού οξέος (από-καροτενικός εστέρας) σε συμπυκνωμένο βούτυρο και βούτυρο. Ο απο-καροτενικός εστέρας είναι το άθροισμα όλων των ουσιών που περιέχονται σε εκχύλισμα δειγμάτων λαμβανόμενο υπό τις συνθήκες που περιγράφονται στη μέθοδο και οι οποίες απορροφούν φωτεινή ακτινοβολία σε μήκος κύματος 440 nm.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τηγμένο βούτυρο διαλύεται σε πετρελαϊκό αιθέρα και μετράται η απορρόφηση στα 440 nm. Η περιεκτικότητα σε απο-καροτενικό εστέρα προσδιορίζεται ως προς εξωτερικό πρότυπο.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

3.1. Βαθμολογημένα σιφώνια των 0,25-0,50-0,75-1,0 ml.

3.2. Φασματοφωτόμετρο, κατάλληλο για χρήση σε μήκος κύματος 440 nm (και 447-449 nm) και εφοδιασμένο με κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1 cm

3.3. Ογκομετρικές φιάλες των 20 ml και 100 ml

3.4. Αναλυτικός ζυγός με ευαισθησία 0,1 mg, ακρίβεια ζύγισης 1 mg και αναγνωσιμότητα 0,1 mg

3.5. Κλίβανος θερμοκρασίας 45 °C ± 1 °C

3.6. Ηθμοί ταχείας διήθησης, χωρίς τέφρα

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας.

4.1. Εναιώρημα απο-καροτενικού εστέρα (περίπου 20 %).

4.1.1. Η περιεκτικότητα του εναιωρήματος προσδιορίζεται ως εξής:

Θερμαίνεται το εναιώρημα σε θερμοκρασία 45 °C έως 50 °C και ομογενοποιείται μέσα στο αρχικό δοχείο, χωρίς αυτό να ανοιχθεί. Ζυγίζονται περίπου 400 mg σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, διαλύονται σε 20 ml χλωροφορμίου (4.4) και συμπληρώνεται ο όγκος με κυκλοεξάνιο (4.5). Αραιώνονται 5 ml του διαλύματος αυτού μέχρι τα 100 ml με κυκλοεξάνιο (διάλυμα Α). Αραιώνονται 5 ml του διαλύματος Α μέχρι τα 100 ml με κυκλοεξάνιο. Μετράται η απορρόφηση του προκύπτοντος διαλύματος στα 447-449 nm (μέτρηση της μέγιστης απορρόφησης έναντι κυκλοεξανίου ως τυφλού διαλύματος, με κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1 cm).

Περιεκτικότητα σε απο-καροτενικό εστέρα: P (%) = (Abs_{max} × 40 000) / (M_{susp} × 2 550) **ή** ανάπτυγμα: (Abs_{max} / 2 550) × (100 / 5) × (100 / 5) × (100 / M_{susp})

Abs_{max} = μέγιστη απορρόφηση του διαλύματος μέτρησης

M_{susp} = μάζα του εναιωρήματος (g)

2 550 = τιμή απορρόφησης αναφοράς (1 %, 1 cm)

P = καθαρότητα (περιεκτικότητα) του εναιωρήματος (%)

▼B

Σημείωση: Το εναιώρημα απο-καροτενικού εστέρα είναι ευαίσθητο στον αέρα, στη θερμότητα και στο φως. Στο αρχικό του δοχείο (σφραγισμένο σε ατμόσφαιρα αζώτου) που δεν έχει ακόμη ανοιχθεί, εφόσον αυτό φυλάσσεται σε ψυχρό χώρο, μπορεί να διατηρηθεί για 12 μήνες περίπου. Μετά το άνοιγμα, το περιεχόμενο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα.

4.1.2. Πρότυπο διάλυμα απο-καροτενικού εστέρα, συγκέντρωσης περίπου 0,2 mg/ml

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, περίπου 0,100 g εναιωρήματος απο-καροτενικού εστέρα (4.1.1) (W), διαλύονται σε πετρελαϊκό αιθέρα (4.2), μεταγγίζονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με πετρελαϊκό αιθέρα.

Το διάλυμα αυτό περιέχει (W × P)/10 mg/ml απο-καροτενικού εστέρα.

Σημείωση: Το διάλυμα πρέπει να φυλάσσεται στο σκοτάδι και σε ψυχρό χώρο. Διάλυμα που δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε διάστημα ενός μηνός, πρέπει να απορρίπτεται.

4.2. Πετρελαϊκός αιθέρας (40-60 °C).

4.3. Θειικό νάτριο, άνυδρο, κοκκώδες, που έχει προξηρανθεί στους 102 °C επί δύο ώρες

4.4. Χλωροφόρμιο

4.5. Κυκλοεξάνιο

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1. **Προετοιμασία του δείγματος δοκιμής**

5.1.1. *Συμπυκνωμένο βούτυρο*

Το δείγμα τήκεται σε κλίβανο στους 45 °C περίπου.

5.1.2. *Βούτυρο*

Το δείγμα τήκεται σε κλίβανο στους 45 °C περίπου. Αντιπροσωπευτικό τμήμα του δείγματος διηθείται μέσω ηθμού που περιέχει περίπου 10 g άνυδρου θειικού νατρίου (4.3), σε περιβάλλον προστατευμένο από ισχυρό φυσικό ή τεχνητό φωτισμό, και διατηρείται στους 45 °C. Συλλέγεται κατάλληλη ποσότητα τηγμένου βουτύρου.

5.2. **Προσδιορισμός**

Ζυγίζεται, με ακρίβεια 1 mg, ποσότητα περίπου 1 g συμπυκνωμένου βουτύρου (ή εκχυλισμένου τηγμένου βουτύρου (5.1.2)), (M), μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml (V) με τη βοήθεια πετρελαϊκού αιθέρα (4.2), συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή και το σύνολο αναμειγνύεται πλήρως.

Κατάλληλη ποσότητα του ανωτέρω διαλύματος μεταγγίζεται σε κυψελίδα του 1 cm και μετράται η απορρόφηση στα 440 nm έναντι πετρελαϊκού αιθέρα ως τυφλού διαλύματος. Η συγκέντρωση του απο-καροτενικού εστέρα στο διάλυμα υπολογίζεται με βάση τη ληφθείσα καμπύλη αναφοράς (C σε μg/ml).

5.3. **Βαθμονόμηση**

Λαμβάνονται με σιφώνιο 0, 0,25, 0,5, 0,75 και 1,0 ml προτύπου διαλύματος απο-καροτενικού εστέρα (4.1.2) και φέρονται σε πέντε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml, αντιστοίχως. Τα διαλύματα αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με πετρελαϊκό αιθέρα (4.2) και αναμειγνύονται.

Οι κατά προσέγγιση συγκεντρώσεις των διαλυμάτων καλύπτουν την περιοχή 0 έως 2 μg/ml, υπολογίζονται δε επακριβώς με βάση τη συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος (4.1.2) (W × P)/10 mg/ml. Μετρώνται οι τιμές απορρόφησης στα 440 nm έναντι πετρελαϊκού αιθέρα (4.2) ως τυφλού διαλύματος.

Χαράσσεται καμπύλη με τεταγμένη (άξονας Ψ) τις τιμές απορρόφησης και τετμημένη (άξονας X) τις συγκεντρώσεις απο-καροτενικού εστέρα. Υπολογίζεται η εξίσωση που αντιστοιχεί στην καμπύλη αναφοράς.

▼B

6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

6.1. Η περιεκτικότητα σε απο-καροτενικό εστέρα, εκφραζόμενη σε mg/kg προϊόντος, δίδεται από τον τύπο:

Συμπυκνωμένο βούτυρο: $(C \times V)/M$

Βούτυρο: $0{,}82\ (C \times V)/M$

όπου:

C = περιεκτικότητα σε απο-καροτενικό εστέρα, σε μg/ml, όπως προκύπτει από την καμπύλη βαθμονόμησης (5.3)

V = όγκος (ml) του διαλύματος δοκιμής (5.2)

M = μάζα (g) του τμήματος του δείγματος δοκιμής (5.2)

0,82 = διορθωτικός συντελεστής για να ληφθεί υπόψη η περιεκτικότητα του βουτύρου σε τηγμένο βούτυρο

7. ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

7.1. **Επαναληψιμότητα**

7.1.1. *Ανάλυση βουτύρου*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από έναν χειριστή με τα ίδια σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Ανάλυση συμπυκνωμένου βουτύρου*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από έναν χειριστή με τα ίδια σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 1,6 mg/kg.

7.2. **Αναπαραγωγιμότητα**

7.2.1. *Ανάλυση βουτύρου*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων με διαφορετικά σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 4,7 mg/kg.

7.3. **Ανάλυση συμπυκνωμένου βουτύρου**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων με διαφορετικά σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 5,3 mg/kg.

7.4. **Πηγή των δεδομένων που αφορούν την ακρίβεια**

Τα σχετικά με την ακρίβεια δεδομένα προσδιορίστηκαν σε δοκιμή που διεξήχθη το 1995 με τη συμμετοχή 11 εργαστηρίων, σε 12 ιχνηθετημένα δείγματα (έξι διπλά τυφλά πειράματα) για το βούτυρο και 12 ιχνηθετημένα δείγματα (έξι διπλά τυφλά πειράματα) για το συμπυκνωμένο βούτυρο.

8. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ

8.1. Πρέπει να λαμβάνονται τρία δείγματα από το ιχνηθετημένο προϊόν, ώστε να ελέγχεται η ορθή ιχνηθέτησή του.

8.2. **Βούτυρο**

8.2.1. Η αναλογία ενσωμάτωσης για το βούτυρο, λαμβανομένης υπόψη της απορρόφησης υποβάθρου, είναι 22 mg/kg.

8.2.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 17,7 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης),

— 12,2 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης).

▼B

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 17,7 mg/kg και 12,2 mg/kg.

8.3. **Συμπυκνωμένο βούτυρο**

8.3.1. Η αναλογία ενσωμάτωσης για το συμπυκνωμένο βούτυρο, λαμβανομένης υπόψη της απορρόφησης υποβάθρου, είναι 24 mg/kg.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 19,2 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης),

— 13,2 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 19,2 mg/kg και 13,2 mg/kg.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII

(Άρθρο 5)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΤΟΣΤΕΡΟΛΗΣ Ή ΣΤΙΓΜΑΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΤΟ ΒΟΥΤΥΡΟ Ή ΣΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΒΟΥΤΥΡΟ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Στη μέθοδο περιγράφεται διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού σιτοστερόλης ή στιγμαστερόλης στο συμπυκνωμένο βούτυρο ή στο βούτυρο. Ως σιτοστερόλη θεωρείται το άθροισμα της β-σιτοστερόλης και της 22-διυδρο-β-σιτοστερόλης, ενώ υποτίθεται ότι οι λοιπές σιτοστερόλες είναι αμελητέες.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το βούτυρο ή το συμπυκνωμένο βούτυρο σαπωνοποιείται με υδροξείδιο του καλίου σε διάλυμα αιθανόλης και τα μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά εκχυλίζονται με διαιθυλαιθέρα.

Οι στερόλες μετατρέπονται σε τριμεθυλο-σιλυλ-αιθέρες και αναλύονται με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης με βετουλίνη ως εσωτερικό πρότυπο.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

3.1. Φιάλη σαπωνοποίησης των 150 ml, εφοδιασμένη με κάθετο ψυκτήρα με συνδέσμους εσμυρισμένης υάλου

3.2. Διαχωριστικές χοάνες των 500 ml

3.3. Φιάλες των 250 ml

3.4. Χοάνες εξισορρόπησης της πίεσης, των 250 ml ή ανάλογης χωρητικότητας, για τη συλλογή του απορριπτόμενου διαιθυλαιθέρα

3.5. Γυάλινη στήλη διαστάσεων 350 mm × 20 mm, εφοδιασμένη με διάφραγμα από πορώδες γυαλί

3.6. Υδατόλουτρο ή θερμαντικός μανδύας

3.7. Φιαλίδια αντίδρασης των 2 ml.

3.8. Αεριοχρωματογράφος κατάλληλος για χρήση με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα διαμερισμού (splitting) και αποτελούμενος από:

3.8.1. θερμοστατικό θάλαμο στηλών, ικανό να διατηρεί την επιθυμητή θερμοκρασία με ακρίβεια ± 1 °C,

3.8.2. μονάδα ψεκασμού με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία,

3.8.3. ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) και μετατροπέα-ενισχυτή,

3.8.4. ολοκληρωτή-καταγραφέα κατάλληλο για χρήση με τον μετατροπέα-ενισχυτή (3.8.3)

3.9. Τριχοειδής στήλη από άμορφο χαλαζία, εξ ολοκλήρου επιστρωμένη με BP1 ή ισοδύναμο υλικό με ομοιόμορφο πάχος 0,25 μm (ή οποιαδήποτε άλλη στήλη, τουλάχιστον ίσης διαχωριστικής ικανότητας), ικανή να διαχωρίζει τριμεθυλο-σιλυλοπαράγωγα λανοστερόλης και σιτοστερόλης. Κατάλληλη είναι μια στήλη BP1 μήκους 12 μέτρων και εσωτερικής διαμέτρου 0,2 mm.

3.10. Μικροσύριγγα του 1 μl για αεριοχρωματογραφία, με βελόνα συγκολλημένη στο σώμα της

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας.

4.1. Αιθανόλη καθαρότητας τουλάχιστον 95 %

4.2. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 60 %: διαλύονται σε νερό 600 g υδροξειδίου του καλίου (καθαρότητας τουλάχιστον 85 %) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρις ενός λίτρου με νερό.

▼B

4.3. Βετουλίνη καθαρότητας τουλάχιστον 99 %

4.3.1. Διαλύματα βετουλίνης σε διαιθυλαιθέρα (4.4)

4.3.1.1. Η συγκέντρωση του διαλύματος βετουλίνης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σιτοστερόλης πρέπει να είναι 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. Η συγκέντρωση του διαλύματος βετουλίνης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της στιγμαστερόλης πρέπει να είναι 0,4 mg/ml.

4.4. Διαιθυλαιθέρας αναλυτικής καθαρότητας (χωρίς υπεροξείδια και υπολείμματα)

4.5. Θειικό νάτριο, άνυδρο, κοκκώδες, που έχει προξηρανθεί στους 102 °C επί δύο ώρες

4.6. Αντιδραστήριο σιλυλίωσης (σιλανοποίησης), π.χ. TRI-SIL (διαθέσιμο από την Pierce Chemical Co., αριθ. καταλόγου 49001) ή ισοδύναμο (Προσοχή: το TRI-SIL είναι εύφλεκτο, τοξικό, διαβρωτικό και πιθανώς καρκινογόνο. Το προσωπικό του εργαστηρίου πρέπει να γνωρίζει τα δεδομένα ασφαλείας για το TRI-SIL και να λαμβάνει τις απαραίτητες προφυλάξεις).

4.7. Λανοστερόλη

4.8. Σιτοστερόλη γνωστής καθαρότητας, τουλάχιστον 90 % (P)

Σημείωση 1: Η καθαρότητα των πρότυπων υλικών που χρησιμοποιούνται για βαθμονόμηση πρέπει να προσδιορίζεται με τη μέθοδο της κανονικοποίησης. Υπόθεση εργασίας είναι ότι όλες οι στερόλες που περιέχονται στο δείγμα εμφανίζονται στο χρωματογράφημα, ότι το συνολικό εμβαδόν των κορυφών αντιπροσωπεύει το 100 % των στερολικών συστατικών και ότι η απόκριση του ανιχνευτή είναι η ίδια για όλες τις στερόλες. Πρέπει να επαληθεύεται η γραμμικότητα του συστήματος στο πεδίο τιμών συγκέντρωσης που ενδιαφέρει.

4.8.1. Πρότυπο διάλυμα σιτοστερόλης — παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει, με ακρίβεια 0,001 mg/ml, περίπου 0,5 mg/ml (W_1) σιτοστερόλης (4.8) σε διαιθυλαιθέρα (4.4)

4.9. Στιγμαστερόλη γνωστής καθαρότητας, τουλάχιστον 90 % (P)

4.9.1. Πρότυπο διάλυμα στιγμαστερόλης — παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει, με ακρίβεια 0,001 mg/ml, περίπου 0,2 mg/ml (W_1) στιγμαστερόλης (4.9) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

4.10. Μείγμα ελέγχου της διαχωριστικής ικανότητας: Παρασκευάζεται διάλυμα 0,05 mg/ml λανοστερόλης (4.7) και 0,5 mg/ml σιτοστερόλης (4.8) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

5. ΜΕΘΟΔΟΣ

5.1. **Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων για τη χρωματογραφία**

Το διάλυμα εσωτερικού προτύπου (4.3.1) πρέπει να προστίθεται στο κατάλληλο πρότυπο διάλυμα στερόλης ταυτόχρονα με την προσθήκη του στο σαπωνοποιημένο δείγμα (5.2.2).

5.1.1. Χρωματογραφικό πρότυπο διάλυμα σιτοστερόλης: Λαμβάνονται δύο φιαλίδια αντίδρασης (3.7), μεταγγίζεται στο καθένα 1 ml προτύπου διαλύματος σιτοστερόλης (4.8.1) και απομακρύνεται ο διαιθυλαιθέρας με ρεύμα αζώτου. Προστίθεται 1 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4.3.1.1) και απομακρύνεται ο διαιθυλαιθέρας με ρεύμα αζώτου.

5.1.2. Χρωματογραφικό πρότυπο διάλυμα στιγμαστερόλης: Λαμβάνονται δύο φιαλίδια αντίδρασης (3.7), μεταγγίζεται στο καθένα 1 ml προτύπου διαλύματος στιγμαστερόλης (4.9.1) και απομακρύνεται ο διαιθυλαιθέρας με ρεύμα αζώτου. Προστίθεται 1 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4.3.1.2) και απομακρύνεται ο διαιθυλαιθέρας με ρεύμα αζώτου.

5.2. **Παρασκευή των μη σαπωνοποιήσιμων υλών**

5.2.1. Το δείγμα βουτύρου τήκεται σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 35 °C και αναμειγνύεται πλήρως με ανάδευση.

Σε φιάλη των 150 ml (3.1) ζυγίζεται, με ακρίβεια 1 mg, περίπου 1 g βουτύρου (W_2) ή συμπυκνωμένου βουτύρου (W_2). Προστίθενται 50 ml αιθανόλης (4.1) και 10 ml διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (4.2). Συνδέεται ο κάθετος ψυκτήρας και το σύνολο θερμαίνεται στους 75 °C περίπου επί 30 λεπτά. Ο ψυκτήρας αποσυνδέεται και η φιάλη ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

▼B

5.2.2. Προστίθεται στη φιάλη 1,0 ml διαλύματος εσωτερικού πρότυπου (4.3.1.1), εάν πρόκειται για προσδιορισμό σιτοστερόλης, ή (4.3.1.2), εάν πρόκειται για προσδιορισμό στιγμαστερόλης, και ακολουθεί πλήρης ανάμειξη. Το περιεχόμενο της φιάλης μεταγγίζεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη των 500 ml (3.2), ενώ η φιάλη εκπλύνεται εναλλάξ με 50 ml νερού και 250 ml διαιθυλαιθέρα (4.4). Η διαχωριστική χοάνη ανακινείται ζωηρά επί δύο λεπτά και αφήνεται σε ηρεμία για να διαχωριστούν οι φάσεις. Η κατώτερη υδατική στιβάδα απορρίπτεται και η αιθερική στιβάδα εκπλύνεται τέσσερις φορές με ανακίνηση με 100 ml νερού κάθε φορά.

Σημείωση 2: Για να μη σχηματιστεί γαλάκτωμα, είναι απαραίτητη η ήπια εκτέλεση των δύο πρώτων εκπλύσεων με νερό (10 αναστροφές). Η τρίτη έκπλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ζωηρή ανακίνηση επί 30 δευτερόλεπτα. Εάν σχηματιστεί γαλάκτωμα, μπορεί να καταστραφεί με την προσθήκη 5 έως 10 ml αιθανόλης. Σε περίπτωση προσθήκης αιθανόλης, απαιτούνται δύο επιπλέον εκπλύσεις με νερό με ζωηρή ανακίνηση.

5.2.3. Η διαυγής, απαλλαγμένη από σάπωνα αιθερική στιβάδα αφήνεται να διέλθει μέσω γυάλινης στήλης (3.5) που περιέχει 30 g άνυδρου θειικού νατρίου (4.5). Ο αιθέρας συλλέγεται σε φιάλη των 250 ml (3.3). Προστίθεται ένα σφαιρίδιο βρασμού και ακολουθεί εξάτμιση σχεδόν μέχρι ξηρού σε υδατόλουτρο ή θερμαντικό μανδύα, με μέριμνα για τη συλλογή των απορριπτόμενων διαλυτών.

Σημείωση 3: Εάν τα εκχυλίσματα του δείγματος ξηρανθούν πλήρως σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, ενδέχεται να υπάρξουν απώλειες στερόλης.

5.3. **Παρασκευή τριμεθυλο-σιλυλ-αιθέρων**

5.3.1. Το αιθερικό διάλυμα που παραμένει στη φιάλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο αντίδρασης των 2 ml (3.7) με 2 ml διαιθυλαιθέρα και ο αιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου. Η φιάλη εκπλύνεται δύο φορές ακόμη με μεταφορά με 2 ml διαιθυλαιθέρα στο φιαλίδιο και απομάκρυνση του αιθέρα με άζωτο κάθε φορά.

5.3.2. Το δείγμα σιλυλιώνεται με την προσθήκη 1 ml TRI-SIL (4.6). Το φιαλίδιο πωματίζεται και ανακινείται ζωηρά ώστε να επιτευχθεί διάλυση. Εάν η διάλυση δεν είναι πλήρης, θερμαίνεται στους 65-70 °C. Αφήνεται σε ηρεμία επί τουλάχιστον 5 λεπτά πριν εισαχθεί στον αεριοχρωματογράφο. Τα πρότυπα σιλυλιώνονται κατά τον ίδιο τρόπο όπως τα δείγματα. Το μείγμα ελέγχου της διαχωριστικής ικανότητας (4.10) σιλυλιώνεται κατά τον ίδιο τρόπο όπως τα δείγματα.

Σημείωση 4: Η σιλυλίωση πρέπει να πραγματοποιείται σε περιβάλλον απαλλαγμένο από νερό. Ένδειξη ατελούς σιλυλίωσης της βετουλίνης αποτελεί η εμφάνιση δεύτερης κορυφής κοντά σε εκείνη της βετουλίνης.

Η παρουσία αιθανόλης στο στάδιο της σιλυλίωσης παρεμποδίζει τη σιλυλίωση. Η εν λόγω παρουσία μπορεί να οφείλεται σε ανεπαρκή έκπλυση κατά το στάδιο της εκχύλισης. Εάν το πρόβλημα αυτό παραμένει, μπορεί να προστεθεί στο στάδιο της εκχύλισης μια πέμπτη έκπλυση με ζωηρή ανακίνηση επί 30 δευτερόλεπτα.

5.4. **Αεριοχρωματογραφική ανάλυση**

5.4.1. *Επιλογή συνθηκών λειτουργίας*

Ο αεριοχρωματογράφος ρυθμίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι συνιστώμενες συνθήκες λειτουργίας είναι οι εξής:

— θερμοκρασία στήλης: 265 °C

— θερμοκρασία συστήματος έγχυσης: 265 °C

— θερμοκρασία ανιχνευτή: 300 °C

— ταχύτητα ροής φέροντας αερίου: 0,6 ml/min

— πίεση υδρογόνου: 84 kPa

— πίεση αέρα: 155 kPa

▼B

— διαμερισμός δείγματος: 10:1 έως 50:1. Ο λόγος διαμερισμού δείγματος πρέπει να βελτιστοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τη γραμμικότητα της απόκρισης του ανιχνευτή και, κατόπιν, να επικυρώνεται στο πεδίο τιμών συγκέντρωσης που ενδιαφέρει.

Σημείωση 5: Είναι εξαιρετικά σημαντικό να καθαρίζεται τακτικά ο υποδοχέας έγχυσης.

— εισαγόμενη ποσότητα ουσίας: 1 μl διαλύματος τριμεθυλο-σιλυλαιθέρα (TMSE).

Πριν αρχίσει η ανάλυση, το σύστημα αφήνεται να έλθει σε κατάσταση ισορροπίας και να επιτύχει ικανοποιητικά σταθερή απόκριση.

Οι συνθήκες αυτές πρέπει να μεταβάλλονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του αεριοχρωματογράφου, ώστε να λαμβάνονται χρωματογραφήματα που πληρούν τις ακόλουθες απαιτήσεις:

— η κορυφή της σιτοστερόλης πρέπει να διαχωρίζεται επαρκώς από εκείνη της λανοστερόλης. Το σχήμα 1 δείχνει το τυπικό χρωματογράφημα που πρέπει να προκύπτει από σιλυλιωμένο μείγμα ελέγχου της διαχωριστικής ικανότητας (4.10)·

— οι σχετικοί χρόνοι κατακράτησης για τις ακόλουθες στερόλες πρέπει να είναι κατά προσέγγιση:

χοληστερόλη: 1,0

στιγμαστερόλη: 1,3

σιτοστερόλη: 1,5

βετουλίνη: 2,5·

— ο χρόνος κατακράτησης της βετουλίνης πρέπει να είναι κατά προσέγγιση 24 λεπτά.

5.4.2. *Αναλυτική διαδικασία*

Εισάγεται 1 μl σιλυλιωμένου προτύπου διαλύματος (στιγμαστερόλης ή σιτοστερόλης) και ρυθμίζονται οι παράμετροι βαθμονόμησης του ολοκληρωτή.

Εισάγεται ακόμη 1 μl σιλυλιωμένου προτύπου διαλύματος για να προσδιοριστούν οι συντελεστές απόκρισης ως προς τη βετουλίνη.

Εισάγεται 1 μl σιλυλιωμένου διαλύματος δείγματος και μετρώνται τα εμβαδά των κορυφών. Κάθε χρωματογραφική μέτρηση πρέπει να πλαισιώνεται από έγχυση προτύπων διαλυμάτων.

Ενδεικτικά, κάθε πλαισιωμένη μέτρηση πρέπει να περιλαμβάνει έξι εγχύσεις δείγματος.

Σημείωση 6: Η ολοκλήρωση του εμβαδού της κορυφής της στιγμαστερόλης πρέπει να περιλαμβάνει τις ενδεχόμενες «ουρές», όπως ορίζεται από τα σημεία 1, 2 και 3 στο σχήμα 2β.

Όταν αξιολογείται η ολική σιτοστερόλη, η ολοκλήρωση του εμβαδού της κορυφής της σιτοστερόλης πρέπει να περιλαμβάνει το εμβαδόν της κορυφής της 22-διυδρο-β-σιτοστερόλης (στιγμαστανόλης), η οποία εκλούεται αμέσως μετά τη σιτοστερόλη (βλέπε σχήμα 3β).

6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

6.1. Προσδιορίζεται το εμβαδόν των κορυφών των στερολών και των κορυφών της βετουλίνης και για τα δύο πρότυπα που πλαισιώνουν μια σειρά δειγμάτων και υπολογίζεται η τιμή R_1:

R_1 = (μέσο εμβαδόν της κορυφής της στερόλης του προτύπου διαλύματος)/(μέσο εμβαδόν της κορυφής της βετουλίνης του προτύπου διαλύματος)

Προσδιορίζεται το εμβαδόν της κορυφής της στερόλης (στιγμαστερόλης και σιτοστερόλης) και της κορυφής της βετουλίνης για το δείγμα και υπολογίζεται η τιμή R_2:

R_2 = (εμβαδόν της κορυφής της στερόλης του δείγματος)/(εμβαδόν της κορυφής της βετουλίνης του δείγματος)

W_1 = ποσότητα πρότυπης στερόλης (mg) που περιέχεται σε 1 ml πρότυπου διαλύματος (4.8.1 ή 4.9.1)

W_2 = βάρος του δείγματος (g) (5.2.1)

P = καθαρότητα της πρότυπης στερόλης (4.8 ή 4.9)

▼B

Περιεκτικότητα του δείγματος σε στερόλη (mg/kg) = $((R_2) / (R_1)) \times ((W_1) / (W_2)) \times P \times 10$.

7. ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

7.1. **Βούτυρο**

7.1.1. *Επαναληψιμότητα*

7.1.1.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από έναν χειριστή με τα ίδια σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από έναν χειριστή με τα ίδια σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

7.1.2.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων με διαφορετικά σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων με διαφορετικά σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει το 8,7 % σε σχέση με τη μέση τιμή των προσδιορισμών.

7.1.3. *Πηγή των δεδομένων που αφορούν την ακρίβεια*

Τα σχετικά με την ακρίβεια δεδομένα προσδιορίστηκαν σε δοκιμή που διεξήχθη το 1992 με τη συμμετοχή οκτώ εργαστηρίων, σε έξι δείγματα (τρία διπλά τυφλά πειράματα) για τη στιγμαστερόλη και έξι δείγματα (τρία διπλά τυφλά πειράματα) για τη σιτοστερόλη.

7.2. **Συμπυκνωμένο βούτυρο**

7.2.1. *Επαναληψιμότητα*

7.2.1.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από έναν χειριστή με τα ίδια σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από έναν χειριστή με τα ίδια σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει το 3,6 % σε σχέση με τη μέση τιμή των προσδιορισμών.

7.2.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

7.2.2.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων με διαφορετικά σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελέστηκαν, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων με διαφορετικά σκεύη και όργανα, δεν μπορεί να υπερβαίνει το 8,9 % σε σχέση με τη μέση τιμή των προσδιορισμών.

▼B

7.2.3. *Πηγή των δεδομένων που αφορούν την ακρίβεια*

Τα σχετικά με την ακρίβεια δεδομένα προσδιορίστηκαν σε δοκιμή που διεξήχθη το 1991 με τη συμμετοχή εννέα εργαστηρίων, σε έξι δείγματα (τρία διπλά τυφλά πειράματα) για τη στιγμαστερόλη και έξι δείγματα (τρία διπλά τυφλά πειράματα) για τη σιτοστερόλη.

8. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ

8.1. Πρέπει να λαμβάνονται τρία δείγματα από το ιχνηθετημένο προϊόν, ώστε να ελέγχεται η ορθή ιχνηθέτησή του

8.2. **Βούτυρο**

8.2.1. *Στιγμαστερόλη*

8.2.1.1. Για τη στιγμαστερόλη, η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 150 g στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 95 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 142,5 mg/kg, ή 170 g στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 85 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 115,8 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 85 %).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 115,8 mg/kg και 80,1 mg/kg ή μεταξύ των τιμών 117,7 mg/kg και 81,5 mg/kg.

8.2.2. *Σιτοστερόλη*

8.2.2.1. Για τη σιτοστερόλη, η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 600 g σιτοστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 90 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 540 mg/kg.

8.2.2.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 482,6 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης σιτοστερόλης καθαρότητας 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης σιτοστερόλης καθαρότητας 90 %).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 482,6 mg/kg και 347,6 mg/kg.

8.3. **Συμπυκνωμένο βούτυρο**

8.3.1. *Στιγμαστερόλη*

8.3.1.1. Για τη στιγμαστερόλη, η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 150 g στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 95 % ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου, δηλαδή 142,5 mg/kg, ή 170 g στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 85 % ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου, δηλαδή 144,5 mg/kg.

