

I

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων απαιτείται δημοσίευση)

**ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 213/2001 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ
της 9ης Ιανουαρίου 2001****για τη θέσπιση λεπτομερειών εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999, όσον αφορά τις μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και την αξιολόγηση της ποιότητας του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων και για την τροποποίηση των κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 2771/1999 και (ΕΚ) αριθ. 2799/1999**

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

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 14,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Οι κανονισμοί της Επιτροπής (ΕΟΚ) αριθ. 1216/68, (ΕΟΚ) αριθ. 3942/92, (ΕΚ) αριθ. 86/94, (ΕΚ) αριθ. 2721/95, (ΕΚ) αριθ. 1080/96, (ΕΚ) αριθ. 1081/96, (ΕΚ) αριθ. 1082/96, (ΕΚ) αριθ. 1854/96, (ΕΚ) αριθ. 880/98 και (ΕΚ) αριθ. 1459/98, οι πλήρεις αναφορές στους οποίους εμφανίζονται στο παράρτημα XXVI του παρόντος κανονισμού καθορίζουν τις μεθόδους αναφοράς και τις συνήθειες μεθόδους για την ανάλυση και την αξιολόγηση της ποιότητας του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και το πεδίο και τους κανόνες εφαρμογής των εν λόγω μεθόδων. Για λόγους σαφήνειας, προκειμένου να παρασχεθεί στους συναλλασσόμενους του τομέα ένα ενιαίο σώμα των εν λόγω μεθόδων και κανόνων για την εφαρμογή τους, πρέπει να πραγματοποιηθεί ανασύνταξη των προαναφερθέντων κανονισμών, συγκεντρώνοντάς τους σε ένα μόνο κείμενο. Με τον ίδιο σκοπό, πρέπει να τροποποιηθούν οι κανονισμοί της Επιτροπής (ΕΚ) αριθ. 2771/1999, της 16ης Δεκεμβρίου 1999, περί λεπτομερειών εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 του Συμβουλίου όσον αφορά τα μέτρα παρέμβασης στην αγορά του βουτύρου και της κρέμας γάλακτος⁽²⁾ και (ΕΚ) αριθ. 2799/1999, της 17ης Δεκεμβρίου 1999, για λεπτομέρειες εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 όσον αφορά τη χορήγηση ενίσχυσης στο αποκορυφωμένο γάλα και στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που προορίζονται για τη διατροφή ζώων και για την πώληση του εν λόγω αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη⁽³⁾, με σκοπό

την ενσωμάτωση στον παρόντα κανονισμό των παραρτημάτων τους που αφορούν τις μεθόδους ανάλυσης.

- (2) Τα χαρακτηριστικά σύνδεσης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν καθοριστεί στο πλαίσιο των καθεστώτων που προβλέπονται από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 πρέπει να επαληθευθούν προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι είναι απόλυτα σύμφωνα με τις καθορισθείσες απαιτήσεις.
- (3) Έχει συχνά οριστεί ότι οι μέθοδοι αναφοράς που χρησιμοποιούνται για τέτοιου είδους επαληθεύσεις είναι μέθοδοι που δημοσιεύονται από διεθνείς οργανισμούς όπως CEN, IDF, ISO και AOAC International και που ενημερώνονται κατά τακτά χρονικά διαστήματα από τους οργανισμούς αυτούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μία κοινοτική μέθοδος αναφοράς έχει καθορισθεί· σε άλλες περιπτώσεις, δεν υφίσταται καμία ειδική μέθοδος αναφοράς στην κοινοτική νομοθεσία. Με σκοπό να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία στην εφαρμογή των μεθόδων αναφοράς, πρέπει να καταρτίζεται κάθε έτος ένας πίνακας μεθόδων αναφοράς και να διευκρινίζεται ότι η προς εφαρμογή μέθοδος πρέπει να εμφανίζεται στον πίνακα αυτό.
- (4) Η εφαρμογή των συνήθων μεθόδων δεν πρέπει να αποκλεισθεί· οι όροι χρησιμοποίησής τους πρέπει ως εκ τούτου να καθοριστούν επακριβώς.
- (5) Προκειμένου να καθιερωθεί μία ενιαία πρακτική για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων, πρέπει επίσης να καθοριστούν κοινές μέθοδοι. Το ίδιο ισχύει για την οργανοληπτική αξιολόγηση των σχετικών προϊόντων και για την επανεξέταση των αποτελεσμάτων που έχουν αποτελέσει αντικείμενο αμφισβήτησης.
- (6) Για να πραγματοποιηθούν ορισμένες αναλύσεις δεν υφίσταται επί του παρόντος διεθνώς αναγνωρισμένες μέθοδοι αναφοράς, οι οποίες να έχουν επικυρωθεί. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει καμία διαθέσιμη πληροφορία όσον αφορά τις αποκλίσεις των αποτελεσμάτων ανάλυσης από το ένα εργαστήριο στο άλλο. Πρέπει επομένως να καθοριστούν μέθοδοι σε κοινοτικό επίπεδο, οι οποίες να έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τους κανόνες που έχουν διεθνώς θεσπιστεί και οι οποίες εφαρμόζονται ως μέθοδοι αναφοράς.

⁽¹⁾ ΕΕ L 160 της 26.6.1999, σ. 48.⁽²⁾ ΕΕ L 333 της 24.12.1999, σ. 11.⁽³⁾ ΕΕ L 340 της 31.12.1999, σ. 3.

- (7) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2571/97 της Επιτροπής της 15ης Δεκεμβρίου 1997 σχετικά με την πώληση σε μειωμένη τιμή βουτύρου και τη χορήγηση ενίσχυσης στην κρέμα γάλακτος, στο βούτυρο και στο συμπυκνωμένο βούτυρο που προορίζονται για την παρασκευή προϊόντων ζαχαροπλαστικής, παγωτών και άλλων προϊόντων διατροφής⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 635/2005⁽²⁾, προβλέπει, σε ορισμένες περιστάσεις, την ιχνοθέτηση της κρέμας, του βουτύρου και του συμπυκνωμένου βουτύρου για να εξασφαλιστεί μία σωστή τελική χρήση των προϊόντων αυτών. Λαμβανομένης υπόψη της σημασίας της ιχνοθέτησης για την καλή λειτουργία του καθεστώτος και προκειμένου να εξασφαλιστεί ισοτιμία μεταχείρισης μεταξύ των συναλλασσομένων που συμμετέχουν, πρέπει να καθοριστούν, κατά το μέτρο του δυνατού, κοινές μέθοδοι προσδιορισμού ορισμένων από τους εν λόγω ιχνηθότες.
- (8) Το συμπυκνωμένο βούτυρο πρέπει να αποτελείσει αντικείμενο ιχνηθέτησης που θα υπόκειται σε έλεγχο, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 3143/85 της Επιτροπής της 11ης Νοεμβρίου 1985 για τη διάθεση, σε μειωμένη τιμή, βουτύρου παρέμβασης που προορίζεται για την άμεση κατάλυση υπό μορφή συμπυκνωμένου βουτύρου⁽³⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 101/1999⁽⁴⁾ και σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 429/90 της Επιτροπής της 20ής Φεβρουαρίου 1990 σχετικά με τη χορήγηση βάσει δημοπρασίας ενίσχυσης στο συμπυκνωμένο βούτυρο που προορίζεται για άμεση κατανάλωση στην Κοινότητα⁽⁵⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 124/1999⁽⁶⁾ και με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2571/97. Η αυστηρή τήρηση των όρων σχετικά με τη σήμανση του συμπυκνωμένου βουτύρου είναι απαραίτητη για να προληφθεί ο κίνδυνος εκτροπής. Πρέπει ως εκ τούτου να οριστεί μια κοινοτική μέθοδος ανίχνευσης των εν λόγω ιχνηθετών.
- (9) Μία ενίσχυση στην ιδιωτική αποθεματοποίηση των τυριών με βάση το πρόβειο γάλα μπορεί να χορηγηθεί δυνάμει του άρθρου 9 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999. Μπορεί να χορηγηθεί ειδική επιστροφή για τα ίδια προϊόντα δυνάμει του άρθρου 31 του ίδιου κανονισμού. Προβλέπεται η εισαγωγή στην Κοινότητα από ορισμένες τρίτες χώρες, υπό προτιμησιακούς όρους, των τυριών με βάση το πρόβειο γάλα, το αίγιο γάλα και το βουβαλίσιο γάλα ή μειγμάτων πρόβειου, αίγιου και βουβαλίσιου γάλακτος. Λόγω των προαναφερθεισών διατάξεων, είναι αναγκαίο να διαπιστωθεί με κατάλληλους ελέγχους ότι δεν έχει ενσωματωθεί αγελαδινό γάλα στα σχετικά προϊόντα. Κατά συνέπεια, πρέπει να θεσπισθεί μία κοινοτική μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος, με την επιφύλαξη της εφαρμογής συνήθων μεθόδων, εφόσον αυτές είναι σύμφωνες με ορισμένα κριτήρια.
- (10) Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90 της Επιτροπής της 10ης Οκτωβρίου 1990, περί χορηγήσεως ενισχύσεων για το αποκορυφωμένο γάλα το οποίο μεταποιείται για παρασκευή καζείνης και καζείνικων αλάτων⁽⁷⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2654/1999⁽⁸⁾, προ-

βλέπει ότι πρέπει να διαπιστώνεται η απουσία κολοβακτηριδίων. Η μέθοδος αναφοράς που είναι αποδεκτή σε διεθνές επίπεδο για την αναζήτηση κολοβακτηριδίων στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι το διεθνές πρότυπο IDF73A: 1985. Ωστόσο, εφαρμόζεται μόνο με τροποποιημένη μορφή για την ανίχνευση των κολοβακτηριδίων σε μία ορισμένη ποσότητα προϊόντος. Πρέπει λοιπόν να θεσπιστεί μία κοινοτική μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση κολοβακτηριδίων, η οποία να βασίζεται στο προαναφερθέν πρότυπο.

- (11) Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2658/87 του Συμβουλίου της 23ης Ιουλίου 1987 για τη δασμολογική και στατιστική ονοματολογία και το κοινό δασμολόγιο⁽⁹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό 254/2000⁽¹⁰⁾, διαφοροποιεί το ύψος των δασμών για τις σύνθετες ζωοτροφές που υπάγονται στη θέση 2309 του δασμολογίου, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητά τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Για να εξασφαλιστεί μία ενιαία εφαρμογή των σχετικών διατάξεων, πρέπει να προσδιορισθεί μία μέθοδος ανάλυσης της περιεκτικότητας σε λακτόζη που είναι υποχρεωτική για όλα τα κράτη μέλη και να ληφθεί υπόψη για το σκοπό αυτό μία εν γένει αναγνωρισμένη μέθοδος.
- (12) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 προβλέπει ότι ορισμένες ποιοτικές προϋποθέσεις πρέπει να τηρούνται όσον αφορά το βούτυρο και το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που προορίζονται για την παρέμβαση ή, στην περίπτωση του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη που προορίζεται για τη διατροφή των ζώων. Πρέπει κατά συνέπεια να καθοριστούν μέθοδοι αναφοράς για τον έλεγχο των εν λόγω προϋποθέσεων.
- (13) Η θέση σε εφαρμογή ορισμένων από τις μεθόδους που εισάγονται για πρώτη φορά από τον παρόντα κανονισμό καθιστά αναγκαία μία περίοδο προσαρμογής πρέπει ως εκ τούτου να μετατεθεί χρονικά η εφαρμογή.
- (14) Η επιτροπή διαχείρισης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων δεν διατύπωσε γνώμη εντός της προθεσμίας που καθόρισε ο πρόεδρος της,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Άρθρο 1

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Ο παρών κανονισμός θεσπίζει τους κανόνες σχετικά με την εφαρμογή μεθόδων χημικής, φυσικής, μικροβιολογικής ανάλυσης και για την οργανοληπτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων στο πλαίσιο των καθεστώτων που προβλέπονται από την κοινή οργάνωση αγοράς στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, που καθορίζονται από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1255/1999, καθώς και ορισμένων από τις μεθόδους αυτές.

⁽⁹⁾ ΕΕ L 256 της 7.9.1987, σ. 1.

⁽¹⁰⁾ ΕΕ L 28 της 3.2.2000, σ. 16.

⁽¹⁾ ΕΕ L 350 της 20.12.1997, σ. 3.

⁽²⁾ ΕΕ L 76 της 25.3.2000, σ. 9.

⁽³⁾ ΕΕ L 298 της 12.11.1985, σ. 9.

⁽⁴⁾ ΕΕ L 11 της 16.1.1999, σ. 14.

⁽⁵⁾ ΕΕ L 45 της 21.2.1990, σ. 8.

⁽⁶⁾ ΕΕ L 16 της 21.1.1999, σ. 19.

⁽⁷⁾ ΕΕ L 279 της 11.10.1990, σ. 22.

⁽⁸⁾ ΕΕ L 325 της 17.12.1999, σ. 10.

Άρθρο 2

Πίνακας των μεθόδων

1. Ο πίνακας των μεθόδων αναφοράς που εφαρμόζονται στις αναλύσεις που αναφέρονται στο άρθρο 1 περιλαμβάνεται στο παράρτημα I.
2. Τουλάχιστον μία φορά κατ' έτος, η Επιτροπή ενημερώνει τον εν λόγω πίνακα σύμφωνα με τη διαδικασία που προβλέπεται στο άρθρο 42 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999.

Άρθρο 3

Συνήθεις μέθοδοι

Συνήθεις μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις αναλύσεις που προβλέπονται από την κοινοτική ρύθμιση υπό τον όρο ότι είναι σωστά ταξινομημένες και ελέγχονται τακτικά σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς.

Η διαδικασία που αναφέρεται στο παράρτημα 2 μπορεί να εφαρμοστεί για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μέσω των συνήθων μεθόδων, και τα οποία προσεγγίζουν τα όρια που καθορίζονται στους σχετικούς κανονισμούς.

Σε περίπτωση διαφοράς, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη μέθοδο αναφοράς είναι καθοριστικά.

Άρθρο 4

Επικύρωση των μεθόδων αναφοράς

1. Μία μέθοδος αναφοράς επικυρώνεται εφόσον είναι σύμφωνη με προκαθορισμένα κριτήρια ακριβείας, που αφορούν το όριο επαλληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας.
2. Εφόσον μία μέθοδος αναφοράς που καθορίζεται από τους σχετικούς κανονισμούς δεν έχει επικυρωθεί, τα κράτη μέλη καθορίζουν ένα προσωρινό όριο αναπαραγωγιμότητας.

Το όριο αυτό λαμβάνεται σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζεται στο παράρτημα III στοιχείο β). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια των δεκαοκτώ μηνών που έπονται της έναρξης της ισχύος του παρόντος κανονισμού, τα κράτη μέλη μπορούν να χρησιμοποιήσουν μια ισοδύναμη διαδικασία.

Η τήρηση του ορίου ελέγχεται τουλάχιστον μία φορά κατ' έτος.

3. Εφόσον τα αποτελέσματα της εφαρμογής των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς ή των μεθόδων με προσωρινά αριθμητικά στοιχεία όσον αφορά την ακρίβεια αναφέρουν την υπέρβαση ενός ορίου, εφαρμόζεται η μέθοδος αξιολόγησης των αποτελεσμάτων ανάλυσης που περιγράφεται στο παράρτημα IV με σκοπό τον προσδιορισμό της κρίσιμης διαφοράς σε σχέση με το εν λόγω όριο.

Άρθρο 5

Αποδοχή των αποτελεσμάτων των αναλύσεων

1. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε εργαστήρια που εφαρμόζουν μία εσωτερική μέθοδο ελέγχου της ποιότητας, σύμφωνη με

αυτή που περιγράφεται στο παράρτημα V α) ή μία μέθοδο συγκρίσιμου επιπέδου.

Λεπτομερής περιγραφή της εφαρμοζόμενης μεθόδου πρέπει να είναι διαθέσιμη στο εργαστήριο.

