# ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 4154/87 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

**της 22ας Δεκεμβρίου 1987**

**για τον καθορισμό των μεθόδων ανάλυσης και άλλων διατάξεων τεχνικού χαρακτήρα που είναι απαραίτητες για την εφαρμογή του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 3033/80 του Συμβουλίου περί καθορισμού του καθεστώτος συναλλαγών που εφαρμόζονται σε ορισμένα εμπορεύματα που προέρχονται από τη μεταποίηση γεωργικών προϊόντων**

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2658/87 του Συμβουλίου της 23ης Ιουλίου 1987 για τη δασμολογική και στατιστική ονοματολογία και το κοινό δασμολόγιο [1], όπως τροποποιήθηκε από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3985/87 [2], και ιδίως το άρθρο 9,

Εκτιμώντας:

ότι ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1061/69 της Επιτροπής [3], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1822/86 [4] έχει καθορίσει τις μεθόδους ανάλυσης για την εφαρμογή του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 1059/69 του Συμβουλίου [5]· ότι ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1059/69 έχει καταργηθεί και αντικατασταθεί από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3033/80 του Συμβουλίου [6], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3743/87 [7]·

ότι οι λεπτομέρειες εφαρμογής του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 3033/80, σε ό,τι αφορά τις εισαγωγές, έχουν καθοριστεί με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3034/80 του Συμβουλίου της 11ης Νοεμβρίου 1980 περί καθορισμού των ποσοτήτων των προϊόντων βάσεως που θεωρούνται ότι έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή εμπορευμάτων τα οποία υπάγονται στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3033/80 περί τροποποιήσεως του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 950/80 περί κοινού δασμολογίου [8], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 4091/87 [9]·

ότι, προκειμένου να ληφθούν υπόψη οι επιστημονικές και τεχνικές εξελίξεις των μεθόδων ανάλυσης και να συνεχιστεί να εξασφαλίζεται μια ομοιόμορφη αντιμετώπιση κατά την εισαγωγή μέσα στην Κοινότητα των εμπορευμάτων στα οποία εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 3033/80, πρέπει να καταργηθεί και να αντικατασταθεί ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1061/69·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Επιτροπής Ονοματολογίας του Κοινού Δασμολογίου,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

*Άρθρο 1*

Ο παρών κανονισμός καθορίζει τις μεθόδους ανάλυσης που είναι αναγκαίες για την εφαρμογή των κανονισμών (ΕΟΚ) αριθ. 3033/80 (όσον αφορά τις εισαγωγές) και (ΕΟΚ) αριθ. 3034/80 ή, αντί μεθόδου ανάλυσης, τη φύση των απαιτούμενων αναλυτικών εργασιών ή την αρχή της μεθόδου που πρέπει να εφαρμοστεί.

*Άρθρο 2*

Σύμφωνα με τους ορισμούς που περιλαμβάνονται στο παράρτημα III του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 3034/80 σχετικά με άμυλο/γλυκόζη και σακχαρόζη/ιμβερτοποιημένο σάκχαρο/ισογλυκόζη και για την εφαρμογή των παραρτημάτων II και III του κανονισμού αυτού, οι ακόλουθοι τύποι και οι ακόλουθες διαδικασίες και μεθόδοι πρέπει να χρησιμοποιούνται:

1. *Περιεκτικότητα σε άμυλο/γλυκόζη:*

(εκφρασμένη ως ξηρό άμυλο 100 % επί του εμπορεύματος ως έχει)

α) (Z − F) × 0,9
όταν η περιεκτικότητα σε γλυκόζη υπερβαίνει ή είναι ίση με την περιεκτικότητα σε φρουκτόζη·

β) (Z − G) × 0,9
όταν η περιεκτικότητα σε γλυκόζη είναι μικρότερη από την περιεκτικότητα σε φρουκτόζη,

όπου:

Z = περιεκτικότητα σε γλυκόζη προσδιορισμένη με τη μέθοδο που περιγράφεται στο παράρτημα I του παρόντος κανονισμού,

F = περιεκτικότητα σε φρουκτόζη προσδιορισμένη με HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης),

G = περιεκτικότητα σε γλυκόζη προσδιορισμένη με HPLC.

Στην περίπτωση του στοιχείου α), όταν δηλώνεται η παρουσία προϊόντος υδρόλυσης της λακτόζης ή/και ανευρίσκονται ποσότητες λακτόζης και γαλακτόζης, μια περιεκτικότητα σε γλυκόζη ισοδύναμη με την περιεκτικότητα σε γαλακτόζη (προσδιορισμένη με HPLC) αφαιρείται από την περιεκτικότητα σε γλυκόζη (Z) πριν διεξαχθεί οποιοσδήποτε άλλος υπολογισμός.

---

(1) ΕΕ αριθ. L 256 της 7. 9. 1987, σ. 1.
(2) ΕΕ αριθ. L 376 της 31. 12. 1987, σ. 1.
(3) ΕΕ αριθ. L 141 της 12. 6. 1969, σ. 24.
(4) ΕΕ αριθ. L 158 της 13. 6. 1986, σ. 1.
(5) ΕΕ αριθ. L 141 της 12. 6. 1969, σ. 1.
(6) ΕΕ αριθ. L 323 της 29. 11. 1980, σ. 1.
(7) ΕΕ αριθ. L 352 της 15. 12. 1987, σ. 29.
(8) ΕΕ αριθ. L 323 της 29. 11. 1980, σ. 7.
(9) ΕΕ αριθ. L 382 της 31. 12. 1987, σ. 27.