▼B

8.3.1.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 118,5 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης στιγμαστερόλης καθαρότητας 85 %).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 118,5 mg/kg και 82,9 mg/kg ή μεταξύ των τιμών 120,4 mg/kg και 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Σιτοστερόλη*

8.3.2.1. Για τη σιτοστερόλη, η αναλογία ενσωμάτωσης είναι 600 g σιτοστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 90 % ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου, δηλαδή 540 mg/kg.

8.3.2.2. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα τρία δείγματα από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθούν η αναλογία και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και το χαμηλότερο από τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνεται με τα ακόλουθα όρια:

— 480,9 mg/kg (95 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης σιτοστερόλης καθαρότητας 90 %),

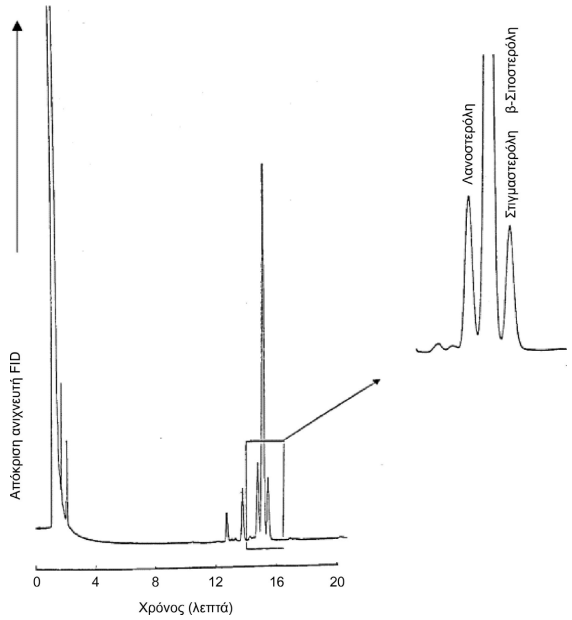
— 345,9 mg/kg (70 % της ελάχιστης αναλογίας ενσωμάτωσης σιτοστερόλης καθαρότητας 90 %).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει η χαμηλότερη τιμή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 480,9 mg/kg και 345,9 mg/kg.

Σχήμα 1

Χρωματογράφημα μίγματος ελέγχου της διαχωριστικής ικανότητας

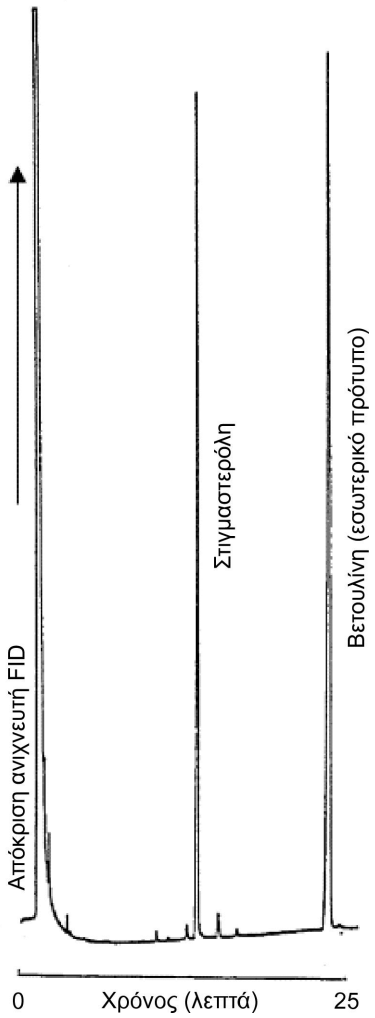
Προτιμάται ο τέλειος διαχωρισμός, δηλ. το ίχνος της γραμμής της κορυφής της λανοστερόλης πρέπει να επιστρέφει στη γραμμή βάσης, πριν αρχίσει να σχηματίζει την κορυφή της σιτοστερόλης, αλλά είναι αποδεκτός και ο ατελής διαχωρισμός.



▼B

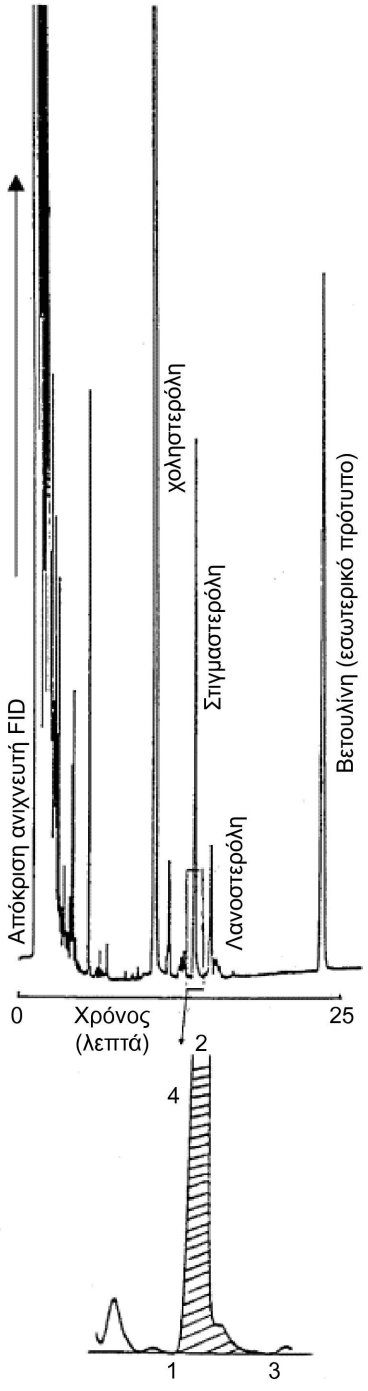
Σχήμα 2α

Πρότυπο διάλυμα στιγμαστερόλης



Σχήμα 2β

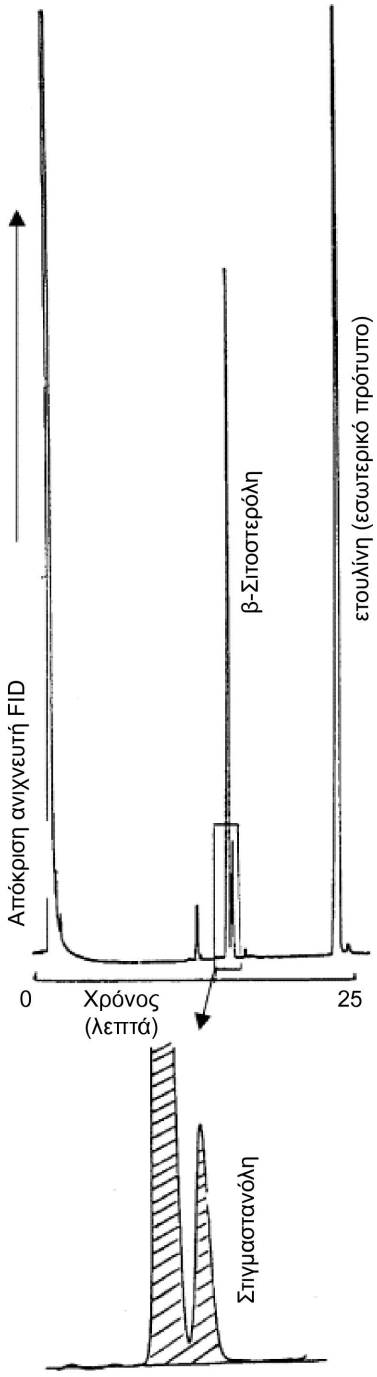
Δείγμα βουτύρου μετουσιωμένο με στιγμαστερόλη



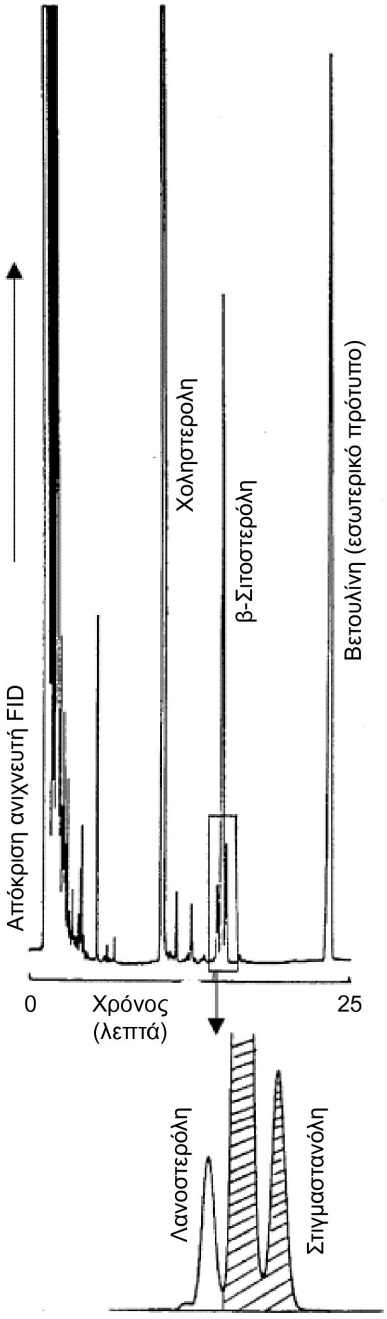
Σημείωση: Η ολοκλήρωση του εμβαδού της κορυφής της στιγμαστερόλης πρέπει να περιλαμβάνει τις ενδεχόμενες «ουρές», όπως ορίζεται από τα σημεία 1, 2 και 3.

▼B

Σχήμα 3α
Πρότυπο διάλυμα σιτοστερόλης



Σχήμα 3β
Δείγμα βουτύρου μετουσιωμένο με β-σιτοστερόλη



Σημείωση: Η β-σιτοστερόλη συχνά περιέχει μια ξένη πρόσμιξη (στιγμαστανόλη), η οποία εκλούεται αμέσως μετά τη β-σιτοστερόλη. Όταν αξιολογείται η συνολική περιεκτικότητα σε β-σιτοστερόλη, πρέπει να αθροίζονται τα εμβαδά των δύο αυτών κορυφών.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX

(Άρθρο 6)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΚΑΖΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ ΣΕ ΤΥΡΙΑ ΑΠΟ ΓΑΛΑ ΠΡΟΒΑΤΩΝ, ΑΙΓΩΝ Η ΒΟΥΒΑΛΩΝ ΚΑΙ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ, ΑΙΓΩΝ ΚΑΙ ΒΟΥΒΑΛΩΝ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε τυριά που παρασκευάζονται από γάλα προβάτων, αιγών ή βουβάλων και μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων με ισοηλεκτρική εστίαση γ-καζεϊνών μετά από πλασμινόλυση.

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος είναι κατάλληλη για ευαίσθητη και εξειδικευμένη ανίχνευση φυσικού και θερμικά κατεργασμένου αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε νωπά και ώριμα τυριά από γάλα προβάτων, αιγών ή βουβάλων και μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων. Η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση της νοθείας του γάλακτος και των τυριών με συμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού αγελαδινού γάλακτος που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.1. Απομόνωση καζεϊνών από το τυρί και τα πρότυπα υλικά αναφοράς

3.2. Διάλυση των καζεϊνών που έχουν απομονωθεί και υποβολή σε διάσπαση με πλασμίνη (EC.3.4.21.7)

3.3. Ισοηλεκτρική εστίαση των κατεργασμένων με πλασμίνη καζεϊνών παρουσία ουρίας και χρώση πρωτεϊνών.

3.4. Αξιολόγηση του αποτελέσματος της χρώσης των γ_3- και γ_2-καζεϊνών (ένδειξη παρουσίας αγελαδινού γάλακτος) με σύγκριση του αποτελέσματος που προκύπτει από το δείγμα με εκείνα που προκύπτουν στην ίδια πηκτή από τα πρότυπα υλικά αναφοράς που περιέχουν αγελαδινό γάλα σε αναλογία 0 % και 1 %.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες αναλυτικής καθαρότητας, εκτός αντίθετων υποδείξεων. Το νερό πρέπει να είναι δισαπεσταγμένο ή ισοδύναμης καθαρότητας.

Σημείωση: Οι περιγραφές που ακολουθούν ισχύουν για πηκτές πολυακρυλαμιδίου με ουρία, διαστάσεων 265 × 125 × 0,25 mm, που παρασκευάζονται στο εργαστήριο. Σε περίπτωση χρήσης πηκτών άλλων διαστάσεων και τύπων, ενδέχεται να χρειαστεί προσαρμογή των συνθηκών διαχωρισμού.

Ισοηλεκτρική εστίαση

4.1. **Αντιδραστήρια για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμιδίου που περιέχουν ουρία**

4.1.1. *Μητρικό διάλυμα πηκτής*

Διαλύονται σε νερό:

4,85 g ακρυλαμιδίου

0,15 g N, N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου (BIS)

48,05 g ουρίας

15,00 g γλυκερίνης (87 % w/w),

συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 100 ml και το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο μέσα σε σκοτεινόχρωμη φιάλη.

▼B

Σημείωση: Αντί των νευροτοξικών ακρυλαμιδίων στις ανωτέρω καθοριζόμενες ποσότητες, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται διάλυμα προαναμεμειγμένου ακρυλαμιδίου/BIS, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο. Εφόσον η περιεκτικότητα του εν λόγω διαλύματος σε ακρυλαμίδιο και σε BIS είναι 30 % w/v και 0,8 % w/v, αντίστοιχα, πρέπει να χρησιμοποιούνται για το παρασκεύασμα 16,2 ml αντί των ανωτέρω καθοριζόμενων ποσοτήτων. Ο μέγιστος χρόνος διατήρησης του μητρικού διαλύματος είναι 10 ημέρες. Εάν η αγωγιμότητά του υπερβαίνει τα 5μS, απιονίζεται με ανάδευση με 2 g Amberlite MB-3 επί 30 λεπτά και, στη συνέχεια, διηθείται μέσω μεμβράνης των 0,45 μm.

4.1.2. *Διάλυμα πηκτής*

Παρασκευάζεται διάλυμα πηκτής με ανάμιξη προσθέτων και αμφολυτών με το μητρικό διάλυμα πηκτής (βλέπε σημείο 4.1.1.).

9,0 ml μητρικού διαλύματος

24 mg β-αλανίνης

500 μl αμφολύτη με pH 3,5-9,5 ([1])

250 μl αμφολύτη με pH 5-7 ([1])

250 μl αμφολύτη με pH 6-8 ([1])

Το διάλυμα πηκτής αναμειγνύεται και στη συνέχεια απαερώνεται επί 2 έως 3 λεπτά σε λουτρό υπερήχων ή υπό κενό.

Σημείωση: Το διάλυμα πηκτής παρασκευάζεται αμέσως πριν χυθεί πάνω στην πλάκα (βλέπε σημείο 6.2).

4.1.3. *Διαλύματα καταλυτών*

4.1.3.1. N, N, N', N'-τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED)

4.1.3.2. Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (PER) 40 % w/v:

Διαλύονται σε νερό 800 mg PER και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 2 ml.

Σημείωση: Να χρησιμοποιείται πάντοτε πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα PER.

4.2. **Λιπαντικό ρευστό**

Κηροζίνη ή υγρή παραφίνη

4.3. **Διάλυμα της ανόδου**

Διαλύονται σε νερό 5,77 g φωσφορικού οξέος (85 % w/w) και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τα 100 ml.

4.4. **Διάλυμα της καθόδου**

Διαλύονται σε νερό 2,00 g υδροξειδίου του νατρίου και το διάλυμα αραιώνεται με νερό μέχρι τα 100 ml.

Προετοιμασία του δείγματος

4.5. **Αντιδραστήρια για την απομόνωση των πρωτεϊνών**

4.5.1. *Αραιό οξικό οξύ (25,0 ml παγόμορφου οξικού οξέος αραιώνονται με νερό μέχρι τα 100 ml)*

4.5.2. *Διχλωρομεθάνιο*

4.5.3. *Ακετόνη*

4.6. **Ρυθμιστικό διάλυμα για τη διάλυση πρωτεϊνών**

Διαλύονται σε νερό

5,75 g γλυκερίνης (87 % w/w)

24,03 g ουρίας

250 mg διθειοθρεϊτόλης

και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 ml.

([1]) Τα προϊόντα Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) και Resolyte® pH 5-7 και pH 6-8 (BDH, Merck) έχουν αποδειχθεί ιδιαιτέρως κατάλληλα για την επίτευξη του απαιτούμενου διαχωρισμού των γ-καζεϊνών.

▼B

Σημείωση: Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο και ο μέγιστος χρόνος διατήρησής του είναι μία εβδομάδα.

4.7. **Αντιδραστήρια για την πλασμινόλυση των καζεϊνών**

4.7.1. *Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού αμμωνίου*

Τιτλοδοτείται διάλυμα όξινου ανθρακικού αμμωνίου 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml νερού) που περιέχει 0,05 mol/l αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA, 1,46 g/100 ml) με διάλυμα ανθρακικού αμμωνίου 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml νερού) που περιέχει 0,05 mol/l EDTA έως pH 8.

4.7.2. *Βόειος πλασμίνη (EC. 3.4.21.7), δραστικότητας τουλάχιστον 5 U/ml*

4.7.3. *Διάλυμα ε-αμινοκαπρονικού οξέος για αναστολή ενζύμου*

Διαλύονται 2,624 g ε-αμινοκαπρονικού οξέος (6-αμινο-κ-εξανικό οξύ) σε 100 ml αιθανόλης 40 % (v/v).

4.8. **Πρότυπα υλικά**

4.8.1. *Πιστοποιημένα πρότυπα υλικά αναφοράς που συνίστανται σε μείγμα αποκορυφωμένου αιγοπρόβειου γάλακτος με προσθήκη πυτιάς, το οποίο περιέχει αγελαδινό γάλα σε αναλογία 0 % και 1 %, διατίθενται από το Ινστιτούτο Υλικών και Μετρήσεων Αναφοράς της Επιτροπής, B -2440 Geel, Βέλγιο.*

4.8.2. *Παρασκευή ενδιάμεσων προτύπων υλικών του εργαστηρίου που συνίστανται σε γάλα βουβάλων με προσθήκη πυτιάς, το οποίο περιέχει αγελαδινό γάλα σε αναλογία 0 % και 1 %*

Αποκορυφωμένο γάλα λαμβάνεται με φυγοκέντρηση ακατέργαστου και ασυσκεύαστου γάλακτος βουβάλων ή αγελαδινού στους 37 °C και σε 2 500 g επί 20 λεπτά. Μετά από ταχεία ψύξη του σωλήνα και του περιεχομένου του σε θερμοκρασία 6-8 °C, αφαιρείται τελείως η ανώτερη λιπαρή στιβάδα. Για την παρασκευή του προτύπου υλικού 1 %, προστίθενται 5,00 ml αποκορυφωμένου αγελαδινού γάλακτος σε 495 ml αποκορυφωμένου γάλακτος βουβάλων μέσα σε ποτήρι ζέσεως του 1 λίτρου και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6,4 με την προσθήκη αραιού γαλακτικού οξέος (10 % w/v). Ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 35 °C, προστίθενται 100 μl πυτιάς μόσχου (δραστικότητα πυτιάς 1:10 000, περίπου 3 000 U/ml), το σύνολο αναδεύεται επί ένα λεπτό και στη συνέχεια το ποτήρι ζέσεως, καλυμμένο με αλουμινόχαρτο, αφήνεται στους 35 °C επί μία ώρα για να σχηματισθεί το τυρόπηγμα. Αφού σχηματισθεί το τυρόπηγμα, το πηγμένο γάλα λυοφιλοποιείται χωρίς προηγούμενη ομογενοποίηση ούτε στράγγιση του ορού. Μετά τη λυοφιλίωση, λειοτριβείται προς σχηματισμό ομοιογενούς σκόνης. Για την παρασκευή του προτύπου υλικού 0 % ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αμιγές αποκορυφωμένο γάλα βουβάλων. Τα πρότυπα υλικά πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία – 20 °C.

Σημείωση: Πριν από την παρασκευή των προτύπων υλικών, συνιστάται να ελέγχεται η καθαρότητα του γάλακτος βουβάλων με ισοηλεκτρική εστίαση των καζεϊνών μετά από κατεργασία με πλασμίνη.

Αντιδραστήρια για τη χρώση των πρωτεϊνών

4.9. **Αντιδραστήριο στερέωσης**

Διαλύονται σε νερό 150 g τριχλωροξικού οξέος και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml.

4.10. **Διάλυμα αποχρωματισμού**

Αραιώνονται με απεσταγμένο νερό 500 ml μεθανόλης και 200 ml παγόμορφου οξικού οξέος μέχρις όγκου 2 000 ml.

Σημείωση: Παρασκευάζεται νέο διάλυμα αποχρωματισμού καθημερινά. Μπορεί να παρασκευαστεί με ανάμειξη ίσων όγκων μητρικών διαλυμάτων μεθανόλης 50 % (v/v) και παγόμορφου οξικού οξέος 20 % (v/v).

4.11. **Διαλύματα χρώσης**

4.11.1. *Διάλυμα χρώσης (μητρικό διάλυμα 1)*

Διαλύονται 3,0 g χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (Color Index 42655) σε 1 000 ml μεθανόλης 90 % (v/v) με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (45 λεπτά περίπου) και το διάλυμα διηθείται μέσω δύο πτυχωτών ηθμών μεσαίας ταχύτητας.

▼B

4.11.2. *Διάλυμα χρώσης (μητρικό διάλυμα 2)*

Διαλύονται 5,0 g πενταένυδρου θειικού χαλκού σε 1 000 ml οξικού οξέος 20 % (v/v).

4.11.3. *Διάλυμα χρώσης (διάλυμα εργασίας)*

Αναμειγνύονται 125 ml από κάθε μητρικό διάλυμα (4.11.1 και 4.11.2) αμέσως πριν από τη χρώση.

Σημείωση: Το διάλυμα χρώσης πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

5.1. Γυάλινες πλάκες (διαστάσεις 265 × 125 × 4 mm), ελαστικός κύλινδρος (πλάτος 15 cm), τραπέζι οριζοντίωσης

5.2. Φύλλο συγκράτησης πηκτής (διαστάσεις 265 × 125 mm)

5.3. Φύλλο κάλυψης (διαστάσεις 280 × 125 mm). Σε κάθε μεγάλη πλευρά επικολλάται λωρίδα αυτοκόλλητης ταινίας διαστάσεων 280 × 6 × 0,25 mm (βλέπε σχήμα 1)

5.4. Θάλαμος ηλεκτροεστίασης με ψυκτική πλάκα (π.χ. 265 × 125 mm) και κατάλληλο τροφοδοτικό (τάσης ≥ 2,5 kV) ή αυτόματη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

5.5. Κρυοστάτης κυκλοφορίας, ρυθμισμένος στους 12 ±0,5 °C

5.6. Φυγόκεντρος, ρυθμιζόμενη σε 3 000 g

5.7. Ταινίες ηλεκτροδίων (μήκος ≥ 265 mm)

5.8. Πλαστικές σταγονομετρικές φιάλες για το διάλυμα της ανόδου και της καθόδου

5.9. Εφαρμογείς δείγματος (διαστάσεις 10 × 5 mm, διηθητικός χάρτης βισκόζης ή χαμηλής προσρόφησης πρωτεϊνών)

5.10. Ψαλίδια, νυστέρια και λαβίδες από ανοξείδωτο χάλυβα

5.11. Τρυβλία χρώσης και αποχρωματισμού από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί (π.χ. δίσκοι οργάνων, διαστάσεων 280 × 150 mm)

5.12. Ρυθμιζόμενος ομοιογενοποιητής με ράβδο (διάμετρος ατράκτου 10 mm), που λειτουργεί στις 8 000 έως 20 000 rpm

5.13. Μαγνητικός αναδευτήρας

5.14. Λουτρό υπερήχων

5.15. Συγκολλητής μεμβράνης

5.16. Μικροσιφώνια των 25 μl

5.17. Συμπυκνωτής κενού ή συσκευή λυοφιλίωσης

5.18. Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο ρυθμιζόμενο στους 35 και 40 ± 1 °C με τάρακτρο

5.19. Πυκνόμετρο για μήκος κύματος λ = 634 nm

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1. **Προετοιμασία του δείγματος**

6.1.1. *Απομόνωση καζεϊνών*

Σε σωλήνα φυγοκέντρου των 100 ml ζυγίζεται ποσότητα ισοδύναμη με 5 g ξηρής μάζας τυριού ή προτύπων υλικών αναφοράς, προστίθενται 60 ml απεσταγμένου νερού και το σύνολο ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή με ράβδο (8 000 έως 10 000 rpm). Ρυθμίζεται το pH σε 4,6 με αραιό οξικό οξύ (4.5.1) και ακολουθεί φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 3 000 g). Το λίπος και ο ορός αποχύνονται, το υπόλειμμα ομογενοποιείται στις 20 000 rpm με 40 ml απεσταγμένου νερού του οποίου το pH έχει ρυθμιστεί σε 4,5 με αραιό οξικό οξύ (4.5.1), προστίθενται 20 ml διχλωρομεθανίου (4.5.2) και ακολουθεί νέα ομογενοποιήσει και φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 3 000 g). Αφαιρείται με σπάτουλα η στιβάδα της καζεΐνης που επιπλέει μεταξύ της υδατικής και της οργανικής φάσης (βλέπε σχήμα 2) και απορρίπτονται οι δύο αυτές φάσεις. Η καζεΐνη ομογενοποιείται εκ νέου με 40 ml απεσταγμένου νερού (βλέπε ανωτέρω) και 20 ml διχλωρομεθανίου (4.5.2) και φυγοκεντρείται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου και οι δύο εκχυλιστικές φάσεις

▼B

είναι άχρωμες (2 έως 3 φορές). Το πρωτεϊνικό υπόλειμμα ομογενοποιείται με 50 ml ακετόνης (4.5.3) και διηθείται μέσω πτυχωτού χάρτινου ηθμού μεσαίας ταχύτητας. Το υπόλειμμα εκπλύνεται πάνω στον ηθμό δύο φορές με 25 ml ακετόνης κάθε φορά, αφήνεται να ξηρανθεί στον αέρα ή σε ρεύμα αζώτου και κατόπιν κονιοποιείται σε γουδί.

Σημείωση: Οι ξηρές απομονωμένες καζεΐνες πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία – 20 °C.

6.1.2. *Πλασμινόλυση των β-καζεϊνών προς ενίσχυση των γ-καζεϊνών*

Παρασκευάζεται εναιώρημα 25 mg απομονωμένων καζεϊνών (6.1.1) σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού αμμωνίου (4.7.1) και ομογενοποιείται επί 20 λεπτά, π.χ. με υπερήχους. Ακολουθεί θέρμανση στους 40 °C, προσθήκη 10 μl πλασμίνης (4.7.2), ανάμιξη και επώαση στους 40 °C επί μία ώρα με συνεχή ανακίνηση. Για την αναστολή του ενζύμου προστίθενται 20 μl διαλύματος ε-αμινοκαπρονικού οξέος (4.7.3) και, στη συνέχεια, 200 mg στερεάς ουρίας και 2 mg διθειοθρεϊτόλης.

Σημείωση: Για να προκύψουν πιο συμμετρικές ταινίες εστιασμένης καζεΐνης, συνιστάται λυοφιλίωση του διαλύματος μετά την προσθήκη του ε-αμινοκαπρονικού οξέος και, στη συνέχεια, διάλυση των υπολειμμάτων σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος για διάλυση πρωτεϊνών (4.6).

6.2. **Παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμιδίου που περιέχουν ουρία**

Το φύλλο συγκράτησης πηκτής (5.2) κυλίεται με τη βοήθεια μερικών σταγόνων νερού πάνω σε γυάλινη πλάκα (5.1), ενώ η εξωτερική υγρασία απομακρύνεται με χαρτοπετσέτα ή χαρτομάντιλο. Το φύλλο κάλυψης (5.3) με αποστάτες (0,25 mm) κυλίεται κατά τον ίδιο τρόπο πάνω σε άλλη γυάλινη πλάκα. Η πλάκα τοποθετείται οριζοντίως σε τραπέζι οριζοντίωσης.

Προστίθενται 10 μl διαλύματος TEMED (4.1.3.1) στο διάλυμα πηκτής που έχει παρασκευασθεί και απαερωθεί (4.1.2), αναδεύονται και προστίθενται 10 μl διαλύματος PER (4.1.3.2). Το σύνολο αναμειγνύεται πλήρως και αμέσως χύνεται ομοιόμορφα στο κέντρο του φύλλου κάλυψης. Το ένα άκρο της πλάκας συγκράτησης πηκτής (η πλευρά με το φύλλο προς τα κάτω) τοποθετείται πάνω στην πλάκα με το φύλλο κάλυψης και χαμηλώνεται αργά, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα υμένιο πηκτής μεταξύ των φύλλων και να απλωθεί ομαλά χωρίς φυσαλίδες (βλέπε σχήμα 3). Η πλάκα συγκράτησης πηκτής χαμηλώνεται τελείως με προσοχή και με τη βοήθεια μιας λεπτής σπάτουλας και πάνω της τοποθετούνται τρεις ακόμη γυάλινες πλάκες σαν βάρος. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός (60 λεπτά περίπου), απομακρύνεται το φύλλο συγκράτησης που φέρει την πολυμερισμένη πηκτή μαζί με το φύλλο κάλυψης, με ελαφρά κτυπήματα στις γυάλινες πλάκες. Η οπίσθια πλευρά του φύλλου συγκράτησης καθαρίζεται επιμελώς για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα πηκτής και η ουρία. Το «σάντουιτς» της πηκτής συσκευάζεται με συγκόλληση μέσα σε σωλήνα από πλαστική μεμβράνη και φυλάσσεται στο ψυγείο (έξι εβδομάδες κατ' ανώτατο όριο).

Σημείωση: Το φύλλο κάλυψης με τους αποστάτες μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου μπορεί να κοπεί σε μικρότερες διαστάσεις, κοπή που συνιστάται όταν τα δείγματα είναι λίγα ή όταν χρησιμοποιείται αυτόματη συσκευή ηλεκτροφόρησης (δύο πηκτές διαστάσεων 4,5 × 5 cm).

6.3. **Ισοηλεκτρική εστίαση**

Ο θερμοστάτης του κρυοστάτη ρυθμίζεται στους 12 °C. Η οπίσθια πλευρά του φύλλου συγκράτησης πηκτής επαλείφεται με κηροζίνη και στη συνέχεια ενσταλάζονται μερικές σταγόνες κηροζίνης (4.2) στο κέντρο του ψυχόμενου τμήματος. Κυλίεται κατόπιν πάνω σ' αυτό το «σάντουιτς» της πηκτής, με το φύλλο συγκράτησης προς τα κάτω, προσέχοντας να μην σχηματιστούν φυσαλίδες. Σφουγγίζεται η τυχόν περίσσεια κηροζίνης και αφαιρείται το φύλλο κάλυψης. Διαβρέχονται οι ταινίες ηλεκτροδίων με το διάλυμα της ανόδου και της καθόδου (4.3 και 4.4), κόβονται στο μήκος της πηκτής και τοποθετούνται στις προβλεπόμενες θέσεις (απόσταση ηλεκτροδίων 9,5 cm).