2. Τα εργαστήρια καθορίζουν τα εσωτερικά τους πρότυπα ακριβείας σε μία σειρά για όλες τις μεθόδους σύμφωνα με:

- α) τη μέθοδο που ορίζεται στο παράρτημα V σημείο β) ή
- β) μία επικυρωμένη μέθοδος, που έχει δημοσιευτεί και που παρέχει μία καθορισμένη επαναληψιμότητα.

Η τήρηση του ορίου αναπαραγωγιμότητας πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον μία φορά κατ' έτος σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζεται στο παράρτημα III στοιχείο α).

Το δεύτερο εδάφιο δεν εφαρμόζεται, αν το εργαστήριο έχει συμμετάσχει σε ένα πρόγραμμα δοκιμής καταλληλότητας κατά τη διάρκεια του έτους.

3. Η έκθεση του εργαστηρίου επί των αποτελεσμάτων ανάλυσης πρέπει να περιέχει επαρκή στοιχεία για να καθιστά δυνατή μία αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με το παράρτημα IV και το παράρτημα VIII.

4. Τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης θεωρούνται αποδεκτά εφόσον έχουν ληφθεί σύμφωνα με κριτήρια αποδοχής που προσδιορίζονται στην εσωτερική μέθοδο ελέγχου της ποιότητας, η οποία αναφέρεται στην παράγραφο 1 και στα εσωτερικά πρότυπα ακριβείας που αναφέρονται στην παράγραφο 2.

Άρθρο 6

Οργανοληπτική αξιολόγηση

1. Όσον αφορά το βούτυρο, εφαρμόζονται οι μέθοδοι του παρόντος παραρτήματος VI για τον έλεγχο της εργασίας των εκτιμητών και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα VII εφαρμόζεται ως μέθοδος αναφοράς για την οργανοληπτική αξιολόγηση.

2. Όσον αφορά το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα εκτός του βουτύρου, τα κράτη μέλη χρησιμοποιούν ως μέθοδο αναφοράς για την οργανοληπτική αξιολόγηση είτε το πρότυπο IDF 99C/1997 είτε άλλες συγκρίσιμες μεθόδους, τις οποίες ανακοινώνουν στην Επιτροπή.

Οι μέθοδοι του παραρτήματος VI μπορούν να εφαρμοστούν για τον έλεγχο των εργασιών των εκτιμητών και της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

Άρθρο 7

Δειγματοληψία και αμφισβήτηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων

1. Ενόψει των αναλύσεων που προβλέπονται από την κοινοτική ρύθμιση, πρέπει να λαμβάνονται εις διπλούν δείγματα.

2. Η διαδικασία που ορίζεται στο παράρτημα VIII εφαρμόζεται στις περιπτώσεις, όπου τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης δεν γίνονται δεκτά από έναν συναλλασσόμενο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Άρθρο 8

Περιεκτικότητα σε ύδωρ/ξηρές ουσίες/λιπαρές ουσίες στο βούτυρο

1. Εφαρμόζεται η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στο παράρτημα IX, ως μέθοδος αναφοράς, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ύδωρ του βουτύρου.
2. Εφαρμόζεται η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στο παράρτημα X, ως μέθοδος αναφοράς, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ξηρές μη λιπαρές ουσίες του βουτύρου.
3. Εφαρμόζεται η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στο παράρτημα XI, ως μέθοδος αναφοράς, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπαρές ουσίες του βουτύρου.

Άρθρο 9

Ιχνηθέτες

1. Η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στο παράρτημα XII εφαρμόζεται ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της βανιλίνης στο συμπυκνωμένο βούτυρο, στο βούτυρο ή στην κρέμα.
2. Η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στο παράρτημα XIII εφαρμόζεται ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της ποσότητας αιθυλικού εσθέρου του β-αρο-8'-καροτινικού οξέος στο συμπυκνωμένο βούτυρο ή το βούτυρο.
3. Η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στο παράρτημα XIV εφαρμόζεται ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του βουτύρου και του συμπυκνωμένου βουτύρου σε στιγμαστερόλη ή σε β-σιτοστερόλη.
4. Το συμπυκνωμένο βούτυρο, το βούτυρο ή η κρέμα έχουν ιχνοθετηθεί σύμφωνα με τη σχετική κοινοτική νομοθεσία, αν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται αντιστοιχούν στις προδιαγραφές του σημείου 8 των παραρτημάτων που αναφέρονται στις παραγράφους 1, 2 και 3.

Άρθρο 10

Ανίχνευση της καζείνης του αγελαδινού γάλακτος

1. Η αναλυτική μέθοδος αναφοράς που εμφανίζεται στο παράρτημα XV εφαρμόζεται για να εξασφαλισθεί ότι το τυρί που πρέπει να παραχθεί αποκλειστικά από πρόβειο, αίγιο ή βουβαλίσιο γάλα ή από μείγμα πρόβειο, αίγιου ή βουβαλίσιο γάλακτος δεν περιέχει καζείνη αγελαδινού γάλακτος.

Η καζείνη αγελαδινού γάλακτος θεωρείται παρούσα εφόσον η εμφανής περιεκτικότητα σε καζείνη του αγελαδινού γάλακτος του προς ανάλυση δείγματος είναι ίση ή ανώτερη με την περιεκτικότητα του δείγματος αναφοράς που περιέχει 1 % αγελαδινό γάλα, το οποίο προβλέπεται στο παράρτημα XV.

2. Οι συνήθεις μέθοδοι για την ανίχνευση της καζείνης του αγελαδινού γάλακτος στα τυριά που αναφέρονται στην παράγραφο 1 μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπό τους ακόλουθους όρους:

- α) Το όριο ανίχνευσης πρέπει να είναι κατ' ανώτατο όριο 0,5 %
- β) δεν είναι δυνατό να υπάρξουν θετικά ψευδή αποτελέσματα,
- γ) η καζείνη αγελαδινού γάλακτος πρέπει να είναι ανιχνεύσιμη με την απαιτούμενη ευαισθησία, ακόμη και μετά από μακρές περιόδους ωρίμανσης, όπως αυτό μπορεί να συμβεί υπό συνήθεις όρους εμπορικής εκμετάλλευσης.

Αν ο όρος που προβλέπεται στο στοιχείο β) δεν πληρούται, κάθε δείγμα που παρέχει θετικό αποτέλεσμα πρέπει να αναλυθεί μέσω της μεθόδου αναφοράς.

Αν δεν πληρούται η απαίτηση που προβλέπεται στο στοιχείο γ) για έναν από τους τύπους τυριών που αναφέρονται στην παράγραφο 1, το τυρί αυτό πρέπει να αναλυθεί μέσω της μεθόδου αναφοράς.

Άρθρο 11

Ανίχνευση κολοβακτηριδίων

1. Η αναλυτική μέθοδος αναφοράς που περιγράφεται στο παράρτημα XVI εφαρμόζεται για την ανίχνευση της παρουσίας κολοβακτηριδίων στο γάλα, στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, την καζείνη και τα καζεϊνικά άλατα.
2. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνήθεις μέθοδοι για την ανίχνευση των κολοβακτηριδίων, υπό τον όρο ότι τα λαμβανόμενα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αυτά που λαμβάνονται με τη μέθοδο αναφοράς που περιγράφεται στο εν λόγω παράρτημα. Οι συνήθεις μέθοδοι πρέπει, ειδικότερα, να έχουν ένα επαρκές όριο ανίχνευσης. Δεν είναι δυνατό να υπάρξουν ψευδή αρνητικά αποτελέσματα. Αν είναι αδύνατο να αποκλείσουμε την παρουσία ψευδών θετικών αποτελεσμάτων, κάθε θετικό αποτέλεσμα πρέπει να επιβεβαιώνεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αναφοράς.

Άρθρο 12

Περιεκτικότητα σε λακτόζη

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λακτόζη των προϊόντων που υπάγονται στη θέση 2309 της συνδυασμένης ονοματολογίας ορίζεται στο παράρτημα XVII.

Άρθρο 13

Ανίχνευση του τυρογάλακτος πυτίας

1. Η μέθοδος για την παρουσία του τυρογάλακτος πυτίας στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που προορίζεται για δημόσια αποθεματοποίηση ορίζεται στο παράρτημα XVIII.
2. Η μέθοδος για την ανίχνευση της παρουσίας τυρογάλακτος πυτίας στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη και στα μίγματα που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων ορίζεται στο παράρτημα XIX.

Άρθρο 14

Ανίχνευση του βουτυρογάλακτος

Η μέθοδος για την ανίχνευση της παρουσίας του βουτυρογάλακτος στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη ορίζεται στο παράρτημα XX.

Άρθρο 15

Αντιμικροβιοτικά κατάλοιπα

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της παρουσίας καταλοίπων αντιβιοτικών και σουλφοναμιδών/darson στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη ορίζεται στο παράρτημα XXI.

Άρθρο 16

Περιεκτικότητα σε αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη στις σύνθετες ζωοτροφές ορίζεται στο άρθρο XXII.

Άρθρο 17

Ανίχνευση του αμύλου

Η μέθοδος για την ανίχνευση της παρουσίας αμύλου στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, το μετουσιωμένο γάλα σε σκόνη και τις σύνθετες ζωοτροφές ορίζεται στο παράρτημα XXIII.

Άρθρο 18

Ποσοστό υγρασίας του όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό του ποσοστού υγρασίας του όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στις ζωοτροφές, ορίζεται στο άρθρο XXIV.

Άρθρο 19

Ανίχνευση ξένων λιπαρών ουσιών

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της παρουσίας ξένων λιπαρών ουσιών στις λιπαρές ουσίες του γάλακτος ορίζεται στο παράρτημα XXV.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΤΕΛΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Άρθρο 20

Τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2771/1999

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2771/1999 τροποποιείται ως εξής:

1. Στο άρθρο 4 παράγραφος 1, η πρώτη περίοδος αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο: «Οι αρμόδιες αρχές ελέγχουν την ποιότητα του βουτύρου σύμφωνα με τις μεθόδους που αναφέρονται στο παράρτημα I και βάσει των δειγμάτων που λαμβάνονται σύμφωνα με τις λεπτομέρειες που αναφέρονται στο παράρτημα IV».
2. Στο παράρτημα I, το κείμενο της υποσημείωσης 2 αντικαθίσταται ως εξής: «βλέπε παράρτημα I του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 213/2001 (παρών κανονισμός).»

3. Καταργούνται τα παραρτήματα II και III.

4. Στο παράρτημα IV, σημείο 2, προτελευταία σειρά, οι όροι «με το παράρτημα III» αντικαθίστανται από τους όρους «με το παράρτημα VII του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 213/2001».

Άρθρο 21

Τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2799/1999

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2799/1999 τροποποιείται ως εξής:

1. Στο άρθρο 20, οι παράγραφοι 1, 2, 3 και 4 αντικαθίστανται από το ακόλουθο κείμενο:

«1. Η περιεκτικότητα σε αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη των μειγμάτων και των συνθέτων ζωοτροφών επαληθεύεται με ανάλυση, που διενεργείται τουλάχιστον εις διπλούν, σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο παράρτημα XXII του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 213/2001, που συμπληρώνεται με τα μέτρα ελέγχου που προβλέπονται στο άρθρο 17 παράγραφος 3 του παρόντος κανονισμού. Αν υπάρχει διαφορά στα αποτελέσματα των δύο αυτών επαληθεύσεων, θεωρείται οριστικό το αποτέλεσμα των επιτόπιων ελέγχων.

2. Η απουσία τυρογάλακτος πυτίας προσδιορίζεται με τη μέθοδο που περιγράφεται στο παράρτημα XIX του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 213/2001.

3. Η περιεκτικότητα σε άμυλο των συνθέτων ζωοτροφών προσδιορίζεται με τα μέτρα ελέγχου που αναφέρονται στο άρθρο 17 παράγραφος 3 του παρόντος κανονισμού, που πρέπει να συμπληρωθούν με τη μέθοδο ανάλυσης που ορίζεται στο παράρτημα XXIII του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 213/2001.

4. Η περιεκτικότητα σε υγρασία του όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη προσδιορίζεται με τη μέθοδο που περιγράφεται στο παράρτημα XXIV του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 213/2001»

2. Καταργούνται τα παραρτήματα III, IV, V και VI.

Άρθρο 22

Καταργήσεις

Καταργούνται οι κανονισμοί (ΕΟΚ) αριθ. 1216/68, (ΕΟΚ) αριθ. 3942/92, (ΕΟΚ) αριθ. 86/94, (ΕΚ) αριθ. 2721/95, (ΕΚ) αριθ. 1854/96, (ΕΚ) αριθ. 1080/96, (ΕΚ) αριθ. 1081/96, (ΕΚ) αριθ. 1082/96, (ΕΚ) αριθ. 880/98 και (ΕΟΚ) αριθ. 1459/98.

Οι αναφορές στους κανονισμούς που καταργούνται νοούνται ότι πραγματοποιούνται στον παρόντα κανονισμό.

Άρθρο 23

Έναρξη της ισχύος

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την έβδομη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Ωστόσο, οι μέθοδοι που προβλέπονται στα παραρτήματα III, IV σημείο 4, V, VI και VIII εφαρμόζονται δεκαοκτώ μήνες μετά την έναρξη της ισχύος του παρόντος κανονισμού.

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

Βρυξέλλες, 9 Ιανουαρίου 2001.

Για την Επιτροπή
Franz FISCHLER
Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

(Άρθρο 2)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ευρετήριο

Ελαχ.: = ελάχιστο, Μέγ.: = μέγιστο, Παράρτημα = παράρτημα του προαναφερόμενου κανονισμού, ΣΥΑΛ = στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος, ΕΛΟ = ελεύθερα λιπαρά οξέα, ΑΥ = αριθμός υπεροξειδίου, Ε = εμφάνιση, Γ = γεύση, Σ = σύσταση, ΣΑΒ = συνολικός αριθμός βακτηριδίων, Therm. = αριθμός θερμοφίλων βακτηριδίων, ΚΜ = κράτος μέλος, IDF = διεθνής γαλακτοκομική ομοσπονδία, ISO = διεθνής οργανισμός πιστοποίησης, UAYAC = διεθνής ένωση καθαρής και εφαρμοσμένης χημείας, ADPI = αμερικανικό ινστιτούτο γαλακτοκομικών, ΖΣΤ = ζαχαρούχο συμπυκνωμένο γάλα, ΓΚΕ = γάλα ή κρέμα εβαπορέ, ΣΥΑΛ-γάλ. = στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος του γάλακτος.