2. *Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη/ιμβερτοσάκχαρο/ισογλυκόζη:*

(εκφρασμένη σε σακχαρόζη επί του εμπορεύματος ως έχει)

α) S + (2F) × 0,95
όταν η περιεκτικότητα σε γλυκόζη υπερβαίνει ή είναι ίση με την περιεκτικότητα σε φρουκτόζη·

β) S + (G + F) × 0,95
όταν η περιεκτικότητα σε γλυκόζη είναι μικρότερη από την περιεκτικότητα σε φρουκτόζη,

όπου:

S = περιεκτικότητα σε σακχαρόζη προσδιορισμένη με HPLC,

F = περιεκτικότητα σε φρουκτόζη προσδιορισμένη με HPLC,

G = περιεκτικότητα σε γλυκόζη προσδιορισμένη με HPLC.

Όταν δηλώνεται η παρουσία προϊόντος υδρόλυσης της λακτόζης ή/και ανευρίσκονται ποσότητες λακτόζης και γαλακτόζης, μια περιεκτικότητα σε γλυκόζη ισοδύναμη με την περιεκτικότητα σε γαλακτόζη (προσδιορισμένη με HPLC) αφαιρείται από τη περιεκτικότητα σε γλυκόζη (G) πριν διεξαχθεί οποιοσδήποτε άλλος υπολογισμός.

3. *Περιεκτικότητα σε λιπαρές ύλες γάλακτος:*

α) Με την επιφύλαξη των διατάξεων του στοιχείου β) που ακολουθεί, η κατά βάρος περιεκτικότητα του εμπορεύματος ως έχει σε λιπαρές ύλες γάλακτος προσδιορίζεται με εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα μετά από υδρόλυση με υδροχλωρικό οξύ.

β) Όταν δηλώνεται ότι στη σύνθεση του εμπορεύματος περιλαμβάνονται και άλλες λιπαρές ύλες εκτός εκείνων του γάλακτος, εφαρμόζεται η ακόλουθη διαδικασία:

— η κατά βάρος περιεκτικότητα (%) του εμπορεύματος ως έχει σε λιπαρή ύλη (ολική) προσδιορίζεται με τον τρόπο που αναφέρεται στο στοιχείο α) ανωτέρω,

— η κατά βάρος περιεκτικότητα (%) σε βουτυρικό οξύ της ολικής λιπαρής ύλης υπολογίζεται με τη μέθοδο IUPAC αριθ. 2310 (βλέπε Pure and applied Chemistry, αριθ. 10, σσ. 1419 έως 1428 του 1986),

— η κατά βάρος περιεκτικότητα (%) του εμπορεύματος στην αρχική του κατάσταση σε λιπαρές ύλες γάλακτος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την περιεκτικότητα % σε βουτυρικό οξύ της ολικής λιπαρής ύλης επί τον αριθμό 27, το αποτέλεσμα αυτό επί την κατά βάρος περιεκτικότητα (%) του εμπορεύματος ως έχει σε ολική λιπαρή ύλη και διαιρώντας το νέο αποτέλεσμα διά 100.

4. *Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες γάλακτος:*

α) Με την επιφύλαξη των διατάξεων του στοιχείου β) που ακολουθεί, η περιεκτικότητα του εμπορεύματος ως έχει σε πρωτεΐνες γάλακτος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την περιεκτικότητα σε άζωτο (προσδιορισμένη με τη μέθοδο Kjeldahl) επί τον συντελεστή 6,38.

β) Όταν δηλώνεται ότι στη σύνθεση του εμπορεύματος περιλαμβάνονται και άλλες πρωτεΐνες εκτός εκείνων του γάλακτος:

— η περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο προσδιορίζεται με τη μέθοδο Kjeldahl,

— η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες γάλακτος υπολογίζεται με τον τρόπο που αναφέρεται στο στοιχείο α) ανωτέρω, αφαιρώντας από την περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο την περιεκτικότητα σε άζωτο που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που δεν προέρχονται από το γάλα.

*Άρθρο 3*

Για την εφαρμογή του παραρτήματος I του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 3034/80 χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες μέθοδοι ή/και διαδικασίες:

1. Για την κατάταξη των προϊόντων που υπάγονται στις διακρίσεις 0403 10 51 έως 0403 10 59 και 0403 10 91 έως 0403 10 99 και 0403 90 71 έως 0403 90 79 και 0403 90 91 έως 0403 90 99 της συνδυασμένης ονοματολογίας, οι λιπαρές ύλες που προέρχονται από το γάλα προσδιορίζονται με τη μέθοδο που περιγράφεται στο άρθρο 2 παράγραφος 3.