▼B

Συνθήκες ισοηλεκτρικής εστίασης:

6.3.1. *Διαστάσεις πηκτής 265 × 125 × 0,25 mm*

Στάδιο	Χρόνος (min.)	Τάση (V)	Ένταση (mA)	Ισχύς (W)	Βολτώρες (Vh)
1. Προεστίαση	30	μέγιστη 2 500	μέγιστη 15	σταθερή 4	περίπου 300
2. Εστίαση δείγματος ([1])	60	μέγιστη 2 500	μέγιστη 15	σταθερή 4	περίπου 1 000
3. Τελική εστίαση	60	μέγιστη 2 500	μέγιστη 5	μέγιστη 20	περίπου 3 000
	40	μέγιστη 2 500	μέγιστη 6	μέγιστη 20	περίπου 3 000
	30	μέγιστη 2 500	μέγιστη 7	μέγιστη 25	περίπου 3 000

([1]) Τοποθέτηση του δείγματος: Μετά την προεστίαση (στάδιο 1), φέρονται με σιφώνιο 18 μl δείγματος και προτύπων διαλυμάτων στους εφαρμογείς δείγματος (10 × 5 mm) και οι τελευταίοι τοποθετούνται πάνω στην πηκτή ανά 1 mm, κατά μήκος της ανόδου και σε απόσταση 5 mm από αυτή, με ελαφρά πίεση. Εκτελείται η εστίαση στις ανωτέρω συνθήκες, ενώ οι εφαρμογείς δείγματος αφαιρούνται με προσοχή μετά την πάροδο των 60 λεπτών εστίασης του δείγματος.

Σημείωση: Σε περίπτωση μεταβολής του πάχους ή του πλάτους των πηκτών, πρέπει να προσαρμόζονται κατάλληλα οι τιμές της έντασης και της ισχύος του ρεύματος (π.χ. οι τιμές της έντασης και της ισχύος διπλασιάζονται εάν χρησιμοποιηθεί πηκτή διαστάσεων 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. *Παράδειγμα προγραμματισμού τάσης για αυτόματη συσκευή ηλεκτροφόρησης (2 πηκτές διαστάσεων 5,0 × 4,5 cm) με ηλεκτρόδια που εφαρμόζονται κατευθείαν στην πηκτή, χωρίς ταινίες ηλεκτροδίων*

Στάδιο	Τάση	Ένταση	Ισχύς	Θερμοκρασία	Βολτώρες
1. Προεστίαση	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Εστίαση δείγματος	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Εστίαση	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Εστίαση	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Ο εφαρμογέας δείγματος τοποθετείται στο στάδιο 2 στις 0 Vh.

Ο εφαρμογέας δείγματος απομακρύνεται στο στάδιο 2 στις 30 Vh.

6.4. **Χρώση πρωτεϊνών**

6.4.1. *Στερέωση πρωτεϊνών*

Απομακρύνονται οι ταινίες ηλεκτροδίων αμέσως μετά τη διακοπή του ρεύματος και η πηκτή τοποθετείται αμέσως σε τρυβλίο χρώσης/αποχρωματισμού που έχει πληρωθεί με 200 ml σταθεροποιητή (4.9), όπου και παραμένει επί 15 λεπτά υπό συνεχή ανακίνηση.

6.4.2. *Έκπλυση και χρώση της πλάκας της πηκτής*

Το αντιδραστήριο στερέωσης στραγγίζεται τελείως και η πλάκα της πηκτής εκπλύνεται δύο φορές επί 30 δευτερόλεπτα με 100 ml διαλύματος αποχρωματισμού (4.10) κάθε φορά. Το διάλυμα αποχρωματισμού αποχύνεται και το τρυβλίο πληρούται με 250 ml διαλύματος χρώσης (4.11.3), το οποίο αφήνεται να ενεργήσει επί 45 λεπτά υπό ήπια ανακίνηση.

6.4.3. *Αποχρωματισμός της πλάκας της πηκτής*

Αποχύνεται το διάλυμα χρώσης, εκπλύνεται η πλάκα της πηκτής δύο φορές με 100 ml διαλύματος αποχρωματισμού (4.10) κάθε φορά και κατόπιν ανακινείται με 200 ml διαλύματος αποχρωματισμού επί 15 λεπτά. Το στάδιο αποχρωματισμού επαναλαμβάνεται τουλάχιστον δυο-τρεις φορές, μέχρις ότου το υπόβαθρο είναι διαυγές και άχρωμο. Στη συνέχεια, η πλάκα της πηκτής εκπλύνεται με απεσταγμένο νερό (δύο φορές επί 2 λεπτά) και αφήνεται να ξηρανθεί στον αέρα (2 έως 3 ώρες) ή ξηραίνεται με στεγνωτήρα μαλλιών (10 έως 15 λεπτά).

▼B

Σημείωση 1: Η στερέωση, η έκπλυση, η χρώση και ο αποχρωματισμός εκτελούνται σε θερμοκρασία 20 °C. Οι υψηλές θερμοκρασίες πρέπει να αποφεύγονται.

Σημείωση 2: Εάν προτιμηθεί πιο ευαίσθητη μέθοδος χρώσης με άργυρο (π.χ. αντιδραστήριο Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, κωδικός αριθ. 17-1150-01), τα δείγματα καζεΐνης που έχουν υποστεί κατεργασία με πλασμίνη πρέπει να αραιωθούν μέχρι τα 5 mg/ml.

7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η αξιολόγηση διεξάγεται με σύγκριση των πρωτεϊνικών ταινιών του άγνωστου δείγματος με εκείνες των προτύπων υλικών αναφοράς στην ίδια πηκτή. Το αγελαδινό γάλα ανιχνεύεται σε τυριά από γάλα προβάτων, αιγών ή βουβάλων και από μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων μέσω των γ_3- και γ_2-καζεϊνών, των οποίων τα ισοηλεκτρικά σημεία κυμαίνονται μεταξύ των τιμών pH 6,5 και 7,5 (σχήματα 4α, 4β και 5). Το όριο ανίχνευσης είναι χαμηλότερο από 0,5 %.

7.1. **Οπτική εκτίμηση**

Για την οπτική εκτίμηση της ποσότητας αγελαδινού γάλακτος συνιστάται η προσαρμογή των συγκεντρώσεων των δειγμάτων και των προτύπων υλικών ώστε να προκύψει ο ίδιος βαθμός έντασης των γ_2- και γ_3-καζεϊνών προβάτων, αιγών ή/και βουβάλων (βλέπε «γ_2 E,G,B» και «γ_3 E, G, B» στα σχήματα 4α, 4β και 5). Κατόπιν αυτού, η ποσότητα αγελαδινού γάλακτος (μικρότερη, ίση ή μεγαλύτερη από 1 %) στο άγνωστο δείγμα μπορεί να εκτιμηθεί απευθείας με σύγκριση της έντασης των βόειων γ_3- και γ_2- καζεϊνών (βλέπε «γ_3 C» και «γ_2 C» στα σχήματα 4α, 4β και 5) με εκείνες των προτύπων υλικών αναφοράς με περιεκτικότητα 0 % και 1 % (προβάτων, αιγών) ή των προσωρινών προτύπων υλικών του εργαστηρίου (βουβάλων).

7.2. **Πυκνομετρικός υπολογισμός**

Εφόσον υπάρχει δυνατότητα, χρησιμοποιείται πυκνόμετρο (5.19) για τον προσδιορισμό του λόγου των εμβαδών των κορυφών των βόειων γ_2- και γ_3-καζεϊνών προς εκείνες των αιγοπροβάτων ή/και βουβάλων (βλέπε σχήμα 5). Η τιμή αυτή συγκρίνεται με το λόγο των εμβαδών των κορυφών των γ_2- και γ_3-καζεϊνών του προτύπου υλικού αναφοράς με περιεκτικότητα 1 % (προβάτων, αιγών) ή του προσωρινού πρότυπου υλικού του εργαστηρίου (βουβάλων) που αναλύθηκε στην ίδια πηκτή.

Σημείωση: Η μέθοδος παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα, εφόσον υπάρχει σαφής θετική ένδειξη βόειων γ_2- και γ_3-καζεϊνών στο πρότυπο υλικό 1 %, όχι όμως στο πρότυπο υλικό 0 %. Σε αντίθετη περίπτωση, η διαδικασία βελτιστοποιείται με επακριβή εφαρμογή των λεπτομερειών της μεθόδου.

Ένα δείγμα κρίνεται θετικό, εάν οι βόειες γ_2- και γ_3-καζεΐνες βοοειδών ή οι αντίστοιχοι λόγοι των εμβαδών των κορυφών είναι ίσοι ή μεγαλύτεροι από το επίπεδο του προτύπου υλικού αναφοράς 1 %.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I, Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2-caseins. Milchwissenschaft 45, 708-711 (1990).*

2. *Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. Milchwissenschaft 50, 83-85 (1995).*

3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. in: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).*

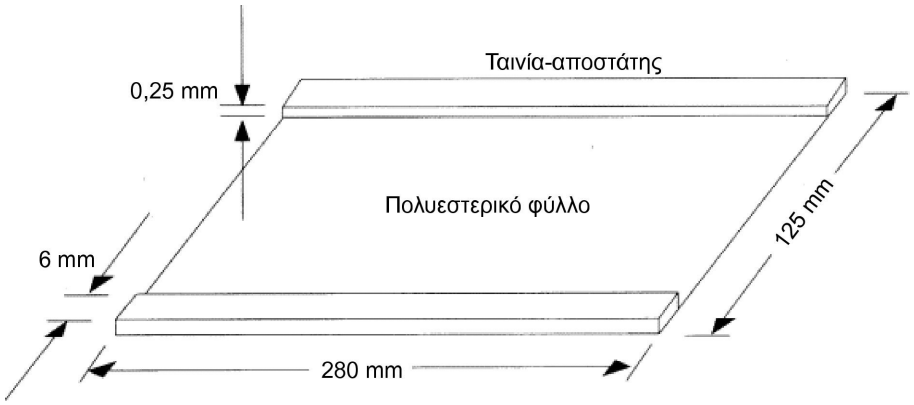
4. *Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195-199 (1982).*

▼B

5. *Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. Electrophoresis 1, 43-56 (1980).*

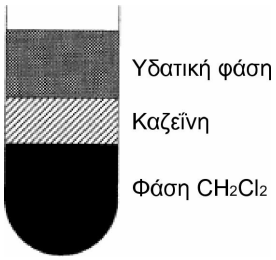
Σχήμα 1

Σχεδιάγραμμα του φύλλου κάλυψης



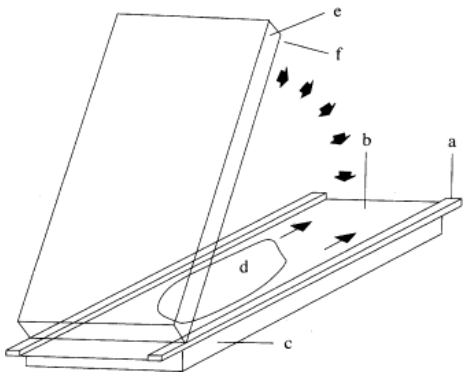
Σχήμα 2

Στιβάδα καζεΐνης που επιπλέει μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης μετά από φυγοκέντρηση



Σχήμα 3

Τεχνική επικάλυψης για στρώση υπέρλεπτων πηκτών πολυακρυλαμιδίου

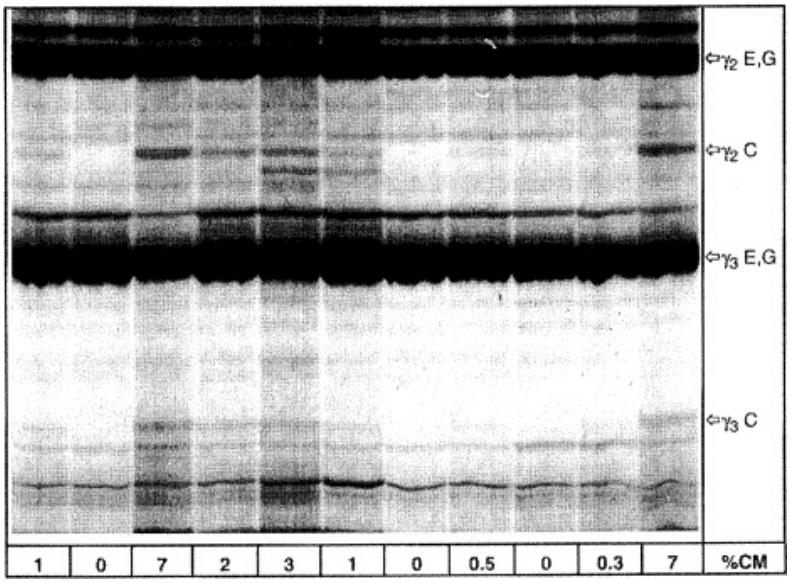


a = ταινία-αποστάτης (0,25 mm)· b = φύλλο κάλυψης (5.3)· c, e = γυάλινες πλάκες (5.1)· d = διάλυμα πηκτής (4.1.2)· f = φύλλο συγκράτησης πηκτής (5.2)

▼B

Σχήμα 4α

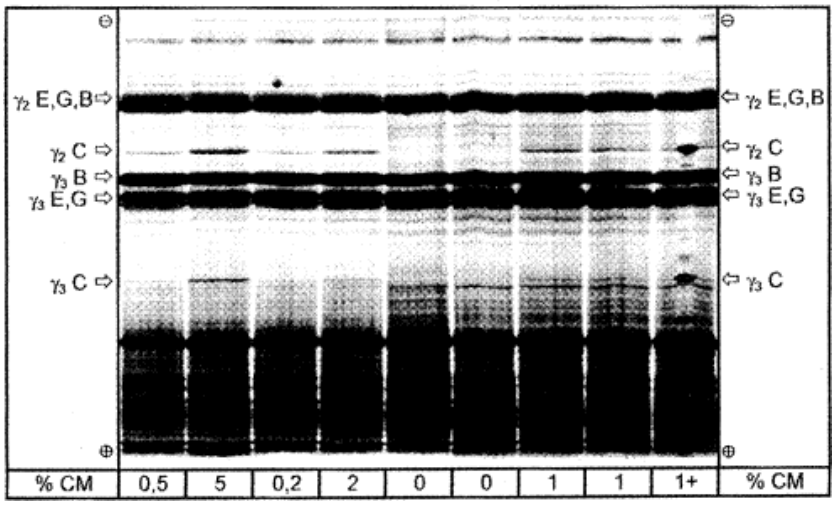
Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) κατεργασμένων με πλασμίνη καζεϊνών από τυρί παραγόμενο από αιγοπρόβειο γάλα που περιέχει διαφορετικές ποσότητες αγελαδινού γάλακτος



% CM = εκατοστιαία αναλογία αγελαδινού γάλακτος, C = αγελάδων, E = προβάτων, G = αιγών
Απεικονίζεται το άνω ήμισυ της πηκτής της IEF.

Σχήμα 4β

Ισοηλεκτρική εστίαση κατεργασμένων με πλασμίνη καζεϊνών από τυρί παραγόμενο από μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων που περιέχουν διαφορετικές ποσότητες αγελαδινού γάλακτος

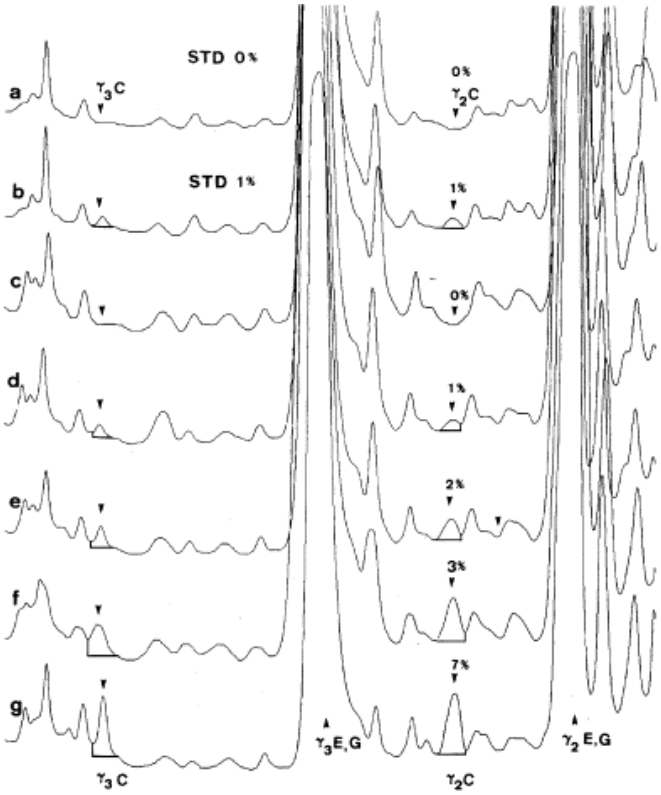


% CM = εκατοστιαία αναλογία αγελαδινού γάλακτος, 1 + = δείγμα που περιέχει αγελαδινό γάλα σε αναλογία 1 % και εμπλουτίστηκε με καθαρή βόεια καζεΐνη στο μέσο της διαδρομής, C = αγελάδων, E = προβάτων, G = αιγών, B = βουβάλων
Απεικονίζεται η συνολική απόσταση διαχωρισμού της πηκτής της IEF.

▼B

Σχήμα 5

Υπέρθεση των πυκνογραφημάτων των προτύπων υλικών (STD) και των δειγμάτων τυριού από μείγμα πρόβειου και αίγειου γάλακτος μετά την ισοηλεκτρική εστίαση



α, b = πρότυπα υλικά που περιέχουν αγελαδινό γάλα σε αναλογίες 0 και 1 %, c-g = δείγματα τυριού που περιέχουν αγελαδινό γάλα σε αναλογίες 0, 1, 2, 3 και 7 %, C = αγελάδων, E = προβάτων, G = αιγών

Το άνω ήμισυ της πηκτής της IEF σαρώθηκε σε μήκος κύματος λ = 634 nm.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ X

(Άρθρο 7)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΣΕ ΒΟΥΤΥΡΟ, ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ, ΚΑΖΕΪΝΗ ΚΑΙ ΚΑΖΕΪΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

   Πρότυπο ISO 8261

2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

   Πρότυπο ISO 4831

   Στο θρεπτικό υλικό ενοφθαλμίζονται δείγματα που αντιστοιχούν σε 1 g βουτύρου ή 0,1 g αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη ή καζεΐνης/καζεϊνικών αλάτων.

   Ενοφθαλμίζονται τρεις σωλήνες ανά δείγμα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

   Εάν από τους τρεις σωλήνες προκύψουν τρία αρνητικά αποτελέσματα, το πόρισμα είναι «συμμόρφωση».

   Εάν από τους τρεις σωλήνες προκύψουν δύο ή τρία θετικά αποτελέσματα, το πόρισμα είναι «μη συμμόρφωση».

   Εάν από τους τρεις σωλήνες προκύψουν δύο αρνητικά αποτελέσματα, η ανάλυση επαναλαμβάνεται δύο φορές (με δύο σωλήνες).

   — Εάν και τα δύο αποτελέσματα είναι αρνητικά, το πόρισμα είναι «συμμόρφωση».

   — Εάν ένα τουλάχιστον αποτέλεσμα είναι θετικό, το πόρισμα είναι «μη συμμόρφωση».

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XI

(Άρθρο 8)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Προσδιορισμός της λακτόζης σε σύνθετες ζωοτροφές

2. ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

Η περιεκτικότητα σε λακτόζη ορίζεται ως η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία που προσδιορίζεται με την περιγραφόμενη διαδικασία.

3. ΟΡΙΣΜΟΣ

Η περιεκτικότητα σε άνυδρη λακτόζη εκφράζεται σε g ανά 100 g.

4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Γίνεται ανασύσταση της σύνθετης ζωοτροφής με νερό. Σε αραιωμένη ζυγισμένη ποσότητα προστίθεται διάλυμα Biggs για να καταβυθιστούν το λιπαρό και το πρωτεϊνικό κλάσμα της σύνθετης ζωοτροφής. Το δείγμα διηθείται (ή φυγοκεντρείται) και το διήθημα (ή το υπερκείμενο) εισάγεται σε στήλη HPLC κατιονανταλλαγής με ιόντα μολύβδου, όπου ως κινητή φάση χρησιμοποιείται νερό καθαρότητας HPLC. Η εκλουόμενη λακτόζη ανιχνεύεται με διαφορικό διαθλασίμετρο ([i]).

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

5.1. **Γενικά**

Χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας, εκτός αντίθετων προδιαγραφών, και απαερωμένο νερό καθαρότητας HPLC.

5.2. **Λακτόζη**

Η μονοένυδρη D-λακτόζη ($(C_{12}H_{22})O_{11}H_2O$) μπορεί να απορροφήσει πρόσθετη υγρασία. Πριν χρησιμοποιηθεί η λακτόζη, μετράται η πραγματική ποσότητα νερού με τη μέθοδο Karl-Fisher ή απομακρύνεται η πρόσθετη υγρασία με θέρμανση της ουσίας σε κλίβανο στους 105 °C επί 8 ώρες (με την κατεργασία αυτή δεν απομακρύνεται το κρυσταλλικό νερό της λακτόζης).

5.3. **Πυκνό διάλυμα Biggs/Szijartoii** ([ii])

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml διαλύονται 9,10 g διένυδρου οξικού ψευδαργύρου ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) και 5,46 g ένυδρου φωσφοροβολφραμικού οξέος ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) σε περίπου 70 ml νερού καθαρότητας HPLC (6.8).

Προστίθενται 5,81 ml παγόμορφου οξικού οξέος (CH_3COOH). Το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τη χαραγή των 100 ml με νερό καθαρότητας HPLC (6.8) και αναμιγνύεται. Μπορεί να διατηρηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί ένα έτος.

5.4. **Αραιό διάλυμα Biggs/Szijarto**

Σε ογκομετρική φιάλη αραιώνονται μέχρι τα 500 ml με νερό 25 ml πυκνού διαλύματος Biggs/Szijarto (5.3). Το διάλυμα αυτό μπορεί να διατηρηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί ένα μήνα.

5.5. **Παρασκευή νερού καθαρότητας HPLC**

Το υπερκάθαρο νερό (6.8) διηθείται με το σύστημα διήθησης υπό κενό (6.9). Για να βελτιωθούν οι επιδόσεις της αντλίας και να ληφθεί σταθερή γραμμή βάσης, η κινητή φάση απαερώνεται καθημερινά με μία από τις διαθέσιμες τεχνικές κατ' επιλογή, π.χ. εμφύσηση ηλίου, κατεργασία με υπερήχους, απαέρωση υπό κενό ή εν σειρά.

Σημείωση: Για την παράταση της διάρκειας ζωής της στήλης είναι απαραίτητο να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη η περιεκτικότητα της φάσης έκλουσης σε διοξείδιο του άνθρακα και να αποτρέπεται η επαναπορρόφηση του τελευταίου.

▼B

6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

6.1. **Στήλη ρητίνης για HPLC ιονανταλλαγής**

Υλικό πλήρωσης της στήλης: Συμπολυμερές πολυ(στυρόλιο-διβινυλοβενζόλιο) με σταυροδεσμούς 8 %, ενεργοποιημένο με κατιονανταλλακτικές ομάδες μολύβδου.

Διαστάσεις στήλης: μήκος 300 mm, εσωτερική διάμετρος περίπου 8 mm.

Η χρήση στηλών διαφορετικών διαμέτρων είναι δυνατή, υπό τον όρο να ρυθμίζεται αναλόγως η ταχύτητα ροής.

6.2. **Προστήλη**

Η προστήλη συνίσταται σε συνδυασμό ενός χωριστού κατιονανταλλάκτη (H^+) και ενός ανιονανταλλάκτη (CO_3-), με τους οποίους έχουν πληρωθεί στήλες διαστάσεων περίπου 30 mm × 4,6 mm (μήκος × εσωτερική διάμετρος) (π.χ. προστήλες micro-guard σε υποδοχέα micro-guard) που συνδέονται εν σειρά, ή οι οποίοι έχουν τη μορφή ανάμικτου στρώματος από ρητίνες AG 50W-X4, 200-400 mesh (H^+) και AG3-X4A, 200-400 mesh (OH-) σε αναλογία 35:65 (m/m), με το οποίο πληρούται χειρωνακτικά στήλη διαστάσεων περίπου 20 × 9 mm (μήκος × εσωτερική διάμετρος).

6.3. **Κλίβανος στήλης**

Κλίβανος με δυνατότητα διατήρησης σταθερής θερμοκρασίας 85 °C ± 1 °C

6.4. **Αντλία HPLC**

Αντλία ικανή να δημιουργεί σταθερή ταχύτητα ροής 0,2-1,0 m/min (διακυμάνσεις <0,5 %)

6.5. **Σύστημα έγχυσης HPLC**

Αυτόματος δειγματολήπτης ικανός να εισάγει 25 μL και να επιτυγχάνει επαναληψιμότητα < 0,5 %

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί χειροκίνητο σύστημα (ανταποκρινόμενο στις ίδιες απαιτήσεις όπως ο αυτόματος δειγματολήπτης).

6.6. **Ανιχνευτής HPLC**

Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης με μεγάλη ευαισθησία και θόρυβο < $5{,}10^{-9}$ μονάδες RI

6.7. **Ολοκληρωτής**

Λογισμικό ή ειδικός ολοκληρωτής για τη συγκέντρωση και επεξεργασία των δεδομένων και τον υπολογισμό εμβαδών και υψών κορυφών, τα οποία μπορούν να μετατρέπονται σε συγκεντρώσεις λακτόζης.

6.8. **Μονάδα καθαρισμού νερού**

Σύστημα ικανό να παρέχει υπερκάθαρο νερό (τύπου 1) με ειδική αντίσταση >14 MΩ.cm

6.9. **Μονάδα διήθησης διαλύτη**

Σύστημα που επιτρέπει τη διήθηση του νερού μέσω διηθητικής μεμβράνης με διάμετρο πόρων είναι 0,45 μm.

Σημείωση: Πολλές μονάδες καθαρισμού νερού (6.8) διαθέτουν ενσωματωμένο διηθητικό σύστημα των 0,45 ή 0,2 μm. Εάν το νερό αυτό χρησιμοποιείται κατευθείαν, μπορεί να παραλειφθεί η πρόσθετη διήθηση.

6.10. **Αναλυτικός ζυγός**

Ζυγός με ένδειξη 0,1 mg

6.11. **Υδατόλουτρο**

Υδατόλουτρο με δυνατότητα διατήρησης της θερμοκρασίας στους 40 °C (±0,5)

6.12. **Φυγόκεντρος**

Ικανή να αποδίδει τουλάχιστον 3 000 g για φιαλίδια Eppendorf ή ισοδύναμα ή μεγαλύτερα φιαλίδια.

▼B

6.13. **Ογκομετρική φιάλη των 50 ml**

Χωρητικότητα 50 ml, κατηγορία Α

Σημείωση: Μπορούν να χρησιμοποιούνται φιάλες διαφορετικής χωρητικότητας, εφόσον λαμβάνεται υπόψη ο παράγοντας όγκος.

6.14. **Ογκομετρική φιάλη των 100 ml**

Χωρητικότητα 100 ml, κατηγορία Α

6.15. **Βαθμολογημένο σιφώνιο**

Βαθμολογημένο σιφώνιο των 10 ml

Σημείωση: Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτόματο σιφώνιο (handpipettor) των 5 ml, οπότε προστίθενται δύο φορές 5 ml αντιδραστηρίου (5.3).

7. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Είναι σημαντικό να φθάνει στο εργαστήριο ένα δείγμα το οποίο έχει ληφθεί σύμφωνα με το πρότυπο ISO 707/IDF 50 [iii], είναι πραγματικά αντιπροσωπευτικό και δεν έχει φθαρεί κατά τη μεταφορά ή την αποθήκευση.

8. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ

8.1. **Πρότυπο διάλυμα 1**

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml (5.2) διαλύεται επακριβώς ζυγισμένη (ένδειξη 0,1 mg) ποσότητα περίπου 50 mg μονοένυδρης λακτόζης (6.14) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό.

8.2. **Πρότυπο διάλυμα 2**

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml (5.2) διαλύεται επακριβώς ζυγισμένη (ένδειξη 0,1 mg) ποσότητα περίπου 100 mg μονοένυδρης λακτόζης (6.14) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό.

Σημείωση: Τα πρότυπα διαλύματα μπορούν να διατηρηθούν επί 1 εβδομάδα κατ' ανώτατο όριο σε θερμοκρασία 5 °C περίπου.

9. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

9.1. **Ανασύσταση του δείγματος**

Σε φιάλη των 50 ml (6.13) ζυγίζονται περίπου 5 g σκόνης και σημειώνεται το βάρος με ακρίβεια 1 mg (W_1, (11)). Προστίθενται 50 mL νερού και σημειώνεται η αύξηση του βάρους (W_2 (11)) με ακρίβεια 0,01 g. Η κλειστή φιάλη τοποθετείται στο υδατόλουτρο (6.11) επί 30 λεπτά, στη διάρκεια των οποίων αναστρέφεται μερικές φορές, και στη συνέχεια αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

9.2. **Κατεργασία του δείγματος**

Λαμβάνεται περίπου 1 g από το διάλυμα αυτό και φέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL (6.13). Σημειώνεται το βάρος με ακρίβεια 1 mg (W_3 (11)), προστίθενται 20 mL νερού και έπειτα 10 mL αραιωμένου αντιδραστηρίου Biggs/Szijarto (5.4) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με νερό. Η φιάλη αναστρέφεται ήπια πέντε φορές κατά τα πρώτα 30 λεπτά.

Μετά μία ώρα, λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα και φυγοκεντρείται (6.12) στα 3 000 g επί 10 λεπτά (είναι δυνατή η φυγοκέντρηση σε υψηλότερη τιμή g με αντίστοιχη μείωση του χρόνου). Κατάλληλη ποσότητα του υπερκειμένου χρησιμοποιείται για ανάλυση HPLC.

10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ HPLC

10.1. **Προετοιμασία της HPLC**

10.1.1. *Εγκατάσταση της στήλης και της προστήλης*

Τοποθετείται η προστήλη (6.2) εκτός του κλιβάνου στήλης (6.3) και η στήλη (6.1) μέσα στον κλίβανο.

Σημείωση: Εάν ο κλίβανος δεν περιλαμβάνει σωλήνωση για την προθέρμανση της φάσης έκλουσης, η τελευταία πρέπει απαραιτήτως να διέρχεται από ανοξείδωτο χαλύβδινο σωλήνα μήκους περίπου 15 cm στον κλίβανο, πριν εισέλθει στη στήλη (η θέρμανση της φάσης έκλουσης πριν από την είσοδό της στη στήλη είναι απολύτως απαραίτητη, ειδάλλως διευρύνονται οι κορυφές).

▼B

10.1.2. *Ανιχνευτής και αρχική ροή*

Για να επιτευχθεί σταθερή γραμμή βάσης, ο ανιχνευτής (6.6) τίθεται σε λειτουργία τουλάχιστον 24 ώρες πριν αρχίσει η ανάλυση. Ρυθμίζεται η εσωτερική θερμοκρασία του ανιχνευτή στους 35 °C και η ταχύτητα ροής σε 0,2 ml/min (6.4) τουλάχιστον επί 20 λεπτά, ενώ ο κλίβανος στήλης (6.3) έχει ρυθμιστεί στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

10.1.3. *Κλίβανος στήλης και τελική ταχύτητα ροής*

Ρυθμίζεται ο κλίβανος στήλης (6.3) στους 85 °C. Μόλις επιτευχθεί η θερμοκρασία αυτή, αυξάνεται σταδιακά μετά από 30 λεπτά η ταχύτητα ροής από 0,2 ml/min σε 0,6 ml/min (6.4). Το σύστημα αφήνεται να αποκτήσει ισορροπία στη συγκεκριμένη ταχύτητα ροής και στη θερμοκρασία των 85 °C επί 2 ώρες ή μέχρι να προκύψει σταθερή γραμμή βάσης.