ΜΕΡΟΣ Α:

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2771/1999: Δημόσια αποθεματοποίηση (ΕΕ L 333 της 24.12.1999, σ. 11)	Βούτυρο ανάλατο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία ΣΥΑΛ: ΕΛΟ (Μέγ.) ΑΥ (Μέγ.) Κολοβακτηρίδια Λιπαρά ξένα προς το γάλα Ιχνηθέτες στερολών Άλλοι ιχνηθέτες — βανιλίνη — καροτενικός αιθυλεστέρας — τριγλυκερίδια οινανθικού (επτανόϊ- κού) οξέος Οργανικά χαρακτηριστικά Διασπορά ύδατος	Ελάχ. 82 % Μέγ. 16 % Μέγ. 2 % 1,2 mmol/100 g λιπαρά 0,3 meq. οξυγόνου/1 000 g λιπαρά Μη ανιχνεύσιμα σε 1 g Μη ανιχνεύσιμα με ανάλυση τριγλυκε- ριδίων Μη ανιχνεύσιμοι Μη ανιχνεύσιμη Μη ανιχνεύσιμος Μη ανιχνεύσιμα Τουλάχιστον 4 από 5 βαθμοί για Ε, Γ και Σ Τουλάχιστον 4 βαθμοί	Παράρτημα XI Παράρτημα ΙΧ Παράρτημα Χ Πρότυπο IDF 6B:1989 Πρότυπο IDF 74A:1991 (αγγλική δια- τύπωση) Παράρτημα XVII Παράρτημα XXVI Παράρτημα XIV Παράρτημα XII Παράρτημα XIII IUPAC 2.301 sub 5 Παράρτημα VII Πρότυπο IDF 112A:1989	Σημείωση 1 Σημείωση 3
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2771/1999: Ιδιωτική αποθεματοποίηση	Βούτυρο ανάλατο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία	Ελάχ. 82 % Μέγ. 16 %	Παράρτημα XI Παράρτημα ΙΧ	Σημείωση 6
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2771/1999: Ιδιωτική αποθεματοποίηση	Βούτυρο αλατισμένο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία Αλάτι	Ελάχ. 80 % Μέγ. 16 % Μέγ. 2 %	Παράρτημα XI Παράρτημα ΙΧ Πρότυπο IDF 12B:1988	Σημείωση 6

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2571/97 (ΕΕ L 350 της 20.12.1997, σ. 3)	Βούτυρο ανάλατο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία Ιχνηθέτες: — στερόλες — βανιλίνη — καροτενικός αιθυλεστέρας — τριγλυκερίδια οινανθικού (επτανοϊκού) οξέος	Ελάχ. 82 % Μέγ. 16 %	Παράρτημα XI Παράρτημα IX Παράρτημα XIV Παράρτημα XII Παράρτημα XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2571/97	Βούτυρο αλατισμένο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία: Αλάτι: Ιχνηθέτες: — στερόλες — βανιλίνη — καροτενικός αιθυλεστέρας — τριγλυκερίδια οινανθικού (επτανοϊκού) οξέος	Ελάχ. 80 % Μέγ. 16 % Μεγ. 2 %	Παράρτημα XI Παράρτημα IX Πρότυπο IDF 12B:1988 Παράρτημα XIV Παράρτημα XII Παράρτημα XIII IUPAC 2.301 sub 5	
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2571/97	Συμπυκνωμένο βούτυρο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία και ΣΥΑΛγαλ. ΕΛΟ ΑΥ (Μέγ.) Λιπαρά ξένα προς το γάλα Γεύση Οσμή Άλλα Ιχνηθέτες: — στερόλες — βανιλίνη — καροτενικός αιθυλεστέρας — τριγλυκερίδια οινανθικού (επτανοϊκού) οξέος	Ελάχ. 99,8 % Μέγ. 0,2 % Μέγ. 0,35 % (ελαϊκό) 0,5 μέγ. οξυγόνου/1 000 g λιπαρά Απουσία Γνήσια Απουσία ξένων οσμών Απουσία μέσων εξουδετέρωσης, αντι-οξειδικών και συντηρητικών	Πρότυπο IDF 24:1964 Πρότυπο IDF 23A:1988 (Υγρασία) Πρότυπο IDF 24:1964 (ΣΥΑΛγαλ.) Πρότυπο IDF 6B:1989 Πρότυπο IDF 74A:1991 (αγγλική διατύπωση) Παράρτημα XXV Παράρτημα XIV Παράρτημα XII Παράρτημα XIII IUPAC 2.301 sub 5	Σημείωση 1

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2571/97	Κρέμα γάλακτος	Λιπαρά Ιχνηθέτες: — στερόλες — βανιλίνη — καροτενικός αιθυλεστέρας — τριγλυκερίδια οινανθικού (επτανοϊκού) οξέος	35 %	Πρότυπο IDF 16C:1987 Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή Παράρτημα XII Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή IUPAC 2.301 sub 5	Σημείωση 2 Σημείωση 2
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 429/90 (ΕΕ L 45 της 21.2.1990, σ. 8)	Συμπυκνωμένο βούτυρο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος ΣΥΛΛ Ιχνηθέτες: — στιγμαστερόλη (95 %) — στιγμαστερόλη (85 %) — τριγλυκερίδια οινανθικού (επτανοϊκού) οξέος — Βουτυρικός αιθυλεστέρας ή στιγμαστερόλη Λεκιθίνη (E322) NaCl ΕΛΟ ΑΥ (Μέγ.) Γεύση Οσμή Άλλα	Ελάχ. 96 % Μέγ. 2 % 15 g/100 kg συμπύκνωμα βουτύρου 17 g/100 kg συμπύκνωμα βουτύρου 1,1 kg/100 kg συμπύκνωμα βουτύρου βλέπε παράρτημα, σημείο 1 στοιχείο γ) Μέγ. 0,5 % Μέγ. 0,75 % Μέγ. 0,35 % (ελαϊκό) Μέγ. 0,5 μεq. οξυγόνου/1 000 g λιπαρά Γνήσια Απουσία ξένων οσμών Απουσία μέσωσ εξουδετέρωσης, αντιοξειδικών και συντηρητικών	Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή Παράρτημα XIV Παράρτημα XIV IUPAC 2.301 sub 5 Παράρτημα XIV Μέθοδος εγκεκριμένη από την αρμόδια αρχή (βουτυρικό οξύ) Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή Πρότυπο IDF 12B:1988 Πρότυπο IDF 6B:1989 Πρότυπο IDF 74A:1991 (αγγλική διατύπωση)	Σημείωση 2 Σημείωση 2 Σημείωση 2 Σημείωση 2 Σημείωση 1
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2191/81 (ΕΕ L 213 της 1.8.1981, σ. 20)	Βούτυρο ανάλατο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία	Ελάχ. 82 % Μέγ. 16 %	Παράρτημα XI Παράρτημα IX	

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2191/81	Βούτυρο αλατισμένο	Λιπαρή ουσία του γάλακτος Υγρασία Αλάτι	Ελάχ. 80 % Μέγ. 16 % Μέγ. 2 %	Παράρτημα XI Παράρτημα IX Πρότυπο IDF 12B:1988	
Άρθρο 9 και τίτλος II του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999	Τυρί με βάση το πρόβειο ή/και αίγιο γάλα	Αγελαδινό γάλα	< 1 %	Παράρτημα XV	
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	παράρτημα I — όξινη βρώσιμη καζεΐνη	Υγρασία Λιπαρά Ελεύθερα οξέα	Μέγ. 12,00 % Μέγ. 1,75 % Μέγ. 0,30 % (γαλακτικό)	Πρότυπο IDF 78C:1991 IDF 127A: 1988 Πρότυπο IDF 91:1979	
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	παράρτημα I — βρώσιμη καζεΐνη-πυτιάς	Υγρασία Λιπαρά Τέφρα	Μέγ. 12,00 % Μέγ. 1,00 % Ελάχ. 7,50 %	Πρότυπο IDF 78C:1991 IDF 127A:1998 Πρότυπο IDF 90:1979	
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2921/90	παράρτημα I — Βρώσιμα καζεϊνικά άλατα	Υγρασία Πρωτεΐνη γάλακτος Λιπαρά και τέφρα	Μέγ. 6,00 % Ελάχ. 88,00 % Μέγ. 6,00 %	Πρότυπο IDF 78C:1991 Πρότυπο IDF 92:1979 IDF 127A:1988 Πρότυπο IDF 89:1979 ή Πρότυπο IDF 90:1979	
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	παράρτημα II — όξινη βρώσιμη καζεΐνη	Υγρασία Λιπαρά Ελεύθερα οξέα ΣΑΒ (Μέγ.) Κολοβακτηρίδια Therm. (Μέγ.)	Μέγ. 10,00 % Μέγ. 1,50 % Μέγ. 0,20 % (γαλακτικό) 30 000 1/g Απουσία/0,1 g 5 000 1/g	Πρότυπο IDF 78C:1991 IDF 127A:1988 Πρότυπο IDF 91:1979 Πρότυπο IDF 100B:1991 Παράρτημα XVI Πρότυπο IDF 100B:1991	Σημείωση 3 Σημείωση 3 Σημειώσεις 3, 4
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	παράρτημα II — βρώσιμη καζεΐνη-πυτιάς	Υγρασία Λιπαρά Τέφρα ΣΑΒ (Μέγ.) Κολοβακτηρίδια Therm. (Μέγ.)	Μέγ. 8,00 % Μέγ. 1,00 % Ελάχ. 7,50 % 30 000 1/g Απουσία/0,1 g 5 000 1/g	Πρότυπο IDF 78C:1991 IDF 127A:1988 Πρότυπο IDF 90:1979 Πρότυπο IDF 100B:1991 Παράρτημα XVI Πρότυπο IDF 100B:1991	Σημείωση 3 Σημείωση 3 Σημειώσεις 3, 4

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα II — Βρώσιμα καζεϊνικά άλατα	Υγρασία Πρωτεΐνη γάλακτος Λιπαρά και τέφρα ΣΑΒ (Μέγ.) Κολοβακτηρίδια Therm. (Μέγ.)	Μέγ. 6,00 % Ελάχ. 88,00 % Μέγ. 6,00 % 30 000 l/g Απουσία/0,1 g 5 000 l/g	Πρότυπο IDF 78C:1991 Πρότυπο IDF 92:1979 IDF 127A:1988 IDF 89:1979 ή IDF 90:1979 Πρότυπο IDF 100B:1991 Παράρτημα XVI Πρότυπο IDF 100B:1991	Σημείωση 3 Σημείωση 3 Σημειώσεις 3, 4
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2921/90	Παράρτημα III — Βρώσιμα καζεϊνικά άλατα	Υγρασία Πρωτεΐνη του γάλακτος Λιπαρά Λακτόζη Τέφρα ΣΑΒ (Μέγ.) Κολοβακτηρίδια Therm. (Μέγ.)	Μέγ. 6,00 % Ελάχ. 85,00 % Μέγ. 1,50 % Μέγ. 1,00 % Μέγ. 6,50 % 30 000 l/g Απουσία/0,1 g 5 000 l/g	Πρότυπο IDF 78C:1991 Πρότυπο IDF 92:1979 IDF 127A:1988 Πρότυπο IDF 106:1982 IDF 89:1979 ή IDE 90:1979 Πρότυπο IDF 100B:1991 Παράρτημα XVI Πρότυπο IDF 100B:1991	Σημείωση 3 Σημείωση 3 Σημειώσεις 3, 4
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2799/1999 (EE L 340 της 31.12.1999, σ. 3)	Σύνθετες ζωοτροφές και αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη (ΑΓΣ) (για τη διατροφή των ζώων)	Υγρασία (όξινο βουτυρόγαλα σε σκόνη) Πρωτεΐνη Υγρασία (ΑΓΣ) Λιπαρά (ΑΓΣ) Τυρόγαλα πυτίας (ΑΓΣ) Άμυλο (ΑΓΣ) Υγρασία (μείγμα) Λιπαρά (μείγμα) Τυρόγαλα πυτίας (μείγμα) Περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε ΑΓΣ Περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε λιπαρά Περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε άμυλο Περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε χαλκό	Μέγ. 5 % 31,4 % (Ελάχ. επί του μη λιπαρού τελικού προϊόντος) Μέγ. 5 % Μέγ. 11 % Απουσία Απουσία 5 % Μέγ. επί του μη λιπαρού τελικού προϊόντος — Απουσία Ελάχ. 50 % Ελάχ. 2,5 % ή 5 % Ελάχ. 2 % 25 ppm	Πρότυπο IDF 20B:1993 Πρότυπο IDF 26A:1993 Πρότυπο IDF 9C:1987 Παράρτημα XIX Παράρτημα XXIII Πρότυπο IDF 26A:1993 Οδηγία 84/4/ΕΟΚ της Επιτροπής (EE L 15 της 18.1.1984, σ. 28) Παράρτημα XIX Παράρτημα XXII Οδηγία 84/4/ΕΟΚ της Επιτροπής Παράρτημα XXII Οδηγία 78/633/ΕΟΚ της Επιτροπής (EE L 206 της 26.7.1987, σ. 43)	Σημείωση 7 Σημείωση 7 Σημείωση 8 Σημείωση 9

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 322/96 (ΕΕ L 45 της 23.2.1996, σ. 5)	ΑΓΣ (σπρέυ)	Λιπαρά	Μέγ. 1,0 %	Πρότυπο IDF 9C:1987	
		Πρωτεΐνη	31,4 % (Ελαχ. επί του μη λιπαρού τελικού προϊόντος)	Πρότυπο IDF 20B:1993	
		Υγρασία	Μέγ. 3,5 %	Πρότυπο IDF 26A:1993	
		Οξύτητα (N/10 NaOH)	Μέγ. 19,5 ml	Πρότυπο IDF 86:1981	
		Γαλακτικά οξέα	Μέγ. 150 mg/100 g	Πρότυπο IDF 69B:1987	
		Φωσφατάση	Αρνητικό	Πρότυπο ISO 3356:1975	
		Διαλυτότητα	Μέγ. 0,5 ml στους 24 °C	IDF 129A:1988	
		Καμμένα μόρια	disk B Ελάχ. (15,0 mg)	ADPI:1990	
		ΣΑΒ	40 000 l/g	Πρότυπο IDF 100B:1991	Σημείωση 3
		Κολοβακτηρίδια	Αρνητικό/0,1 g	Παράρτημα XVI	Σημείωση 3
		Βουτυρόγαλα	Αρνητικό	Παράρτημα XX	
		Τυρόγαλα πυτίας	Αρνητικό	Παράρτημα XVIII	
		Όξινο τυρόγαλα	Αρνητικό	Μέθοδος εγκεκριμένη από την αρμόδια αρχή	Σημείωση 2
		Αντιμικροβιακές ουσίες		Παράρτημα XXI	

ΜΕΡΟΣ Β

Οι μέθοδοι αναφοράς που περιέχονται στο Μέρος Β για την ανάλυση προϊόντων τα οποία διέπονται από οιοδήποτε κανονισμό που αναφέρεται στην πρώτη στήλη

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Κωδικός NC	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2658/87 (ΕΕ L 256 της 7.9.1987, σ. 1) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2414/98 (ΕΕ L 299 της 10.11.1998, σ. 7) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1374/98 (ΕΕ L 185 της 30.6.1998, σ. 21) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2508/97 (ΕΕ L 345 της 16.12.1997, σ. 31) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 174/1999 (ΕΕ L 20 της 27.1.1999, σ. 8)	Γάλα και κρέμα γάλακτος (ανθόγαλα) όχι συμπυκνωμένα ούτε με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών	0401	Λιπαρά (≤ 6 %)	Τα όρια είναι τα καθοριζόμενα στην περιγραφή του κωδικού ΣΟ για το ειδικό προϊόν και, ενδεχομένως, αυτά που προσδιορίζονται επακριβώς στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3846/87 της Επιτροπής (ΕΕ L 366 της 24.12.1987, σ. 1) μέρος 9 της ονοματολογίας κατά την εξαγωγή ή στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1374/1998 (ΕΕ L 185 της 30.6.1998, σ. 21)	Πρότυπο IDF 1D:1996	
			Λιπαρά (> 6 %)		Πρότυπο IDF 16C:1987	

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Κωδικός NC	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
	Γάλα και κρέμα γάλακτος (ανθόγαλα) συμπυκνωμένα ή με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών	0402	Λιπαρά (υγρή μορφή) Λιπαρά (στερεή μορφή) Πρωτεΐνη Σακχαρόζη (συνήθης περιεκτικότητα) Σακχαρόζη (μικρή περιεκτικότητα) Ξηρά ουσία (ΖΣΓ) Ξηρά ουσία (ΓΚΕ)		Πρότυπο IDF 13C:1987 Πρότυπο IDF 9C:1987 Πρότυπο IDF 20B:1983 Πρότυπο IDF 35A:1992 Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή Πρότυπο IDF 15B:1991 Πρότυπο IDF 21B:1987	Σημείωση 2
	Βουτυρόγαλα, γάλα και κρέμα που έχουν υποστεί ζύμωση ή έχουν καταστεί όξινα, συμπυκνωμένα ή μη με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών	0403	Λιπαρά Πρωτεΐνη Σακχαρόζη (συνήθης περιεκτικότητα) Σακχαρόζη (μικρή περιεκτικότητα)		IDF 1D:1996, IDF 9C:1987, IDF 16C:1987, IDF 22B:1987, IDF 126A:1988 Πρότυπο IDF 35A:1992 Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή	Σημείωση 2
	Ορός γάλακτος συμπυκνωμένος ή μη, με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών προϊόντα που αποτελούνται από φυσικά συστατικά του γάλακτος	0404	Λιπαρά Πρωτεΐνη Σακχαρόζη (συνήθης περιεκτικότητα) Σακχαρόζη (μικρή περιεκτικότητα)		IDF 9C:1987, IDF 16C:1987, IDF 22B:1987 Πρότυπο IDF 20B:1993 Πρότυπο IDF 35A:1992 Μέθοδοι εγκεκριμένες από την αρμόδια αρχή	Σημείωση 2
		0404 90	Πρωτεΐνη Υγρασία Matéria seca (produtos concentrados)		Πρότυπο IDF 20B:1993 Πρότυπο IDF 26A:1993 Πρότυπο IDF 15B:1991 Πρότυπο IDF 21B:1987	
	Βούτυρο και άλλα λιπαρά προερχόμενα από το γάλα-βούτυρο επάλειψης	0405	Λιπαρά (εάν ≤ 85 %) Υγρασία ΣΥΑΛ NaCl		Παράρτημα XI Παράρτημα IX Παράρτημα X Πρότυπο IDF 12B:1988	
		Βούτυρο			Πρότυπο IDF 24:1964	
		Βουτυρέλαιο	Λιπαρά (εάν > 99 %) Υγρασία (εάν λιπαρά < 99 %)		Πρότυπο IDF 23A:1988	

Κανονισμός της Επιτροπής	Προϊόν	Κωδικός NC	Παράμετρος	Όριο	Μέθοδος αναφοράς	Σημείωση
	Τυρί και τυρόπηγμα	0406	Λιπαρά Ξηρά ουσία Ξηρά ουσία (Ricotta) NaCl Λακτόζη		Πρότυπο IDF 5B:1986 Πρότυπο IDF 4A:1982 Πρότυπο IDF 58:1970 Πρότυπο IDF 88A:1988 Πρότυπο IDF 79B:1991	
Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2658/87	Σύνθετες ζωοτροφές	2309	Λακτόζη		Παράρτημα XVII	

Σημειώσεις στον πίνακα μεθόδων αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης:

Σημείωση 1: Απομόνωση των λιπαρών ουσιών του γάλακτος όπως περιγράφεται στο πρότυπο IDF 6B:1989 (προστασία από το φώς).