2. Για την κατάταξη των προϊόντων που υπάγονται στις διακρίσεις 1704 10 11 έως 1704 10 99 και 1905 20 10 έως 1905 20 90 της συνδυασμένης ονοματολογίας, η σακχαρόζη, συμπεριλαμβανομένου και του ιμβερτοσακχάρου που υπολογίζεται ως σακχαρόζη, προσδιορίζεται με μια μέθοδο HPLC (σαν ιμβερτοποιημένο σάκχαρο νοείται το αριθμητικό άθροισμα ίσων ποσοτήτων γλυκόζης και φρουκτόζης πολλαπλασιασμένο επί 0,95).

3. Για την κατάταξη των προϊόντων που υπάγονται στις διακρίσεις 1806 10 10 έως 1806 10 90 της συνδυασμένης ονοματολογίας, η σακχαρόζη/το ιμβερτοσάκχαρο/η ισογλυκόζη προσδιορίζονται βάσει των τύπων, μεθόδων και διαδικασιών που αναφέρονται στο άρθρο 2 σημείο 2.

4. Για την κατάταξη των προϊόντων που υπάγονται στις διακρίσεις 3505 20 10 έως 3505 20 90 της συνδυασμένης ονοματολογίας, τα άμυλα κάθε είδους, οι δεξτρίνες ή τα άλλα τροποποιημένα άμυλα κάθε είδους προσδιορίζονται με τη μέθοδο που αναφέρεται στο παράρτημα II.

5. Για την κατάταξη των προϊόντων που υπάγονται στις διακρίσεις 3809 10 10 έως 3809 10 90 της συνδυασμένης ονοματολογίας, οι αμυλώδεις ύλες προσδιορίζονται με τη μέθοδο που αναφέρεται στο παράρτημα II.

6. Για την κατάταξη των προϊόντων που υπάγονται στις διακρίσεις 1901 90 11 και 1901 90 19 της συνδυασμένης ονοματολογίας, η διάκριση μεταξύ αυτών γίνεται βάσει του προσδιορισμού του ξηρού εκχυλίσματος ο οποίος πραγματοποιείται με ξήρανση σε θερμοκρασία 103 ± 2°C μέχρι σταθερού βάρους.

7. Για την κατάταξη των προϊόντων στις διακρίσεις 1902 19 10 και 1902 19 90 της συνδυασμένης ονοματολογίας, η παρουσία αλεύρων και αμύλων μαλακού σιταριού στα ζυμαρικά προσδιορίζεται με τη μέθοδο που αναφέρεται στο παράρτημα III του παρόντος κανονισμού.

8. Η περιεκτικότητα σε μαννίτη και D-γλυκιτόλη (σορβίτη) στα εμπορεύματα που υπάγονται στις διακρίσεις 2905 44 11 έως 2905 44 99 και 3823 60 11 έως 3823 60 99 της συνδυασμένης ονοματολογίας προσδιορίζεται με μέθοδο που βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

*Άρθρο 4*

1. Συντάσσεται δελτίο ανάλυσης.

2. Στο δελτίο της ανάλυσης πρέπει να αναφέρονται συγκεκριμένα:

— όλα τα στοιχεία που αφορούν την ταυτοποίηση του δείγματος,

— η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και τα ακριβή στοιχεία αναφοράς του νομικού κειμένου που την περιλαμβάνει ή, κατά περίπτωση, η αναφορά σε μια λεπτομερή μέθοδο στην οποία να περιλαμβάνεται η φύση των απαιτούμενων αναλυτικών εργασιών ή η αρχή μιας εφαρμοστέας μεθόδου όπως αυτές υποδεικνύονται στον παρόντα κανονισμό,

— τα στοιχεία που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα,

— τα αποτελέσματα της ανάλυσης, εκφρασμένα όπως απαιτείται από τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και όπως ορίζεται για τις ανάγκες των τελωνειακών υπηρεσιών ή των υπηρεσιών διαχείρισης που ζήτησαν τη διεξαγωγή της ανάλυσης.

*Άρθρο 5*

Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1061/69 καταργείται.

*Άρθρο 6*

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την 1η Ιανουαρίου 1988.

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

Βρυξέλλες, 22 Δεκεμβρίου 1987.

*Για την Επιτροπή*

COCKFIELD

*Αντιπρόεδρος*

*ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι*

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΜΥΛΑ, ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗ

1. **Θέμα και πεδίο εφαρμογής**

α) Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της κατά βάρος περιεκτικότητας σε άμυλα και προϊόντα αποικοδόμησής τους, περιλαμβανομένης και της γλυκόζης (στο εξής αναφερόμενα ως «άμυλο»).

β) Η περιεκτικότητα σε άμυλο, όπως ορίζεται στο στοιχείο α) είναι ίση με την τιμή Ε όπως αυτή υπολογίζεται στο σημείο 6 της παρούσας μεθόδου.

2. **Αρχή**

Το δείγμα υδρολύεται με υδροξείδιο του νατρίου και κατόπιν το άμυλο αποικοδομείται σε μονάδες γλυκόζης με τη βοήθεια αμυλογλυκοσιαδάζης. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης γίνεται με ενζυματική οδό.

3. **Αντιδραστήρια**

Χρησιμοποιείται δισαπεσταγμένο νερό.

3.1. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,5 N (0,5 mol/l).

3.2. Οξικό οξύ (παγόμορφο) 96 % τουλάχιστον.

3.3. Διάλυμα αμυλογλυκοσιδάζης:

Αμέσως πριν τη χρήση, διαλύστε περίπου 10 mg αμυλογλυκοσιδάζη (EC 3.2.1.3) (6 U/mg) μέσα σε 1 ml νερού (1).