10.1.4. *Ολοκλήρωση*

Επιλέγονται με προσοχή οι παράμετροι απόκτησης δεδομένων και ολοκλήρωσης (6.7), όπως ρυθμός μεταφοράς δεδομένων, ευαισθησία, σταθερά χρόνου, εύρος κορυφής και κατώτατο όριο.

Ο χρόνος κατακράτησης της λακτόζης είναι περίπου 11 λεπτά.

Σημείωση: Πολλά προγράμματα λογισμικού απόκτησης δεδομένων (6.7) παρέχουν τη δυνατότητα ευχερούς μέτρησης του αριθμού θεωρητικών πλακών. Μετράται τακτικά ο αριθμός θεωρητικών πλακών για το πρότυπο διάλυμα 1 (8.1) και η στήλη (6.1) αντικαθίσταται, όταν ο αριθμός αυτός είναι κατά 25 % χαμηλότερος από την αρχική τιμή του για μια νέα στήλη.

10.1.5. *Δοκιμή της προστήλης*

Ελέγχεται τακτικά (τουλάχιστον μία φορά σε κάθε σειρά μετρήσεων) η ικανότητα της προστήλης (6.2) να απομακρύνει τα άλατα από το δείγμα, με την εισαγωγή 25 μl διαλύματος χλωριούχου νατρίου 0,05 %. Εάν εμφανιστούν κορυφές, η προστήλη πρέπει να αντικατασταθεί.

10.2. **Μέτρηση των προτύπων διαλυμάτων**

Στην αρχή κάθε σειράς αναλύσεων εισάγονται διαδοχικά 25 μl (6.5) του προτύπου διαλύματος 1 (8.1) και του προτύπου διαλύματος 2 (8.2). Αυτό επαναλαμβάνεται ανά 10 έως 20 δείγματα, καθώς και στο τέλος της σειράς.

10.3. **Μέτρηση των δειγμάτων**

Εισάγονται 25 μl του υπερκειμένου (9.2) του δείγματος.

11. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

11.1. **Βαθμονόμηση**

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται κατά κανόνα τα ύψη των κορυφών. Εάν όμως το σήμα έχει υπερβολικό θόρυβο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα εμβαδά των κορυφών (ο ποσοτικός προσδιορισμός με τη βοήθεια του ύψους των κορυφών επηρεάζεται λιγότερο από τις κορυφές των συστατικών που περιέχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες διαχωρίζονται εν μέρει αλλά ανεπαρκώς από την κορυφή της λακτόζης).

Το λογισμικό (6.7) πρέπει να χαράσσει γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, διερχόμενη από την αρχή των αξόνων. Η καμπύλη ελέγχεται για πιθανή έλλειψη γραμμικότητας (τα πιθανότερα αίτια της έλλειψης γραμμικότητας είναι τα σφάλματα στην παρασκευή του προτύπου διαλύματος 1 (8.1) ή 2 (8.2), η κακή ολοκλήρωση και, σε μικρότερο βαθμό, η ελαττωματική λειτουργία του συστήματος έγχυσης).

Ως δεδομένα εισάγονται οι υπολογισθείσες συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων 1 (8.1) και 2 (8.2), σε mg/ml άνυδρης λακτόζης.

Η κλίση (RF) της καμπύλης βαθμονόμησης ορίζεται από το εμβαδόν/συγκέντρωση σε mg/ml.

11.2. **Δείγματα**

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης προκύπτει σε g/100 g και υπολογίζεται με τη βοήθεια του λογισμικού (6.7) ή με τον ακόλουθο τύπο:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0,1$$

▼B

όπου:

C: συγκέντρωση λακτόζης σε g/100 g σκόνης

H: ύψος της κορυφής της λακτόζης του δείγματος

RF: συντελεστής απόκρισης (ή κλίση) της καμπύλης βαθμονόμησης σε mV/mg/ml

W_1: βάρος του δείγματος σκόνης σε g (9.1)

W_2: βάρος, σε g, του νερού που προστέθηκε στο δείγμα σκόνης (9.1)

W_3: βάρος του δείγματος από το διάλυμα ανασύστασης της σκόνης σε g (9.2)

50: όγκος της ογκομετρικής φιάλης που χρησιμοποιήθηκε στο σημείο (9.2)

0,1: μετατροπή του αποτελέσματος σε g/100 g

12. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Οι τιμές που προέκυψαν από αυτή τη διεργαστηριακή δοκιμή ενδέχεται να μην ισχύουν για πεδία τιμών συγκέντρωσης και υλικά διαφορετικά από τα αναφερόμενα. Οι τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας θα προκύψουν από το αποτέλεσμα διεργαστηριακής δοκιμής σύμφωνα με το πρότυπο ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, στο ίδιο εργαστήριο από τον ίδιο χειριστή με τον ίδιο εξοπλισμό, σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων την τιμή xxx (θα προσδιοριστεί με ομαδική δοκιμή) ([v]).

12.2. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, σε διαφορετικά εργαστήρια από διαφορετικούς χειριστές, με διαφορετικό εξοπλισμό, δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων την τιμή 0,5 g/100 g (θα προσδιοριστεί με ομαδική δοκιμή).

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

([i]) J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89-106.

([ii]) D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

([iii]) ISO 707 (IDF 50), Milk and milk products — Methods of sampling.

([iv]) ISO 5725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions.

([v]) ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: A basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XII

(Άρθρο 9)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (ΤΥΡΟΓΑΛΑ ΠΥΤΙΑΣ) ΣΕ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΔΗΜΟΣΙΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΑΖΕΪΝΟΜΑΚΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Με την παρούσα μέθοδο είναι δυνατόν να ανιχνευθεί η παρουσία γλυκού ορού γάλακτος (τυρόγαλα πυτιάς) στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που προορίζεται για δημόσια αποθεματοποίηση, με προσδιορισμό των *καζεϊνομακροπεπτιδίων*.

2. ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

Διεθνές πρότυπο ISO 707 — Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα — Μέθοδοι δειγματοληψίας, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του παραρτήματος Ι σημείο 2 στοιχείο γ), τελευταίο εδάφιο.

3. ΟΡΙΣΜΟΣ

Η περιεκτικότητα σε στερεό υπόλειμμα γλυκού ορού γάλακτος ορίζεται ως η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία που προσδιορίζεται μέσω της περιεκτικότητας σε καζεϊνομακροπεπτίδια η οποία προκύπτει από την περιγραφόμενη διαδικασία.

4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

— Ανασύσταση του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη, απομάκρυνση του λίπους και των πρωτεϊνών με τη βοήθεια τριχλωροξικού οξέος και φυγοκέντρηση ή διήθηση

— Ποσοτικός προσδιορισμός των καζεϊνομακροπεπτιδίων (CMP) στο υπερκείμενο με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

— Αξιολόγηση του αποτελέσματος που προκύπτει για τα δείγματα με σύγκριση με πρότυπα δείγματα, τα οποία συνίστανται από αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη με ή χωρίς προσθήκη γνωστής εκατοστιαίας αναλογίας ορού γάλακτος σε σκόνη

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας.

5.1. **Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος**

Διαλύονται 240 g τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COOH) σε νερό και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1000 ml. Το διάλυμα πρέπει να είναι διαυγές και άχρωμο.

5.2. **Διάλυμα έκλουσης, pH 6,0**

Διαλύονται σε περίπου 700 ml νερού 1,74 g όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4), 12,37 g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) και 21,41 g θειικού νατρίου (Na_2SO_4). Εάν είναι αναγκαίο, ρυθμίζεται το pH σε 6,0 με διάλυμα φωσφορικού οξέος ή υδροξειδίου του καλίου.

Προστίθεται νερό μέχρι τελικού όγκου 1 000 ml και το διάλυμα ομογενοποιείται.

Σημείωση: Η σύσταση του διαλύματος έκλουσης μπορεί να αναπροσαρμοστεί ώστε να είναι σύμφωνη με το πιστοποιητικό των προτύπων υλικών ή με τις συστάσεις του κατασκευαστή του υλικού πλήρωσης της στήλης.

Πριν χρησιμοποιηθεί, το διάλυμα έκλουσης διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm.

5.3. **Διαλύτης έκπλυσης**

Αναμειγνύεται ένας όγκος ακετονιτριλίου (CH_3CN) με εννέα όγκους νερού. Πριν χρησιμοποιηθεί, το μείγμα διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm.

▼B

Σημείωση: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε άλλος διαλύτης έκπλυσης που έχει βακτηριοκτόνο δράση και δεν μεταβάλλει τη διαχωριστική ικανότητα των στηλών.

5.4. **Πρότυπα δείγματα**

5.4.1. *Αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη το οποίο ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις του παρόντος κανονισμού (δηλαδή [0]).*

5.4.2. *Το ίδιο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, νοθευμένο σε αναλογία 5 % (m/m) με σκόνη γλυκού ορού γάλακτος πρότυπης σύστασης (δηλαδή [5]).*

6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

6.1. Αναλυτικός ζυγός

6.2. Προαιρετικά, φυγόκεντρος ικανή να επιτυγχάνει φυγόκεντρο δύναμη 2 200 g, εφοδιασμένη με πωματισμένους σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml περίπου

6.3. Μηχανικό τάρακτρο

6.4. Μαγνητικός αναδευτήρας

6.5. Γυάλινες χοάνες, διαμέτρου περίπου 7 cm

6.6. Χάρτινοι ηθμοί μέσης διηθητικής ικανότητας, διαμέτρου περίπου 12,5 cm

6.7. Γυάλινη συσκευή διήθησης, εφοδιασμένη με διηθητική μεμβράνη διαμέτρου πόρων 0,45 μm

6.8. Βαθμολογημένα σιφώνια παροχής 10 ml (ISO 648, κατηγορίας A ή ISO/R 835) ή σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 10,0 ml σε δύο λεπτά

6.9. Σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 20,0 ml νερού θερμοκρασίας περίπου 50 °C

6.10. Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 25 ±0,5 °C

6.11. Εξοπλισμός HPLC, ο οποίος περιλαμβάνει:

6.11.1. Αντλία

6.11.2. Σύστημα έγχυσης, χειροκίνητο ή αυτόματο, χωρητικότητας 15 έως 30 μl

6.11.3. Δύο στήλες TSK 2 000 SW εν σειρά (μήκος 30 cm, εσωτερική διάμετρος 0,75 cm) ή ισοδύναμες στήλες (π.χ. μία TSK 2 000-SWxl και μία Agilent Technologies Zorbax GF 250) και μια προστήλη (3 cm × 0,3 cm) με υλικό πλήρωσης I 125 ή υλικό ισοδύναμης αποτελεσματικότητας

6.11.4. Θερμοστατούμενο κλίβανο στήλης, ρυθμισμένος στους 35 ± 1 °C

6.11.5. Ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος, με δυνατότητα μετρήσεων στα 205 nm με ευαισθησία 0,008 AU

6.11.6. Ολοκληρωτή με δυνατότητα ολοκλήρωσης μεταξύ των «κοιλάδων» του χρωματογραφήματος

Σημείωση: Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες που διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αλλά η διαχωριστική τους ικανότητα είναι κατά τι μικρότερη. Στην περίπτωση αυτή, οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας κατά την ίδια σειρά αναλύσεων πρέπει να είναι μικρότερες από ± 5 °C.

7. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

7.1. Τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται με τη διαδικασία που καθορίζεται στο διεθνές πρότυπο ISO 707. Τα κράτη μέλη μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιούν άλλη μέθοδο δειγματοληψίας, εφόσον αυτή είναι σύμφωνη με τις αρχές του προαναφερόμενου προτύπου.

7.2. Το δείγμα φυλάσσεται σε συνθήκες που αποκλείουν τη φθορά ή τη μεταβολή της σύστασης.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

▼B

8.1. **Προετοιμασία του δείγματος δοκιμής**

Η σκόνη γάλακτος μεταφέρεται σε δοχείο χωρητικότητας περίπου διπλάσιας του όγκου της, εφοδιασμένο με αεροστεγές πώμα. Το δοχείο πωματίζεται αμέσως και η σκόνη γάλακτος αναμειγνύεται πλήρως με επανειλημμένες αναστροφές του δοχείου.

8.2. **Τμήμα δείγματος δοκιμής**

Σε σωλήνα φυγοκέντρου (6.2) ή κατάλληλη φιάλη με πώμα (50 ml) ζυγίζονται 2,000 ±0,001 g δείγματος δοκιμής.

8.3. **Απομάκρυνση του λίπους και των πρωτεϊνών**

8.3.1. Στο τμήμα δείγματος προστίθενται 20,0 ml θερμού νερού (50 °C). Διαλύεται η σκόνη με ανακίνηση επί πέντε λεπτά σε μηχανικό τάρακτρο (6.3). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο (6.10) και αφήνεται να αποκτήσει ισορροπία στους 25 °C.

8.3.2. Προστίθενται, σε διάστημα δύο λεπτών, 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξικού οξέος (5.1) θερμοκρασίας περίπου 25 °C υπό ζωηρή ανάδευση στον μαγνητικό αναδευτήρα (6.4). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο (6.10) όπου παραμένει επί 60 λεπτά.

8.3.3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (6.2) στα 2 200 g επί 10 λεπτά ή διήθηση μέσω χάρτινου ηθμού (6.6), ενώ απορρίπτονται τα πρώτα 5 ml του διηθήματος.

8.4. **Χρωματογραφικός προσδιορισμός**

8.4.1. Εισάγονται 15 έως 30 μl υπερκειμένου ή διηθήματος (8.3.3), επακριβώς μετρημένα, στη συσκευή HPLC (6.11), η οποία λειτουργεί με ταχύτητα ροής 1,0 ml διαλύματος έκλουσης (5.2) ανά λεπτό.

Σημείωση 1: Μπορεί να εφαρμοστεί διαφορετική ταχύτητα ροής ανάλογα με τη εσωτερική διάμετρο των χρησιμοποιούμενων στηλών ή τις οδηγίες του κατασκευαστή τους.

Σημείωση 2: Η θερμοκρασία του διαλύματος έκλουσης (5.2) πρέπει να διατηρείται στους 85 °C καθ' όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης, ώστε να διατηρείται απαεριωμένο το διάλυμα έκλουσης και να αποτρέπεται η ανάπτυξη βακτηριδίων. Κάθε προφύλαξη με ανάλογο αποτέλεσμα είναι αποδεκτή.

Σημείωση 3: Σε κάθε διακοπή εκπλύνονται οι στήλες με νερό. Δεν πρέπει ποτέ να παραμένει σε αυτές το διάλυμα έκλουσης (5.2).

Πριν από κάθε διακοπή που υπερβαίνει τις 24 ώρες, εκπλύνονται οι στήλες με νερό και στη συνέχεια με το διάλυμα (5.3) τουλάχιστον επί τρεις ώρες, με ταχύτητα ροής 0,2 ml ανά λεπτό.

8.4.2. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης του δείγματος δοκιμής [E] λαμβάνονται υπό μορφή χρωματογραφήματος, στο οποίο κάθε κορυφή ταυτοποιείται από τον οικείο χρόνο κατακράτησης, RT, ως εξής:

Κορυφή II:	Η δεύτερη κορυφή του χρωματογραφήματος, με RT 12,5 λεπτών περίπου
Κορυφή III:	Η τρίτη κορυφή του χρωματογραφήματος, η οποία αντιστοιχεί στα CMP, με RT 15,5 λεπτών

Η επιλογή της ή των στηλών μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον χρόνο κατακράτησης των επιμέρους κορυφών.

Ο ολοκληρωτής (6.11.6) υπολογίζει αυτόματα το εμβαδόν A κάθε κορυφής:

A_{II}:	εμβαδόν της κορυφής II
A_{III}:	εμβαδόν της κορυφής III

Πριν από την ποσοτική ερμηνεία, είναι απαραίτητο να εξετάζεται η μορφή κάθε χρωματογραφήματος για να εντοπιστούν τυχόν ανωμαλίες που οφείλονται είτε σε ελαττωματική λειτουργία της συσκευής ή των στηλών είτε στην προέλευση και το είδος του αναλυθέντος δείγματος.

Σε περίπτωση αμφιβολίας επαναλαμβάνεται η ανάλυση.

▼B

8.5. **Βαθμονόμηση**

8.5.1. Εφαρμόζεται κατά γράμμα στα πρότυπα δείγματα (5.4) η διαδικασία που περιγράφεται στα σημεία 8.2 έως 8.4.2.

Χρησιμοποιούνται διαλύματα που έχουν παρασκευασθεί πρόσφατα, δεδομένου ότι τα CMP αποικοδομούνται σε περιβάλλον τριχλωροξικού οξέος 8 %. Η σχετική απώλεια ουσίας εκτιμάται σε 0,2 % ανά ώρα στους 30 °C.

8.5.2. Πριν από τον χρωματογραφικό προσδιορισμό στα δείγματα, οι στήλες προσαρμόζονται στις συνθήκες με επανειλημμένη εισαγωγή διαλύματος (8.5.1) του πρότυπου δείγματος (5.4.2) μέχρι να σταθεροποιηθούν το εμβαδόν και ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής που αντιστοιχεί στα CMP.

8.5.3. Προσδιορίζονται οι συντελεστές απόκρισης, R, με την εισαγωγή του ίδιου όγκου διηθημάτων (8.5.1) με αυτόν των δειγμάτων.

9. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

9.1. **Μέθοδος υπολογισμού και τύποι**

9.1.1. *Υπολογισμός των συντελεστών απόκρισης R:*

Κορυφή II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

όπου:

R_{II} = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής II

A_{II} [0] = το εμβαδόν της κορυφής II του πρότυπου δείγματος [0], που λαμβάνεται στο σημείο 8.5.3

Κορυφή III:	$R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$

όπου:

R_{III} = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής III

A_{III} [0] και A_{III} [5] = τα εμβαδά των κορυφών III των πρότυπων δειγμάτων [0] και [5], αντίστοιχα, που λαμβάνονται στο σημείο 8.5.3

W = η ποσότητα ορού γάλακτος που περιέχεται στο πρότυπο δείγμα [5], δηλαδή 5.

9.1.2. *Υπολογισμός του σχετικού εμβαδού των κορυφών του δείγματος [E]*

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

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

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

όπου:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = τα σχετικά εμβαδά των κορυφών II, III και IV, αντίστοιχα, του δείγματος [E]

A_{II} [E], A_{III} [E] = τα εμβαδά των κορυφών II και III, αντίστοιχα, του δείγματος [E], που λαμβάνονται στο σημείο 8.4.2

R_{II}, R_{III} = οι συντελεστές απόκρισης που υπολογίζονται στο σημείο 9.1.1

9.1.3. *Υπολογισμός του σχετικού χρόνου κατακράτησης της κορυφής III του δείγματος [E]:* $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$

όπου:

RRT_{III} [E] = ο σχετικός χρόνος κατακράτησης της κορυφής III του δείγματος [E]

RT_{III} [E] = ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής III του δείγματος [E] που λαμβάνεται στο σημείο 8.4.2

▼B

RT_{III} [5] = ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής III του δείγματος μάρτυρα [5] που λαμβάνεται στο σημείο 8.5.3.

9.1.4. Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι υφίσταται γραμμική σχέση μεταξύ του σχετικού χρόνου κατακράτησης της κορυφής III, δηλαδή RRT_{III} [E], και του ποσοστού ορού γάλακτος σε σκόνη που προστίθεται μέχρι ορίου 10 %

— ο RRT_{III} [E] είναι < 1,000, όταν η περιεκτικότητα σε ορό γάλακτος είναι > 5 %,

— ο RRT_{III} [E] είναι ≥ 1,000, όταν η περιεκτικότητα σε ορό γάλακτος είναι ≤ 5 %.

Η επιτρεπόμενη αβεβαιότητα για τις τιμές του RRT_{III} είναι ± 0,002. Κατά κανόνα, η τιμή του RRT_{III} [0] αποκλίνει λίγο από το 1,034. Ανάλογα με τις συνθήκες των στηλών, η τιμή αυτή μπορεί να προσεγγίσει το 1,000, αλλά πρέπει πάντοτε να είναι μεγαλύτερη από αυτό.

9.2. Υπολογισμός της εκατοστιαίας αναλογίας σκόνης γλυκού ορού γάλακτος στο δείγμα:

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

όπου:

W = η κατά μάζα (m/m) εκατοστιαία αναλογία γλυκού ορού γάλακτος στο δείγμα (E)

S_{III} [E] = το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III του δείγματος δοκιμής [E], που λαμβάνεται στο σημείο 9.1.2

1,3 = αντιπροσωπεύει το σχετικό μέσο εμβαδόν της κορυφής III, εκφραζόμενο σε γραμμάρια γλυκού ορού γάλακτος ανά 100 g, όπως προσδιορίζεται σε ανόθευτο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη ποικίλης προέλευσης. Η τιμή αυτή έχει προκύψει πειραματικά.

S_{III} [0] = αντιπροσωπεύει το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, που ισούται με $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Οι τιμές αυτές λαμβάνονται στα σημεία 9.1.1 και 8.5.3, αντίστοιχα.

(S_{III} [0] – 0,9) = αντιπροσωπεύει τη διόρθωση του σχετικού μέσου εμβαδού 1,3, σε περίπτωση που το S_{III} [0] δεν ισούται με 0,9. Η πειραματική τιμή του σχετικού μέσου εμβαδού της κορυφής III του δείγματος μάρτυρα[0] είναι 0,9.

9.3. **Ορθότητα της διαδικασίας**

9.3.1. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα ή με μικρή χρονική διαφορά, σε πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από τον ίδιο αναλυτή με τον ίδιο εξοπλισμό, δεν υπερβαίνει το 0,2 % m/m.

9.3.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ δύο μεμονωμένων και ανεξάρτητων αποτελεσμάτων από δύο διαφορετικά εργαστήρια, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, δεν υπερβαίνει το 0,4 % m/m.

9.4. **Ερμηνεία**

9.4.1. Τεκμαίρεται η απουσία ορού γάλακτος εάν το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, S_{III} [E], εκφραζόμενο σε γραμμάρια γλυκού ορού γάλακτος ανά 100 γραμμάρια προϊόντος, είναι ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), όπου

2,0 = η μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή για το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, λαμβάνοντας υπόψη το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, δηλαδή 1,3, την αβεβαιότητα που οφείλεται σε διακυμάνσεις της σύστασης της σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (9.3.2)

(S_{III} [0] – 0,9) = η διόρθωση σε περίπτωση που το εμβαδόν S_{III} [0] διαφέρει από την τιμή 0,9 (βλέπε σημείο 9.2)

9.4.2. Εάν το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, S_{III} [E], είναι > 2,0 + (S_{III} [0] — 0,9) και το σχετικό εμβαδόν της κορυφής II, S_{II} [E], είναι ≤ 160, προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε γλυκό ορό γάλακτος σύμφωνα με το σημείο 9.2.

▼B

9.4.3. Εάν το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, S_{III} [E], είναι > 2,0 + (S_{III} [0] — 0,9) και το σχετικό εμβαδόν της κορυφής II, S_{II} [E], είναι ≤ 160, προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες (P %) και, στη συνέχεια, εξετάζονται οι γραφικές παραστάσεις 1 και 2.

9.4.3.1. Τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση δειγμάτων ανόθευτου αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη με υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες συγκεντρώνονται στις γραφικές παραστάσεις 1 και 2.

Η συνεχής γραμμή αντιπροσωπεύει τη γραμμική παλινδρόμηση, της οποίας οι συντελεστές υπολογίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Η διακεκομμένη ευθεία γραμμή καθορίζει το ανώτατο όριο του σχετικού εμβαδού της κορυφής III, με πιθανότητα μη υπέρβασης στο 90 % των περιπτώσεων.

Οι εξισώσεις των διακεκομμένων ευθειών που εμφαίνονται στις γραφικές παραστάσεις 1 και 2 είναι:

$S_{III} = 0{,}376\ P\ \% - 10{,}7$	(γραφική παράσταση 1)
$S_{III} = 0{,}0123\ S_{II}\ [E] + 0{,}93$	(γραφική παράσταση 2)

όπου:

S_{III} = είναι το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, υπολογιζόμενο είτε σύμφωνα με την περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες, είτε σύμφωνα με το σχετικό εμβαδόν της κορυφής II, S_{II} [E]

P % = είναι η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες, εκφραζόμενη σε εκατοστιαία αναλογία κατά βάρος

(S_{II} [E] = είναι το σχετικό εμβαδόν της κορυφής II του δείγματος, που υπολογίζεται στο σημείο 9.1.2.

Οι εξισώσεις αυτές ισοδυναμούν με την αριθμητική τιμή 1,3 που αναφέρεται στο σημείο 9.2.

Η απόκλιση (T_1 και T_2) μεταξύ του ευρεθέντος σχετικού εμβαδού S_{III} [E] και του σχετικού εμβαδού S_{III} δίδεται από τις ακόλουθες σχέσεις: $T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\ \% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)] T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$

9.4.3.2.

Εάν T_1 ή/και T_2 είναι ίση με το μηδέν ή κατώτερη, δεν είναι δυνατόν να διαπιστωθεί η παρουσία γλυκού ορού γάλακτος.

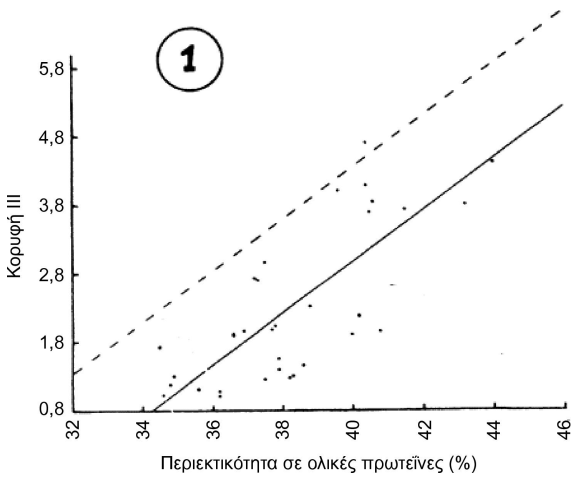
Εάν T_1 και T_2 είναι μεγαλύτερες του μηδενός, συμπεραίνεται παρουσία γλυκού ορού γάλακτος.

Η περιεκτικότητα σε γλυκό ορό γάλακτος υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο: $W = T_2 + 0{,}91$

όπου:

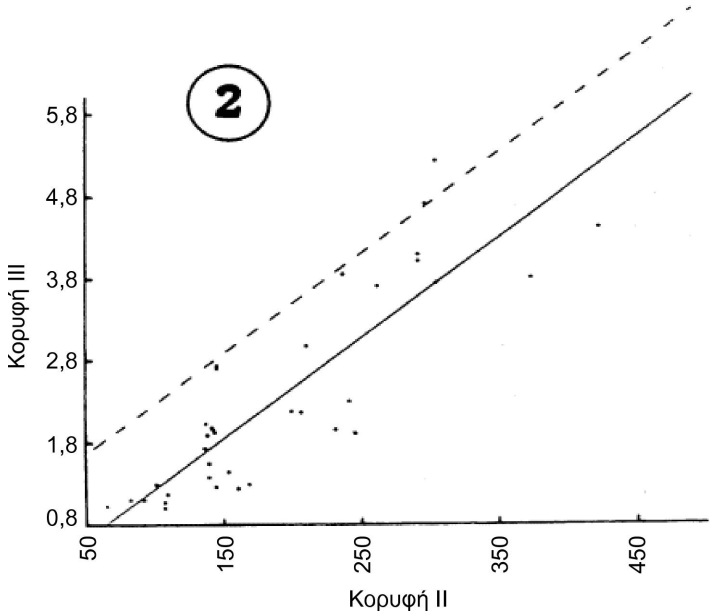
0,91 είναι η κάθετη απόσταση μεταξύ της συνεχούς και της διακεκομμένης ευθείας γραμμής.

Αποκορυφωμενο γαλα σε σκονη



▼B

Αποκορυφωμενο γαλα σε σκονη



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIII

(Άρθρο 9)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (ΤΥΡΟΓΑΛΑ ΠΥΤΙΑΣ) ΣΤΟ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ (ΕΚ) Αριθ. 2799/1999

1. ΣΚΟΠΟΣ: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ:

   α) αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, όπως ορίζεται στο άρθρο 2 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2799/1999 και

   β) μείγματα, όπως ορίζονται στο άρθρο 4 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2799/1999.

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΡΟΤΥΠΟ ISO 707

3. ΟΡΙΣΜΟΣ

   Η περιεκτικότητα σε στερεό υπόλειμμα γλυκού ορού γάλακτος ορίζεται ως η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία που προσδιορίζεται μέσω της περιεκτικότητας σε καζεϊνομακροπεπτίδια η οποία προκύπτει από την περιγραφόμενη διαδικασία.

4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

   Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε καζεϊνομακροπεπτίδια σύμφωνα με το παράρτημα XII. Τα δείγματα που δίδουν θετικά αποτελέσματα υποβάλλονται σε ανάλυση για την ανίχνευση καζεϊνομακροπεπτιδίου Α με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανεστραμμένης φάσης. Εναλλακτικά, τα δείγματα υποβάλλονται κατευθείαν σε ανάλυση με τη διαδικασία HPLC ανεστραμμένης φάσης. Το αποτέλεσμα αξιολογείται με σύγκριση με πρότυπα δείγματα, τα οποία συνίστανται από αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη με ή χωρίς προσθήκη γνωστής εκατοστιαίας αναλογίας σκόνης ορού γάλακτος. Τα αποτελέσματα που υπερβαίνουν το 1 % (m/m) αποδεικνύουν την παρουσία στερεού υπολείμματος γλυκού ορού γάλακτος.

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

   Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας. Το ακετονιτρίλιο πρέπει να είναι καθαρότητας φασματοσκοπικής ή HPLC.

   Τα αντιδραστήρια που χρειάζονται για τη διαδικασία περιγράφονται στο παράρτημα XII του παρόντος κανονισμού.

   Αντιδραστήρια για την HPLC ανεστραμμένης φάσης

5.1. **Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος**

   Διαλύονται 240 g τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COOH) σε νερό και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml. Το διάλυμα πρέπει να είναι διαυγές και άχρωμο.

5.2. **Διαλύματα έκλουσης Α και Β**

   Διάλυμα έκλουσης Α: σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml φέρονται 150 ml ακετονιτριλίου (CH_3CN), 20 ml ισοπροπανόλης ($CH_3CHOH-CH_3$) και 1,00 ml τριφθοροξικού οξέος (CF_3COOH ή TFA) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό.

   Διάλυμα έκλουσης Β: σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml φέρονται 550 ml ακετονιτριλίου, 20 ml ισοπροπανόλης και 1,00 ml TFA και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό. Πριν χρησιμοποιηθεί, το διάλυμα έκλουσης διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm.

5.3. **Διατήρηση της στήλης**

   Μετά τις αναλύσεις η στήλη εκπλύνεται με το διάλυμα έκλουσης Β (με βαθμίδωση) και, στη συνέχεια, με ακετονιτρίλιο (με βαθμίδωση επί 30 λεπτά). Η στήλη φυλάσσεται σε ακετονιτρίλιο.