Σημείωση 2: Δεν έχει καθοριστεί μέθοδος αναφοράς.

Σημείωση 3: Προετοιμασία δειγμάτων σύμφωνα με το πρότυπο IDF 122C:1996 ή με το πρότυπο IDF 73A:1985.

Σημείωση 4: Επώαση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία 55 °C. Πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις κατά της ξήρανσης του περιβάλλοντος καλλιέργειας.

Σημείωση 5: % ΣΥΑΛ = % ξηράς ουσίας - % λιπαράς ουσίας.

Σημείωση 6: Το βούτυρο πρέπει να αντιστοιχεί στην εθνική κατηγορία ποιότητας του κράτους μέλους παραγωγής που αναφέρεται στο παράρτημα V του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2771/1999 της Επιτροπής.

Σημείωση 7: Οδηγία (ΕΟΚ) αριθ. 4/84 της Επιτροπής.

Σημείωση 8: Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1758/94 της Επιτροπής (ΕΕ L 183 της 19.7.1994, σ. 14).

Σημείωση 9: Οδηγία 78/633/ΕΟΚ της Επιτροπής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

(Άρθρο 3)

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΕΠΙΖΟΥΝ ΤΑ ΟΡΙΑ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΥΣ

Εάν m_0 είναι όριο που ορίζεται σε έναν κανονισμό, το όριο απόφασης (L) είναι

$$L = m_0$$

εάν $R_{Rout}/R_{Ref} \leq 1$

R_{Rout} : Όριο αναπαραγωγιμότητας της συνήθους μεθόδου

R_{Ref} : Όριο αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου αναφοράς

Εάν m_0 είναι ανώτατο όριο και $R_{Rout}/R_{Ref} > 1$, το όριο αυτό απόφασης προκύπτει βάσει του τύπου

$$L = m_0 - [(R_{Rout}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

Εάν, υπό τις ίδιες συνθήκες, m_0 είναι ένα κατώτερο όριο, το όριο απόφασης προκύπτει βάσει

$$L = m_0 + [(R_{Rout}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

CrD_{95} : Κρίσιμη διαφορά της μεθόδου αναφοράς (βλέπε παράρτημα IV)

Στην περίπτωση που το m_0 είναι ανώτατο όριο, ένα τελικό αποτέλεσμα που προκύπτει βάσει της συνήθους μεθόδου και το οποίο είναι μεγαλύτερο του ορίου απόφασης, πρέπει να αντικαθίσταται από ένα τελικό αποτέλεσμα που προκύπτει βάσει της μεθόδου αναφοράς. Το τελικό αυτό αποτέλεσμα πρέπει να βασίζεται τουλάχιστον στον ίδιο αριθμό αναλύσεων δειγμάτων όπως το τελικό αποτέλεσμα της συνήθους μεθόδου.

Στην περίπτωση που το m_0 είναι κατώτατο όριο, πρέπει να ακολουθείται η ίδια διαδικασία για την επίτευξη τελικού αποτελέσματος βάσει της συνήθους μεθόδου, το οποίο είναι μικρότερο του ορίου απόφασης.

Παρατήρηση

Η προαναφερθείσα διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί εφόσον δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμες επιδράσεις υποστρώματος.

Οι επιδράσεις του υποστρώματος είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με τον ακόλουθο τρόπο: για κάθε δείγμα που χρησιμοποιείται για βαθμονόμηση προσδιορίζεται η διαφορά (w_i) μεταξύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν βάσει της μεθόδου αναφοράς και της συνήθους μεθόδου.

Η τυπική απόκλιση που υπολογίζεται βάσει του τύπου

$$s = \sqrt{(\sum w_i^2)/2m}$$

m : Αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για βαθμονόμηση

συγκρίνεται με τον αριθμητικό μέσο όρο της επαναλαμβανομένης τυπικής απόκλισης της μεθόδου αναφοράς και της συνήθους μεθόδου

$$s_r = \sqrt{(s_{r(Ref)}^2 + s_{r(ma)}^2)/2}$$

Η επίδραση του υποστρώματος δεν μπορεί να εξαιρεθεί εάν

$$m \bullet s^2 / s_r^2 > Chi_{f, 1-\alpha}^2$$

$f = m$ (f : αριθμός των βαθμών ελευθερίας)

$Y =$ Πιθανότητα σφάλματος $\alpha = 0,05$.

Στην περίπτωση αυτή, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω διερευνήσεων πριν τον καθορισμό ορίου απόφασης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

(Άρθρα 4 και 5)

α) Διαδικασία για τον προσδιορισμό τήρησης ενός θεσπισμένου ορίου αναπαραγωγιμότητας (χημική ανάλυση)

Η τήρηση του ορίου αναπαραγωγιμότητας ελέγχεται με σύγκριση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα ενός έμπειρου εργαστηρίου (¹), τα οποία προκύπτουν από ένα πανομοιότυπο δείγμα. Διεξάγεται προσδιορισμός εις διπλούν και στα δύο εργαστήρια και τα αποτελέσματα αξιολογούνται βάσει του τύπου:

$$CrD_{95}(|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

CrD₉₅: Κρίσιμη διαφορά (P = 0.95)

\bar{y}_1 : αριθμητικός μέσος όρος των δύο αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στο εργαστήριο 1

\bar{y}_2 : αριθμητικός μέσος όρος των δύο αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στο εργαστήριο 2

R: όριο αναπαραγωγιμότητας: προσδιορίζεται με προέκταση,

r: όριο επαναληψιμότητας: εάν η ακρίβεια ποικίλλει σε σχέση με το επίπεδο

Εάν παρατηρείται υπέρβαση της κρίσιμης διαφοράς, πρέπει να γίνεται κάθε προσπάθεια για την εντόπιση της αιτίας, και πρέπει να πραγματοποιείται άλλο ένα πείραμα εντός των επόμενων δύο μηνών. Σε περίπτωση μη τήρησης του ορίου αναπαραγωγιμότητας στο δεύτερο αυτό πείραμα, οι αρμόδιες αρχές πρέπει να παίρνουν τα απαραίτητα μέτρα.

β) Διαδικασία για την επίτευξη προσωρινού ορίου αναπαραγωγικότητας (χημική ανάλυση)

Το προσωρινό όριο αναπαραγωγιμότητας (R_{prov}) προκύπτει χρησιμοποιώντας την ακόλουθη ισότητα:

$$R_{prov} = \sqrt{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

\bar{y}_1 : Μέσος όρος των δύο αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στο εργαστήριο 1

\bar{y}_2 : Μέσος όρος των δύο αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στο εργαστήριο 2 (βλέπε παράρτημα ΙΙΙ σημείο α).

r: Όριο επαναληψιμότητας ή προσωρινό όριο επαναληψιμότητας.

Παρατηρήσεις:

1. Η R_{prov} μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό κρίσιμων διαφορών (βλέπε παράρτημα VI)
2. Η R_{prov} ορίζεται σε 2r, εάν η υπολογισθείσα τιμή για R_{prov} είναι μικρότερη των 2r.
3. Εάν η υπολογισθείσα τιμή είναι μεγαλύτερη από 3r ή υπερβαίνει πάνω από δύο φορές από την τιμή R-value που αναμένεται από την εξίσωση Horwitz (*), τότε η τιμή R_{prov} είναι απαράδεκτα υψηλή και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της κρίσιμης διαφοράς.
4. Η R_{prov} θα πρέπει να προσδιορίζεται τουλάχιστον μία φορά ανά έτος βάσει των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στα δύο εργαστήρια (βλέπε παράρτημα IV).
5. Η μέση τιμή της R_{prov} θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των κρίσιμων διαφορών. Οι κανόνες που δίδονται στα σημεία 2 και 3 ισχύουν για τη μέση τιμή της R_{prov}.

(*) Εξίσωση Horwitz:

$$RSD_R(\%) = 2^{1-0,5 \log_{10} C}$$

RSD_R: Σχετική τυπική απόκλιση της αναπαραγωγιμότητας

C: Συγκέντρωση που εκφράζεται ως δεκαδική τιμή (παράδειγμα: 10 g/100 g. = 0,1).

Αναφορά:

Peeler, J. T., Horwitz, W. and Albert, R.
J. Ass. Off. Anal. Chem.
72 (5), 784-806 (1989).

(¹) Κατά γενικό κανόνα, το πειραμαμένο εργαστήριο πρέπει να είναι εργαστήριο που συμμετέχει επιτυχώς είτε στην επικύρωση της μεθόδου δοκιμής είτε σε μια δοκιμή επάρκειας.

Το όριο αναπαραγωγιμότητας (R-value) προκύπτει από τον υπολογισμό της τιμής RSD_R - ως

$$R = 0,0283 \bar{x} RSD_R$$

(\bar{x} = αριθμητικός μέσος όρος των αποτελεσμάτων)

Ορισμένες υπολογισμένες τιμές RSD_R -(παραδείγματα)

Συγκέντρωση	RSD_R (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

Για συγκέντρωση του αναλύτη 1 g/100g λαμβάνουμε:

$$R = 0,0283 * 1 * 4 = 0,11g/100g.$$

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

(Άρθρο 4)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΕΠΙΚΥΡΩΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Εάν το αναλυτικό αποτέλεσμα δεικνύει υπέρβαση ενός ορίου, υπολογίζεται ο αριθμητικός μέσος όρος δύο ή περισσότερων αποτελεσμάτων. Πρέπει να εφαρμόζεται η ακόλουθη διαδικασία:

1. Σε περιπτώσεις όπου το αναλυτικό αποτέλεσμα αντιπροσωπεύει ένα και μόνον αποτέλεσμα, πρέπει να διεξάγεται δεύτερη ανάλυση υπό όρους επαναληψιμότητας. Εάν δεν είναι δυνατό να διεξαχθούν οι δύο αναλύσεις βάσει των όρων επαναληψιμότητας, πραγματοποιήσατε μία πρόσθετη ανάλυση εις διπλούν βάσει των όρων επαναληψιμότητας και χρησιμοποιήσατε τα αποτελέσματα αυτά για να εκτιμηθεί το κατά πόσον τηρείται η κρίσιμη διαφορά.
2. Προσδιορίζεται η απόλυτος τιμή της διαφοράς μεταξύ του αριθμητικού μέσου όρου των αποτελεσμάτων που επιτυγχάνονται κάτω από συνθήκες επαναληψιμότητας και του ορίου. Μία απόλυτος τιμή της διαφοράς μεγαλύτερη από την κρίσιμη διαφορά δηλώνει ότι το δείγμα το οποίο υποβλήθηκε σε ανάλυση δεν πληροί τις προϋποθέσεις.

Η κρίσιμη διαφορά προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_o|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

\bar{y} : αριθμητικός μέσος όρος των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται

m_o : όριο

n : αριθμός των αναλύσεων/δείγμα.

Εάν η ακρίβεια ποικίλλει ανάλογα με το επίπεδο, ίσως να είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του r και του R δια προέκτασης.

Κανονικά, ένα τελικό αποτέλεσμα που αναφέρεται για ένα δείγμα πρέπει να δεικνύει τήρηση του ορίου.

Τελικά αποτελέσματα συμπεριλαμβανόμενα

- στην περιοχή m_o και $m_o + CrD_{95}(|\bar{y} - m_o|)$, εάν το όριο είναι ένα ανώτατο όριο·
- στην περιοχή m_o και $m_o - CrD_{95}(|\bar{y} - m_o|)$ εάν το όριο είναι ένα κατώτατο όριο,

θα πρέπει να προκύπτουν μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις.

Τα τελικά αποτελέσματα εντός των προαναφερθέντων περιοχών είναι αποδεκτά εφόσον προκύπτουν μία φορά ανά 5 δείγματα που έχουν υποβληθεί σε ανάλυση ανά αποστολή, το πολύ. Εάν έχουν υποβληθεί σε ανάλυση λιγότερο από 5 δείγματα ανά αποστολή, ένα αποτέλεσμα εντός της προαναφερθείσας περιοχής είναι αποδεκτό. Ωστόσο, πρέπει να τηρείται ο κανόνας που λέει ότι μόνο ένα αποτέλεσμα εντός των προαναφερθεισών περιοχών επιτυγχάνεται ανά 5 δείγματα που υποβάλλονται σε ανάλυση, εάν ο παραγωγός φέρει αποστολές κατ' επανάληψη.

3. Εάν το τελικό αποτέλεσμα X υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο της μορφής $x = y_1 \pm y_2$ (παράδειγμα: νερό + περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία του βουτύρου χωρίς λίπος για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε λίπος) όπου y_1 και y_2 είναι τα τελικά αποτελέσματα ενός και μόνου τύπου ανάλυσης, τότε τα συνολικά όρια επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας r_x και R_x των τελικών αποτελεσμάτων X υπολογίζονται ως εξής:

$$r_x = \sqrt{r_1^2 + r_2^2}$$

$$R_x = \sqrt{R_1^2 + R_2^2}$$

όπου r_1 και r_2 είναι τα όρια επαναληψιμότητας και R_1 και R_2 τα όρια αναπαραγωγιμότητας των y_1 και y_2 αντίστοιχως.

Το x συγκρίνεται με το όριο m_o βάσει των κανόνων που καθορίζονται στα σημεία 1 και 2. Η κρίσιμη διαφορά προσδιορίζεται βάσει του τύπου

$$CrD_{95}(|x - m_o|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

όπου x είναι ο αριθμητικός μέσος όρος των αποτελεσμάτων x_i .