3.4. Ρυθμιστικό διάλυμα τριαθανολαμίνης:

14,0 g υδροχλωρικής τριαθανολαμίνης [χλωρίδιο του αμμωνίου του τρις (2-υδροξυαιθυλίου)] και 0,25 g θειικού μαγνησίου ($MgSO_4 7H_2O$) διαλύονται σε 80 ml νερού. Προστίθενται περίπου 5 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 5 NaOH (c = 5 mol/l) και το pH ρυθμίζεται στα 7,6 με τη βοήθεια διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 1 N (1 mol/l). Προστίθεται νερό μέχρις ότου ληφθεί τελικός όγκος 100 ml. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα διατηρείται επί τέσσερις τουλάχιστον εβδομάδες στους 4 °C.

3.5. Διάλυμα NADP (Nicotinamide Adenine Dinicleotide phosphate άλας δινατρίου):

60 mg NADP διαλύονται σε 6 ml νερού. Το διάλυμα αυτό διατηρείται επί τέσσερις τουλάχιστον εβδομάδες στους 4 °C.

3.6. Διάλυμα ATP (Adenosine-5'-Triphosphate άλας δινατρίου):

300 mg ATP και 300 mg όξινου ανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3$) διαλύονται σε 6 ml νερού. Το διάλυμα αυτό διατηρείται επί τέσσερις τουλάχιστον εβδομάδες στους 4 °C.

3.7. Εναιώρημα HK/G6P-DH (Hexokinase — EC 2.7.1.1) και G6 P-DH (Glycose-6-Phosphate déhydrogénase (EC 1.1.1.49):

Σχηματίστε εναιώρημα ως εξής: 280 U HK και 140 U G6P-DH προστίθενται σε 1 ml διαλύματος θειικού αμμωνίου, (c = 3,2 mol/l). Το εναιώρημα που σχηματίζεται διατηρείται επί ένα τουλάχιστον έτος στους 4 °C.

4. **Εξοπλισμός**

4.1. Μαγνητικός αναδευτήρας με υδατόλουτρο στους 60 °C.

4.2. Μαγνητικές ράβδοι.

4.3. Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους, με κυψελίδες 1 cm.

4.4. Σιφώνια για ενζυματική ανάλυση.

5. **Τρόπος εργασίας**

5.1. *Διάσπαση με υδροξείδιο του νατρίου και ενζυματική υδρόλυση του «αμύλου»*

5.1.1. Ανάλογα με την αναμενόμενη, περιεκτικότητα σε «άμυλο», επιλέγονται οι ακόλουθες ποσότητες. (Η περιεκτικότητα σε «άμυλο» δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 0,4 g ανά ζυγισμένη ποσότητα):

(1) Όπου U είναι η διεθνής μονάδα ενζυματικής δράσης.

| Αναμενόμενη περιεκτικότητα του προϊόντος σε «άμυλο» (g/100 g) | Ζυγισθείσα κατά προσέγγιση ποσότητα σε g (p) | Όγκος της ογκομετρικής φιάλης (ml) | Συντελεστής (f) αραίωσης μέχρι II |
|---|---|---|---|
| > 70 | 0,35-0,4 | 500 | 2 |
| 20-70 | έως 0,5 | 500 | 2 |
| 5-20 | έως 1 | 250 | 4 |
| < 5 | έως 2 | 200 | 5 |

5.1.2. Το δείγμα ζυγίζεται με ακρίβεια μέχρι 0,1 mg σε ποτήρι.

5.1.3. Προστίθενται 50 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (c = 0,5 mol/l) (3.1) και αναδεύεται συνεχώς επί 30 λεπτά στο υδατόλουτρο του μαγνητικού αναδευτήρα που διατηρείται στους 60 °C (4.1).

5.1.4. Το pH ρυθμίζεται στα 4,6-4,8 με λίγα ml πυκνού οξικού οξέος (3.2).

5.1.5. Το ποτήρι τοποθετείται στο υδατόλουτρο του μαγνητικού αναδευτήρα στους 60 °C (4.1), 1,0 ml διαλύματος ενζύμου (3.3) το οποίο αφήνεται να δράσει επί 30 λεπτά υπό ανάδευση.

5.1.6. Αφού ψυχθεί, το περιεχόμενο του σωλήνα μεταγγίζεται στην ενδεδειγμένη ογκομετρική φιάλη και προστίθεται δισαπεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

5.1.7. Αν είναι αναγκαίο ακολουθεί διήθηση με πτυχωτό ηθμό (δλέπε παρατήρηση 1).

5.2. *Προσδιορισμός της γλυκόζης*

5.2.1. Το διάλυμα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει 100 έως 1 000 mg γλυκόζης ανά λίτρο, πράγμα που αντιστοιχεί σε $\Delta E_{340}$ μέχρι 1,0.

Το διάλυμα της δοκιμασίας, αραιωμένο με νερό σε μια αναλογία 1 + 30, δεν θα πρέπει να παρουσιάζει απορρόφηση μεγαλύτερη από 0,4 (μετρούμενη έναντι του αέρα).

5.2.2. Το ρυθμιστικό διάλυμα (3.4) φέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C).