5.4. **Πρότυπα δείγματα**

5.4.1. Αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη το οποίο ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις για δημόσια αποθεματοποίηση (δηλαδή [0])

▼B

5.4.2. Το ίδιο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, νοθευμένο σε αναλογία 5 % (m/m) με σκόνη γλυκού ορού γάλακτος πρότυπης σύστασης (δηλαδή [5])

5.4.3. Το ίδιο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, νοθευμένο σε αναλογία 50 % (m/m) με σκόνη γλυκού ορού γάλακτος πρότυπης σύστασης (δηλαδή [50]) ([1])

6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για τη διαδικασία περιγράφεται στο παράρτημα XII του παρόντος κανονισμού.

6.1. Αναλυτικός ζυγός

6.2. Προαιρετικά, φυγόκεντρος ικανή να επιτυγχάνει φυγόκεντρο δύναμη 2 200 g, εφοδιασμένη με πωματισμένους σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml περίπου

6.3. Μηχανικό τάρακτρο

6.4. Μαγνητικός αναδευτήρας

6.5. Γυάλινες χοάνες, διαμέτρου περίπου 7 cm

6.6. Χάρτινοι ηθμοί μέσης διηθητικής ικανότητας, διαμέτρου περίπου 12,5 cm

6.7. Γυάλινη συσκευή διήθησης, εφοδιασμένη με διηθητική μεμβράνη διαμέτρου πόρων 0,45 μm

6.8. Βαθμολογημένα σιφώνια παροχής 10 ml (ISO 648, κατηγορίας A ή ISO/R 835) ή σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 10,0 ml σε δύο λεπτά

6.9. Σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 20,0 ml νερού θερμοκρασίας περίπου 50 °C

6.10. Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 25 ± 0,5 °C

6.11. Εξοπλισμός HPLC, ο οποίος περιλαμβάνει:

6.11.1. Σύστημα αντλίας διπλής βαθμίδωσης

6.11.2. Σύστημα έγχυσης, χειροκίνητο ή αυτόματο, χωρητικότητας 100 μl

6.11.3. Στήλη Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρος 0,46 cm) ή ισοδύναμη στήλη ανεστραμμένης φάσης από διοξείδιο του πυριτίου με ευρείς πόρους

6.11.4. Θερμοστατούμενο κλίβανο στήλης, ρυθμισμένο στους 35 ± 1 °C

6.11.5. Ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος, με δυνατότητα μετρήσεων στα 210 nm (εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερο μήκος κύματος, με ανώτατο όριο τα 220 nm), ευαισθησίας 0,02 AU

6.11.6. Ολοκληρωτή με δυνατότητα ρύθμισης της ολοκλήρωσης στην κοινή γραμμή βάσης ή μεταξύ των «κοιλάδων» του χρωματογραφήματος

Σημείωση: Είναι δυνατή η λειτουργία της στήλης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό τον όρο ότι η θερμοκρασία αυτή δεν παρουσιάζει διακυμάνσεις μεγαλύτερες του 1 °C, ειδάλλως ο χρόνος κατακράτησης του CMP_A παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα.

7. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

7.1. Τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται με τη διαδικασία που καθορίζεται στο διεθνές πρότυπο ISO 707. Τα κράτη μέλη μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιούν άλλη μέθοδο δειγματοληψίας, εφόσον αυτή είναι σύμφωνη με τις αρχές του προαναφερόμενου προτύπου.

7.2. Το δείγμα φυλάσσεται σε συνθήκες που αποκλείουν τη φθορά ή τη μεταβολή της σύστασης.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

([1]) Γλυκός ορός γάλακτος σε σκόνη, πρότυπης σύστασης, καθώς και νοθευμένο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη διατίθενται από την εταιρεία NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA Ede. Ωστόσο, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σκόνες που παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα με τις σκόνες NIZO.

▼B

8.1. **Προετοιμασία του δείγματος δοκιμής**

Η σκόνη γάλακτος μεταφέρεται σε δοχείο χωρητικότητας περίπου διπλάσιας του όγκου της σκόνης, εφοδιασμένο με αεροστεγές πώμα. Το δοχείο πωματίζεται αμέσως και η σκόνη γάλακτος αναμειγνύεται πλήρως με επανειλημμένες αναστροφές του δοχείου.

8.2. **Τμήμα δείγματος δοκιμής**

Σε σωλήνα φυγοκέντρου (6.2) ή κατάλληλη φιάλη με πώμα (50 ml) ζυγίζονται 2,00 ±0,001 g δείγματος δοκιμής.

Σημείωση: Στην περίπτωση των μειγμάτων, ζυγίζεται ποσότητα δείγματος δοκιμής τόση ώστε το τμήμα δείγματος μετά την απολίπανση να αντιστοιχεί σε 2,00 g.

8.3. **Απομάκρυνση του λίπους και των πρωτεϊνών**

8.3.1. Στο τμήμα δείγματος προστίθενται 20,0 ml θερμού νερού (50 °C). Διαλύεται η σκόνη με ανακίνηση επί πέντε λεπτά, ή 30 λεπτά στην περίπτωση του όξινου βουτυρογάλακτος, σε μηχανικό τάρακτρο (6.3). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο (6.10) και αφήνεται να αποκτήσει ισορροπία στους 25 °C.

8.3.2. Προστίθενται, σε διάστημα δύο λεπτών με σταθερό ρυθμό, 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξικού οξέος (5.1) θερμοκρασίας περίπου 25 °C υπό ζωηρή ανάδευση στον μαγνητικό αναδευτήρα (6.4). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο (6.10) όπου παραμένει επί 60 λεπτά.

8.3.3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (6.2) στα 2 200 g επί 10 λεπτά ή διήθηση μέσω χάρτινου ηθμού (6.6), ενώ απορρίπτονται τα πρώτα 5 ml του διηθήματος.

8.4. **Χρωματογραφικός προσδιορισμός**

8.4.1. Εκτελείται ανάλυση HPLC όπως περιγράφεται στο παράρτημα XII. Εάν προκύψει αρνητικό αποτέλεσμα, το δείγμα που αναλύθηκε δεν περιέχει στερεό υπόλειμμα γλυκού ορού γάλακτος σε ανιχνεύσιμες ποσότητες. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος πρέπει να εφαρμοστεί η διαδικασία HPLC ανεστραμμένης φάσης που περιγράφεται κατωτέρω. Εναλλακτικά, μπορεί να εφαρμοστεί κατευθείαν η μέθοδος HPLC ανεστραμμένης φάσης. Η παρουσία σκόνης όξινου βουτυρογάλακτος μπορεί να οδηγήσει σε ψευδοθετικά αποτελέσματα κατά τη χρήση της μεθόδου του παραρτήματος XII. Η μέθοδος HPLC ανεστραμμένης φάσης αποκλείει αυτό το ενδεχόμενο.

8.4.2. Πριν από την ανάλυση με HPLC ανεστραμμένης φάσης, πρέπει να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες βαθμίδωσης. Για συστήματα βαθμίδωσης με νεκρό όγκο περίπου 6 ml (ο όγκος από το σημείο όπου συναντώνται οι διαλύτες μέχρι και τον όγκο του βρόχου του συστήματος έγχυσης), ο βέλτιστος χρόνος κατακράτησης είναι 26 ±2 λεπτά για το CMP_A. Στην περίπτωση των συστημάτων βαθμίδωσης με μικρότερο νεκρό όγκο (π.χ. 2 ml) πρέπει να χρησιμοποιούνται ως βέλτιστος χρόνος κατακράτησης τα 22 λεπτά.

Λαμβάνονται διαλύματα των πρότυπων δειγμάτων (5.4) με και χωρίς γλυκό ορό γάλακτος σε αναλογία 50 %.

Εισάγονται 100 μl υπερκειμένου ή διηθήματος (8.3.3) στη συσκευή HPLC, η οποία λειτουργεί στις συνθήκες διερευνητικής βαθμίδωσης που εμφαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Συνθήκες διερευνητικής βαθμίδωσης για τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφίας

Χρόνος (min)	Ροή (ml/min)	% A	% B	Καμπύλη
Έναρξη	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	γραμμική
32	1,0	10	90	γραμμική
37	1,0	10	90	γραμμική
42	1,0	90	10	γραμμική

Με σύγκριση των δύο χρωματογραφημάτων πρέπει να φαίνεται η θέση της κορυφής του CMP_A.

▼B

Με τη βοήθεια του επόμενου τύπου είναι δυνατόν να υπολογιστεί η αρχική σύσταση του διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί για την κανονική βαθμίδωση (βλέπε 8.4.3) % B = 10 – 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 1,11

όπου:

RT_{cmpA}: ο χρόνος κατακράτησης του CMP_A στη διερευνητική βαθμίδωση

10: το αρχικό % B της διερευνητικής βαθμίδωσης

2,5: το % B στο μέσο της διαδρομής μείον το % B στην έναρξη της κανονικής βαθμίδωσης

13,5: ο χρόνος στο μέσο της διαδρομής στη διερευνητική βαθμίδωση

26: απαιτούμενος χρόνος κατακράτησης για το CMP_A

6: λόγος των κλίσεων της διερευνητικής και της κανονικής βαθμίδωσης

30: το % B στην έναρξη μείον το % B στα 27 λεπτά της διερευνητικής βαθμίδωσης

27: χρόνος διαδρομής της διερευνητικής βαθμίδωσης.

8.4.3. Λήψη διαλυμάτων των δειγμάτων δοκιμής

Εισάγονται 100 μl υπερκειμένου ή διηθήματος (8.3.3), επακριβώς μετρημένα, στη συσκευή HPLC, η οποία λειτουργεί με ταχύτητα ροής 1,0 ml διαλύματος έκλουσης (5.2) ανά λεπτό.

Η σύσταση του διαλύματος έκλουσης στην αρχή της ανάλυσης προκύπτει από το σημείο 8.4.2 και προσεγγίζει συνήθως τον λόγο A:B = 76:24 (5.2). Αμέσως μετά την έγχυση αρχίζει μια γραμμική βαθμίδωση που δίδει μετά από 27 λεπτά ποσοστό του B μεγαλύτερο κατά 5 %. Στη συνέχεια αρχίζει μια γραμμική βαθμίδωση που οδηγεί σε σύσταση του διαλύματος έκλουσης 90 % B σε διάστημα 5 λεπτών. Η σύσταση αυτή διατηρείται επί 5 λεπτά και, στη συνέχεια, μεταβάλλεται με γραμμική βαθμίδωση επί 5 λεπτά για να επανέλθει στην αρχική. Ανάλογα με τον εσωτερικό όγκο του συστήματος αντλίας, η επόμενη έγχυση μπορεί να γίνει 15 λεπτά αφότου επιτευχθούν οι αρχικές συνθήκες.

Σημείωση 1: Ο χρόνος κατακράτησης του CMP_A πρέπει να είναι 26 ±2 λεπτά και μπορεί να επιτευχθεί με τη μεταβολή των αρχικών και των τελικών συνθηκών της πρώτης βαθμίδωσης. Ωστόσο η διαφορά του % B για τις αρχικές και τις τελικές συνθήκες της πρώτης βαθμίδωσης πρέπει να παραμένει 5 %.

Σημείωση 2: Τα διαλύματα έκλουσης πρέπει να απαερώνονται επαρκώς και επίσης να διατηρούνται απαερωμένα. Αυτό είναι απαραίτητο για την καλή λειτουργία του βαθμιδωτού συστήματος αντλίας. Η τυπική απόκλιση για τον χρόνο κατακράτησης που αντιστοιχεί στην κορυφή του CMP_A πρέπει να είναι μικρότερη από 0,1 λεπτό (n = 10).

Σημείωση 3: Ανά πέντε δείγματα πρέπει να εισάγεται το δείγμα αναφοράς (5) και να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό νέου συντελεστή απόκρισης R (9.1.1).

8.4.4. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης του δείγματος δοκιμής [E] λαμβάνονται υπό μορφή χρωματογραφήματος, στο οποίο η κορυφή του CMP_A ταυτοποιείται από τον οικείο χρόνο κατακράτησης των 26 λεπτών περίπου.

Ο ολοκληρωτής (6.11.6) υπολογίζει αυτόματα το ύψος H της κορυφής του CMP_A. Σε κάθε χρωματογράφημα πρέπει να ελέγχεται η θέση της γραμμής βάσης. Εάν η γραμμή βάσης δεν βρίσκεται στη σωστή θέση, πρέπει να επαναλαμβάνεται η ανάλυση ή η ολοκλήρωση.

▼B

Σημείωση: Εάν η κορυφή του CMP_A είναι επαρκώς διαχωρισμένη από τις υπόλοιπες κορυφές, χρησιμοποιείται η γραμμή βάσης μεταξύ των «κοιλάδων». Σε αντίθετη περίπτωση, φέρονται κάθετοι σε κοινή γραμμή βάσης, η οποία πρέπει να αρχίζει από ένα σημείο κοντά στην κορυφή του CMP_A (συνεπώς, όχι από το σημείο t = 0 λεπτά!). Χρησιμοποιείται ο ίδιος τύπος ολοκλήρωσης για το πρότυπο δείγμα και για τα δείγματα δοκιμής και, στην περίπτωση της κοινής γραμμής βάσης, ελέγχεται η σταθερότητά της για τα δείγματα δοκιμής και το πρότυπο δείγμα.

Πριν από την ποσοτική ερμηνεία, είναι απαραίτητο να εξετάζεται η μορφή κάθε χρωματογραφήματος για τον εντοπισμό τυχόν ανωμαλιών που οφείλονται είτε σε ελαττωματική λειτουργία της συσκευής ή της στήλης είτε στην προέλευση και το είδος του αναλυθέντος δείγματος. Σε περίπτωση αμφιβολίας επαναλαμβάνεται η ανάλυση.

8.5. **Βαθμονόμηση**

8.5.1. Εφαρμόζεται κατά γράμμα στα πρότυπα δείγματα (5.4.1 έως 5.4.2) η διαδικασία που περιγράφεται στα σημεία 8.2 έως 8.4.4. Χρησιμοποιούνται διαλύματα που έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα, δεδομένου ότι τα CMP αποικοδομούνται σε περιβάλλον τριχλωροξικού οξέος 8 % σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στους 4 °C το διάλυμα παραμένει σταθερό επί 24 ώρες. Στην περίπτωση μακρών σειρών αναλύσεων είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται ένας ψυχόμενος δίσκος δειγμάτων στο αυτόματο σύστημα έγχυσης.

Σημείωση: Το σημείο 8.4.2 μπορεί να παραλειφθεί εάν το % Β στις αρχικές συνθήκες είναι γνωστό από προηγούμενες αναλύσεις.

Το χρωματογράφημα του δείγματος αναφοράς [5] πρέπει να είναι ανάλογο με το σχήμα 1. Στο σχήμα αυτό, πριν από την κορυφή του CMP_A εμφανίζονται δύο μικρές κορυφές. Είναι απαραίτητο να επιτυγχάνεται συγκρίσιμος διαχωρισμός.

8.5.2. Πριν από τον χρωματογραφικό προσδιορισμό στα δείγματα, εισάγονται 100 μl του προτύπου δείγματος χωρίς γλυκό ορό γάλακτος [0] (5.4.1).

Το χρωματογράφημα δεν πρέπει να παρουσιάζει κορυφή στον χρόνο κατακράτησης που αντιστοιχεί στην κορυφή του CMP_A.

8.5.3. Προσδιορίζονται οι συντελεστές απόκρισης, R, με την εισαγωγή του ίδιου όγκου διηθήματος (8.5.1) με αυτόν των δειγμάτων.

9. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

9.1. **Μέθοδος υπολογισμού και τύποι**

9.1.1. *Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης R:*

Κορυφή CMP_A: R = W/H

όπου:

R = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής του CMP_A

H = το ύψος της κορυφής του CMP_A

W = η ποσότητα ορού γάλακτος που περιέχεται στο πρότυπο δείγμα [5].

9.2. **Υπολογισμός της εκατοστιαίας αναλογίας σκόνης γλυκού ορού γάλακτος στο δείγμα:**

$W(E) = R \times H(E)$

όπου:

W(E) = η κατά μάζα (m/m) εκατοστιαία αναλογία γλυκού ορού γάλακτος στο δείγμα (E)

R = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής του CMP_A (9.1.1)

H(E) = το ύψος της κορυφής του CMP_A του δείγματος (E).

Εάν η τιμή W(E) υπερβαίνει το 1 % και η διαφορά μεταξύ του χρόνου κατακράτησης και του αντίστοιχου χρόνου του πρότυπου δείγματος [5] είναι μικρότερη από 0,2 λεπτά, το δείγμα περιέχει στερεό υπόλειμμα γλυκού ορού γάλακτος.

9.3. **Ορθότητα της διαδικασίας**

9.3.1. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα ή με μικρή χρονική διαφορά, σε πανομοιότυπο υλικό δοκιμής, από τον ίδιο αναλυτή με τον ίδιο εξοπλισμό δεν υπερβαίνει το 0,2 % m/m.

▼B

9.3.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

Δεν έχει προσδιοριστεί.

9.3.3. *Γραμμικότητα*

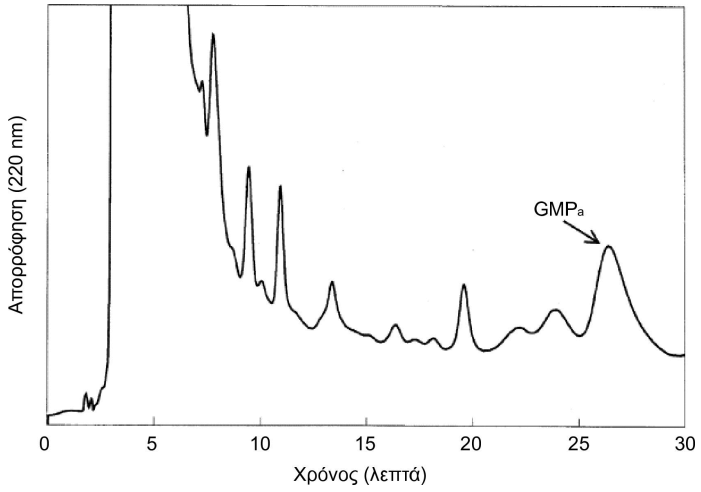
Στο πεδίο τιμών εκατοστιαίας αναλογίας γλυκού ορού γάλακτος 0 έως 16 % πρέπει να προκύπτει γραμμική σχέση με συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο του 0,99.

9.4. **Ερμηνεία**

Το όριο 1 % καθορίζεται σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος XIX σημεία 9.2 και 9.4.1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 214/2001, που περιλαμβάνει την αβεβαιότητα λόγω αναπαραγωγιμότητας.

Πίνακας 1

Ni –4,6 πρότυπο δείγμα



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIV

(Άρθρο 10)

ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ: ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΣΕΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗΣ

Μέθοδος: HPLC ανεστραμμένης φάσης

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Στη μέθοδο περιγράφεται διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) σε αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη (ΑΓΣ)· η μέθοδος είναι κατάλληλη για την ανίχνευση στερεού υπολείμματος βουτυρογάλακτος στο ΑΓΣ.

2. ΟΡΙΣΜΟΣ

Περιεκτικότητα σε PS + PE: το κλάσμα μάζας ουσίας το οποίο προσδιορίζεται με τη διαδικασία που ορίζεται στο παρόν παράρτημα. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε χιλιοστόγραμμα διπαλμιτικής φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PEDP) ανά 100 g σκόνης.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εκχύλιση αμινοφωσφολιπιδίων από ανασυσταθείσα σκόνη γάλακτος με μεθανόλη. Προσδιορισμός των PS και PE ως παραγώγων που σχηματίζονται με ο-φθαλοδιαλδεΰδη (OPA), με HPLC ανεστραμμένης φάσης και ανίχνευση φθορισμού. Ποσοτικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας του δείγματος δοκιμής σε PS και PE με σύγκριση με πρότυπο δείγμα που περιέχει γνωστή ποσότητα PEDP.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας. Το νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας, εκτός αντίθετων διατάξεων.

4.1. **Πρότυπο υλικό: PEDP, καθαρότητας τουλάχιστον 99 %**

Σημείωση: Το πρότυπο υλικό πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία – 18 °C.

4.2. **Αντιδραστήρια για την προετοιμασία του πρότυπου δείγματος και του δείγματος δοκιμής**

4.2.1. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC

4.2.2. Χλωροφόρμιο καθαρότητας HPLC

4.2.3. Υδροχλωρική θρυπταμίνη

4.3. **Αντιδραστήρια για σχηματισμό παραγώγων της ο-φθαλοδιαλδεΰδης**

4.3.1. Υδροξείδιο του νατρίου, υδατικό διάλυμα 12 M

4.3.2. Βορικό οξύ, υδατικό διάλυμα 0,4 M, του οποίου το pH ρυθμίζεται στην τιμή 10,0 με υδροξείδιο του νατρίου (4.3.1)

4.3.3. 2-μερκαπτοαιθανόλη

4.3.4. ο-φθαλοδιαλδεΰδη (OPA)

4.4. **Διαλύτες έκλουσης HPLC**

4.4.1. Οι διαλύτες έκλουσης πρέπει να παρασκευάζονται με αντιδραστήρια καθαρότητας HPLC.

4.4.2. Νερό καθαρότητας HPLC

4.4.3. Μεθανόλη ελεγμένης φθορισμομετρικής καθαρότητας

4.4.4. Τετραϋδροφουράνιο

4.4.5. Δισόξινο φωσφορικό νάτριο

4.4.6. Οξικό νάτριο

4.4.7. Οξικό οξύ

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

5.1. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης 1 mg και αναγνωσιμότητα 0,1 mg

▼B

5.2. Ποτήρια ζέσεως των 25 και 100 ml

5.3. Σιφώνια παροχής 1 και 10 ml

5.4. Μαγνητικός αναδευτήρας

5.5. Βαθμολογημένα σιφώνια παροχής 0,2, 0,5 και 5 ml

5.6. Ογκομετρικές φιάλες των 10, 50 και 100 ml

5.7. Σύριγγες των 20 και 100 μl

5.8. Λουτρό υπερήχων

5.9. Φυγόκεντρος που λειτουργεί στα 27 000 × g

5.10. Γυάλινα φιαλίδια χωρητικότητας περίπου 5 ml

5.11. Ογκομετρικός κύλινδρος των 25 ml

5.12. Πεχάμετρο με ακρίβεια 0,1 μονάδων pH

5.13. Εξοπλισμός HPLC

5.13.1. Βαθμιδωτό σύστημα αντλίας με δυνατότητα παροχής 1,0 ml/min υπό πίεση 200 bar

5.13.2. Αυτόματος δειγματολήπτης με δυνατότητα σχηματισμού παραγώγων

5.13.3. Θερμαντήρας στήλης, ικανός να διατηρεί τη θερμοκρασία της στους 30 °C ± 1 °C

5.13.4. Ανιχνευτής φθορισμού με δυνατότητα λειτουργίας σε μήκος κύματος διέγερσης 330 nm και μήκος κύματος εκπομπής 440 nm

5.13.5. Ολοκληρωτής ή λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων με δυνατότητα μέτρησης εμβαδών κορυφών

5.13.6. Στήλη Lichrosphere — 100 (διαστάσεις 250 × 4,6 mm) ή ισοδύναμη στήλη που έχει πληρωθεί με δεκαοκτυλοσιλάνιο (C 18), μεγέθους σωματιδίων 5 μm

6. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η δειγματοληψία πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 707.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

7.1. **Παρασκευή του διαλύματος εσωτερικού προτύπου**

7.1.1. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml (5.6) ζυγίζονται 30,0 ±0,1 mg υδροχλωρικής θρυπταμίνης(4.2.3) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (4.2.1).

7.1.2. Λαμβάνεται με σιφώνιο 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού, φέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (4.2.1), ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση θρυπταμίνης 0,15 mM.

7.2. **Παρασκευή του διαλύματος δείγματος δοκιμής**

7.2.1. Σε ποτήρι ζέσεως των 25 ml (5.2) ζυγίζονται 1,000 ±0,001 g δείγματος ΑΓΣ. Προστίθενται 10 ml απεσταγμένου νερού θερμοκρασίας 40 °C ± 1 °C με σιφώνιο (5.3) και το σύνολο αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα (5.4) επί 30 λεπτά για να διαλυθούν οι σβώλοι.

7.2.2. Μεταγγίζονται με σιφώνιο 0,2 ml (5.5) του ανασυσταθέντος γάλακτος σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6), προστίθενται 100 μl διαλύματος θρυπταμίνης 0,15 mM (7.1) με τη βοήθεια σύριγγας (5.7) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Το σύνολο αναμειγνύεται προσεκτικά με αναστροφή και υποβάλλεται σε κατεργασία με υπερήχους (5.8) επί 15 λεπτά.

7.2.3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (5.9) στα 27 000 × g επί 10 λεπτά και συλλογή του υπερκειμένου σε γυάλινο φιαλίδιο (5.10).

Σημείωση: Το διάλυμα δείγματος δοκιμής πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι την εκτέλεση της ανάλυσης HPLC.

7.3. **Παρασκευή του διαλύματος εξωτερικού προτύπου**

▼B

7.3.1. Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (5.6) ζυγίζονται 55,4 mg PEDP (4.1) και προστίθενται περίπου 25 ml χλωροφορμίου (4.2.2) με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου (5.11). Η φιάλη πωματίζεται, θερμαίνεται στους 50 °C ± 1 °C και το περιεχόμενο αναμειγνύεται προσεκτικά μέχρι να διαλυθεί η PEDP. Η φιάλη ψύχεται στους 20 °C, συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1) και το περιεχόμενο αναμιγνύεται με αναστροφή.

7.3.2. Μεταγγίζεται με σιφώνιο 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml (5.6) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Μεταγγίζεται με σιφώνιο 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6), προστίθενται 100 μl (5.7) διαλύματος θρυπταμίνης 0,15 mM (7.1) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Το σύνολο αναμειγνύεται με αναστροφή.

Σημείωση: Το διάλυμα δείγματος αναφοράς πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι την εκτέλεση της ανάλυσης HPLC.

7.4. **Παρασκευή του αντιδραστηρίου σχηματισμού παραγώγων**

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6) ζυγίζονται 25,0 ±0,1 mg OPA (4.3.4), προστίθενται 0,5 ml (5.5) μεθανόλης (4.2.1) και το σύνολο αναμειγνύεται προσεκτικά για να διαλυθεί η OPA. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με διάλυμα βορικού οξέος (4.3.2) και προστίθενται 20 μl 2-μερκαπτοαιθανόλης (4.3.3) με σύριγγα (5.7).

Σημείωση: Το αντιδραστήριο σχηματισμού παραγώγων πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4 °C σε σκοτεινόχρωμο γυάλινο φιαλίδιο και είναι σταθερό επί μία εβδομάδα.

7.5. **Προσδιορισμός με HPLC**

7.5.1. *Διαλύτες έκλουσης (4.4)*

Διαλύτης Α: Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου 0,3 mM και οξικού νατρίου 3 mM (με pH ρυθμισμένο στην τιμή 6,5 ±0,1 με οξικό οξύ): μεθανόλη: τετραϋδροφουράνιο = 558:440:2 (v/v/v)

Διαλύτης Β: μεθανόλη

7.5.2. *Προτεινόμενη βαθμίδωση της έκλουσης:*

Χρόνος (λεπτά)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)	Ταχύτητα ροής (ml/min)
Έναρξη	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

Σημείωση: Ενδέχεται να απαιτηθεί ελαφρά τροποποίηση της βαθμίδωσης της έκλουσης για να επιτευχθεί η διαχωριστική ικανότητα που εμφαίνεται στο σχήμα 1.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

7.5.3. *Όγκος έγχυσης: 50 μl αντιδραστηρίου σχηματισμού παραγώγων και 50 μl διαλύματος δείγματος*

▼B

7.5.4. *Εξισορρόπηση της στήλης*

Με εκκίνηση του συστήματος σε καθημερινή βάση, εκπλύνεται η στήλη με 100 % διαλύτη Β επί 15 λεπτά, στη συνέχεια ρυθμίζεται σε λόγο A:B = 40:60 και εξισορροπείται σε ταχύτητα ροής 1 ml/min επί 15 λεπτά. Εκτελείται τυφλή μέτρηση με έγχυση μεθανόλης (4.2.1).

Σημείωση: Πριν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, η στήλη εκπλύνεται με μεθανόλη: χλωροφόρμιο = 80:20 (v/v) επί 30 λεπτά.

7.5.5. *Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος δοκιμής σε PS + PE.*

7.5.6. *Η σειρά των χρωματογραφικών αναλύσεων εκτελείται με τήρηση σταθερού χρόνου μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων, ώστε να επιτυγχάνονται σταθεροί χρόνοι κατακράτησης. Ανά 5-10 διαλύματα δείγματος δοκιμής, εισάγεται το διάλυμα εξωτερικού προτύπου (7.3) για τον υπολογισμό του συντελεστή απόκρισης 0*

Σημείωση: Ανά 20-25 μετρήσεις, η στήλη πρέπει να καθαρίζεται με έκπλυση με 100 % διαλύτη Β (7.5.1) επί 30 λεπτά τουλάχιστον.

7.6. **Τρόπος ολοκλήρωσης**

7.6.1. *Κορυφή της PEDP*

Η PEDP εκλούεται ως μία και μόνο κορυφή. Προσδιορίζεται το εμβαδόν της κορυφής με ολοκλήρωση μεταξύ των «κοιλάδων».

7.6.2. *Κορυφή της θρυπταμίνης*

Η θρυπταμίνη εκλούεται ως μία και μόνο κορυφή (σχήμα 1). Προσδιορίζεται το εμβαδόν της κορυφής με ολοκλήρωση μεταξύ των «κοιλάδων».

7.6.3. *Ομάδες κορυφών PS και PE*

Υπό τις περιγραφόμενες συνθήκες (σχήμα 1), η PS εκλούεται ως δύο κύριες, εν μέρει μη διαχωρισμένες κορυφές, των οποίων προηγείται μία ελάσσων κορυφή. Η PE εκλούεται ως τρεις κύριες, εν μέρει μη διαχωρισμένες κορυφές. Προσδιορίζεται το συνολικό εμβαδόν κάθε ομάδας κορυφών με χάραξη της γραμμής βάσης όπως εμφαίνεται στο σχήμα 1.

8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η περιεκτικότητα του δείγματος δοκιμής σε PS και PE υπολογίζεται ως εξής: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

όπου:

C = η περιεκτικότητα του δείγματος δοκιμής σε PS ή PE (mg/100 g σκόνης)

A_1 = το εμβαδόν της κορυφής της PEDP του διαλύματος πρότυπου δείγματος (7.3)

A_2 = το εμβαδόν της κορυφής της PS ή της PE του διαλύματος δείγματος δοκιμής (7.2)

T_1 = το εμβαδόν της κορυφής της θρυπταμίνης του διαλύματος πρότυπου δείγματος (7.3)

T_2 = το εμβαδόν της κορυφής της θρυπταμίνης του διαλύματος δείγματος δοκιμής (7.2)

9. ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σημείωση: Οι τιμές επαναληψιμότητας υπολογίστηκαν σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο IDF ([1]). Το προσωρινό όριο αναπαραγωγιμότητας υπολογίστηκε με τη διαδικασία του παραρτήματος III στοιχείο β).