4. Εάν το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο της μορφής

$$x = \frac{y_i}{y_j}$$

(παράδειγμα: λίπος σε περιεκτικότητα επί ξηράς ουσίας τυριού)

όπου y_1 και y_2 είναι τα τελικά αποτελέσματα ενός και μόνο είδους ανάλυσης, τότε τα συνολικά όρια επαναληψιμότητας και αναπαραγωγικότητας r_x και R_x είναι δυνατόν να υπολογιστούν ως εξής:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{s1}^2 + r_{s2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{s1}^2 + R_{s2}^2}$$

$$\mu_x = \mu_1 | \mu_2$$

μ_1 : όριο ή τιμή στόχος για το y_1 (παράδειγμα: λίπος)

μ_2 : όριο ή τιμή στόχος για το y_2 (παράδειγμα: ξηρά ουσία)

$$r_{s1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0.15$$

$$r_{s2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

r_1 : όριο επαναληψιμότητας y_1

r_2 : όριο επαναληψιμότητας y_2

$$R_{s1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0.15$$

$$R_{s2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

R_1 : όριο αναπαραγωγικότητας y_1

R_2 : όριο αναπαραγωγικότητας y_2 .

Οι διαδικασίες για τον υπολογισμό του r_x και του R_x εφαρμόζονται μόνον εφόσον τα σχετικά όρια επαναληψιμότητας και αναπαραγωγικότητας (r_{s1} , r_{s2} , R_{s1} , R_{s2}) είναι μικρότερα ή ίσα με 0,15.

Ο x συγκρίνεται με το όριο μ_x με βάση τους κανόνες που ορίζονται στα σημεία 1 και 2. Η κρίσιμη διαφορά προσδιορίζεται βάσει του τύπου

$$CrD_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

Όπου \bar{x} είναι ο αριθμητικός μέσος όρος των αποτελεσμάτων x που προκύπτουν κατά χρονολογική σειρά (*).

(*) Σημείωση: Εάν προκύπτουν για παράδειγμα τα αποτελέσματα y_{11} , y_{12} , και y_{22} , πρέπει να υπολογίζεται ο αριθμητικός μέσος όρος του y_{11}/y_{21} και y_{12}/y_{22} .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V
ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

(Άρθρο 5)

α) Διαδικασία εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου (IQC) (χημική ανάλυση)

Προσδιορισμός του υλικού ελέγχου

Χρησιμοποιείται κάποιο υλικό για την IQC και υπόκειται στην ίδια, ή σε μέρος της ίδιας διαδικασίας, όπως και τα δοκιμασμένα υλικά.

Το υλικό ελέγχου μπορεί να είναι:

- πιστοποιημένο υλικό αναφοράς,
- υλικό αναφοράς του εργαστηρίου,
- επικυρωμένο υλικό βάσει δοκιμή επάρκειας,
- υλικό εμβολιασμένο.

Διαδικασία για τη θέσπιση IQC

Το εργαστήριο θα πρέπει να θεσπίσει IQC σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο έγγραφο IUPAC «Εναρμονισμένες κατευθυντήριες γραμμές για τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο σε αναλυτικά εργαστήρια»⁽¹⁾.

Η IQC πραγματοποιείται συμπεριλαμβάνοντας υλικά ελέγχου στην αναλυτική αλληλουχία ή με επαναλαμβανόμενη ανάλυση του δείγματος για δοκιμή. Τα υλικά ελέγχου πρέπει να είναι παρόμοια σε χημική σύνθεση με τα δείγματα για δοκιμή και να είναι επαρκώς σταθερά κατά τη διάρκεια της εξεταζόμενης περιόδου. Πρέπει να αποδεικνύεται ότι μπορούν να καταμεριστούν κατάλληλα σε πανομοιότυπες αναλογίες για τους σκοπούς της ανάλυσης και ότι η συγκέντρωση της ουσίας προς ανάλυση είναι εντός της περιοχής ενδιαφέροντος.

Ένα υλικό ελέγχου θα πρέπει να εισάγεται τουλάχιστον μία φορά σε κάθε αναλυτική μέτρηση και η τιμή που λαμβάνεται θα πρέπει να απεικονίζεται σε γραφικό έλεγχο με στόχο να υπολογίζονται τα μακροπρόθεσμα σφάλματα. Επιπλέον, το εργαστήριο θα πρέπει σε περιοδική βάση να αποδεικνύει ότι τηρεί τους όρους επαναληψιμότητας στο πλαίσιο μιας μεθόδου. Αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθεί με ανάλυση των υλικών ελέγχου ή/και δοκιμής. Τα αποτελέσματα των ανάλυσεων αυτών θα πρέπει να συγκρίνονται με οιαδήποτε δημοσιευμένα όρια επαναληψιμότητας και οιαδήποτε δεδομένα ακριβείας που υπάρχουν στο εργαστήριο.

Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται υλικά ελέγχου, οι τιμές που προκύπτουν από την ανάλυση μεταξύ μεθόδων του υλικού ελέγχου θα πρέπει να αποτυπώνονται σε γραφικό Shewhart [ISO 8258 (1991)] με κατάλληλα όρια ελέγχου. Τα όρια δράσης θα πρέπει να τίθενται σε

$$x \pm 3s_i$$

όπου s_i είναι η συνολική τυπική απόκλιση,

ή, τα όρια ασφαλείας σε

$$x \pm 2s_i$$

Ολική τυπική απόκλιση:

$$s_i = \sqrt{s_b^2 + s_w^2/n}$$

όπου:

s_b = Τυπική απόκλιση μεταξύ μεθόδων

s_w = Τυπική απόκλιση στο πλαίσιο μιας μεθόδου

n = αριθμός προσδιορισμών.

Στις περιπτώσεις όπου δεν χρησιμοποιούνται υλικά ελέγχου (π.χ. λόγω έλλειψης σταθερότητας) τουλάχιστον ένα από τα δοκιμαστικά υλικά πρέπει να αναλύεται εις διπλούν σε κάθε μέθοδο.

Οι απόλυτες διαφορές που προκύπτουν από τις αναλύσεις εις διπλούν στο πλαίσιο μιας μεθόδου (βλέπε παράρτημα III) πρέπει να απεικονίζονται. Η κεντρική γραμμή είναι $1,128 s_w$, το κατώτατο όριο είναι 0, το ανώτατο όριο (όριο δράσης) είναι $3,686 s_w$, όπου s_w είναι η τυπική απόκλιση στο πλαίσιο μιας μεθόδου.

Η διαδικασία ελέγχου πρέπει να περιλαμβάνει υλικά με χαμηλό και υψηλό επίπεδο όπου η περιοχή συγκεντρώσεων είναι μεγάλη.

⁽¹⁾ M. Thomson and R. Wood: «Pure and Applied Chemistry» 67 (4), 649-666 (1995).

Σε περίπτωση που τα δοκιμαστικά υλικά καλύπτουν μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων της προς ανάλυση ουσίας, το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίσει τη σχέση μεταξύ ακρίβειας και επιπέδου συγκεντρώσεως. Εάν η ακρίβεια είναι ανάλογη του επιπέδου μεταγενέστερος έλεγχος θα πρέπει να γίνει με βάση την σχετική ακρίβεια (δηλαδή απόλυτη διαφορά ως ποσοστό μέσης τιμής).

Εφόσον συμβεί ένα από τα ακόλουθα, παύει να υφίσταται η αξιοπιστία του αναλυτικού συστήματος:

- A. η τρέχουσα τιμή βρίσκεται εκτός των ορίων δράσης,
- B. η τρέχουσα και η προηγούμενη τιμή είναι εκτός των ορίων ασφαλείας αλλά εντός των ορίων δράσης,
- Γ. στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται υλικά ελέγχου, εννέα διαδοχικές τιμές είναι στην ίδια πλευρά σε σχέση με τη μέση γραμμή.

Το εργαστήριο πρέπει να ανταποκρίνεται στην εκτός ελέγχου κατάσταση με:

- A. παύση των αναλύσεων εν αναμονή των διαγνωστικών δοκιμών και μέτρων αποκατάστασης και,
- B. απόρριψη της σειράς αποτελεσμάτων και επανάληψη των αναλύσεων των δοκιμαστικών υλικών.

β) Διαδικασία για την επιλογή υλικού ελέγχου του εργαστηρίου και για τον καθορισμό ορίων ακρίβειας «του εργαστηρίου» (χημική ανάλυση)

Δεδομένα εντός των ορίων ακρίβειας του εργαστηρίου είναι δυνατόν να προκύψουν με επανάληψη των αναλύσεων των υλικών ελέγχου ή/και με επαναληπτική ανάλυση των δοκιμαστικών δειγμάτων.

Η κάτωθι προσέγγιση χρησιμεύει ως κατευθυντήρια γραμμή για εργαστήρια που θεσπίζουν παραμέτρους ακρίβειας όσον αφορά τη διαφοροποίηση στο πλαίσιο μιας μεθόδου και μεταξύ μεθόδων, για μεταγενέστερη χρήση κατά την κατάρτιση γραφικών ελέγχου. Τα εργαστήρια μπορούν να θεσπίσουν εναλλακτικές διαδικασίες εφόσον μπορούν να αποδείξουν επαρκώς ότι προέκυψαν αξιόπιστα δεδομένα ακρίβειας.

1. Επιλογή των υλικών ελέγχου

Όταν το εργαστήριο κρίνει κατάλληλη τη χρήση υλικού ελέγχου πρέπει πρώτα να συγκεντρώνονται δεδομένα με σκοπό τον καθορισμό των ορίων. Εφόσον είναι δυνατό να πρέπει να χρησιμοποιούνται Πιστοποιημένα Υλικά Αναφοράς (CRM). Τα υποψήφια υλικά ελέγχου θα πρέπει να αναλύονται βάσει των όρων για επαναληψιμότητα στα πλαίσια μιας μεθόδου, συμπεριλαμβανομένων κατάλληλων CRM με επανάληψη και τυχαία επιλογή. Τα υποψήφια υλικά ελέγχου θα πρέπει να αναλυθούν υπό συνθήκες επαναληπτικότητας μαζί με κατάλληλα CRM με επανάληψη και τυχαία δείγματα. Σε περίπτωση που η προσέγγιση αυτή δεν είναι εφικτή, τα εργαστήρια θα πρέπει να επιδιώκουν τη συμμετοχή τους σε δοκιμές επάρκειας και να καθορίζουν συμβατικούς μέσους όρους (προσδιορισμένες τιμές) που μπορούν να θεωρούνται ως συμβατικοί πραγματικοί μέσοι όροι στους οποίους μπορεί να αποδοθεί λογικό ποσοστό αβεβαιότητας. Άλλες διαδικασίες συμπεριλαμβάνουν προσδιορισμό πραγματικής τιμής με τυποποίηση ή με τη χρήση υλικών ελέγχου εμβολιασμένου.

Επιπλέον, σε περίπτωση που το εργαστήριο έχει πείρα σχετική με την ανάλυση και έχει ήδη καθορίσει στατιστικό έλεγχο, τα οιαδήποτε νέα υλικά ελέγχου (π.χ. τα οποία απαιτούνται λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων) πρέπει να αποκτώνται βάσει αναλύσεων οι οποίες υπόκεινται σε έλεγχο, χρησιμοποιώντας υλικά που ήδη υπάρχουν.

2. Καθορισμός των ορίων

Έχοντας επιλέξει ένα υλικό ελέγχου, το εργαστήριο πρέπει να καθορίσει στοιχεία ακρίβειας στο πλαίσιο μιας μεθόδου και μεταξύ μεθόδων χρησιμοποιώντας το υλικό αυτό.

Ως ελάχιστη προϋπόθεση για τη θέσπιση ακρίβειας στο πλαίσιο μιας μεθόδου, το υλικό ελέγχου θα πρέπει να αναλύεται εις διπλούν σε δώδεκα περιπτώσεις. Η ανάλυση εις διπλούν θα πρέπει να διεξάγεται βάσει των όρων επαναληψιμότητας, δηλαδή ο ίδιος χρήστης, τα ίδια αντιδραστήρια κ.λπ.. Η ανάλυση εις διπλούν του υλικού ελέγχου θα πρέπει να υποβάλλεται σε τυχαία δειγματοληψία στο πλαίσιο μιας αναλυτικής μεθόδου. Κάθε ανάλυση εις διπλούν θα πρέπει να πραγματοποιείται σε χωριστή ημέρα κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου έτσι ώστε να αντιπροσωπεύει μία λογική διαφοροποίηση από μέτρηση σε μέτρηση, λαμβάνοντας υπόψη τις κανονικές διαφοροποιήσεις π.χ. αντιδραστήρια, αναβαθμονομήσεως οργάνων και ενδεχομένως διαφορετικοί αναλυτές.

Σημείωση: Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η χρήση δεδομένων τα οποία δεν είναι πλήρως αντιπροσωπευτικά της διαφοροποίησης μεταξύ των μεθόδων είναι δυνατό να οδηγήσουν σε μη απαραίτητη επανάληψη της ανάλυσης μέσω του καθορισμού πολύ στενών ορίων. Αντιστρόφως, ένα εργαστήριο που υποβάλλει δεδομένα ακρίβειας τα οποία είναι άκρως ανακριβή, είναι δυνατόν να μην είναι σε θέση να τηρήσει τα προδιαγραφόμενα όρια των μεθόδων αναφοράς, θα πρέπει να αναμένει χαμηλή απόδοση σε σύγκριση με ισάξια εργαστήρια, και είναι δυνατόν να παράγει δεδομένα τα οποία δεν είναι κατάλληλα για τον συγκεκριμένο σκοπό.

2.1. Καθορισμός ακρίβειας στο πλαίσιο μιας μεθόδου

2.1.1. Ακρίβεια στο πλαίσιο μιας μεθόδου σε περίπτωση που υπάρχει υλικό ελέγχου

Δεδομένα εις διπλούν (τουλάχιστον 12 δείγματα εις διπλούν) πρέπει πρώτα να υποβάλλονται σε δοκιμή μέγιστης διακύμανσης Cochran's. Αυτό σημαίνει σύγκριση του τετραγώνου της μέγιστης διαφοράς των διπλών δειγμάτων με το άθροισμα των ευρών των επαναλήψεων στο τετράγωνο.

$$c = \frac{d^2 \max}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

όπου

$d_i =$ η διαφορά μεταξύ των διπλών δειγμάτων.

Η τιμή του κριτηρίου Cochran, C, συγκρίνεται με πινακοποιημένες τιμές [ISO 5725 (1994)]. Σε περίπτωση τιμών παράξενων (straggler) ή ακραίων (outlier), το αποτέλεσμα πρέπει να ερευνηθεί για να δοθεί εξήγηση, π.χ. τεχνικό σφάλμα, υπολογιστικό λάθος, παρεκτροπή κατά την διεξαγωγή της δοκιμής, ανάλυση λανθασμένου δείγματος. Σε περίπτωση που η εξήγηση του τεχνικού σφάλματος είναι τέτοια ώστε να είναι αδύνατον να αντικατασταθεί το ύποπτο αποτέλεσμα, θα πρέπει να απορρίπτεται ως πραγματικά ακραία τιμή. Σε περίπτωση που παράξενες ή ακραίες τιμές παραμένουν χωρίς να είναι δυνατόν να αιτιολογηθούν, οι παράξενες τιμές κρατούνται ως σωστές και απορρίπτονται οι ακραίες. Το εργαστήριο πρέπει να επιδιώκει την επίτευξη τιμών αντικατάστασης.

Εφόσον το εργαστήριο είναι ικανοποιημένο ότι τα δεδομένα δεν εμπεριέχουν ακραίες τιμές, η τυπική απόκλιση στο πλαίσιο μιας μεθόδου s_w επιτυγχάνεται ως εξής:

Για κάθε ζεύγος x_{i1} , x_{i2} των p δεδομένων εις διπλούν, το άθροισμα των δειγμάτων εις διπλούν,

$$s_i = x_{i1} + x_{i2}$$

και η διαφορά των δειγμάτων εις διπλούν,

$$d_i = x_{i2} - x_{i1}$$

υπολογίζονται και αθροίζονται σε

$$A = \sum_{i=1}^p s_i$$

$$B = \sum_{i=1}^p d_i^2$$

$$C = \sum_{i=1}^p s_i^2$$

Μία κάποια εκτίμηση της τυπικής απόκλισης στο πλαίσιο μιας μεθόδου είναι:

$$s_w = \sqrt{\frac{B}{2p}}$$

Το όριο ακρίβειας στο εργαστήριο είναι $2,8 s_w$.