5.2.3. Η θερμοκρασία των αντιδραστηρίων και του δείγματος πρέπει να είναι μεταξύ 20 έως 25 °C.

5.2.4. Μετράται η απορρόφηση στα 340 nm έναντι του αέρα (στην οπτική διαδρομή αναφοράς δεν τοποθετείται κυψελίδα).

5.2.5. Για την εκτέλεση της δοκιμασίας λαμβάνονται οι κατωτέρω ποσότητες και ακολουθείται η εξής διαδικασία:

| Εισάγονται στις κυψελίδες | Τυφλός προσδιορισμός (ml) | Δοκιμασία (ml) |
|---|---|---|
| Ρυθμιστικό διάλυμα (3.4) | 1,00 | 1,00 |
| NADP (3.5) | 0,10 | 0,10 |
| ATP (3.6) | 0,10 | 0,10 |
| Διάλυμα της δοκιμασίας (5.1.6 ή 5.1.7) | — | 0,10 |
| Δισαπεσταγμένο νέρο | 2,00 | 1,90 |

Ανάμειξη, μέτρηση της απορρόφησης ($E_1$) των διαλυμάτων μετά από τρία λεπτά περίπου. Προκαλείται αντίδραση με την προσθήκη:

| | | |
|---|---|---|
| HK/G6P.DH (3.7) | 0,02 | 0,02 |

Ανάμειξη, αναμονή μέχρι το τέλος της αντίδρασης (περίπου 15 λεπτά) και μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων ($E_2$). Εάν η αντίδραση δεν έχει τελειώσει μετά 15 λεπτά, συνεχίστε την ανάγνωση των απορροφήσεων κάθε πέντε λεπτά μέχρις ότου η αύξηση της απορρόφησης να είναι σταθερή επί πέντε λεπτά, και ακολούθως αναγάγετε την απορρόφηση στη στιγμή της προσθήκης του αντιδραστηρίου 3.7 (δλέπε παρατήρηση 2).

5.2.6. Για τον τυφλό προσδιορισμό υπολογίζεται η διαφορά απορρόφησης $E_2 - E_1$. Η διαφορά απορρόφησης που αντιστοιχεί στον τυφλό προσδιορισμό αφαιρείται από τη διαφορά απορρόφησης της κανονικής δοκιμασίας (= ΔE):

$$\Delta E = \Delta E_{\text{τυφλού προσδιορισμού}} - \Delta E_{\text{κανονικής δοκιμασίας}}$$

Από το αποτέλεσμα της αφαίρεσης αυτής προκύπτει η περιεκτικότητα του διαλύματος της δοκιμασίας σε γλυκόζη:

*Γλυκόζη σε g/l του διαλύματος δοκιμασίας*

$$Gl = \frac{3,22 \times 180,16}{6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1\,000} \times \Delta E_{340} = 0,921 \times \Delta E_{340}$$

(3,22 = όγκος του προς μέτρηση διαλύματος (ml), 1 = διαδρομή φωτός μέσα στην κυψελίδα (cm), 0,1 = όγκος του διαλύματος του δείγματος (ml), 180,16 = μοριακό βάρος της γλυκόζης (g/mol)

5.2.7. Εάν η μέτρηση της απορρόφησης στα 340 nm δεν είναι δυνατή, η μέτρηση μπορεί να γίνει στο μήκος κύματος 365 nm ή 334 nm. Σε αυτή την περίπτωση ο αριθμός 6,3 του τύπου Gl ανωτέρω πρέπει να αντικατασταθεί με τον αριθμό 3,5 ή 6,18 αντιστοίχως.

6. **Υπολογισμός και έκφραση των αποτελεσμάτων**

α) περιεκτικότητα σε «άμυλο» (E) (g/100 g):

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

β) περιεκτικότητα σε γλυκόζη (Z) (g/100 g):

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

όπου:

Gl = γλυκόζη σε (g/l) (5.2.6),

f = συντελεστής αραίωσης (5.1.1),

p = ζυγισθείσα ποσότητα δείγματος (g),

0,9 = συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε άμυλο.

*Παρατηρήσεις*

1. Σε περίπτωση που διαπιστώνεται ότι το διάλυμα δεν μπορεί να διηθηθεί σύμφωνα με το σημείο 5.1.7, ο χημικός παίρνει τα κατάλληλα μέτρα.
2. Σε περίπτωση που διαπιστώνεται αδρανοποίηση των ενζύμων, συνιστάται να εφαρμοστεί η μέθοδος «γνωστής περιεκτικότητας προσθηκών» χρησιμοποιώντας καθαρό άμυλο.

*ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II*

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΜΥΛΑ ΚΑΘΕ ΕΙΔΟΥΣ, ΔΕΞΤΡΙΝΗ Ή ΑΛΛΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΑΜΥΛΑ ΚΑΘΕ ΕΙΔΟΥΣ, ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΕΜΠΟΡΕΥΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΚΡΙΣΕΩΝ 3505 20 10 ΕΩΣ 3505 20 90 ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΕ ΑΜΥΛΩΔΕΙΣ ΥΛΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΕΜΠΟΡΕΥΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΚΡΙΣΕΩΝ 3809 10 10 ΕΩΣ 3809 10 90 ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ**

I. **Αρχή**

Με όξινη υδρόλυση, το άμυλο μετατρέπεται σε ανάγοντα σάκχαρα, τα οποία μετρούνται ογκομετρικά με το υγρό του Fehling.