([1]) International IDF-Standard 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure (Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Χαρακτηριστικά ακρίβειας των αναλυτικών μεθόδων. Συνοπτική περιγραφή διαδικασίας ομαδικής μελέτης).

▼B

9.1. **Επαναληψιμότητα**

Η σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας, η οποία εκφράζει τη μεταβλητότητα των ανεξάρτητων αναλυτικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον ίδιο χειριστή με χρήση των ίδιων οργάνων υπό τις ίδιες συνθήκες, με πανομοιότυπο δείγμα δοκιμής και σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 2 %. Σε περίπτωση δύο προσδιορισμών υπό τις συνθήκες αυτές, η σχετική διαφορά μεταξύ των δύο αποτελεσμάτων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 6 % του αριθμητικού μέσου των αποτελεσμάτων.

9.2. **Αναπαραγωγιμότητα**

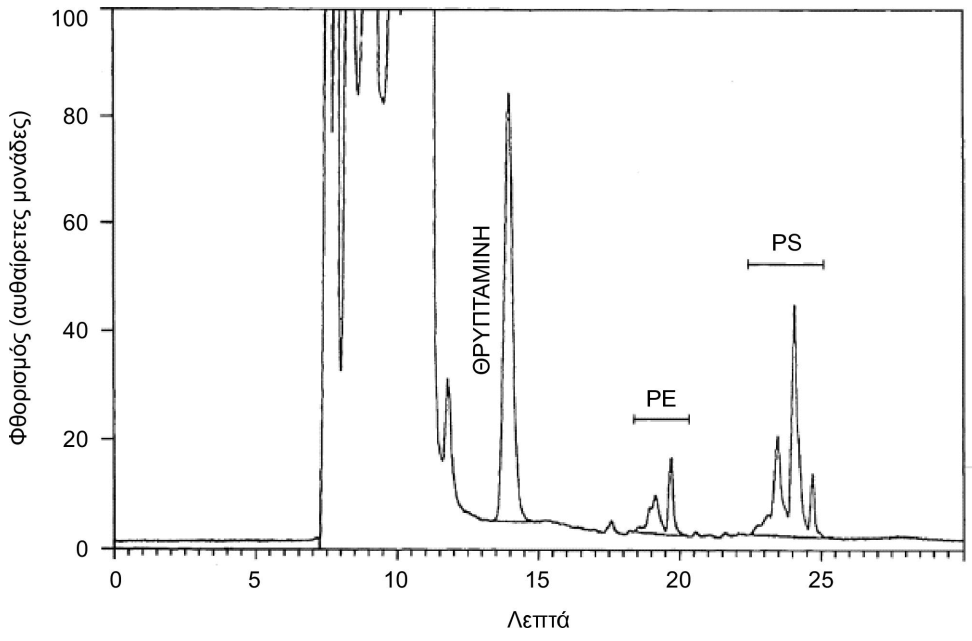
Σε περίπτωση δύο προσδιορισμών από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων, με διαφορετικά όργανα υπό διαφορετικές συνθήκες για την ανάλυση του ιδίου δείγματος δοκιμής, η σχετική διαφορά μεταξύ των δύο αποτελεσμάτων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 11 % του αριθμητικού μέσου των αποτελεσμάτων.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., «Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids.» Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).*

Σχήμα 1

Δείγμα χρωματογραφήματος HPLC των σχηματιζόμενων με OPA παραγώγων φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) σε μεθανολικό εκχύλισμα ανασυσταθείσας σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος. Αναφέρεται ο τρόπος ολοκλήρωσης για τις κορυφές των PS, PE και θρυπταμίνης (εσωτερικό πρότυπο)



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XV

(Άρθρο 11)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΕ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

Χρησιμοποιείται μια δοκιμή διαλογής (screening) με αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης του Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis, στέλεχος ATCC 10149 (πανομοιότυπο με το στέλεχος C953), ως μικροοργανισμού δοκιμής, η οποία είναι αρκετά ευαίσθητη για την ανίχνευση 4 μg βενζυλοπενικιλλίνης ανά kg γάλακτος και 100 μg σουλφαδιμιδίνης ανά kg γάλακτος. Κυκλοφορούν στο εμπόριο συσκευασίες έτοιμων αντιδραστηρίων (kit) δοκιμών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εφόσον έχουν την απαιτούμενη ευαισθησία για βενζυλοπενικιλλίνη και σουλφαδιμιδίνη.

Για τη δοκιμή χρησιμοποιείται ανασυσταθέν αποκορυφωμένο γάλα από σκόνη (1 g σκόνης + 9 ml απεσταγμένου νερού). Η δοκιμή διεξάγεται όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO/TS 26844:2006 Milk and milk products — Determination of antimicrobial residues — Tube diffusion test (IDF — Bulletin αριθ. 258/1991, τμήμα 1 κεφάλαιο 2) ή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit δοκιμών ([1]).

Τα θετικά αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται ως εξής:

1. Η παρουσία β-λακταμών μπορεί να επιβεβαιωθεί με επανάληψη της δοκιμής με την προσθήκη πενικιλλινάσης στο σύστημα δοκιμών ([2]):

   Αρνητικό αποτέλεσμα: η ανασταλτική ουσία είναι αντιβιοτικό β-λακτάμης.

   Το θετικό αποτέλεσμα παραμένει: η ανασταλτική ουσία δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη διαδικασία αυτή, οπότε εφαρμόζεται το σημείο 2.

2. Η παρουσία σουλφοναμιδών μπορεί να επιβεβαιωθεί με επανάληψη της δοκιμής με την προσθήκη π-αμινο-βενζοϊκού οξέος στο σύστημα δοκιμών:

   Αρνητικό αποτέλεσμα: η ανασταλτική ουσία είναι σουλφοναμίδη.

   Το θετικό αποτέλεσμα παραμένει: η ανασταλτική ουσία δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη διαδικασία αυτή, οπότε εφαρμόζεται το σημείο 3.

3. Η παρουσία συνδυασμού β-λακτάμης και σουλφοναμίδης μπορεί να επιβεβαιωθεί με επανάληψη της δοκιμής με την προσθήκη πενικιλλινάσης και π-αμινο-βενζοϊκού οξέος στο σύστημα δοκιμών:

   Αρνητικό αποτέλεσμα: οι ανασταλτικές ουσίες είναι αντιβιοτικό β-λακτάμης και σουλφοναμίδη.

   Θετικό αποτέλεσμα: η ανασταλτική ουσία δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη διαδικασία αυτή.

([1]) Προσοχή: Είναι δυνατόν να προκύψουν ψευδοθετικά αποτελέσματα κατά την ανάλυση αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να επαληθεύεται ότι το χρησιμοποιούμενο σύστημα δοκιμών δεν παρέχει ψευδοθετικά αποτελέσματα.

([2]) Ορισμένες β-λακτάμες είναι λιγότερο ευαίσθητες στις β-λακταμάσες. Για τις περιπτώσεις αυτές συνιστάται συμπληρωματική προκατεργασία του δείγματος (1 ml δείγματος δοκιμής με 0,3 ml συμπυκνωμένης Penase στους 37 °C επί 2 ώρες).

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVI

(Άρθρο 12)

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ, ΜΕ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΑΖΕΪΝΗΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Ποσοτικός προσδιορισμός της σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος σε σύνθετες ζωοτροφές, με ενζυματική θρόμβωση της παρακαζεΐνης.

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Η παρούσα μέθοδος εφαρμόζεται στις σύνθετες ζωοτροφές που περιέχουν αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη σε αναλογία τουλάχιστον 10 %. Η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων βουτυρογάλακτος ή/και ορισμένων μη γαλακτικών πρωτεϊνών μπορεί να έχει παρεμποδιστική δράση.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.1. Διάλυση της καζεΐνης που περιέχεται στη σύνθετη ζωοτροφή με εκχύλιση με διάλυμα κιτρικού νατρίου.

3.2. Ρύθμιση της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου στο επίπεδο που απαιτείται για την καταβύθιση της παρακαζεΐνης με την προσθήκη πυτιάς.

3.3. Η περιεκτικότητα του ιζήματος παρακαζεΐνης σε άζωτο προσδιορίζεται κατά τη μέθοδο Kjeldahl που περιγράφεται στο πρότυπο ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001. Η ποσότητα του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη υπολογίζεται βάσει ελάχιστης περιεκτικότητας σε καζεΐνη 27,5 % (βλέπε σημείο 8.1).

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης καθαρότητας. Εκτός της πυτιάς (4.5), όλα τα αντιδραστήρια και διαλύματα πρέπει να είναι απαλλαγμένα αζωτούχων ουσιών.

4.1. Κιτρικό νάτριο, διένυδρο (διάλυμα 1 % w/v)

4.2. Χλωριούχο ασβέστιο (διάλυμα περίπου 5 M)

Διαλύονται 75g of $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ σε 100 ml απεσταγμένου νερού με ανακίνηση (προσοχή στην εξώθερμη αντίδραση). Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία όλη τη νύκτα και στη συνέχεια διηθείται· φυλάσσεται στο ψυγείο.

4.3. Υδροξείδιο του νατρίου 0,1 N

4.4. Υδροχλωρικό οξύ 0,1 N

4.5. Υγρή πυτιά μόσχου (ισχύς περίπου 100 IMCU/ml σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11815/IDF 157)· φυλάσσεται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4-6 °C.

4.6. Αντιδραστήρια για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αζώτου κατά τη μέθοδο Kjeldahl που περιγράφεται στο πρότυπο ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός που περιλαμβάνει:

5.1. Γουδί ή ομογενοποιητή

5.2. Αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια ζύγισης 1 mg και αναγνωσιμότητα 0,1 mg

5.3. Επιτραπέζια φυγόκεντρο (500 g ή 2 000-3 000 rpm,) εφοδιασμένη με σωλήνες των 50 ml και 2 000 g

5.4. Μαγνητικό αναδευτήρα με ράβδους (10-15 mm)

5.5. Ποτήρια ζέσεως των 150-200 ml

5.6. Φιάλες των 250 ml και 500 ml

▼B

5.7. Γυάλινες χοάνες διαμέτρου 60 έως 80 mm

5.8. Ηθμούς ταχείας διήθησης, χωρίς τέφρα, διαμέτρου 150 mm (Whatman N° 41 ή ισοδύναμους)

5.9. Σιφώνια διαφόρων ονομαστικών όγκων

5.10. Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 37 °C ± 1° C

5.11. Πεχάμετρο με ακρίβεια 0,1 μονάδων pH

5.12. Θερμόμετρα με ακρίβεια 1 °C

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1. **Προετοιμασία του δείγματος**

Αλέθονται στο γουδί ή σε συσκευή ομογενοποίησης 10-20 g δείγματος, ώστε να ληφθεί ομοιογενές μείγμα.

6.2. **Διάλυση της σκόνης γάλακτος και διαχωρισμός του αδιάλυτου υπολείμματος**

6.2.1. Ζυγίζονται απευθείας σε σωλήνα φυγοκέντρου των 50 ml 1,000 ±0,002 g πλήρως ομογενοποιημένης σύνθετης ζωοτροφής (6.1). Προστίθενται 30 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου (4.1) που έχει προθερμανθεί στους 45 ± 2 °C και το σύνολο αναμιγνύεται με τη βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα τουλάχιστον επί 5 λεπτά ή με ζωηρή ανακίνηση με το χέρι.

6.2.2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση επί 10 λεπτά στα 500 g (2 000-3 000 rpm) και απόχυση της διαυγούς υπερκείμενης υδατικής στιβάδας σε ποτήρι ζέσεως των 150-200 ml. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην συμπαρασυρθεί κατά τη απόχυση χαλαρό υλικό από τον πυθμένα.

6.2.3. Λαμβάνονται με την ίδια διαδικασία δύο ακόμη εκχυλίσματα του υπολείμματος, τα οποία προστίθενται στο πρώτο.

6.2.4. Σε περίπτωση αποχωρισμού ελαιώδους στιβάδας στην επιφάνεια, το εκχύλισμα ψύχεται στο ψυγείο μέχρι να στερεοποιηθεί το λίπος, το οποίο ακολούθως αφαιρείται με σπάτουλα.

6.3. **Θρόμβωση της καζεΐνης με τα ένζυμα της πυτιάς**

6.3.1. Στο συνολικό υδατικό εκχύλισμα (περίπου 100 ml) προστίθενται στάγδην, υπό συνεχή ανάδευση, 2 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (4.2). Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6,4-6,5 με διάλυμα NaOH (4.3) ή HCI (4.4). Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται στο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C ± 1 °C επί 15 ως 20 λεπτά για να αποκατασταθεί η ισορροπία των αλάτων, η οποία διαπιστώνεται από την εμφάνιση ελαφράς θολερότητας.

6.3.2. Μεταγγίζεται το υγρό σε σωλήνα φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται στα 2 000 g επί 10 λεπτά για να απομακρυνθεί το ίζημα. Το υπερκείμενο μεταγγίζεται χωρίς έκπλυση του ιζήματος σε άλλο σωλήνα φυγοκέντρου.

6.3.3. Επαναφέρεται η θερμοκρασία του υπερκειμένου στους 37 °C ± 1 °C. Ενώ αναδεύεται το εκχύλισμα, προστίθενται στάγδην 0,5 ml υγρής πυτιάς (4.5). Η θρόμβωση επέρχεται σε δύο λεπτά.

6.3.4. Επανατοποθετείται το δείγμα στο υδατόλουτρο όπου παραμένει σε θερμοκρασία 37 °C ± 1 °C επί 15 λεπτά. Απομακρύνεται το δείγμα από το υδατόλουτρο και διασπάται το πήγμα με ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2 000 g επί 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διηθείται μέσω κατάλληλου χάρτινου ηθμού (5.8), ο οποίος φυλάσσεται. Το ίζημα εκπλύνεται στον σωλήνα φυγοκέντρου με 50 ml νερού θερμοκρασίας 35 °C περίπου υπό ανάδευση.

Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 2 000 g επί 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διηθείται μέσω του χάρτινου ηθμού που φυλάχθηκε προηγουμένως.

6.4. **Προσδιορισμός του καζεϊνικού αζώτου**

6.4.1. Μετά την έκπλυση, το ίζημα μεταφέρεται ποσοτικά με απεσταγμένο νερό στον χάρτινο ηθμό που έχει φυλαχθεί στο σημείο 6.3.4. Μεταφέρεται ο ξηρός χάρτινος ηθμός στη φιάλη Kjeldahl και προσδιορίζεται το άζωτο κατά τη μέθοδο Kjeldahl που περιγράφεται στο πρότυπο ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001.

▼B

7. ΤΥΦΛΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

7.1. Εκτελείται σε τακτά διαστήματα τυφλό πείραμα με την ανοργανοποίηση κατά τη μέθοδο Kjeldahl, που περιγράφεται στο πρότυπο ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001, ενός χάρτινου ηθμού χωρίς τέφρα (5.8) που έχει υγρανθεί με μείγμα 90 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου (4.1), 2 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (4.2) και 0,5 ml υγρής πυτιάς (4.5) και έχει εκπλυθεί 3 φορές με 15 ml απεσταγμένου νερού κάθε φορά.

7.2. Ο όγκος οξέος που καταναλώνεται για το τυφλό πείραμα πρέπει να αφαιρείται από τον όγκο οξέος (4.4) που καταναλώνεται για την τιτλοδότηση του δείγματος.

8. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

8.1. Η εκατοστιαία αναλογία σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος στη σύνθετη ζωοτροφή υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ SMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100\right) - 2,81}{0,908}$$

όπου:

N είναι η εκατοστιαία αναλογία του αζώτου της παρακαζεΐνης,

27,5 είναι ο συντελεστής μετατροπής της προσδιοριζόμενης καζεΐνης σε εκατοστιαία αναλογία σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος,

2,81 και 0,908 είναι οι διορθωτικοί συντελεστές που προκύπτουν από ανάλυση παλινδρόμησης.

9. ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

9.1. **Επαναληψιμότητα**

Σε ποσοστό τουλάχιστον 95 % των μελετώμενων περιπτώσεων, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του ιδίου δείγματος εις διπλούν, από τον ίδιο χειριστή και στο ίδιο εργαστήριο, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2,3 g αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη ανά 100 g σύνθετης ζωοτροφής.

9.2. **Αναπαραγωγιμότητα**

Σε ποσοστό 95 % τουλάχιστον των μελετώμενων περιπτώσεων, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του ιδίου δείγματος σε δύο διαφορετικά εργαστήρια δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 6,5 g αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη ανά 100 g σύνθετης ζωοτροφής.

10. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

10.1. Η προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων ορισμένων μη γαλακτικών πρωτεϊνών, ιδίως πρωτεϊνών σόγιας, θερμαινόμενων μαζί με τη σκόνη αποκορυφωμένου γάλακτος, ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα υπερβολικά υψηλές τιμές, λόγω συγκαθίζησης με την παρακαζεΐνη του γάλακτος.

10.2. Η προσθήκη βουτυρογάλακτος ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα σχετικά χαμηλές τιμές, επειδή προσδιορίζεται μόνο το μη λιπαρό τμήμα. Η προσθήκη ορισμένων ειδών όξινου βουτυρογάλακτος ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα αισθητά χαμηλότερες τιμές, λόγω ατελούς διάλυσης στο διάλυμα κιτρικού άλατος.

10.3. Η προσθήκη λεκιθίνης σε ποσοστό 0,5 % ή μεγαλύτερο ενδέχεται επίσης να έχει ως αποτέλεσμα χαμηλές τιμές.

10.4. Η ενσωμάτωση σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος που έχει θερμανθεί σε υψηλή θερμοκρασία ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα υπερβολικά υψηλές τιμές, λόγω συγκαθίζησης ορισμένων πρωτεϊνών του ορού γάλακτος με την παρακαζεΐνη του γάλακτος.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVII

(Άρθρο 13)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΜΥΛΟΥ ΣΕ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ, ΜΕΤΟΥΣΙΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΚΑΙ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Η παρούσα μέθοδος προορίζεται για την ανίχνευση του αμύλου που χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης σε μετουσιωμένο γάλα σε σκόνη.

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι περίπου 0,05 g αμύλου ανά 100 g δείγματος.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αντίδραση βασίζεται σε εκείνη που χρησιμοποιείται στην ιωδιομετρία:

— δέσμευση του ελεύθερου ιωδίου από τα κολλοειδή σε υδατικό διάλυμα,

— απορρόφηση από τα μικκύλια του αμύλου και χρωματισμός.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1. Διάλυμα ιωδίου

— ιώδιο: 1,0 g,

— ιωδιούχο κάλιο: 2,0 g,

— απεσταγμένο νερό: 100 ml.

— Διαλύονται σε νερό 1,0 g ιωδίου και 2,0 g ιωδιούχου καλίου σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml με χαραγή. Το διάλυμα αραιώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή των 100 ml και αναμιγνύεται.

4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

4.1. Αναλυτικός ζυγός

4.2. Ζέον υδατόλουτρο

4.3. Δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 25 mm × 200 mm

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ζυγίζεται 1,0 g δείγματος με ακρίβεια 0,1g και μεταφέρεται στον δοκιμαστικό σωλήνα (4.3).

Προστίθενται 20 ml απεσταγμένου νερού και ο σωλήνας ανακινείται για να διασπαρθεί το δείγμα.

Τοποθετείται στο ζέον υδατόλουτρο (4.2) όπου παραμένει επί 5 λεπτά.

Ο σωλήνας απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Προστίθεται 0,5 ml διαλύματος ιωδίου (3.1), ο σωλήνας ανακινείται και παρατηρείται το χρώμα που εμφανίζεται.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο κυανός χρωματισμός δηλώνει την παρουσία φυσικού αμύλου στο δείγμα.

Όταν το δείγμα περιέχει τροποποιημένο άμυλο, το χρώμα μπορεί να μην είναι κυανό.

7. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Το χρώμα, η ένταση του χρώματος και η μικροσκοπική όψη του αμύλου ποικίλλουν ανάλογα με την προέλευση του φυσικού αμύλου (π.χ. αραβόσιτος ή γεώμηλα) και το είδος του τροποποιημένου αμύλου που περιέχεται στο δείγμα.

Παρουσία τροποποιημένου αμύλου το σχηματιζόμενο χρώμα γίνεται ιώδες, κόκκινο ή καστανό, ανάλογα με το βαθμό τροποποίησης της κρυσταλλικής δομής του φυσικού αμύλου.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVIII

(Άρθρο 14)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΞΗΡΗΣ ΚΡΕΜΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Στο παρόν παράρτημα καθορίζεται μέθοδος προσδιορισμού της υγρασίας της ξηρής κρέμας γάλακτος.

2. ΟΡΟΙ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς του παρόντος παραρτήματος, ισχύει ο ακόλουθος ορισμός.

Υγρασία: η απώλεια μάζας που προσδιορίζεται με τη διαδικασία η οποία καθορίζεται στο παρόν διεθνές πρότυπο.

Εκφράζεται σε εκατοστιαία αναλογία κατά μάζα.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ξήρανση τμήματος του δείγματος δοκιμής σε θερμοκρασία 102 ± 2 °C μέχρι σταθερής μάζας και ζύγιση για τον προσδιορισμό της απώλειας μάζας.

4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

4.1. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης 1 mg και αναγνωσιμότητα 0,1 mg

4.2. Πυριατήριο με καλό αερισμό και θερμοστατικό έλεγχο της θερμοκρασίας, που διατηρείται στους 102 ± 2 °C σε όλο το χώρο εργασίας

4.3. Ξηραντήρας εφοδιασμένος με πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) που έχει πρόσφατα ξηρανθεί, με υγρομετρικό δείκτη, ή με άλλο δραστικό ξηραντικό μέσο

4.4. Τρυβλία με επίπεδο πυθμένα, βάθους περίπου 25 mm και διαμέτρου περίπου 50 mm, κατασκευασμένα από κατάλληλο υλικό (π.χ. γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα, νικέλιο ή αλουμίνιο) και εφοδιασμένα με καλύμματα που εφαρμόζουν ακριβώς και αφαιρούνται εύκολα

4.5. Φιάλες με πώματα ερμητικής σφράγισης για την ανάμιξη των εργαστηριακών δειγμάτων

5. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Είναι σημαντικό να φθάνει στο εργαστήριο ένα πραγματικά αντιπροσωπευτικό δείγμα δοκιμής, το οποίο δεν έχει φθαρεί ούτε μεταβληθεί κατά τη μεταφορά ή την αποθήκευση.

Η δειγματοληψία δεν αποτελεί μέρος της μεθόδου που καθορίζεται στο παρόν διεθνές πρότυπο. Το πρότυπο ISO 707IDF 50 παρέχει συνιστώμενη μέθοδο δειγματοληψίας.

Το δείγμα φυλάσσεται κατά τρόπο που αποτρέπει τη φθορά και τη μεταβολή της σύστασης.

6. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αναμιγνύεται πλήρως το δείγμα δοκιμής με επανειλημμένες ανακινήσεις και αναστροφές του δοχείου (εάν είναι απαραίτητο, αφού μεταφερθούν όλα τα δείγματα δοκιμής σε αεροστεγές δοχείο, του οποίου η χωρητικότητα επιτρέπει την εκτέλεση της εργασίας αυτής).

Εάν δεν επιτευχθεί πλήρης ομοιογένεια με τη διαδικασία αυτή, τα τμήματα δείγματος (για δύο εφάπαξ προσδιορισμούς) λαμβάνονται από δύο σημεία του προετοιμασμένου δείγματος δοκιμής που απέχουν όσο το δυνατόν περισσότερο μεταξύ τους.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

7.1. **Προετοιμασία του τρυβλίου**

7.1.1. Θερμαίνονται στο πυριατήριο (4.2), του οποίου η θερμοκρασία έχει ρυθμιστεί στους 102 ± 2 °C, ένα τρυβλίο χωρίς κάλυμμα και το κάλυμμά του (4.4), τουλάχιστον επί μία ώρα.

7.1.2. Τοποθετείται το κάλυμμα στο τρυβλίο, το οποίο μεταφέρεται στον ξηραντήρα (4.3), αφήνεται να ψυχθεί έως τη θερμοκρασία του χώρου όπου βρίσκεται ο ζυγός και ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg, ενώ το βάρος καταγράφεται σε 0,1 mg.

▼B

7.2. **Τμήμα δείγματος δοκιμής**

Φέρονται στο τρυβλίο 1 έως 3 g προετοιμασμένου δείγματος δοκιμής (6), τοποθετείται το κάλυμμα και το τρυβλίο ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg, ενώ το βάρος καταγράφεται σε 0,1 mg.

7.3. **Προσδιορισμός**

7.3.1. Αφαιρείται το κάλυμμα και το τρυβλίο μαζί με το κάλυμμα τοποθετούνται επί δύο ώρες στο πυριατήριο (4.2), του οποίου η θερμοκρασία έχει ρυθμιστεί στους 102 ± 2 °C.

7.3.2. Τοποθετείται πάλι το κάλυμμα στο τρυβλίο, το οποίο μεταφέρεται στον ξηραντήρα, αφήνεται να ψυχθεί έως τη θερμοκρασία του χώρου όπου βρίσκεται ο ζυγός και ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg, ενώ το βάρος καταγράφεται σε 0,1 mg.

7.3.3. Αφαιρείται το κάλυμμα και το τρυβλίο μαζί με το κάλυμμα θερμαίνονται πάλι στο πυριατήριο επί μία ώρα. Στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η εργασία 7.3.2.

7.3.4. Η διαδικασία θέρμανσης και ζύγισης επαναλαμβάνεται μέχρις ότου διαπιστωθεί μείωση της μάζας κατά 1 mg ή λιγότερο ή αύξησή της μεταξύ δύο διαδοχικών ζυγίσεων.

Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιείται η μικρότερη μάζα που έχει καταγραφεί.

8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

8.1. **Υπολογισμός**

Η υγρασία, εκφραζόμενη σε g/100 g, ισούται με:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

όπου:

m_0 είναι η μάζα, σε γραμμάρια, του τρυβλίου και του καλύμματός του (7.1.2),

m_1 είναι η μάζα, σε γραμμάρια, του τρυβλίου, του καλύμματός του και του τμήματος του δείγματος πριν από την ξήρανση (7.2),

m_2 είναι η μάζα, σε γραμμάρια, του τρυβλίου, του καλύμματός του και του τμήματος του δείγματος μετά την ξήρανση (7.3.4).

Το αποτέλεσμα αναφέρεται με δύο δεκαδικά ψηφία.

9. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Σημείωση: Οι τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας προέκυψαν από τα αποτελέσματα διεργαστηριακής δοκιμής (βλέπε Steiger, G., Bulletin of IDF αριθ. 285/1993, σ. 21-28) η οποία διεξήχθη σύμφωνα με το πρότυπο IDF 135B:1991: Milk and milk products –Precision characteristics of analytical methods — Outline of collaborative study procedure.

9.1. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο ανεξάρτητων μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, στο ίδιο εργαστήριο από τον ίδιο χειριστή με τον ίδιο εξοπλισμό, σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων τα 0,20 g υγρασίας ανά 100 g προϊόντος.

9.2. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο ανεξάρτητων μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, σε διαφορετικά εργαστήρια από διαφορετικούς χειριστές με διαφορετικό εξοπλισμό δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων τα 0,40 g υγρασίας ανά 100 g προϊόντος.

10. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής αναφέρονται

— όλες οι πληροφορίες που απαιτούνται για την πλήρη ταυτοποίηση του δείγματος,

— η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος δειγματοληψίας, εάν είναι γνωστή,

— η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος δοκιμής, με αναφορά στο παρόν διεθνές πρότυπο,

▼B

— κάθε λεπτομέρεια της εκτέλεσης που δεν καθορίζεται στο παρόν διεθνές πρότυπο ή θεωρείται προαιρετική, καθώς και οι λεπτομέρειες τυχόν συμβάντων που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει το ή τα αποτελέσματα της δοκιμής.

Το ή τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δοκιμή και, εάν ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα, το τελικό αποτέλεσμα.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIX

(Άρθρο 15)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Προσδιορισμός της υγρασίας του όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη, του οποίου αρχικός προορισμός είναι η διατροφή των ζώων.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το δείγμα ξηραίνεται υπό κενό. Η απώλεια μάζας προσδιορίζεται με ζύγιση.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

3.1. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης 1 mg και αναγνωσιμότητα 0,1 mg

3.2. Τρυβλία από μέταλλο που δεν διαβρώνεται ή από γυαλί, με καλύμματα που εξασφαλίζουν αεροστεγές κλείσιμο· ωφέλιμη επιφάνεια που επιτρέπει κατανομή του δείγματος περίπου 0,3 g/cm^2

3.3. Ρυθμιζόμενος ηλεκτρικός κλίβανος κενού, εξοπλισμένος με ελαιοαντλία και με μηχανισμό εισαγωγής θερμού αέρα ο οποίος έχει ξηρανθεί διερχόμενος από πύργο που περιέχει, π.χ., οξείδιο του ασβεστίου ή θειικό ασβέστιο (με δείκτη υγρασίας)

3.4. Ξηραντήρας που περιέχει δραστικό ξηραντικό μέσο

3.5. Πυριατήριο με αερισμό και θερμοστατικό έλεγχο της θερμοκρασίας, που διατηρείται στους 102 ± 2 °C

4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Θερμαίνεται στο πυριατήριο (3.5), τουλάχιστον επί μία ώρα, ένα τρυβλίο με το κάλυμμά του (3.2). Τοποθετείται το κάλυμμα στο τρυβλίο, το οποίο μεταφέρεται αμέσως στον ξηραντήρα (3.4), αφήνεται να ψυχθεί έως τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg, ενώ η μάζα καταγράφεται σε 0,1 mg.

Αφαιρείται το κάλυμμα, φέρονται περίπου 5 g δείγματος στο τρυβλίο και το σύνολο ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg, ενώ η μάζα καταγράφεται σε 0,1 mg. Το τρυβλίο με το κάλυμμά του τοποθετείται στον κλίβανο κενού (3.3), ο οποίος έχει θερμανθεί προηγουμένως στους 83 °C. Για να μην μειωθεί υπέρμετρα η θερμοκρασία του κλιβάνου, το τρυβλίο εισάγεται όσο το δυνατόν ταχύτερα.

Αυξάνεται η πίεση στα 100 Torr (13,3 kPa) και αφήνεται το τρυβλίο να ξηρανθεί υπό την πίεση αυτή μέχρι σταθερού βάρους (περίπου 4 ώρες) σε ρεύμα θερμού και ξηρού αέρα.

Υπολογίζεται ο χρόνος ξήρανσης από τη στιγμή που η θερμοκρασία του κλιβάνου επανέρχεται στους 83 °C. Επαναφέρεται με προσοχή ο κλίβανος στην ατμοσφαιρική πίεση. Ανοίγεται ο κλίβανος και τοποθετείται αμέσως το κάλυμμα στο τρυβλίο, το οποίο απομακρύνεται από τον κλίβανο, αφήνεται να ψυχθεί επί 30 έως 45 λεπτά στον ξηραντήρα (3.4) και ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg, ενώ η μάζα καταγράφεται σε 0,1 mg. Ακολουθούν συμπληρωματική ξήρανση 30 λεπτών στον κλίβανο κενού (3.3), σε θερμοκρασία 83 °C, και νέα ζύγιση. Η διαδικασία θέρμανσης και ζύγισης επαναλαμβάνεται μέχρις ότου διαπιστωθεί μείωση της μάζας του τρυβλίου με το κάλυμμά του κατά 1 mg ή λιγότερο ή αύξησή της μεταξύ δύο διαδοχικών ζυγίσεων. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιείται η μικρότερη μάζα που έχει καταγραφεί.