Εάν χρησιμοποιείται μέθοδος αναφοράς, το όριο ακρίβειας του εργαστηρίου πρέπει να συγκρίνεται με το δημοσιευμένο όριο επαναληψιμότητας. Το εργαστήριο πρέπει να τηρεί την προϋπόθεση σχετικά με την μέθοδο αναφοράς: αδυναμία τήρησης της προϋπόθεσης αυτής πρέπει να διερευνάται.

Τα όρια που ορίζονται θα πρέπει να θεωρούνται ως προσωρινά και να υποβάλλονται σε επανεξέταση.

2.1.2. Ακρίβεια στο πλαίσιο μιας μεθόδου όπου δεν υπάρχει υλικό ελέγχου

Το εργαστήριο μπορεί να επιλέξει τον καθορισμό ακρίβειας στο πλαίσιο μιας μεθόδου με ανάλυση εις διπλούν των αντιπροσωπευτικών δοκιμαστικών δειγμάτων (τουλάχιστων 12 διπλές αναλύσεις). Σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν υλικά ελέγχου, π.χ. εξαιτίας αστάθειας, τα δεδομένα των διπλών αναλύσεων πρέπει να υπολογίζονται με αυτή τη μέθοδο.

Σημείωση: Συμπεραίνεται ότι οι αναλύσεις καλύπτουν μια σχετικά στενή περιοχή τιμών και, ως εκ τούτου, μία μεμονωμένη τιμή δεν μπορεί να εφαρμοστεί για όλα τα δείγματα. Σε περιπτώσεις όπου η περιοχή των αποτελεσμάτων είναι μεγαλύτερη, π.χ. κατά σειρά μεγέθους, και η ακρίβεια εξαρτάται από το επίπεδο, τα εργαστήρια θα πρέπει να ερευνούν τη χρήση σχετικών τυπικών αποκλίσεων.

Τα στοιχεία θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή Cochran, όπως στο 2.1.1. Εφόσον το εργαστήριο είναι ικανοποιημένο ότι τα δεδομένα είναι απαλλαγμένα από ακραίες τιμές, η τυπική απόκλιση στο πλαίσιο μιας μεθόδου και το όριο ακρίβειας του εργαστηρίου είναι δυνατόν να επιτευχθούν όπως στον τομέα 2.1.1.

Η τυπική απόκλιση στο πλαίσιο μιας μεθόδου s_w είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή γραφικών ελέγχου (βλέπε παράρτημα II). Τα θεσπισμένα όρια θα πρέπει να θεωρούνται ως προσωρινά και να υπόκεινται σε αναθεώρηση.

2.2. Καθορισμός της ακρίβειας μεταξύ μεθόδων

Υπολογίστε τη μέση τιμή ($s_i/2$) για κάθε ζεύγος και υποβάλλετε αυτές τις τιμές σε δοκιμή Grubbs [ISO 5725 (1994)]. Τα κριτήρια απόρριψης/αποδοχής για παράξενες ή ακραίες τιμές περιγράφονται στο 2.1.1. Το εργαστήριο θα πρέπει να προσπαθεί να επιτύχει τιμή αντικατάστασης για κάθε απορριπτό αποτέλεσμα. Εφόσον το εργαστήριο είναι ικανοποιημένο ότι τα δεδομένα είναι απαλλαγμένα από ακραίες τιμές, η τυπική απόκλιση μεταξύ των μεθόδων s_b υπολογίζεται:

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{4(p-1)} \left(C - \frac{p-1}{p} B - \frac{A^2}{p} \right)}$$

ή 0 σε περίπτωση που το αποτέλεσμα υπό την τετραγωνική ρίζα είναι αρνητικό.

Η ολική τυπική απόκλιση s_i χρησιμοποιείται για την κατασκευή γραφικών ελέγχου για το μέσο όρο η προσδιορισμών (βλέπε παράρτημα II). Τα θεσπισμένα όρια θα πρέπει να θεωρούνται ως προσωρινά και να υπόκεινται σε αναθεώρηση.

3. Αναθεώρηση των αρχικών ορίων

Τα όρια ελέγχου που έχουν θεσπιστεί όπως περιγράφεται ανωτέρω πρέπει να θεωρούνται ως αρχικές εκτιμήσεις και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή πριν να χρησιμοποιηθούν για την απόρριψη αποτελεσμάτων μίας παρτίδας.

Με σκοπό την ενημέρωση των ορίων τα οποία έχουν τεθεί βάσει αποδεκτής ακρίβειας στο πλαίσιο μιας μεθόδου (τομέας 2.1.2), πρέπει να συλλέγονται περαιτέρω δεδομένα εις διπλούν σχετικά με τα δοκιμαστικά δείγματα. Το διάστημα πριν την αναθεώρηση θα εξαρτάται σε ένα βαθμό από τη συχνότητα της ανάλυσης. Κατ' αρχήν, τα δεδομένα θα πρέπει να αναθεωρούνται αφού έχουν επιτευχθεί περαιτέρω 10 διπλές αναλύσεις. Το σύνολο των δεδομένων αυτών θα πρέπει στη συνέχεια να υποβάλλεται σε δοκιμή Cochran και να επαναπροσδιορίζονται τα όρια βάσει του νέου αριθμού τυπικής απόκλισης. Μεταγενέστερες αποφάσεις για την αξιοπιστία των ορίων του ελέγχου πρέπει να πραγματοποιηθούν υπό το φως πρόσθετων δεδομένων.

Η αναθεώρηση των αρχικών δεδομένων που έχουν επιτευχθεί για την ακρίβεια μεταξύ μεθόδων εξαρτάται επίσης από τη συχνότητα της ανάλυσης. Ως βασική αρχή, μετά από την λήψη επιπλέον 10 σημείων δεδομένων από την ανάλυση υλικού ελέγχου, σε συχνότητα 1 ανάλυσης ανά παρτίδα, πρέπει να αναθεωρούνται τα αρχικά συμπεράσματα σχετικά με την τυπική απόκλιση και τον μέσο όρο.

Το σύνολο των δεδομένων θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή Grubbs για ακραίες τιμές. Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση θα πρέπει να υπολογίζονται εκ νέου βάσει των νέων δεδομένων.

Επιπλέον, κατά το στάδιο αυτό το εργαστήριο θα πρέπει να εφαρμόζει ένα γραφικό Cusum [BS S700: (1984) και τροποποίηση 5480 (1987)] για τη διερεύνηση οιασδήποτε προβλημάτων που μπορούν να έχουν σχέση με π.χ. γήρανση των αντιδραστηρίων. Οιοδήποτε μεμονωμένο αποτέλεσμα που βρίσκεται εκτός των ορίων «V-mask» του γραφικού Cusum πρέπει να διερευνάται.

Τα νέα όρια (μέσος όρος και τυπική απόκλιση) πρέπει να υπόκεινται σε τακτή επιθεώρηση χρησιμοποιώντας την τεχνική Cusum. Οιαδήποτε ένδειξη ότι η εγκυρότητα του υλικού ελέγχου τίθεται υπό αμφισβήτηση, πρέπει να εξετάζεται εκτενώς.

4. Αναφορά των στοιχείων ακρίβειας

Το εργαστήριο θα πρέπει να θέτει στη διάθεση της αρμόδιας κρατικής αρχής και της Επιτροπής, τις κάτωθι πληροφορίες:

- χρησιμοποιηθείσα μέθοδος
- τυπική απόκλιση στο πλαίσιο μιας μεθόδου, s_w , και όριο ακρίβειας του εργαστηρίου
- τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων, s_b
- ολική τυπική απόκλιση, s_i
- αριθμός αναλύσεων για την επίτευξη δεδομένων ακρίβειας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

(Άρθρο 6)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΚΤΙΜΗΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Οι κάτωθι διαδικασίες εφαρμόζονται εφόσον χρησιμοποιούνται μέθοδοι βαθμολόγησης (πρότυπο IDF 99 C/1997).

α) Προσδιορισμός του «δείκτη επαναληψιμότητας»

Πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον δέκα δείγματα σαν διπλά τυφλά από έναν εκτιμητή σε περίοδο 12 μηνών. Αυτό συνήθως θα συμβαίνει σε αρκετές περιόδους εργασιών. Τα αποτελέσματα για μεμονωμένα χαρακτηριστικά του προϊόντος αξιολογούνται βάσει του ακόλουθου τύπου:

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

W_1 : δείκτης επαναληψιμότητας

x_{i1} : βαθμολόγηση για την πρώτη αξιολόγηση του δείγματος x_i

x_{i2} : βαθμολόγηση για τη δεύτερη αξιολόγηση του δείγματος x_i

n : αριθμός δειγμάτων

Τα δείγματα που πρέπει να αξιολογηθούν θα πρέπει να αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ ποιοτικό φάσμα. Ο W_1 δε θα πρέπει να υπερβαίνει το 1,5 (κλίμακες 5 βαθμίδων).

β) Προσδιορισμός του «δείκτη απόκλισης»

Ο δείκτης αυτός θα πρέπει να χρησιμοποιείται για το έλεγχο του κατά πόσον ένας εκτιμητής χρησιμοποιεί την ίδια κλίμακα για ποιοτική αξιολόγηση όπως μία έμπειρη ομάδα εκτιμητών. Οι βαθμολογίες που προκύπτουν από τον εκτιμητή συγκρίνονται με τον μέσο όρο των βαθμολογιών που προκύπτουν από την ομάδα εκτιμητών. Ο ακόλουθος τύπος χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων:

$$D_1 = 1 + \frac{\sum [(x_{i1} - \bar{x}_{i1})^2 + (x_{i2} - \bar{x}_{i2})^2]}{2n}$$

x_{i1} ; x_{i2} : βλέπε τομέα (α)

\bar{x}_{i1} ; \bar{x}_{i2} : Μέσος όρος βαθμολογιών της ομάδας εκτιμητών για την πρώτη και τη δεύτερη αξιολόγηση, αντιστοίχως, του δείγματος x_i

n : αριθμός των δειγμάτων (τουλάχιστον 10 ανά 12 μήνες).

Τα δείγματα που πρόκειται να αξιολογηθούν θα πρέπει να αντιπροσωπεύουν ευρύ ποιοτικό φάσμα. Ο D_1 δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1,5 (κλίμακες 5 βαθμίδων).

Τα κράτη μέλη θα πρέπει να αναφέρουν οιαδήποτε δυσκολία κατά την εφαρμογή της διαδικασίας αυτής.

γ) Σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν σε διάφορες περιφέρειες ενός κράτους μέλους και σε διάφορα κράτη μέλη

Όπου είναι δυνατόν, μία φορά το χρόνο, τουλάχιστον, οργανώνεται μία δοκιμή, η οποία επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από εκτιμητές διαφόρων περιφερειών. Εάν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές, τα κράτη μέλη πρέπει να παίρνουν τα απαραίτητα μέτρα για τον προσδιορισμό των αιτιών και να καταλήγουν σε συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Συστήνεται στα κράτη μέλη να οργανώνουν δοκιμές οι οποίες επιτρέπουν τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τους δικούς τους εκτιμητές και από εκτιμητές γειτονικών κρατών μελών. Σημαντικές διαφορές θα πρέπει να καταλήγουν σε εις βάθος διερεύνηση, με στόχο την επίτευξη συγκρίσιμων αποτελεσμάτων.

Ζητείται από τα κράτη μέλη να κοινοποιούν στην Επιτροπή τα αποτελέσματα αυτών των συγκρίσεων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

(Άρθρο 6)

Οργανοληπτική αξιολόγηση βουτύρου**1. Είδος εφαρμογής**

Σκοπός της διαδικασίας αυτής για την οργανοληπτική αξιολόγηση του βουτύρου είναι να παράσχει μία ομοιόμορφη μέθοδο που να μπορεί να εφαρμόζεται σε όλα τα κράτη μέλη.

2. Ορισμοί

Οργανοληπτική αξιολόγηση (εκτίμηση) σημαίνει την εξέταση των χαρακτηριστικών ενός προϊόντος με τα όργανα αισθήσεως.

Πάνελ σημαίνει ομάδα επιλεγμένων εκτιμητών εργαζομένων, κατά τη διάρκεια της εκτιμήσεως, χωρίς διεπικοινωνία, και χωρίς να επηρεάζει ο ένας τον άλλο.

Βαθμολόγηση σημαίνει οργανοληπτική αξιολόγηση από πάνελ, χρησιμοποιώντας μία αριθμητική κλίμακα. Πρέπει να χρησιμοποιείται ονοματολογία ελαττωμάτων.

Κατάταξη σημαίνει ποιοτική ταξινόμηση που πραγματοποιείται με βάση τη βαθμολογία.

Δελτία ελέγχου: έντυπα που χρησιμοποιούνται για την καταχώρηση των επιμέρους βαθμολογήσεων για κάθε χαρακτηριστικό και την τελική κατάταξη του προϊόντος (το έντυπο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης και για την καταγραφή της χημικής σύστασης).

3. Χώρος δοκιμής

- 3.1. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε οι εκτιμητές στο χώρο δοκιμής να μην επηρεάζονται από εξωτερικούς παράγοντες.
- 3.2. Ο χώρος δοκιμής πρέπει να είναι απηλλαγμένος από ξένες οσμές και να μπορεί να καθαρίζεται εύκολα. Οι τοίχοι πρέπει να είναι ανοικτού χρώματος.
- 3.3. Ο χώρος δοκιμής και ο φωτισμός που πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην επηρεάζονται οι ιδιότητες των προς βαθμολόγηση προϊόντων. Ο χώρος πρέπει να είναι εφοδιασμένος με κατάλληλο σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας.

4. Επιλογή των εκτιμητών

Ο εκτιμητής πρέπει να είναι εξοικειωμένος με τα προϊόντα βουτύρου και ικανός για την πραγματοποίηση αισθητικού χαρακτηρισμού. Η ικανότητά του θα πρέπει να εκτιμάται σε τακτά χρονικά διαστήματα (τουλάχιστον μία φορά το χρόνο) από την αρμόδια αρχή.

5. Απαιτήσεις για το πάνελ

Ο αριθμός των εκτιμητών του πάνελ πρέπει να είναι μονός, ο ελάχιστος δε αριθμός των εκτιμητών θα πρέπει να είναι τρεις. Η πλειοψηφία πρέπει να είναι υπάλληλοι της αρμόδιας αρχής ή εξουσιοδοτημένα πρόσωπα τα οποία δεν απασχολούνται στη γαλακτοβιομηχανία.

Πρέπει να ληφθούν υπόψη περισσότεροι παράγοντες πριν από την αξιολόγηση, προκειμένου να επιτευχθούν οι βέλτιστες δυνατές επιδόσεις εκ μέρους των αξιολογητών:

- Οι αξιολογητές δεν πρέπει να πάσχουν από καμία ασθένεια που μπορεί να επηρεάσει τις επιδόσεις τους. Εν τοιαύτη περίπτωση, πρέπει να ενταχθεί άλλο πρόσωπο στο πάνελ.
- Οι αξιολογητές πρέπει να βρίσκονται εγκαίρως επιτόπου προκειμένου να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση και να βεβαιωθούν ότι έχουν αφιερώσει επαρκή χρόνο για την πραγματοποίηση της αξιολόγησης.
- Οι αξιολογητές πρέπει να αποφεύγουν να χρησιμοποιούν προϊόντα με έντονο άρωμα, όπως αρώματα, λοσιόν για μετά το ξύρισμα, αποσμητικά, και την κατανάλωση τροφίμων με έντονη οσμή (μπαχαρικά) κ.λπ.
- Οι αξιολογητές δεν μπορούν ούτε να καπνίσουν, ούτε να φάνε, ούτε να πιουν παρά μόνο νερό κατά τη διάρκεια της μισής ώρας που προηγείται της αξιολόγησης.