II. **Όργανα και αντιδραστήρια**

1. Φιάλη των 250 περίπου χιλιοστών του λίτρου.
2. Φιάλη ογκομετρική των 200 περίπου χιλιοστών του λίτρου.
3. Προχοΐδα βαθμολογημένη των 25 περίπου χιλιοστών του λίτρου.
4. Υδροχλωρικό οξύ πυκνότητας 1,19.
5. Διάλυμα καυστικού καλίου.
6. Άνθρακας για αποχρωματισμό.
7. Υγρό του Fehling.
8. Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 1%.

III. **Τρόπος εργασίας**

Μέσα σε φιάλη των 250 περίπου χιλιοστών του λίτρου εισάγεται ποσότητα δείγματος που αντιστοιχεί σε ποσότητα αμύλου 1 γραμμαρίου. Προστίθενται 100 χιλιοστά του λίτρου απεσταγμένου νερού και 2 χιλιοστά του λίτρου υδροχλωρικού οξέος. Βράζεται με ψυκτήρα επί τρεις ώρες.

Το περιεχόμενο της φιάλης, καθώς και το προϊόν της έκπλυσής της, τοποθετείται μέσα σε ογκομετρική φιάλη 200 χιλιοστών του λίτρου και προστίθεται το διάλυμα καυστικού καλίου μέχρις αντιδράσεως ελαφρά όξινης. Συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 200 χιλιοστά του λίτρου με απεσταγμένο νερό και διηθείται το σύνολο πάνω από άνθρακα αποχρωματισμού.

Στη συνέχεια, φέρεται το διάλυμα μέσα σε βαθμολογημένη προχοΐδα και πραγματοποιείται αναγωγή 10 χιλιοστών του λίτρου υγρού του Fehling σύμφωνα με την ακόλουθη μέθοδο:

Μέσα σε φιάλη με επίπεδο πυθμένα των 250 περίπου χιλιοστών του λίτρου τίθενται 10 περίπου χιλιοστά του λίτρου υγρού του Fehling (5 χιλιοστά του λίτρου διαλύματος Α και 5 χιλιοστά του λίτρου διαλύματος Β). Ανακινείται μέχρις ότου επιτευχθεί διαυγές διάλυμα και, στη συνέχεια, προστίθενται 40 χιλιοστά του λίτρου απεσταγμένου νερού καθώς και μικρή ποσότητα χαλαζία ή κίσηρης.

Τίθεται η φιάλη πάνω σε πλάκα από αμίαντο σχήματος τετραγώνου, η οποία έχει διατρηθεί στο μέσο της με άνοιγμα κυκλικό, διαμέτρου 6 εκατοστομέτρων περίπου και στηρίζεται πάνω σε μεταλλικό πλέγμα. Η φιάλη θερμαίνεται με τρόπο ώστε το υγρό να αρχίζει να βράζει ύστερα από δύο λεπτά περίπου.

Στο υγρό που βράζει προστίθενται με τη βοήθεια προχοΐδας, διαδοχικές ποσότητες του διαλύματος σακχάρων, μέχρις ότου το κυανό χρώμα του υγρού του Fehling μόλις διακρίνεται. Προστίθενται τότε, σαν δείκτης, δύο ή τρεις σταγόνες διαλύματος κυανού του μεθυλενίου και, στη συνέχεια, συμπληρώνεται η ογκομέτρηση προσθέτοντας, σταγόνα σταγόνα, νέα ποσότητα του διαλύματος σακχάρων, μέχρις ότου εξαφανιστεί το κυανό χρώμα του δείκτη.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια, επαναλαμβάνεται η ογκομέτρηση με τις ίδιες συνθήκες, προσθέτοντας, όμως, μονομιάς το σύνολο σχεδόν του διαλύματος σακχάρων που απαιτείται για την αναγωγή του υγρού του Fehling. Σε αυτή τη δεύτερη ογκομέτρηση, η αναγωγή του υγρού του Fehling πρέπει να γίνει μέσα σε χρονικό διάστημα τριών λεπτών.

Συνεχίζεται ο βρασμός επί δύο λεπτά ακριβώς. Κατά τη διάρκεια του τρίτου λεπτού ογκομετρούμε σταγόνα σταγόνα, μέχρις ότου εξαφανιστεί το κυανό χρώμα του δείκτη.

Το ποσοστό κατά βάρος σε άμυλο του δείγματος προσδιορίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

T = εκφράζει την ποσότητα σε γραμμάρια της άνυδρης δεξτρόζης που αντιστοιχεί σε 10 χιλιοστά του

λίτρου υγρού του Fehling (5 χιλιοστά του λίτρου διαλύματος Α και 5 χιλιοστά του λίτρου διαλύματος Β). Ο τίτλος αυτός ισούται με 0,04945 γραμμάρια άνυδρης δεξτρόζης, όταν το διάλυμα Α περιέχει 17,636 γραμμάρια χαλκού ανά λίτρο,

n = εκφράζει τον αριθμό χιλιοστών του λίτρου του διαλύματος σακχάρων που χρησιμοποιήθηκε για την ογκομέτρηση,

p = εκφράζει το βάρος της ποσότητας του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό,

0,95 = εκφράζει το συντελεστή μετατροπής της άνυδρης δεξτρόζης σε άμυλο.