5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

% Υγρασία = $(m_1-m_2) / (m_1-m_0) \times 100$ %

όπου

m_0 είναι η μάζα του τρυβλίου και του καλύμματός του,

m_1 είναι η μάζα του τρυβλίου, του καλύμματός του και του τμήματος του δείγματος πριν από την ξήρανση,

m_2 είναι η μάζα του τρυβλίου, του καλύμματός του και του τμήματος του δείγματος μετά την ξήρανση.

Το αποτέλεσμα καταγράφεται με ακρίβεια 0,1 g / 100 g

▼B

6. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

6.1. **Όριο επαναληψιμότητας**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο ανεξάρτητων μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, στο ίδιο εργαστήριο από τον ίδιο χειριστή με τον ίδιο εξοπλισμό, σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων τα 0,4 g νερού/100 g σκόνης βουτυρογάλακτος.

6.2. **Όριο αναπαραγωγιμότητας**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο ανεξάρτητων μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, σε διαφορετικά εργαστήρια από διαφορετικούς χειριστές με διαφορετικό εξοπλισμό δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων τα 0,6 g νερού/100 g σκόνης όξινου βουτυρογάλακτος.

6.3. **Πηγή των δεδομένων που αφορούν την ακρίβεια**

Τα σχετικά με την ακρίβεια δεδομένα προσδιορίστηκαν σε πείραμα που διεξήχθη το 1995 με τη συμμετοχή οκτώ εργαστηρίων, σε 12 δείγματα (έξι διπλά τυφλά πειράματα).

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XX

(Άρθρο 16)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ — ΔΕΥΤΕΡΗ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Το παρόν πρότυπο ορίζει μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του λίπους γάλακτος με αεριοχρωματογραφική ανάλυση τριγλυκεριδίων. Είναι δυνατή η ανίχνευση τόσο φυτικών όσο και ζωικών λιπών, όπως το βόειο λίπος (στέαρ) και το χοιρινό λίπος (λαρδί).

Με τη βοήθεια καθορισμένων εξισώσεων για τα τριγλυκερίδια, προσδιορίζεται η ακεραιότητα του λίπους γάλακτος. Η μέθοδος εφαρμόζεται κατά βάση στο αγελαδινό γάλα χύμα και στα προϊόντα του, ανεξαρτήτως των συνθηκών διατροφής των ζώων, αναπαραγωγής και γαλουχίας. Μόνο η κατ' εξαίρεση χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων καθαρών φυτικών ελαίων, όπως κραμβελαίου, μπορεί να οδηγήσει σε ψευδοθετικό αποτέλεσμα. Ψευδοθετικό αποτέλεσμα μπορεί επίσης να προκύψει από γαλακτοκομικά προϊόντα προερχόμενα από μεμονωμένες αγελάδες.

Ειδικότερα, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στο λίπος που εξάγεται από γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία δηλώνεται ότι περιέχουν καθαρό λίπος γάλακτος με αμετάβλητη σύσταση, όπως βούτυρο, κρέμα γάλακτος, γάλα και σκόνη γάλακτος. Η τεχνική κατεργασία του λίπους γάλακτος, όπως η αφαίρεση της χοληστερόλης ή ο κλασματικός διαχωρισμός, μπορεί να οδηγήσει σε ψευδοθετικό αποτέλεσμα. Το ίδιο ισχύει για το λίπος γάλακτος που προέρχεται από αποκορυφωμένο γάλα ή από βουτυρόγαλα. Η μέθοδος δεν μπορεί πάντα να εφαρμοστεί στο λίπος που εξάγεται από τυρί, επειδή η διεργασία ωρίμασης είναι δυνατόν να επηρεάσει τόσο έντονα τη σύνθεση του λίπους ώστε να προκύψει ψευδοθετικό αποτέλεσμα.

Σημείωση 1: Το βουτυρικό (κ-βουτανικό) οξύ (C_4) συναντάται αποκλειστικά στο λίπος γάλακτος και παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης μικρών έως μεσαίων ποσοτήτων λίπους γάλακτος σε φυτικά και ζωικά λίπη. Λόγω όμως της μεγάλης μεταβλητότητας του C_4 στο πεδίο τιμών εκατοστιαίου κλάσματος μάζας 3,1 έως 3,8 % περίπου, είναι δύσκολο να ληφθούν ποιοτικά και ποσοτικά στοιχεία για κλάσματα μάζας ξένων λιπών προς καθαρό λίπος γάλακτος έως 20 % [1].

Σημείωση 2: Στην πράξη, δεν είναι δυνατόν να συναχθούν ποσοτικά αποτελέσματα από την περιεκτικότητα των φυτικών λιπών σε στερόλες, διότι αυτά εξαρτώνται από τις συνθήκες παραγωγής και μεταποίησης. Ακόμη και ο ποιοτικός προσδιορισμός των ξένων λιπών μέσω των στερολών παρέχει αμφίβολα αποτελέσματα.

2. ΟΡΙΣΜΟΣ

Καθαρότητα του λίπους γάλακτος: η απουσία φυτικών και ζωικών λιπών, η οποία προσδιορίζεται με τη διαδικασία που καθορίζεται στο παρόν πρότυπο.

Σημείωση: Η καθαρότητα προσδιορίζεται με τη βοήθεια τιμών *S* που υπολογίζονται από τη σύσταση σε τριγλυκερίδια. Τα κλάσματα μάζας τριγλυκεριδίου εκφράζονται σε ποσοστό επί τοις εκατό.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το λίπος που εξάγεται από γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα υποβάλλεται σε ανάλυση με αεριοχρωματογραφία σε πληρωθείσα στήλη ή τριχοειδή στήλη μικρού μήκους για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων (TG), τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με τον συνολικό αριθμό ατόμων άνθρακα. Με την εισαγωγή του κλάσματος μάζας, εκφραζόμενου σε ποσοστό επί τοις εκατό, των μορίων λίπους διαφόρων μεγεθών (C_{24} έως C_{54}, μόνο άρτιοι αριθμοί ατόμων C) σε κατάλληλες εξισώσεις TG, υπολογίζονται τιμές *S*. Εάν οι τιμές *S* υπερβαίνουν τα όρια που έχουν καθοριστεί για το καθαρό λίπος γάλακτος, ανιχνεύεται η παρουσία ξένου λίπους.

▼B

Σημείωση 1: Η καταλληλότητα και η ισοδυναμία της πληρωθείσας και της τριχοειδούς στήλης έχουν αποδειχθεί παλαιότερα [2-4].

Σημείωση 2: Η τιμή *S* αποτελεί άθροισμα των γινομένων των κλασμάτων μάζας TG επί καθορισμένο για το καθένα συντελεστή.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας.

4.1. Φέρον αέριο: άζωτο ή, εναλλακτικά, ήλιο ή υδρογόνο, καθαρότητας τουλάχιστον 99,995 % σε κάθε περίπτωση

4.2. Πρότυπα λίπη για την τυποποίηση πρότυπου λίπους γάλακτος σύμφωνα με το σημείο 7.3.3

4.2.1. Πρότυπα τριγλυκερίδια, κορεσμένα· στο εμπόριο διατίθενται κατάλληλα προϊόντα

4.2.2. Πρότυπη χοληστερόλη

4.3. Μεθανόλη (CH_3OH), απαλλαγμένη νερού

4.4. κ-εξάνιο ($CH_3(CH_2)4CH_3$)

4.5. κ-επτάνιο ($CH_3(CH_2)5CH_3$)

4.6. Άλλα αέρια: υδρογόνο, καθαρότητας τουλάχιστον 99,995 %, χωρίς οργανικές προσμίξεις (C_nH_m < 1 μl/l)· συνθετικός αέρας, χωρίς οργανικές προσμίξεις (C_nH_m < 1 μl/l)

4.7. Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4)

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα.

5.1. **Αεριοχρωματογράφος υψηλών θερμοκρασιών**

Ο αεριοχρωματογράφος υψηλών θερμοκρασιών είναι κατάλληλος για θερμοκρασίες τουλάχιστον 400 °C και εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Τα διαφράγματα (septum) που χρησιμοποιούνται στο σύστημα έγχυσης είναι ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες και παρουσιάζουν πολύ χαμηλό βαθμό διαρροής («bleeding»). Για αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης, χρησιμοποιείται σύστημα απευθείας έγχυσης στη στήλη. Για τη σύνδεση της στήλης, καθώς και για τους συνδετήρες του συστήματος έγχυσης ή/και του ανιχνευτή (όπου ισχύει) πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα στεγανωτικοί δακτύλιοι από γραφίτη.

5.2. **Χρωματογραφική στήλη**

5.2.1. *Πληρωθείσα στήλη*

Χρησιμοποιείται γυάλινη στήλη εσωτερικής διαμέτρου 2 mm και μήκους 500 mm, η οποία έχει πληρωθεί με στατική φάση OV-1 3 % επάνω σε υλικό Gas ChromQ των 125 μm έως 150 μm (100 έως 120 mesh) ([1]). Η ετοιμασία, σιλυλίωση (σιλανοποίηση) και πλήρωση της στήλης, καθώς και η προσαρμογή της πληρωθείσας στήλης στις συνθήκες της ανάλυσης περιγράφονται στο παράρτημα A.

Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί τριχοειδής στήλη (5.2.2).

5.2.2. *Τριχοειδής στήλη*

Χρησιμοποιείται τριχοειδής στήλη μικρού μήκους, π.χ. 5 μέτρων, με μη πολική στατική φάση, ανθεκτική σε θερμοκρασίες 400 °C και άνω ([2]). Η στήλη προσαρμόζεται με την εκτέλεση 20 αναλύσεων διαλύματος λίπους γάλακτος (7.2) σε διάστημα 2-3 ημερών με τις ρυθμίσεις που υποδεικνύονται στο σημείο 7.3.4.2. Μετά τη διαδικασία αυτή, οι συντελεστές απόκρισης (7.3.3) προσεγγίζουν τη μονάδα και είναι μικρότεροι από 1,20.

Σημείωση: Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες διαφορετικών διαστάσεων και με διαφορετική μη πολική και ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες φάση, εφόσον οι επιδόσεις τους συνάδουν με το παρόν πρότυπο. Βλέπε επίσης σημείο 7.3.4.2.

([1]) Παράδειγμα κατάλληλου προϊόντος του εμπορίου. Η πληροφορία αυτή παρέχεται προς διευκόλυνση των χρηστών του παρόντος διεθνούς προτύπου και δεν συνιστά έγκριση του συγκεκριμένου προϊόντος.

([2]) Παράδειγμα κατάλληλου προϊόντος του εμπορίου είναι η στήλη CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 μm). Η πληροφορία αυτή παρέχεται προς διευκόλυνση των χρηστών του παρόντος διεθνούς προτύπου και δεν συνιστά έγκριση του συγκεκριμένου προϊόντος.

▼B

5.3. Στήλη Extrelut χωρητικότητας 1 ml έως 3 ml, η οποία έχει πληρωθεί με πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) και χρειάζεται μόνο για την εκχύλιση του λίπους γάλακτος σύμφωνα με το σημείο 7.1.3.

5.4. Στεγανωτικοί δακτύλιοι από γραφίτη, ανθεκτικοί σε θερμοκρασίες τουλάχιστον 400 °C, προς χρήση για τη σύνδεση της στήλης αεριοχρωματογραφίας, καθώς και για τους συνδετήρες του συστήματος έγχυσης ή/και του ανιχνευτή

5.5. Υδατόλουτρο με δυνατότητα διατήρησης της θερμοκρασίας στους 50 °C ± 2 °C

5.6. Κλίβανος με δυνατότητα λειτουργίας σε θερμοκρασίες 50 °C ± 2 °C και 100 °C ± 2 °C

5.7. Σιφώνιο μικρολίτρων

5.8. Βαθμολογημένο σιφώνιο των 5 ml

5.9. Σφαιρική φιάλη των 50 ml με σφαιρικό πυθμένα

5.10. Φιάλη Erlenmeyer, ονομαστικής χωρητικότητας 250 ml

5.11. Χοάνη

5.12. Λεπτόπορος χάρτινος ηθμός

5.13. Περιστροφικός εξατμιστήρας

5.14. Φύσιγγες, ονομαστικής χωρητικότητας 1 ml, εφοδιασμένες με πρεσαριστό ή βιδωτό πώμα από αλουμίνιο με επένδυση πολυτετραφθοροαιθυλενίου (Teflon)

5.15. Σύριγγα έγχυσης, το έμβολο της οποίας δεν πρέπει να φθάνει στο άκρο της βελόνας (πληρωθείσα στήλη αεριοχρωματογραφίας)

Σημείωση: Με τις σύριγγες αυτές επιτυγχάνεται καλύτερη επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

5.16. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης 1 mg και αναγνωσιμότητα 0,1 mg

6. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Στο εργαστήριο πρέπει να αποστέλλεται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα, το οποίο δεν έχει φθαρεί ούτε μεταβληθεί κατά τη μεταφορά ή την αποθήκευση.

Η δειγματοληψία δεν αποτελεί μέρος της μεθόδου που καθορίζεται στο παρόν διεθνές πρότυπο. Το πρότυπο ISO 707 IDF 50 [5] παρέχει συνιστώμενη μέθοδο δειγματοληψίας.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

7.1. **Προετοιμασία των δειγμάτων δοκιμής**

Για την προετοιμασία των δειγμάτων δοκιμής χρησιμοποιείται μία από τις ακόλουθες τρεις μεθόδους εξαγωγής του λίπους γάλακτος.

7.1.1. *Απομόνωση από βούτυρο ή βουτυρόγαλα*

Τήκονται 50 g έως 100 g δείγματος δοκιμής στους 50 °C σε υδατόλουτρο (5.5) ή κλίβανο (5.6). Φέρεται σε πτυχωτό χάρτινο ηθμό (5.12) 0,5 g έως 1,0 g θειικού νατρίου (4.7). Προθερμαίνονται στον κλίβανο (5.6), του οποίου η θερμοκρασία έχει ρυθμιστεί στους 50 °C, μία φιάλη Erlenmeyer των 250 ml (5.10) και μία χοάνη (5.11) στην οποία έχει τοποθετηθεί χάρτινος ηθμός. Διηθείται η λιπαρή στιβάδα του τηγμένου δείγματος, ενώ το προθερμασμένο σύστημα φιάλης-χοάνης-χάρτινου ηθμού παραμένει στον κλίβανο. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην μεταφερθεί ορός.

Σε περίπτωση που η διαθέσιμη ποσότητα δείγματος είναι περιορισμένη και μόνο τότε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερη ποσότητα δείγματος, η οποία επιβάλλει ανάλογη προσαρμογή της διαδικασίας. Ωστόσο, ο χειρισμός μικρότερου τμήματος του δείγματος ενέχει μεγαλύτερο κίνδυνο να μην είναι το δείγμα αντιπροσωπευτικό.

Σημείωση 1: Μπορεί να ληφθεί βούτυρο από κρέμα γάλακτος με απόδαρση και πολύ καλή έκπλυση των θρόμβων βουτύρου που προκύπτουν.

Σημείωση 2: Το λίπος γάλακτος που λαμβάνεται με τη διαδικασία 7.1.1 είναι σχεδόν απαλλαγμένο φωσφολιπιδίων.

▼B

7.1.2. *Εξαγωγή σύμφωνα με τη σταθμική μέθοδο Röse–Gottlieb*

Το λιπαρό κλάσμα εξάγεται από το δείγμα δοκιμής με εφαρμογή της σταθμικής μεθόδου που περιγράφεται σε ένα από τα πρότυπα ISO 1211 IDF 001D, ISO 2450 IDF 016C ή ISO 7328 IDF 116A.

Σημείωση: Εάν το λαμβανόμενο λίπος γάλακτος περιέχει φωσφολιπίδια, προκύπτει κορυφή χοληστερόλης αυξημένη κατά 0,1 % περίπου. Συνεπώς, η τυποποιημένη σε 100 % σύσταση σε TG που περιλαμβάνει τη χοληστερόλη επηρεάζεται σε αμελητέο μόνο βαθμό.

7.1.3. *Εκχύλιση από γάλα με τη βοήθεια στηλών πηκτής διοξειδίου του πυριτίου*

Στη στήλη Extrelut των 1-3 ml (5.3) προστίθενται με σιφώνιο μικρολίτρων (5.7) 0,7 ml δείγματος δοκιμής που έχει μαλακώσει στους 20 °C και αφήνονται να κατανεμηθούν ομοιόμορφα πάνω στην πηκτή διοξειδίου του πυριτίου επί 5 λεπτά περίπου.

Προστίθενται στη στήλη Extrelut, με το βαθμολογημένο σιφώνιο (5.8), 1,5 ml μεθανόλης (4.3) για τη μετουσίωση των συμπλόκων πρωτεΐνης-λιπιδίου. Στη συνέχεια, εκχυλίζεται το λιπαρό κλάσμα από το δείγμα δοκιμής με 20 ml κ-εξανίου (4.4), το οποίο προστίθεται αργά σε μικρές ποσότητες. Ο διαλύτης που εκρέει συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη των 50 ml (5.9) που έχει ξηρανθεί μέχρι σταθερής γνωστής μάζας, ζυγιζόμενη με ακρίβεια 1 mg, ενώ η μάζα καταγράφεται σε 0,1 mg.

Μετά την εκχύλιση, η στήλη αφήνεται να στραγγίσει μέχρι να κενωθεί. Ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών από το έκλουσμα σε περιστροφικό εξατμιστήρα (5.13) με ρύθμιση του υδατολούτρου του σε θερμοκρασία μεταξύ 40 °C και 50 °C. Μετά την απόσταξη των διαλυτών, η σφαιρική φιάλη και το περιεχόμενό της ξηραίνονται και έπειτα ζυγίζονται με ακρίβεια 1 mg, ενώ η μάζα καταγράφεται σε 0,1 mg. Προσδιορίζεται η απόδοση σε μάζα λίπους με αφαίρεση της μάζας της ξηρανθείσας κενής σφαιρικής φιάλης από τη μάζα που προκύπτει.

Σημείωση: Η εξαγωγή του λίπους κατά Gerber, Weibull-Berntrop ή Schmidt-Bondzynski-Ratzlaff ή η απομόνωση του λίπους γάλακτος με χρήση απορρυπαντικών (μέθοδος BDI) δεν είναι κατάλληλες για ανάλυση TG, επειδή είναι δυνατόν να περάσουν στη λιπαρή φάση σημαντικές ποσότητες μερικώς εστεροποιημένων γλυκεριδίων ή φωσφολιπιδίων. Ως εκ τούτου, το παρόν διεθνές πρότυπο έχει περιορισμένη εφαρμογή όσον αφορά ορισμένα προϊόντα, ιδίως τυριά.

7.2. **Παρασκευή του διαλύματος δείγματος**

Για αεριοχρωματογραφία με πληρωθείσα στήλη, παρασκευάζεται διάλυμα 5 % (κλάσμα όγκου) του λίπους (που ελήφθη σύμφωνα με το σημείο 7.1) σε κ-εξάνιο (4.4) ή κ-επτάνιο (4.5). Ανάλογα με τις διαστάσεις της στήλης, χρησιμοποιείται συγκέντρωση 1 % (στήλη μεγάλης εσωτερικής διαμέτρου 0,53 mm) ή μικρότερη, όταν πρόκειται για απευθείας έγχυση σε τριχοειδή στήλη.

Με βάση τη χρησιμοποιούμενη στήλη και τη μάζα λίπους που έχει ληφθεί στο σημείο 7.1.3, καθορίζεται η ποσότητα διαλύτη (4.4 ή 4.5) που πρέπει να προστεθεί στο δείγμα δοκιμής στη φιάλη, με ζύγιση με ακρίβεια 1 mg, ενώ η μάζα καταγράφεται σε 0,1 mg. Το υπόλοιπο υλικό διαλύεται τελείως.

Μεταγγίζεται περίπου 1 ml διαλύματος δείγματος σε φύσιγγα (5.14).

7.3. **Χρωματογραφικός προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων**

7.3.1. *Μετατόπιση της γραμμής βάσης*

Για να ελαχιστοποιείται η ανύψωση της γραμμής βάσης, η στήλη προσαρμόζεται στις συνθήκες όπως ορίζει το σημείο 5.2.2 (τριχοειδής στήλη) ή το παράρτημα Α.4 (πληρωθείσα στήλη).

Σημείωση: Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας της στήλης, η ανάλυση TG είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε ανύψωση της γραμμής βάσης στο άνω άκρο της κλίμακας αριθμού ατόμων άνθρακα.

7.3.2. *Τεχνική έγχυσης*

▼B

7.3.2.1. Πληρωθείσα στήλη

Προς αποφυγή διακρίσεων, εφαρμόζεται η τεχνική της θερμής βελόνας για τη βελτίωση του ποσοτικού προσδιορισμού των TG υψηλού σημείου ζέσεως. Πληρούται η βελόνα με αέρα με αναρρόφηση του διαλύματος λίπους στη σύριγγα και εισάγεται στο σύστημα έγχυσης. Πριν από την έγχυση, θερμαίνεται η βελόνα επί 3 δευτερόλεπτα περίπου και, έπειτα, εγχέεται ταχέως το περιεχόμενο της σύριγγας.

7.3.2.2. Τριχοειδής στήλη

Όταν εφαρμόζεται η απευθείας έγχυση στη στήλη εν ψυχρώ (7.3.4.2), εισάγεται η βελόνα της σύριγγας και εγχέεται αμέσως το περιεχόμενό της. Ο χρόνος παραμονής της βελόνας στη θυρίδα έγχυσης πρέπει να είναι τόσος ώστε να αποτρέπεται η εμφάνιση ευρείας «ουράς» στην κορυφή του διαλύτη.

Σημείωση: Ο βέλτιστος χρόνος παραμονής είναι συνήθως 3 δευτερόλεπτα.

7.3.3. *Βαθμονόμηση*

7.3.3.1. Γενικά

Για τη βαθμονόμηση των δειγμάτων δοκιμής, εκτελούνται στην αρχή κάθε ημέρας δύο έως τρεις αναλύσεις τυποποιημένου λίπους γάλακτος. Η τελευταία ανάλυση του τυποποιημένου λίπους γάλακτος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συντελεστών απόκρισης, RF_{si} (κλάσμα μάζας/κλάσμα εμβαδού), των TG και της χοληστερόλης, οι οποίοι εφαρμόζονται κατόπιν στα δείγματα δοκιμής (βλέπε σημείο 9.1)

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

όπου:

w_{si} είναι το κλάσμα μάζας, εκφραζόμενο σε ποσοστό επί τοις εκατό, κάθε TG ή της χοληστερόλης του τυποποιημένου λίπους γάλακτος,

A_{si} είναι η αριθμητική τιμή του εμβαδού της κορυφής κάθε TG ή της χοληστερόλης του τυποποιημένου λίπους γάλακτος.

Για τη λήψη τυποποιημένου λίπους γάλακτος με γνωστή σύσταση σε TG, εφαρμόζεται το σημείο 7.3.3.2 ή 7.3.3.3.

7.3.3.2. Πρότυπο λίπος γάλακτος του εμπορίου

Ο καλύτερος τρόπος να προσδιοριστεί ο συντελεστής απόκρισης κάθε συστατικού του δείγματος δοκιμής είναι η χρήση τυποποιημένου λίπους γάλακτος με πιστοποιημένη σύσταση σε TG.

Σημείωση: Κατάλληλο πρότυπο υλικό είναι το CRM 519 (άνυδρο λίπος γάλακτος) που μπορεί να ζητηθεί από το Ινστιτούτο Υλικών και Μετρήσεων Αναφοράς (IRMM), Geel, Βέλγιο ([1]).

7.3.3.3. Πρότυπο λίπος γάλακτος του εργαστηρίου

Παρασκευάζεται περίπου 1 g μείγματος των προτύπων λιπών (βλέπε σημείο 4.2, να περιέχει τουλάχιστον τα κεκορεσμένα τριγλυκερίδια C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} και C_{54} και χοληστερόλη, επιπλέον δε, κατά προτίμηση, τριγλυκερίδια C_{50} και C_{52}), το οποίο ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg, ενώ η μάζα καταγράφεται σε 0,1 mg, ώστε να προκύψει σχετική σύσταση σε TG παρόμοια με εκείνη του λίπους γάλακτος.

Διάλυμα του μείγματος προτύπων λιπών σε κ-εξάνιο (4.4) ή κ-επτάνιο (4.5) υποβάλλεται σε επανειλημμένη ανάλυση σύμφωνα με το σημείο 7.3.4. Στην ίδια σειρά, υποβάλλεται σε επανειλημμένη ανάλυση λίπος γάλακτος μέσης σύστασης.

Προσδιορίζονται οι συντελεστές απόκρισης των TG από το μείγμα προτύπων λιπών. Οι ενδιάμεσοι συντελεστές απόκρισης για TG που δεν περιέχονται στο μείγμα μπορούν να υπολογιστούν με μαθηματική παρεμβολή. Οι προσδιοριζόμενοι συντελεστές απόκρισης εφαρμόζονται

([1]) Παράδειγμα κατάλληλου προϊόντος του εμπορίου. Η πληροφορία αυτή παρέχεται προς διευκόλυνση των χρηστών του παρόντος διεθνούς προτύπου και δεν συνιστά έγκριση του συγκεκριμένου προϊόντος.

▼B

στο λίπος γάλακτος, ώστε να προκύψει τυποποιημένη σύσταση. Το τυποποιημένο λίπος γάλακτος που λαμβάνεται με τον τρόπο αυτό διατηρείται επί πολλά έτη, εάν φυλάσσεται σε ατμόσφαιρα αζώτου και μέγιστη θερμοκρασία -18 °C.

7.3.4. *Συνθήκες χρωματογραφίας*

Σημείωση: Γενικά, η χρήση είτε πληρωθείσας είτε τριχοειδούς στήλης έχει ως αποτέλεσμα διαχωριστική ικανότητα παρόμοια με εκείνη που εμφαίνεται στο σχήμα 1. Δεν παρατηρείται κανονικά διαμερισμός των κορυφών των TG με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα, ο οποίος πρέπει να αποφεύγεται.

7.3.4.1. Πληρωθείσα στήλη

α) Προγραμματισμός θερμοκρασίας: Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ρυθμίζεται στους 210 °C και διατηρείται στην τιμή αυτή επί 1 λεπτό. Στη συνέχεια αυξάνεται στους 350 °C με ταχύτητα 6 °C/min και διατηρείται στην τιμή αυτή (τελική θερμοκρασία) επί 5 λεπτά.

β) Θερμοκρασία ανιχνευτή και συστήματος έγχυσης: Ρυθμίζεται στους 370 °C και στα δύο όργανα.

γ) Φέρον αέριο: Χρησιμοποιείται άζωτο με σταθερή ταχύτητα ροής περίπου 40 ml/min. Η ακριβής ροή του φέροντος αερίου προσαρμόζεται κατά τρόπο ώστε το C_{54} να εκλούεται στους 341 °C.

δ) Διάρκεια της ανάλυσης: 29,3 λεπτά.

ε) Όγκος έγχυσης: Εισάγονται 0,5 μl διαλύματος δείγματος 5 % (κλάσμα όγκου).

Εάν δεν εκτελούνται αναλύσεις TG, καθώς και κατά τη διάρκεια της νύκτας, του σαββατοκύριακου και των αργιών, διατηρούνται σε σταθερό επίπεδο η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου που υποδεικνύεται στο στοιχείο α), η θερμοκρασία του ανιχνευτή και του συστήματος έγχυσης που υποδεικνύεται στο στοιχείο β) και η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου που υποδεικνύεται στο στοιχείο γ). Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζονται άριστες επιδόσεις της στήλης.

7.3.4.2. Τριχοειδής στήλη

α) Προγραμματισμός θερμοκρασίας: Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ρυθμίζεται στους 80 °C και διατηρείται στην τιμή αυτή επί 0,5 λεπτό. Στη συνέχεια αυξάνεται στους 190 °C με ταχύτητα 50 °C/min και έπειτα στους 350 °C με ταχύτητα 6 °C/min, τιμή (τελική θερμοκρασία) στην οποία διατηρείται επί 5 λεπτά.

β) Θερμοκρασία ανιχνευτή: Ρυθμίζεται στους 370 °C.

γ) Φέρον αέριο: Χρησιμοποιείται άζωτο με σταθερή ταχύτητα ροής περίπου 3 ml/min.

δ) Διάρκεια της ανάλυσης: 34,4 λεπτά

ε) Όγκος έγχυσης: Εισάγονται 0,5 μl διαλύματος δείγματος 1 % (κλάσμα όγκου).

Οι ρυθμίσεις αυτές διατηρούνται κατά τις περιόδους που τα όργανα βρίσκονται σε θέση αναμονής για να εξασφαλιστούν άριστες επιδόσεις (βλέπε σημείο 7.3.4.1).

Οι αναλυτικές ρυθμίσεις του σημείου 7.3.4.2 είναι κατάλληλες για στήλη μεγάλης εσωτερικής διαμέτρου (0,53 mm) σύμφωνα με το σημείο 5.2.2. Σε περίπτωση χρήσης διαφορετικής διάστασης της στήλης ή φάσης, μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικές συνθήκες.

8. ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ, ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΔΟΣΕΩΝ

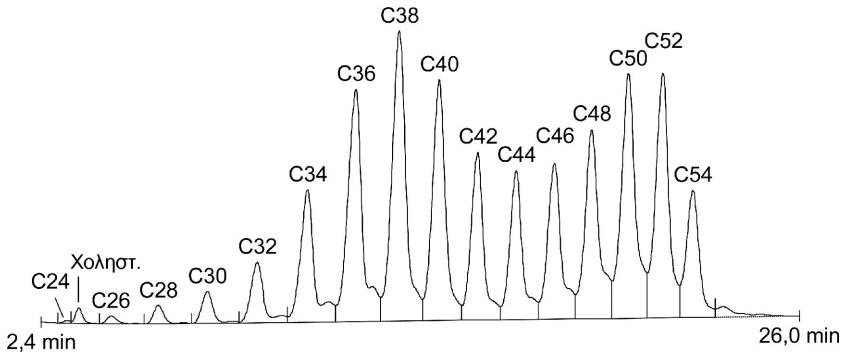
Οι κορυφές του χρωματογραφήματος αξιολογούνται με σύστημα ολοκλήρωσης, το οποίο επιτρέπει τη χάραξη της γραμμής βάσης και την επανολοκλήρωση. Στο σχήμα 1 απεικονίζεται χρωματογράφημα με ορθή ολοκλήρωση, ενώ στο σχήμα 2 εμφαίνεται ένα σποραδικό σφάλμα στο τέλος της γραμμής βάσης μετά την κορυφή C_{54}, το οποίο επηρεάζει την εκατοστιαία αναλογία όλων των TG. Ωστόσο, δεν λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση οι κορυφές των ουσιών που εκλούονται μετά το C_{54}.

Τα TG με περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα ακυλίου ($2n + 1$) συνδυάζονται με τα προηγούμενα TG με άρτιο αριθμό ($2n$), χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η χαμηλή περιεκτικότητα σε C_{56}. Τα επί τοις εκατό εμβαδά των κορυφών των υπόλοιπων TG, συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης, πολλαπλασιάζονται επί τους αντίστοιχους συντελεστές απόκρισης του τυποποιημένου λίπους γάλακτος (τελευταία βαθμονόμηση) και όλα κανονικοποιούνται σε 100 % σύμφωνα με το σημείο 9.1.