6. Εκτίμηση της αξίας κάθε χαρακτηριστικού

6.1. Η οργανοληπτική αξιολόγηση πρέπει να πραγματοποιείται σε σχέση με τα ακόλουθα τρία χαρακτηριστικά: εμφάνιση, σύσταση και γευστικοοσφραντικό αίσθημα.

Η εμφάνιση περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία: χρώμα, ορατή καθαρότητα, ανάπτυξη μυκήτων και διασπορά νερού. Ο σχηματισμός κολλοειδών υδατικών διαλυμάτων ελέγχεται σύμφωνα με το πρότυπο IDF 112A/1989.

Η σύσταση περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία: συνεκτικότητα και επαλειψιμότητα.

Για την αξιολόγηση της σύστασης του βουτύρου μπορούν να εφαρμοστούν φυσικές μέθοδοι. Η Επιτροπή σχεδιάζει τη μελλοντική εναρμόνιση των μεθόδων αυτών.

Το γευστικοσφραγιστικό αίσθημα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία: γεύση και οσμή.

Τυχόν σημαντική απόκλιση από τη συνιστώμενη θερμοκρασία παρεμποδίζει την αξιόπιστη αξιολόγηση της σύστασης, της γεύσης και του αρώματος. Η θερμοκρασία είναι παράγοντας υψίστης σπουδαιότητας.

- 6.2. Κάθε χαρακτηριστικό πρέπει να αξιολογείται οργανοληπτικώς ξεχωριστά. Η βαθμολόγηση πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τον πίνακα 1.
- 6.3. Μπορεί να είναι πρόσφορο οι εκτιμητές να βαθμολογήσουν μαζί, πριν από την έναρξη της εκτίμησης, ένα ή περισσότερα δείγματα αναφοράς για την εμφάνιση, σύσταση, γεύση και όσφρηση για την επίτευξη ομοιομορφίας.
- 6.4. Η βαθμολογία για την αποδοχή είναι η εξής:

	Μέγιστη	Απαιτούμενη
Εμφάνιση	5	4
Σύσταση	5	4
Γεύση και όσφρηση	5	4

Όπου δεν επιτυγχάνεται η απαιτούμενη βαθμολογία, πρέπει να περιγράφεται το ελάττωμα. Η βαθμολογία που δίδεται από κάθε εκτιμητή για κάθε χαρακτηριστικό πρέπει να καταχωρείται στο δελτίο ελέγχου. Το προϊόν γίνεται αποδεκτό ή απορρίπτεται βάσει αποφάσεως κατά πλειοψηφία. Περιπτώσεις όπου διαφορές μεταξύ της επιμέρους βαθμολόγησης για κάθε χαρακτηριστικό είναι μεγαλύτερες από εκείνη προσκειμένων βαθμών δεν θα πρέπει να παρατηρούνται συχνά (όχι περισσότερο από μία φορά ανά 20 δείγματα). Άλλως, ο επικεφαλής του πάνελ θα πρέπει να ελέγχει την ικανότητα του πάνελ.

7. Εποπτεία

Ο επικεφαλής του πάνελ που πρέπει να είναι μόνιμος υπάλληλος της αρμόδιας αρχής και μπορεί να είναι και μέλος του πάνελ, πρέπει να είναι εν γένει υπεύθυνος για το σύνολο της διαδικασίας. Πρέπει να καταχωρεί τις ατομικές βαθμολογίες για κάθε χαρακτηριστικά στο δελτίο ελέγχου και να πιστοποιεί αν το προϊόν είναι αποδεκτό ή αν απορρίπτεται.

8. Δειγματοληψία και ετοιμασία του δείγματος

- 8.1. — Καλόν είναι, κατά τη διάρκεια της εκτίμησης, η ταυτότητα των δειγμάτων να αποκρύπτεται, ώστε να αποφεύγεται οποιαδήποτε πιθανή προκατάληψη ή συμπάθεια.
 - Αυτό θα πρέπει να οργανώνεται από τον επικεφαλής του πάνελ πριν από την αξιολόγηση χωρίς την παρουσία των άλλων μελών του πάνελ.
- 8.2. Όταν η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιείται στον ψυχρό χώρο αποθήκευσης, το δείγμα λαμβάνεται χρησιμοποιώντας δοκιμαστή βουτύρου. Εάν η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιείται σε άλλο τόπο, τότε θα πρέπει να λαμβάνεται δείγμα τουλάχιστον 500 g.
- 8.3. Κατά τη διάρκεια της αξιολόγησης, το βούτυρο θα πρέπει να έχει θερμοκρασία 10 — 12 °C. Μεγάλες αποκλίσεις θα πρέπει να αποφεύγονται πάση θυσία.

9. Ονοματολογία

Βλέπε συνημμένο πίνακα 2.

Πίνακας 1: Γνωμάτευση βουτύρου

Εμφάνιση			Σύσταση			Γεύση και άρωμα		
Βαθμοί	Αριθ. (¹)	Παρατηρήσεις	Βαθμοί (ποιοτική κλάση)	Αριθ. (¹)	Παρατηρήσεις	Βαθμοί (ποιοτική κλάση)	Αριθ. (¹)	Παρατηρήσεις
5		Πολύ καλή ιδανικός τύπος καλλίστη ποιότητα (καλώς επαλείψιμο)	5		Πολύ καλή ιδανικός τύπος καλλίστη ποιότητα (καλώς επαλείψιμο)	5		Πολύ καλή ιδανικός τύπος καλλίστη ποιότητα (απολύτως καθαρό θαυμάσιο άρωμα)
4		Καλή (²) (Μη εμφανή ελαττώματα)	4	17 18	Καλή (²) σκληρό μαλακό	4		Καλό (²) (Μη εμφανή ελαττώματα)
3	1 2 3 4 5 6 7 8	Μέτρια (μικρά ελαττώματα) ελεύθερη υγρασία μη ομοιόμορφο, δίχρωμο ραβδωτό με νερά, κηλιδωμένο διαχωρισμός ελαίου έντονο χρώμα πορώδες	3	14 15 16 17 18	Μέτρια (μικρά ελαττώματα) εύθρυπτο πολτώδες λιπαρό κολλώδες σκληρό μαλακό	3	21 22 25 27 33 34 35	Μέτρια (μικρά ελαττώματα) μη καθαρό ξένη γεύση όξινα γεύση σανού γεύση καμμένου γεύση σανού καυστικό, πικρό πολύ αλατισμένο
2	1 3 4 5 6 10 11 12	Κακή (εμφανή ελαττώματα) ελεύθερη υγρασία ραβδωτό με νερά, κηλιδωμένο διαχωρισμός ελαίου ξένες ύλες μουχλιασμένο αδιάλυτο άλας	2	14 15 16 17 18	Κακή (εμφανή ελαττώματα) εύθρυπτο πολτώδες λιπαρό κολλώδες σκληρό μαλακό	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	Κακό (εμφανή ελαττώματα) ακάθαρτο ξένη γεύση μπαγατίτικο όξινο οξειδωμένη γεύση, μεταλλική γεύση γεύση σανού καυστικό πικρό πολύ αλατισμένο γεύση σάπιου χημική γεύση
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	Πολύ κακή (μεγάλα ελαττώματα) ελεύθερη υγρασία ραβδωτό με νερά, κηλιδωμένο διαχωρισμός έντονο χρώμα κοκκώδες ξένες ύλες μουχλιασμένο αδιάλυτο άλας	1	14 15 16 17 18	Πολύ κακή (μεγάλα ελαττώματα) εύθρυπτο πολτώδες λιπαρό κολλώδες σκληρό μαλακό	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	Πολύ κακή (μεγάλα ελαττώματα) ξένη γεύση τυρώδες, γεύση όξινου τυριού όξινο ζυμωμένο μουχλιασμένο ταγγό ελαιώδες γεύση ιχθυελαίου γεύση ξυγγιού οξειδωμένη γεύση, μεταλλική γεύση καυστικό, πικρό γεύση σάπιου γεύση βύνης χημική γεύση

(¹) Πίνακας 2.

(²) Τα ελαττώματα που αναφέρονται κάτω από τον όρο «καλή/καλό» είναι μικρές αποκλίσεις από τον ιδανικό τύπο.

Πίνακας 2: Ονοματολογία ελαττωμάτων βουτύρου

I. Εμφάνιση

1. ελεύθερη υγρασία, εμφανή σταγονίδια νερού
2. μη ομοιόμορφο, δίχρωμο
3. ραβδωτό
4. με νερά, έγχρωμα στίγματα
5. κηλιδωμένο (έγχρωμα σημάδια, κηλίδες τηγμένου βουτύρου)
6. διαχωρισμός ελαίου
7. έντονα χρωματισμένο
8. πορώδες (εμφανής εγκλεισμός αέρα)
9. κοκκώδες
10. ξένες ύλες
11. μουχλιασμένο
12. αδιάλυτο άλας

II. Σύσταση

14. εύθρυπτο
15. πολτώδες
16. κολλώδες
17. σκληρό
18. μαλακό

III. Γευστικοσφραντικό αίσθημα

20. έλλειψη αρώματος
21. ακάθαρτο ⁽¹⁾
22. ξένη γεύση
23. μπαγιάτικο
24. τυρώδες, γεύση όξινου τυριού
25. όξινο
26. ζυμωμένο
27. α) γεύση μαγειρεμένου
β) γεύση καμμένου
28. γεύση μούχλας
29. ταγγό
30. ελαιώδες, γεύση ιχθυελαίου
31. γεύση ξυγγιού
32. α) οξειδωμένη γεύση
β) μεταλλική γεύση
33. γεύση σανού
34. καυστικό, πικρό
35. πολύ αλατισμένο
36. γεύση σάπιου
37. γεύση βύνης
38. χημική γεύση

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII

(Άρθρο 7)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΤΗΡΕΙΤΑΙ ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΑΜΦΙΣΒΗΤΟΥΜΕΝΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ)

1. Είναι δυνατό να διεξαχθεί μία πρόσθετη ανάλυση μετά από αίτημα της επιχείρησης, εντός προθεσμίας 7 εργάσιμων ημερών που έπονται της ανακοίνωσης των αποτελεσμάτων της πρώτης ανάλυσης, εφόσον υπάρχουν σφραγισμένα διπλά δείγματα του προϊόντος και εφόσον έχουν αποθηκευθεί καταλλήλως στους αρμόδιους οργανισμούς.
2. Ο αρμόδιος οργανισμός αποστέλλει, μετά από αίτημα της επιχείρησης και επ' εξόδων της, τα δείγματα αυτά σε ένα δεύτερο εργαστήριο. Το εργαστήριο αυτό πρέπει να είναι εγκεκριμένο για τη διεξαγωγή επίσημων αναλύσεων και πρέπει να έχει αποδεδειγμένη αρμοδιότητα για τις εν λόγω αναλύσεις. Η αρμοδιότητα αυτή θα πρέπει να τεκμηριώνεται με επιτυχή συμμετοχή σε συλλογικές μελέτες, δοκιμές ικανότητας ή διεργαστηριακές συγκρίσεις. Το δεύτερο εργαστήριο πρέπει να χρησιμοποιήσει τη μέθοδο αναφοράς. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα δύο εργαστήρια αξιολογούνται ως εξής:

α) Σε περίπτωση που αμφότερα τα εργαστήρια πληρούν τις προϋποθέσεις επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας

Ο αριθμητικός μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δοκιμών που προκύπτουν από αμφότερα τα εργαστήρια αναφέρεται ως το τελικό αποτέλεσμα. Το τελικό αυτό αποτέλεσμα αξιολογείται λαμβάνοντας υπόψη την κρίσιμη διαφορά, χρησιμοποιώντας τον κάτωθι τύπο:

$$CrD_{95}(y - m_e) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

\bar{y} : αριθμητικός μέσος όρος όλων των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από αμφότερα τα εργαστήρια

m_e : όριο

R: αναπαραγωγιμότητα

r: επαναληψιμότητα

n_1 : αριθμός των αποτελεσμάτων που προκύπτουν στο εργαστήριο 1

n_2 : αριθμός των αποτελεσμάτων που προκύπτουν στο εργαστήριο 2.

Σημείωση 8 Εάν το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο

$$x = y_1 \pm y_2 \text{ ή } x = y_1/y_2$$

(βλέπε παράρτημα VI σημεία 3. και 4., αντιστοίχως), Στον τύπο πρέπει να τοποθετούνται οι τιμές $R^2 \cdot x$ και $r^2 \cdot x$ αντί των R^2 και r^2 .

β) Σε περίπτωση που και τα δύο εργαστήρια πληρούν την προϋπόθεση για επαναληψιμότητα και η προϋπόθεση αναπαραγωγιμότητας δεν τηρείται

Η προς ανάλυση ποσότητα τελικά απορρίπτεται, εάν τα αποτελέσματα αμφότερων των εργαστηρίων καταλήγουν στο συμπέρασμα αυτό. Σε άλλη περίπτωση, η αποστολή γίνεται αποδεκτή.

γ) Σε περίπτωση που μόνο ένα εργαστήριο πληροί την προϋπόθεση επαναληψιμότητας

Το τελικό αποτέλεσμα του εργαστηρίου που πληροί την προϋπόθεση για επαναληψιμότητα χρησιμοποιείται για την απόφαση όσον αφορά την αποδοχή ή όχι της αποστολής.

δ) Σε περίπτωση που κανένα εργαστήριο δεν πληροί την προϋπόθεση για επαναληψιμότητα, αλλά τηρείται η προϋπόθεση αναπαραγωγιμότητας

Εφαρμόζεται το σημείο α).

ε) Σε περίπτωση που κανένα εργαστήριο δεν πληροί την προϋπόθεση για επαναληψιμότητα και δεν τηρείται η προϋπόθεση αναπαραγωγιμότητας

Η προς ανάλυση ποσότητα γίνεται αποδεκτή εφόσον τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το ένα εργαστήριο καταλήγουν στο συμπέρασμα αυτό.

στ) Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα προκύπτουν χρησιμοποιώντας μη επικυρωμένες μεθόδους

Η προς ανάλυση ποσότητα γίνεται αποδεκτή εφόσον τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το ένα εργαστήριο καταλήγουν στο συμπέρασμα αυτό.

3. Τα αποτελέσματα της δεύτερης ανάλυσης ανακοινώνονται στην επιχείρηση από την αρμόδια αρχή το ταχύτερο δυνατό. Το κόστος της δεύτερης ανάλυσης βαρύνει την επιχείρηση στην περίπτωση όπου απορρίπτεται η ποσότητα που υπόκειται σε ανάλυση.

4. Εντός των πέντε εργάσιμων ημερών που ακολουθούν τη δειγματοληψία, εφόσον η επιχείρηση παρέχει την απόδειξη ότι η διαδικασία δειγματοληψίας δεν είναι σωστή, αυτή θα πρέπει, εφόσον είναι δυνατό, να επαναλαμβάνεται. Στην περίπτωση που δεν είναι δυνατή μία νέα δειγματοληψία, η ποσότητα που υπόκειται σε ανάλυση γίνεται αποδεκτή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX

(Άρθρο 8)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Στην παρούσα μέθοδο αναφοράς καθορίζεται ο τρόπος προσδιορισμού της περιεκτικότητας του βουτύρου σε υγρασία.

2. Στοιχεία αναφοράς

Πρότυπο IDF 50 C: 1995. Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα - Μέθοδοι δειγματοληψίας.

3. Ορισμός

Περιεκτικότητα του βουτύρου σε υγρασία: η απώλεια μάζας μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας θέρμανσης που καθορίζεται στο πρότυπο αυτό. Εκφράζεται σε γραμμάρια ανά 100 γραμμάρια.

4. Αρχή της μεθόδου

Εξάτμιση του νερού από μια δεδομένη ποσότητα ελέγχου, παρουσία ελαφρόπετρας, σε θερμοκρασία 102 °C σε πυριατήριο.