IV. **Παρασκευή του υγρού του Fehling**

Διάλυμα Α: Διαλύονται μέσα σε ογκομετρική φιάλη, με τη βοήθεια απεσταγμένου νερού, 69,278 γραμμάρια θειϊκού κρυσταλλικού χαλκού αναλυτικής καθαρότητας ($CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$), απαλλαγμένου από σίδηρο, και φέρεται το διάλυμα στον όγκο ενός λίτρου με τη βοήθεια απεσταγμένου νερού. Ο ακριβής τίτλος του διαλύματος αυτού πρέπει να επαληθευθεί με ποσοτικό προσδιορισμό του χαλκού.

Διάλυμα Β: Διαλύονται, μέσα σε ογκομετρική φιάλη, με τη βοήθεια απεσταγμένου νερού, 100 γραμμάρια υδροξειδίου του νατρίου και 346 γραμμάρια διπλού τρυγικού άλατος νατρίου και καλίου (άλατος του Seignette) και φέρεται το διάλυμα στον όγκο ενός λίτρου με τη βοήθεια απεσταγμένου νερού.

Τα δυό διαλύματα Α και Β πρέπει να αναμειχθούν σε ίσους όγκους αμέσως πριν από τη χρήσή τους. 10 χιλιοστά του λίτρου υγρού του Fehling (5 χιλιοστά του λίτρου διαλύματος Α και 5 χιλιοστά του λίτρου διαλύματος Β) ανάγονται πλήρως, αν η εργασία γίνει με τις συνθήκες που αναφέρονται στο σημείο III, με 0,04945 γραμμάρια άνυδρης δεξτρόζης.

*ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III*

## ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΑΛΕΥΡΟΥ Ή ΣΙΜΙΓΔΑΛΙΟΥ ΑΠΟ ΜΑΛΑΚΟ ΣΙΤΑΡΙ ΣΤΑ ΖΥΜΑΡΙΚΑ

(Σύμφωνα με τη μέθοδο Young και Gilles, όπως τροποποιήθηκε από τους Bernaerts και Gruner)

I. **Αρχή**

Παρασκευάζεται εκχύλισμα από το δείγμα των ζυμαρικών που είναι για ανάλυση χρησιμοποιώντας ένα μη πολικό διαλύτη.

Αυτό το εκχύλισμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία σε λεπτή στιβάδα κολλοειδούς πήγματος διοξειδίου του πυριτίου, με τρόπο ώστε να διαχωριστούν οι υπάρχουσες στερόλες σε διάφορα κλάσματα υπό μορφή ταινιών.

Ανάλογα με τον αριθμό των εντόνων ταινιών που αποκαλύπτονται, είναι δυνατό να προσδιοριστεί αν το εξεταζόμενο προϊόν έχει παρασκευαστεί είτε αποκλειστικά από σκληρό ή μαλακό σιτάρι, είτε από μείγμα αυτών των δύο προϊόντων. Επίσης, είναι δυνατό να προσδιοριστεί αν έχουν προστεθεί αυγά σ' αυτές τις πρώτες ύλες.

II. **Όργανα και αντιδραστήρια**

1. Ομοιογενοποιητική ή αλεστική συσκευή, με την οποία επιτυγχάνεται άλεσμα, το προϊόν του οποίου περνάει μέσα από τυποποιημένο κόσκινο με άνοιγμα 6ροχίδων 0,200 χιλιοστόμετρα.
2. Κόσκινο τυποποιημένο με άνοιγμα 6ροχίδων 0,200 χιλιοστόμετρα.
3. Συμπυκνωτής υπό ελαττωμένη πίεση με υδρόλουτρο.
4. Πλάκα από γυαλί, φύλλο από αλουμίνιο ή άλλη κατάλληλη 6άση διαστάσεων 20 εκατοστόμετρα × 20 εκατοστόμετρα, καλυμμένη από λεπτή στιβάδα κολλοειδούς πήγματος διοξειδίου του πυριτίου. Αν παρασκευάσουμε οι ίδιοι τη λεπτή στιβάδα, θα χρησιμοποιήσουμε κολλοειδές πήγμα διοξειδίου του πυριτίου, αναμειγμένο κατά 13 % με γύψο και θα την αποθέσουμε στην γυάλινη πλάκα σε στρώμα πάχους 0,25 χιλιοστομέτρων, με κατάλληλη συσκευή και σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.
5. Μικροσιφώνιο που επιτρέπει τη μέτρηση 20 μικρολίτρων.
6. Θάλαμος με σκέπασμα κατάλληλος για την εμφάνιση χρωματογραφημάτων.
7. Διάταξη ραντισμού.
8. Πετρελαϊκός αιθέρας με σημείο 6ρασμού που περιλαμ6άνεται μεταξύ 40 και 60 °C, επαναπεσταγμένος πριν από τη χρήση.
9. Άνυδρος αιθυλικός αιθέρας, αναλυτικής καθαρότητας.
10. Τετραχλωράνθρακας για χρωματογραφίες επαναπεσταγμένος πριν από τη χρήση.
11. Φωσφορομολυ6δαινικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας.
12. Αιθυλική αλκοόλη 94°.