▼B

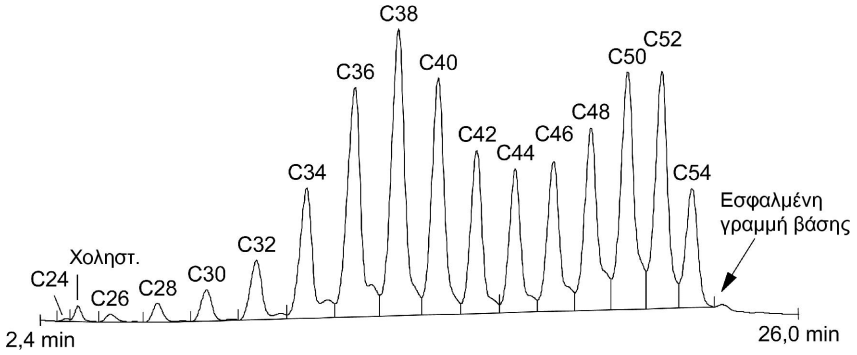
Σχήμα 1

Παράδειγμα χρωματογραφήματος τριγλυκεριδίων λίπους γάλακτος με ορθή χάραξη της γραμμής βάσης



Σχήμα 2

Παράδειγμα χρωματογραφήματος τριγλυκεριδίων λίπους γάλακτος με εσφαλμένη χάραξη της γραμμής βάσης



Για τον έλεγχο των συνθηκών μέτρησης, γίνεται σύγκριση με τους συντελεστές μεταβλητότητας, CV, των διαφόρων TG, εκφραζόμενους σε ποσοστό επί τοις εκατό, οι οποίοι παρατίθενται στον πίνακα 1 και βασίζονται σε 19 διαδοχικές αναλύσεις του ίδιου δείγματος λίπους γάλακτος.

Εάν οι CV είναι σημαντικά ανώτεροι από τις τιμές του πίνακα 1, οι συνθήκες χρωματογραφίας δεν είναι οι ενδεδειγμένες.

Σημείωση: Οι τιμές του πίνακα 1 δεν έχουν δεσμευτικό χαρακτήρα αλλά είναι ενδεικτικές για τον ποιοτικό έλεγχο.

Εάν ωστόσο γίνουν δεκτές υψηλότερες τιμές CV, θα πρέπει να τηρηθούν τα όρια επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας που παρατίθενται στο σημείο 10.

Πίνακας 1

Συντελεστές μεταβλητότητας της περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια (19 διαδοχικές αναλύσεις)

Τριγλυκερίδιο	CV %
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42

▼B

Τριγλυκερίδιο	CV %
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

9.1. **Σύσταση σε τριγλυκερίδια**

9.1.1. *Υπολογισμός*

Το κλάσμα μάζας, w_i, κάθε TG (i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52} και C_{54}) και της χοληστερόλης, εκφραζόμενο σε ποσοστό επί τοις εκατό της περιεκτικότητας του δείγματος δοκιμής σε ολικά TG, υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

όπου:

A_i είναι η αριθμητική τιμή του εμβαδού της κορυφής κάθε TG του δείγματος δοκιμής,

RF_{si} είναι ο συντελεστής απόκρισης κάθε TG, ο οποίος προσδιορίζεται με βαθμονόμηση (7.3.3).

9.1.2. *Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής*

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

9.2. **Τιμές *S***

9.2.1. *Υπολογισμός*

9.2.1.1. Οι τιμές S, εκφραζόμενες σε ποσοστό επί τοις εκατό, υπολογίζονται με την εισαγωγή των w_i (9.1.1) που έχουν υπολογιστεί για τα αντίστοιχα TG στις εξισώσεις (3) έως (7). Χρησιμοποιούνται όλες οι εξισώσεις, ανεξαρτήτως του είδους ξένου λίπους που αφορούν οι υπόνοιες.

9.2.1.2. Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο και ιχθυέλαιο

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Κοκκόλιπος και φοινικοπυρηνέλαιο

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Φοινικέλαιο και βόειο λίπος (στέαρ)

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Χοιρινό λίπος (λαρδί)

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6. Σύνολο

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής*

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

9.3. **Ανίχνευση ξένου λίπους**

Οι πέντε τιμές *S* που προέκυψαν στο σημείο 9.2.1 συγκρίνονται με τα αντίστοιχα όρια *S* που παρατίθενται στον πίνακα 2.

Εάν και οι πέντε τιμές *S* περικλείονται εντός των ορίων του πίνακα 2, το δείγμα δοκιμής θεωρείται ως καθαρό λίπος γάλακτος. Εάν όμως οποιαδήποτε από τις τιμές *S* βρίσκεται εκτός των αντίστοιχων ορίων, θεωρείται ότι το δείγμα περιέχει ξένο λίπος.

Παρόλο που οι επιμέρους εξισώσεις (3) έως (6) είναι πιο ευαίσθητες από τη συνολική εξίσωση (7) για ορισμένα ξένα λίπη (βλέπε πίνακα Β.1), ένα θετικό αποτέλεσμα που έχει προκύψει μόνο από μία από τις εξισώσεις (3) έως (6) δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων για το είδος του ξένου λίπους.

Στο παράρτημα Β περιγράφεται διαδικασία για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του νοθευμένου λίπους γάλακτος σε ζωικά ή φυτικά λίπη. Η διαδικασία αυτή δεν έχει επικυρωθεί και παρατίθεται μόνο πληροφοριακά.

Πίνακας 2

Όρια *S* για καθαρό λίπος γάλακτος

Ξένο λίπος	Εξίσωση	Όρια *S* [a]
Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ιχθυέλαιο	(3)	98,05 έως 101,95
Κοκκόλιπος και φοινικοπυρηνέλαιο	(4)	99,42 έως 100,58
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος (στέαρ)	(5)	95,90 έως 104,10
Χοιρινό λίπος (λαρδί)	(6)	97,96 έως 102,04
Σύνολο	(7)	95,68 έως 104,32

[a] Υπολογισμένα με στάθμη εμπιστοσύνης 99 %, το οποίο συνεπάγεται ότι ένδειξη της προσθήκης ξένου λίπους αποτελεί μόνο η υπέρβαση των ορίων ανίχνευσης της σχετικής εξίσωσης (βλέπε πίνακα Β.1).

10. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

10.1. **Διεργαστηριακή δοκιμή**

Οι τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας προσδιορίστηκαν με βάση τις εξισώσεις (3) έως (7) για καθαρό λίπος γάλακτος και ενδέχεται να μην ισχύουν για υλικά διαφορετικά από τα αναφερόμενα.

10.2. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, στο ίδιο εργαστήριο από τον ίδιο χειριστή με τον ίδιο εξοπλισμό, σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων τα όρια του πίνακα 3.

▼B

Πίνακας 3

Όρια επαναληψιμότητας, r, για τις εξισώσεις (3) έως (7)

Ξένο λίπος	Εξίσωση	r %
Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ιχθυέλαιο	(3)	0,67
Κοκκόλιπος και φοινικοπυρηνέλαιο	(4)	0,12
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος (στέαρ)	(5)	1,20
Χοιρινό λίπος (λαρδί)	(6)	0,58
Σύνολο	(7)	1,49

10.3. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με την ίδια μέθοδο, με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, σε διαφορετικά εργαστήρια από διαφορετικούς χειριστές με διαφορετικό εξοπλισμό δεν υπερβαίνει σε περισσότερο από 5 % των περιπτώσεων τα όρια του πίνακα 4.

Πίνακας 4

Όρια αναπαραγωγιμότητας, R, για τις εξισώσεις (3) έως (7)

Ξένο λίπος	Εξίσωση	R %
Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ιχθυέλαιο	(3)	1,08
Κοκκόλιπος και φοινικοπυρηνέλαιο	(4)	0,40
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος (στέαρ)	(5)	1,81
Χοιρινό λίπος (λαρδί)	(6)	0,60
Σύνολο	(7)	2,07

11. ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Με γνωστές την επαναληψιμότητα, *r*, και την αναπαραγωγιμότητα, *R*, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η διευρυμένη αβεβαιότητα μιας τιμής *S*.

Με τη συνεκτίμηση της διευρυμένης αβεβαιότητας (βάσει αναλύσεων εις διπλούν) στα όρια *S* του πίνακα 2 προκύπτουν διευρυμένα όρια *S*, τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5

Διευρυμένα όρια *S*, που περιλαμβάνουν τη διευρυμένη αβεβαιότητα, για καθαρό λίπος γάλακτος

Ξένο λίπος	Εξίσωση	Διευρυμένα όρια *S*
Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ιχθυέλαιο	(3)	97,36 έως 102,64
Κοκκόλιπος και φοινικοπυρηνέλαιο	(4)	99,14 έως 100,86
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος (στέαρ)	(5)	94,77 έως 105,23
Χοιρινό λίπος (λαρδί)	(6)	97,65 έως 102,35
Ολικά	(7)	94,42 έως 105,58

▼B

12. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής αναφέρονται:

— όλες οι πληροφορίες που απαιτούνται για την πλήρη ταυτοποίηση του δείγματος,

— η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος δειγματοληψίας, εάν είναι γνωστή,

— η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος δοκιμής, με αναφορά στο παρόν διεθνές πρότυπο,

— κάθε λεπτομέρεια της εκτέλεσης που δεν καθορίζεται στο παρόν διεθνές πρότυπο ή θεωρείται προαιρετική, καθώς και οι λεπτομέρειες τυχόν συμβάντων που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει το ή τα αποτελέσματα της δοκιμής,

— το ή τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δοκιμή και, εάν ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα, το τελικό αποτέλεσμα.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

(κανονιστικό)

ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΛΗΡΩΘΕΙΣΑΣ ΣΤΗΛΗΣ

Α.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Α.1.1 Τολουόλιο ($C_6H_5CH_3$)

Α.1.2 Διάλυμα **διμεθυλοδιχλωροσιλανίου** [$Si(CH_3)_2Cl_2$]

Διαλύονται 50 ml διμεθυλοδιχλωροσιλανίου σε 283 ml τολουολίου (Α.1.1)

Α.1.3 Διάλυμα **βουτύρου του κακάου** με κλάσμα μάζας 5 % βουτύρου του κακάου σε κ-εξάνιο (4.4) ή κ-επτάνιο (4.5)

Α.1.4 **Στατική φάση**: OV-1 3 % επάνω σε υλικό Gas ChromQ των 125 μm έως 150 μm (100 έως 120 mesh) [1]

Σημείωση: Η ένδειξη του μεγέθους των κόκκων έχει μετατραπεί σε μικρόμετρα σύμφωνα με το πρότυπο BS 410 (όλα τα μέρη)[6].

Α.1.5 **Γυάλινη στήλη** υοειδούς σχήματος, εσωτερικής διαμέτρου 2 mm και μήκους 500 mm

Α.1.6 **Συσκευή** για την πλήρωση της στήλης

Α.1.6.1 **Στήλη πλήρωσης** με βιδωτά πώματα στα άκρα, που φέρει χαραγή μέχρι την οποία μπορεί να φθάσει η απαιτούμενη ποσότητα στατικής φάσης.

Α.1.6.2 **Λεπτό κόσκινο** με βροχίδες μεγέθους 100 μm περίπου και με βιδωτό πώμα, κατάλληλο για τη σφράγιση της γυάλινης στήλης σύμφωνα με το σχήμα Α.3

Α.1.6.3 Απενεργοποιημένος **σιλυλιωμένος υαλοβάμβακας**

Α.1.6.4 **Δονητής** για την ομοιόμορφη κατανομή της στατικής φάσης κατά την πλήρωση

Α.1.6.5 **Συσκευές σιλυλίωσης** για τη σιλυλίωση της γυάλινης επιφάνειας της στήλης

Α.1.6.6 *Φιάλη Woulff*

Α.1.6.7 *Αντλία αναρρόφησης νερού*

Α.2 ΣΙΛΥΛΙΩΣΗ (ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΓΥΑΛΙΝΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ)

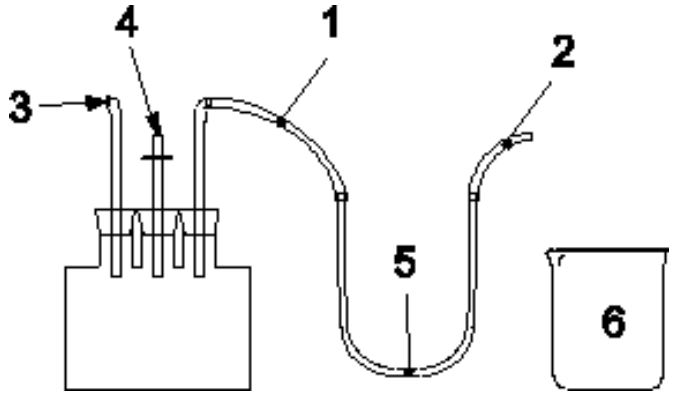
Αφού συνδεθεί η φιάλη Woulff (Α.1.6.6) με την αντλία αναρρόφησης νερού (Α.1.6.7), βυθίζεται ο σωλήνας 2 (βλέπε σχήμα Α.1) στο διάλυμα διμεθυλοχωροσιλανίου (Α.1.2). Πληρούται η στήλη (Α.1.5) με το διάλυμα αυτό κλείνοντας τη στρόφιγγα. Ανοίγεται η στρόφιγγα και αφαιρούνται οι δύο σωλήνες. Η στήλη στερεώνεται σε στήριγμα και συμπληρώνεται η πλήρωσή της με το διάλυμα διμεθυλοδιχλωροσιλανίου (Α.1.2) με τη βοήθεια σιφωνίου.

(1) Παράδειγμα κατάλληλου προϊόντος του εμπορίου. Η πληροφορία αυτή παρέχεται προς διευκόλυνση των χρηστών του παρόντος διεθνούς προτύπου και δεν συνιστά έγκριση του συγκεκριμένου προϊόντος από τον ISO ή την IDF.

▼B

Σχήμα Α.1

Συσκευή σιλυλίωσης



Κλείδα

1 σωλήνας 1

2 σωλήνας 2

3 αντλία αναρρόφησης νερού

4 στρόφιγγα

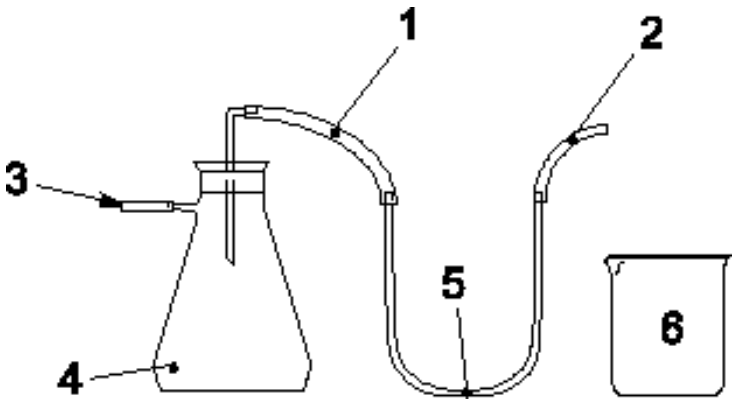
5 γυάλινη στήλη

6 διμεθυλοδιχλωροσιλάνιο και τολουόλιο

Αφήνεται η στήλη σε ηρεμία επί 20 έως 30 λεπτά. Στη συνέχεια η φιάλη Woulff αντικαθίσταται από κωνική φιάλη διήθησης και η στήλη κενώνεται συνδεόμενη με την αντλία αναρρόφησης νερού (Α.1.6.7) (βλέπε σχήμα Α.2). Η κενή στήλη εκπλύνεται διαδοχικά με 75 ml τολουολίου (Α.1.1) και 50 ml μεθανόλης (4.3) με βύθιση του σωλήνα 2 στον διαλύτη. Μετά την έκπλυσή της, η στήλη ξηραίνεται στον κλίβανο (5.6) στους 100 °C επί 30 λεπτά περίπου.

Σχήμα Α.2

Συσκευή έκπλυσης



Κλείδα

1 σωλήνας 1

2 σωλήνας 2

3 αντλία αναρρόφησης νερού

4 κωνική φιάλη διήθησης

5 γυάλινη στήλη

6 μέσο έκπλυσης

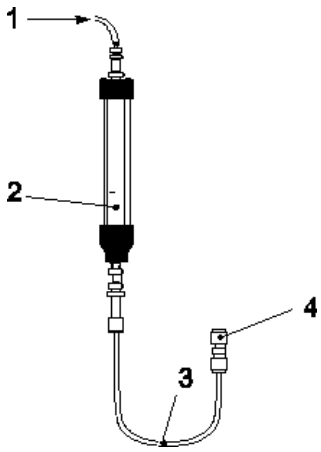
▼B

Α.3 ΠΛΗΡΩΣΗ

Η στήλη πληρούται με τη βοήθεια της συσκευής που απεικονίζεται στο σχήμα Α.3. Εισάγεται η στατική φάση (Α.1.4) στη στήλη πλήρωσης (Α.1.6.1) μέχρι τη χαραγή. Το κάτω άκρο της προς πλήρωση γυάλινης στήλης σφραγίζεται με βύσμα από σιλυλιωμένο συμπιεσμένο υαλοβάμβακα (Α.1.6.3), μήκους περίπου 1 cm. Κλείνεται το άκρο της στήλης με το λεπτό κόσκινο (Α.1.6.2).

Σχήμα Α.3

Πλήρωση της γυάλινης στήλης



Κλείδα

1 στόμιο εισόδου αζώτου

2 στήλη πλήρωσης, προς πλήρωση μέχρι τη χαραγή με υλικό OV-1

3 γυάλινη στήλη προς πλήρωση

4 βιδωτό πώμα με φίλτρο, προς το οποίο ωθούνται ο υαλοβάμβακας και η στατική φάση.

Πληρούται η στήλη με τη στατική φάση υπό πίεση (300 kPa και σε ρεύμα αζώτου). Για να επιτευχθεί ομοιόμορφη, συνεχής και σταθερή γόμωση, κινείται ένας δονητής παλινδρομικά μεταξύ των δύο άκρων της γυάλινης στήλης κατά την πλήρωση. Μετά την πλήρωση, ωθείται στο άλλο άκρο της στήλης στερεό βύσμα από σιλυλιωμένο υαλοβάμβακα (Α.1.6.3), αποκόπτονται τα άκρα που προεξέχουν και ωθείται το βύσμα μέσα στη στήλη για λίγα χιλιοστόμετρα με σπάτουλα.

Α.4 ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Κατά τη διάρκεια των σταδίων α) έως γ), το οπίσθιο άκρο της στήλης δεν πρέπει να συνδέεται με τον ανιχνευτή για την αποφυγή μόλυνσης. Η πληρωθείσα στήλη (Α.3) προσαρμόζεται ως εξής:

α) εκπλύνεται η στήλη με άζωτο επί 15 λεπτά, με ρύθμιση της ταχύτητας ροής στα 40 ml/min και της θερμοκρασίας του κλιβάνου αεριοχρωματογραφίας στους 50 °C·

β) θερμαίνεται η στήλη μέχρι τους 355 °C με ταχύτητα 1 °C/min, ενώ η ταχύτητα ροής του αζώτου έχει ρυθμιστεί στα 10 ml/min·

γ) η στήλη διατηρείται στους 355 °C επί 12 έως 15 ώρες·

δ) εισάγεται δύο φορές 1 μl διαλύματος βουτύρου του κακάου (Α.1.3), με τον προγραμματισμό θερμοκρασίας που υποδεικνύεται για την πληρωθείσα στήλη στο σημείο 7.3.4.1·

Σημείωση: Το βούτυρο του κακάου αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από τριγλυκερίδια C_{50}-C_{54} υψηλού σημείου ζέσεως και, ως εκ τούτου, μειώνει την προσπάθεια προσαρμογής της στήλης όσον αφορά τους αντίστοιχους συντελεστές απόκρισης.

▼B

ε) εισάγονται 20 φορές 0,5 μl διαλύματος λίπους γάλακτος (7.2) σε διάστημα 2-3 ημερών με τις ρυθμίσεις που υποδεικνύονται για την πληρωθείσα στήλη στο σημείο 7.3.4.1.

— Για την ανάλυση των δειγμάτων δοκιμής να χρησιμοποιούνται μόνο στήλες με συντελεστές απόκρισης που προσεγγίζουν τη μονάδα. Οι συντελεστές απόκρισης δεν πρέπει να υπερβαίνουν την τιμή 1,20.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

(πληροφοριακό)

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΞΕΝΩΝ ΛΙΠΩΝ

Β.1 ΓΕΝΙΚΑ

Στον πίνακα Β.1 εμφαίνονται τα όρια ανίχνευσης διαφόρων ξένων λιπών, υπολογισμένα με στάθμη εμπιστοσύνης 99 %. Η μεσαία στήλη δείχνει τα όρια ανίχνευσης για την καλύτερη μεταξύ των επιμέρους εξισώσεων (3) έως (6).

Τα όρια ανίχνευσης για τη συνολική εξίσωση (7), τα οποία εμφαίνονται στη δεξιά στήλη, είναι κάπως υψηλότερα. Η εξίσωση (7) χρειάζεται καταρχήν μόνο για τον προσδιορισμό της ποσότητας των ξένων λιπών.

Με όλες τις εξισώσεις μπορούν να ανιχνευθούν και συνδυασμοί διαφόρων ξένων λιπών. Η διακύμανση της σύστασης σε TG μεταξύ επιμέρους δειγμάτων του ίδιου είδους ξένου λίπους δεν επηρεάζει σημαντικά τα όρια ανίχνευσης.

Όταν χρησιμοποιούνται τόσο οι επιμέρους εξισώσεις όσο και η συνολική εξίσωση, ισχύουν τα όρια ανίχνευσης που αντιστοιχούν στις επιμέρους εξισώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις (Β.2), ωστόσο, χρειάζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό η τιμή S που προκύπτει από τη συνολική εξίσωση.

Πίνακας Β.1

Όρια ανίχνευσης, με εμπιστοσύνη 99 %, των ξένων λιπών που έχουν προστεθεί σε λίπος γάλακτος, σε ποσοστά επί τοις εκατό

Ξένο λίπος	Επιμέρους εξίσωση %	Συνολική εξίσωση %
Σογιέλαιο	2,1	4,4
Ηλιανθέλαιο	2,3	4,8
Ελαιόλαδο	2,4	4,7
Κοκκόλιπος	3,5	4,3
Φοινικέλαιο	4,4	4,7
Φοινικοπυρηνέλαιο	4,6	5,9
Κραμβέλαιο	2,0	4,4
Λινέλαιο	2,0	4,0
Σιτέλαιο	2,7	6,4
Αραβοσιτέλαιο	2,2	4,5
Βαμβακέλαιο	3,3	4,4
Χοιρινό λίπος (λαρδί)	2,7	4,7
Βόειο λίπος (στέαρ)	5,2	5,4
Υδρογονωμένο ιχθυέλαιο	5,4	6,1

Β.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

Εκτελείται ποσοτικός προσδιορισμός ξένων λιπών μόνο σε περίπτωση υπέρβασης ενός τουλάχιστον από τα όρια S (πίνακας 2 ή 5). Για να ληφθούν ποσοτικά στοιχεία, υπολογίζεται το κλάσμα μάζας ξένου λίπους ή μείγματος ξένων λιπών, w_f, εκφραζόμενο σε ποσοστό επί τοις εκατό, στο δείγμα δοκιμής με τη βοήθεια της ακόλουθης εξίσωσης:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(Β. 1)}$$

▼B

όπου:

S είναι το αποτέλεσμα που προκύπτει από την εισαγωγή, σε μία από τις εξισώσεις (3) έως (7), των δεδομένων για τα TG του λίπους γάλακτος στο οποίο έχει προστεθεί ξένο λίπος ή μείγμα ξένων λιπών

S_f είναι σταθερά εξαρτώμενη από το είδος του ξένου λίπους που έχει προστεθεί.

Εάν δεν είναι γνωστό το είδος του ξένου λίπους που έχει προστεθεί στο λίπος γάλακτος, χρησιμοποιείται η γενική τιμή S_f = 7,46 (πίνακας B.2) Πρέπει να χρησιμοποιείται πάντα η τιμή S που προκύπτει από τη εξίσωση (7), έστω και αν δεν έχει σημειωθεί υπέρβαση των ορίων που αντιστοιχούν σε αυτήν αλλά εκείνων που αντιστοιχούν σε άλλη εξίσωση.

Με γνωστά τα ξένα λίπη, εισάγονται οι οικείες επιμέρους τιμές S_f (πίνακας B.2) στην εξίσωση (B.1). Για τον υπολογισμό της S επιλέγεται μεταξύ των εξισώσεων (3) έως (6) η κατάλληλη για το συγκεκριμένο ξένο λίπος.

Πίνακας B.2

Τιμές Sf διαφόρων ξένων λιπών

Ξένο λίπος	S_f
Άγνωστο	7,46
Σογιέλαιο	8,18
Ηλιανθέλαιο	9,43
Ελαιόλαδο	12,75
Κοκκόλιπος	118,13
Φοινικέλαιο	7,55
Φοινικοπυρηνέλαιο	112,32
Κραμβέλαιο	3,30
Λινέλαιο	4,44
Σιτέλαιο	27,45
Αραβοσιτέλαιο	9,29
Βαμβακέλαιο	41,18
Χοιρινό λίπος (λαρδί)	177,55
Βόειο λίπος (στέαρ)	17,56
Ιχθυέλαιο	64,12

B.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

Βιβλιογραφία

1. Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft, 52, 1987, σελίδες 82-85*.

2. Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, *σελίδες* 16-17.

3. Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, *σελίδες* 265-270.

4. Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, *σελίδες* 791-797.

5. ISO 707IDF 50, *Milk and milk products — Guidance on sampling*.

▼B

6. BS 410:1988, *Test sieves — Technical requirements and testing*.

7. Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber*., 43, 1991, *σελίδες* 219-242.

8. Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol*., 93, 1991, *σελίδες* 538-544.

9. DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis].

10. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων: *Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat*. Έγγραφα αριθ. VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93.

11. Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, *σελίδες* 505-510.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXI

(Άρθρο 18)

ΕΦΑΡΜΟΣΤΕΑ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΑΜΦΙΣΒΗΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ)

1. Μετά από αίτημα του παραγωγού, διεξάγεται νέα ανάλυση, σε άλλο, εγκεκριμένο από την αρμόδια αρχή εργαστήριο με εφαρμογή της σχετικής μεθόδου, υπό τον όρο ότι υπάρχουν σφραγισμένα διπλά δείγματα του προϊόντος τα οποία φυλάσσονται καταλλήλως στην αρμόδια αρχή. Το αίτημα υποβάλλεται εντός προθεσμίας 7 εργασίμων ημερών από την κοινοποίηση των αποτελεσμάτων της πρώτης ανάλυσης. Η ανάλυση διεξάγεται εντός 21 εργασίμων ημερών από την παραλαβή του αιτήματος. Η αρμόδια αρχή αποστέλλει τα δείγματα αυτά σε δεύτερο εργαστήριο μετά από αίτημα και με έξοδα του παραγωγού. Το εργαστήριο αυτό πρέπει να είναι εξουσιοδοτημένο για τη διεξαγωγή επίσημων αναλύσεων και να έχει αποδεδειγμένη ικανότητα εκτέλεσης της συγκεκριμένης ανάλυσης.

2. Η διευρυμένη αβεβαιότητα ($k = 2$) του μέσου όρου $\overline{y}_1$ του πλήθους μετρήσεων n_1 στο εργαστήριο 1 και του μέσου όρου $\overline{y}_2$ του πλήθους μετρήσεων n_2 στο εργαστήριο 2 είναι

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1-\frac{1}{n_1}\right)}$ και $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1-\frac{1}{n_2}\right)}$, αντίστοιχα,

όπου σ_r είναι η τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας και σ_R η τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας της εκάστοτε μεθόδου. Εάν το τελικό αποτέλεσμα *y* της μέτρησης στα εργαστήρια υπολογίζεται από τύπο της μορφής $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot 2$ ή $y = x_1/x_2$, πρέπει να εφαρμόζονται οι συνήθεις στις περιπτώσεις αυτές διαδικασίες συνδυασμού των τυπικών αποκλίσεων για να προκύψει η αβεβαιότητα.

4. Για να ελεγχθεί αν τα αποτελέσματα των δύο εργαστηρίων είναι σύμφωνα με την τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας, σ_R, της μεθόδου, υπολογίζεται η διευρυμένη αβεβαιότητα της διαφοράς $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Εάν η απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των εργαστηρίων, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, δεν υπερβαίνει την αβεβαιότητά της, $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

τα αποτελέσματα των δύο εργαστηρίων είναι σύμφωνα με την τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας σ_r, και ο αριθμητικός μέσος των μέσων όρων των δύο εργαστηρίων

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2}$$

αναφέρεται ως το τελικό αποτέλεσμα. Η διευρυμένη αβεβαιότητα του εν λόγω αποτελέσματος είναι

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2-\frac{1}{n_1}-\frac{1}{n_2}\right)}.$$

Το φορτίο απορρίπτεται ως μη σύμφωνο με το νομοθετικά κατοχυρωμένο ανώτατο όριο *UL* εάν

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL$$

σε αντίθετη περίπτωση, γίνεται δεκτό ως σύμφωνο με το *UL*.

Το φορτίο απορρίπτεται ως μη σύμφωνο με το νομοθετικά κατοχυρωμένο κατώτατο όριο *LL* εάν

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL$$

σε αντίθετη περίπτωση, γίνεται δεκτό ως σύμφωνο με το *LL*.

Εάν η απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των εργαστηρίων, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, υπερβαίνει την αβεβαιότητά της, $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

τα αποτελέσματα των δύο εργαστηρίων δεν είναι σύμφωνα με την τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

Στην περίπτωση αυτή το φορτίο απορρίπτεται ως μη σύμφωνο, εάν η δεύτερη ανάλυση επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα της πρώτης· ειδάλλως γίνεται δεκτό ως σύμφωνο.

Το τελικό αποτέλεσμα πρέπει να κοινοποιείται στον παραγωγό από την αρμόδια αρχή το ταχύτερο δυνατόν. Εάν απορριφθεί το φορτίο, η δαπάνη της δεύτερης ανάλυσης βαρύνει τον παραγωγό.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXII

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΑΣ

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 213/2001	Παρών κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 1
Άρθρο 2	Άρθρο 1
Άρθρο 3	Άρθρο 2
—	Άρθρο 3
Άρθρο 4	—
Άρθρο 5	—
Άρθρο 6	Άρθρο 4
Άρθρο 7	Άρθρο 18
Άρθρο 8	—
Άρθρο 9	Άρθρο 5
Άρθρο 10	Άρθρο 6
Άρθρο 11	Άρθρο 7
Άρθρο 12	Άρθρο 8
Άρθρο 13	Άρθρο 9
Άρθρο 14	Άρθρο 10
Άρθρο 15	Άρθρο 11
Άρθρο 16	Άρθρο 12
Άρθρο 17	Άρθρο 13
—	Άρθρο 14
Άρθρο 18	Άρθρο 15
Άρθρο 19	Άρθρο 16
	Άρθρο 17
	Άρθρο 19
Άρθρο 20	—
Άρθρο 21	—
Άρθρο 22	Άρθρο 20
Άρθρο 23	Άρθρο 21