III. **Μέθοδος εργασίας**

Αλέθεται μια εικοσάδα γραμμαρίων του δείγματος για ανάλυση, με τρόπο ώστε να περάσουν στο σύνολό τους μέσα από το κόσκινο. Εισάγεται η αλεσμένη ποσότητα μέσα σε φιάλη Erlenmeyer και καλύπτεται με 150 χιλιοστά του λίτρου πετρελαϊκού αιθέρα. Εκτίθεται σε θερμοκρασία περι6άλλοντος μέχρι την επόμενη ημέρα και ανακινείται από καιρό σε καιρό.

Στη συνέχεια διηθείται με χωνί Büchner, εφοδιασμένο με στρώση 6οηθητικού διήθησης, ή μέσα από πτυχωτό φίλτρο. Μεταγγίζεται λίγο λίγο το διαυγές διάλυμα που λαμ6άνεται μέσα σε προζυγισμένη φιάλη των 100 χιλιοστών του λίτρου. Το διαλυτικό υγρό με ελαττωμένη πίεση εξατμίζεται, και θερμαίνεται η φιάλη σε υδρόλουτρο στους 40° έως 50 °C. Μετά την εξάτμιση του διαλυτικού υγρού, εξακολουθεί η θέρμανση με ελαττωμένη πίεση επί 10 λεπτά. Μετά την ψύξη της φιάλης, προσδιορίζεται το 6άρος του εκχυλίσματος. Διαλύεται το εκχύλισμα μέσα σε αιθυλικό αιθέρα σε αναλογία ενός χιλιοστού του λίτρου αιθυλικού αιθέρα προς 60 χιλιοστά του γραμμαρίου εκχυλίσματος.

Ενεργοποιούνται οι λεπτές στιβάδες, σε θερμοκρασία 130 °C επί τρεις ώρες. Αφήνονται να ψυχθούν σε ξηραντήρα που περιέχει κολλοειδές πήγμα διοξειδίου του πυριτίου. Οι πλάκες που δεν χρησιμοποιούνται αμέσως διατηρούνται μέσα στον ίδιο ξηραντήρα.

Τίθενται σε στιβάδα, κατά προτίμηση πρόσφατα ενεργοποιημένη, 20 μικρόλιτρα του διαυγούς διαλύματος υπό μορφή ταινίας σταθερού πλάτους 3 εκατοστομέτρων που πραγματοποιείται από αλληλοεπικαλυπτόμενα σταγονίδια. Αφήνεται το διαλυτικό υγρό να εξατμιστεί.

Εμφανίζεται το χρωματογράφημα σε θερμοκρασία περι6άλλοντος με τον τετραχλωράνθρακα, χρησιμοποιώντας χρωματογραφικό θάλαμο επικαλυμμένο στα τοιχώματά του με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με διαλυτικό υγρό. Μετά μία ώρα περίπου, το διαλυτικό υγρό έχει φθάσει σε ύψος 18 εκατοστομέτρων. Αφαιρείται η πλάκα και εκτίθεται για να εξατμιστεί το διαλυτικό υγρό στον αέρα. Εμφανίζεται για δεύτερη φορά το χρωματογράφημα, με τρόπο ώστε να διαχωριστούν καλλίτερα οι ταινίες. Εκτίθεται εκ νέου η πλάκα για να εξατμιστεί το διαλυτικό υγρό στον αέρα.

Ραντίζεται η λεπτή στιβάδα κολλοειδούς πήγματος διοξειδίου του πυριτίου με διάλυμα 20 % φωσφορομολυ6δαινικού οξέος σε αιθυλική αλκοόλη. Το χρώμα της στιβάδας πρέπει να είναι ομοιόμορφα κίτρινο. Εμφανίζονται οι ταινίες, θέτοντας τη ραντισμένη πλάκα επί πέντε λεπτά σε 110 °C.

IV. **Αξιολόγηση του χρωματογραφήματος**

Αν το χρωματογράφημα παρουσιάσει μία μόνο έντονη κύρια ταινία που έχει Rf 0,4-0,5 περίπου, το σιτάρι που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του ζυμαρικού είναι σκληρό σιτάρι. Αν, αντίθετα, εμφανιστούν δύο κύριες ταινίες ίσης έντασης, η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε είναι σιτάρι μαλακό. Τα μείγματα σκληρού και μαλακού σιταριού μπορούν να αξιολογηθούν εκτιμώντας τη σχετική ένταση των δύο ταινιών.

Αν διαπιστωθεί η ύπαρξη τριών ταινιών (δύο ταινιών στο ύψος των κυρίων ταινιών μαλακού σιταριού και μιας ενδιάμεσης ταινίας), υπάρχει προσθήκη αυγών στο ζυμαρικό. Σ' αυτή την περίπτωση, η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε είναι σιτάρι σκληρό, εξόσον η ανώτερη ταινία είναι λιγότερο έντονη από την ενδιάμεση ταινία. Αντίθετα, αν η ανώτερη ταινία είναι εντονότερη από την ενδιάμεση ταινία, η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε είναι σιτάρι μαλακό.