5. Εργαστηριακά όργανα και υλικά

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και ειδικότερα:

- 5.1. Αναλυτικός ζυγός με ευαισθησία 1 mg.
- 5.2. Ξηραντήρας εφοδιασμένος με αποδοτικό ξηραντικό μέσο (π.χ. silica gel, που έχει πρόσφατα ξηρανθεί, με υγροσκοπικό δείκτη).
- 5.3. Πυριατήριο με αερισμό και θερμοστατικό έλεγχο της θερμοκρασίας, που λειτουργεί στους 102 ± 2 °C σε όλο το χώρο εργασίας.
- 5.4. Κάψες από γυαλί, πορσελάνη ή μη διαβρωτικό μέταλλο, ύψους περίπου 20 mm και διαμέτρου 60 έως 80 mm.
- 5.5. Ελαφρόπετρα, κοκκοποιημένη και πλυμένη, διαμέτρου 0,8-10 mm.

6. Δειγματοληψία

Βλέπε πρότυπο IDF 50 C: 1995.

7. Εκτέλεση

7.1. Παρασκευή του δείγματος ελέγχου

Το εργαστηριακό δείγμα θερμαίνεται στο κλειστό δοχείο από γυαλί ή κατάλληλη πλαστική ύλη, το οποίο θα πρέπει να είναι γεμάτο κατά το ήμισυ έως τα δύο τρίτα, σε θερμοκρασία που επιτρέπει στο δείγμα να είναι αρκετά μαλακό, ώστε να διευκολύνεται η πλήρης ανάμειξή του προς ομοιογενοποίηση (είτε με μηχανικό αναδευτήρα είτε με το χέρι). Η θερμοκρασία ανάμειξης δεν θα πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει τους 35 °C. Το δείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το συντομότερο δυνατόν μετά την ψύξη, ανοίγεται το δοχείο του δείγματος και το περιεχόμενο ανακινείται για λίγο (όχι περισσότερο από 10 δευτερόλεπτα) με κατάλληλο όργανο, π.χ. κοχλιάριο ή σπαθίδα, πριν από τη ζύγιση.

7.2. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε υγρασία

7.2.1. Στην κάψα (5.4) φέρονται περίπου 10 g ελαφρόπετρας.

7.2.2. Η κάψα με την ελαφρόπετρα ξηραίνεται στο πυριατήριο (5.3) στους 102 ± 2 °C τουλάχιστον για μία ώρα.

Σημείωση: οι χρόνοι ξήρανσης που αναφέρονται στα σημεία 7.2.2, 7.2.5 και 7.2.7 υπολογίζονται από τη στιγμή που η θερμοκρασία του πυριατηρίου φθάνει τους 102 ± 2 °C.

7.2.3. Η κάψα αφήνεται να ψυχθεί στον ξηραντήρα (5.2) στη θερμοκρασία του θαλάμου ζύγισης και ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg.

- 7.2.4. Ζυγίζεται μέσα στην κάψα, με ακρίβεια 1 mg, ποσότητα ελέγχου περίπου 5 g από το δείγμα ελέγχου.
- 7.2.5. Η κάψα τοποθετείται στο πυριατήριο στους 102 ± 2 °C και αφήνεται για τρεις ώρες.
- 7.2.6. Η κάψα αφήνεται να ψυχθεί στον ξηραντήρα στη θερμοκρασία του θαλάμου ζύγισης και ζυγίζεται με ακρίβεια 1 mg.
- 7.2.7. Η διαδικασία ξήρανσης επαναλαμβάνεται για επιπλέον περιόδους 1 ώρας, κάθε φορά με τις φάσεις ψύξης και ζύγισης που καθορίζονται στο σημείο 7.2.6 μέχρι σταθερού βάρους (η μεταβολή της μάζας δεν υπερβαίνει το 1 mg).
- Σε περίπτωση αύξησης της μάζας, χρησιμοποιείται για τους υπολογισμούς η μικρότερη μάζα που έχει καταγραφεί.

8. Έκφραση των αποτελεσμάτων

8.1. Τρόπος υπολογισμού και μαθηματικός τύπος

Η περιεκτικότητα σε υγρασία, W, υπολογίζεται σε κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία με τη βοήθεια του ακόλουθου τύπου:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

όπου

m_0 είναι η μάζα της κάψας με την ελαφρόπετρα (7.2.3), σε γραμμάρια

m_1 είναι η μάζα της ποσότητας ελέγχου, της κάψας και της ελαφρόπετρας (7.2.4), σε γραμμάρια

m_2 είναι η μάζα της ποσότητας ελέγχου, της κάψας και της ελαφρόπετρας μετά την ξήρανση (7.2.7), σε γραμμάρια.

Το αποτέλεσμα καταγράφεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

8.2. Ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων προσδιορισμών, που έχουν εκτελεστεί ταυτόχρονα ή με μικρή χρονική διαφορά από τον ίδιο τεχνικό στις ίδιες συνθήκες και με πανομοιότυπο υλικό ελέγχου, δεν υπερβαίνει το 0,2 %.

8.3. Διεργαστηριακή επαναληπτικότητα

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων και ανεξάρτητων προσδιορισμών, που έχουν εκτελεστεί από δύο τεχνικούς εργαζόμενους σε διαφορετικά εργαστήρια με πανομοιότυπο υλικό ελέγχου, δεν υπερβαίνει το 0,3 %.

9. Έκθεση ελέγχου

Στην έκθεση ελέγχου περιγράφεται η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και παρατίθενται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν. Αναφέρονται επίσης 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 τα αποτελέσματα. Η έκθεση ελέγχου περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που είναι απαραίτητα για την αναγνώριση της ταυτότητας του δείγματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Χ

(Άρθρο 8)

ΒΟΥΤΥΡΟ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΧΩΡΙΣ ΛΙΠΟΣ**1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Στο παρόν πρότυπο καθορίζεται μέθοδος προσδιορισμού της περιεκτικότητας του βουτύρου σε στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος.

2. Στοιχεία αναφοράς

Πρότυπο IDF 50 C: 1995. Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα — Μέθοδοι δειγματοληψίας.

3. Ορισμός

Περιεκτικότητα του βουτύρου σε στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος: η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία των ουσιών που προσδιορίζονται με την καθοριζόμενη μέθοδο. Εκφράζεται σε γραμμάρια ανά 100 γραμμάρια.

4. Αρχή της μεθόδου

Εξάτμιση του νερού από γνωστή ποσότητα βουτύρου, εκχύλιση του λίπους με πετρελαϊκό αιθέρα και ζύγιση του υπολείμματος.

5. Αντιδραστήριο

Πετρελαϊκός αιθέρας με πεδίο τιμών σημείου ζέσεως 30-60 °C. Το αντιδραστήριο δεν αφήνει υπολείμματα σε ποσότητα ανώτερη από 1 mg μετά την εξάτμιση 100 ml.

6. Εργαστηριακά όργανα και υλικά

- 6.1. Αναλυτικός ζυγός με ευαισθησία 1 mg.
- 6.2. Ξηραντήρας εφοδιασμένος με αποδοτικό ξηραντικό μέσο (π.χ. silica gel, που έχει πρόσφατα ξηρανθεί, με υγροσκοπικό δείκτη).
- 6.3. Πυριατήριο με αερισμό και θερμοστατικό έλεγχο της θερμοκρασίας, που λειτουργεί στους 102 ± 2 °C σε όλο το χώρο εργασίας.
- 6.4. Κάψες από γυαλί, πορσελάνη ή μη διαβρωτικό μέταλλο, με ύψους στομίου περίπου 20 mm και διάμετρο 60 έως 80 mm, εφοδιασμένες με γυάλινη ράβδο ανάδευσης.
- 6.5. Διηθητικό χωνευτήριο από συντηγμένο γυαλί, διαμέτρου πόρων 16 έως 40 μm, με φιάλη αναρρόφησης.

7. Δειγματοληψία

Βλέπε πρότυπο IDF 50 C: 1995.

8. Εκτέλεση**8.1. Παρασκευή του δείγματος ελέγχου**

Το εργαστηριακό δείγμα θερμαίνεται στο κλειστό δοχείο από γυαλί ή κατάλληλη πλαστική ύλη, το οποίο θα πρέπει να είναι γεμάτο κατά το ήμισυ έως τα δύο τρίτα, σε θερμοκρασία που επιτρέπει στο δείγμα να είναι αρκετά μαλακό, ώστε να διευκολύνεται η πλήρης ανάμειξή του προς ομοιογενοποίηση (είτε με μηχανικό αναδευτήρα είτε με το χέρι). Η θερμοκρασία ανάμειξης δεν θα πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει τους 35 °C. Το δείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το συντομότερο δυνατόν μετά την ψύξη, ανοίγεται το δοχείο του δείγματος και το περιεχόμενο ανακινείται για λίγο (όχι περισσότερο από 10 δευτερόλεπτα) με κατάλληλο όργανο, π.χ. κοχλιάριο ή σπαθίδα, πριν από τη ζύγιση.

8.2. Προσδιορισμός

- 8.2.1. Η κάψα με τη ράβδο (6.4) και το χωνευτήριο (6.5) ξηραίνονται στο πυριατήριο (6.3) για μία ώρα. Αφήνονται να ψυχθούν στον ξηραντήρα και ζυγίζονται όλα μαζί (δηλαδή κάψα, ράβδος και χωνευτήριο) με ακρίβεια 1 mg (m_0).

Σημειώσεις: — κατά κανόνα, αρκεί χρόνος ψύξης 45 λεπτών,

— εάν υποβάλλονται σε ανάλυση περισσότερες από μία ποσότητες ελέγχου από την παρτίδα, έχει σημασία να χρησιμοποιείται για την καθεμία ο ίδιος συνδυασμός κάψας, ράβδου και χωνευτηρίου.

- 8.2.2. Απομακρύνεται το χωνευτήριο και σημειώνεται το βάρος της κάψας με τη ράβδο με ακρίβεια 1 mg (m_1).

- 8.2.3. Ζυγίζεται μέσα στην κάψα, με ακρίβεια 1 mg, ποσότητα ελέγχου περίπου 5 g από το δείγμα ελέγχου (8.1) (m_2).

- 8.2.4. Η κάψα (που περιέχει τη ράβδο και το βούτυρο) τοποθετείται στο πυριατήριο στους 102 ± 2 °C και αφήνεται όλη τη νύχτα.
- 8.2.5. Η κάψα (8.2.3) αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8.2.6. Προστίθενται στην κάψα 15 ml θερμού (περίπου 25 °C) πετρελαϊκού αιθέρα και με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου αποσπάται όσο το δυνατόν περισσότερο από το ίζημα που προσκολλάται στην κάψα. Ο διαλύτης μεταγγίζεται στο χωνευτήριο και αφήνεται να διηθηθεί στη φιάλη αναρρόφησης.
- 8.2.7. Η εργασία 8.2.6 επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Εάν δεν φαίνονται ίχνη λίπους στην επιφάνεια της κάψας, κατά την τέταρτη έκπλυση μεταφέρεται ποσοτικά στο χωνευτήριο όσο το δυνατόν περισσότερο από το ίζημα. Σε αντίθετη περίπτωση, επαναλαμβάνεται η εργασία 8.2.6 μέχρι να απομακρυνθεί τελείως κάθε ίχνος λίπους.
- 8.2.8. Εκπλύνεται το ίζημα στο χωνευτήριο με 25 ml θερμού πετρελαϊκού αιθέρα.
- 8.2.9. Η κάψα με τη γυάλινη ράβδο και το χωνευτήριο ξηραίνονται μαζί στο πυριατήριο στους 102 ± 2 °C για 30 λεπτά.
- 8.2.10. Αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου στον ξηραντήρα και ζυγίζονται με ακρίβεια 1 mg.
- 8.2.11. Οι εργασίες 8.2.9 και 8.2.10 επαναλαμβάνονται μέχρι σταθερού βάρους (η μεταβολή της μάζας δεν υπερβαίνει το 1 mg) του συνόλου κάψα-ράβδος-χωνευτήριο (m_3).

9. Έκφραση των αποτελεσμάτων

9.1. Υπολογισμός του στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος

Το στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος, SNF, υπολογίζεται σε κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία με τη βοήθεια του ακόλουθου τύπου:

$$\text{SNF} = \frac{m_3 - m_0}{m_2 - m_1} \times 100$$

όπου:

m_0 είναι η μάζα της κενής κάψας με τη γυάλινη ράβδο και του χωνευτηρίου (8.2.1), σε γραμμάρια

m_1 είναι η μάζα της κενής κάψας με τη γυάλινη ράβδο (8.2.2), σε γραμμάρια

m_2 είναι η μάζα της ποσότητας ελέγχου και της κάψας με τη γυάλινη ράβδο (8.2.3), σε γραμμάρια

m_3 είναι η τελική μάζα της κάψας με τη ράβδο και του χωνευτηρίου που περιέχει το ίζημα (8.2.11), σε γραμμάρια.

Το αποτέλεσμα καταγράφεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

9.2. Ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων προσδιορισμών, που εκτελούνται ταυτόχρονα ή με μικρή χρονική διαφορά από τον ίδιο τεχνικό στις ίδιες συνθήκες και με πανομοιότυπο υλικό ελέγχου, δεν υπερβαίνει το 0,1 %.

9.3. Διεργαστηριακή επαναληπτικότητα

Η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων και ανεξάρτητων προσδιορισμών, που εκτελούνται από δύο τεχνικούς εργαζόμενους σε διαφορετικά εργαστήρια με πανομοιότυπο υλικό ελέγχου, δεν υπερβαίνει το 0,2 %.

10. Έκθεση ελέγχου

Στην έκθεση ελέγχου περιγράφεται η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και παρατίθενται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν. Αναφέρονται επίσης 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 τα αποτελέσματα. Η έκθεση ελέγχου περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που είναι απαραίτητα για την αναγνώριση της ταυτότητας του δείγματος.

Σημείωση:

Εάν υποβάλλεται σε ανάλυση αλατισμένο βούτυρο, το άλας που έχει προστεθεί προσδιορίζεται ως στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος. Για τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος του γάλακτος, πρέπει να αφαιρεθεί η περιεκτικότητα σε άλας προσθήκης από την περιεκτικότητα σε στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος. Οι υπολογισμένες τιμές ακρίβειας για τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος του γάλακτος είναι:

Ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα 0,10 %

Διεργαστηριακή επαναληπτικότητα 0,20 %

Από τα ανωτέρω μπορεί να συναχθεί ότι οι τιμές ακρίβειας που προκύπτουν για τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος ισχύουν και για τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος του γάλακτος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΙ

(Άρθρο 8)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ ΣΕ ΛΙΠΟΣ

Η περιεκτικότητα σε λίπος προκύπτει έμμεσα από τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε υγρασία και της περιεκτικότητας σε στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος σύμφωνα με το παράρτημα ΙΧ και το παράρτημα Χ, αντίστοιχα. Η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία λίπους προς

$$100 - (W + SNF)$$

όπου

W: είναι η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία νερού

SNF: είναι η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία στερεού υπολείμματος χωρίς λίπος.

Οι υπολογισμένες τιμές ακρίβειας για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λίπος είναι:

Ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα: $r = 0,22 \%$

Διεργαστηριακή επαναληπτικότητα: $R = 0,36 \%$.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΙΙ

(Άρθρο 9)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ, ΤΟΥ ΒΟΥΤΥΡΟΥ Ή ΤΗΣ ΚΡΕΜΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΒΑΝΙΛΙΝΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Στη μέθοδο αυτή περιγράφεται διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού της βανιλίνης στο συμπυκνωμένο βούτυρο ή την κρέμα γάλακτος.

2. Αρχή

Εκχύλιση γνωστής ποσότητας δείγματος με μείγμα ισοπροπανόλης/αιθανόλης/ακετονιτριλίου (1:1:2). Καταβύθιση του μεγαλύτερου μέρους των λιπαρών υλών με ψύξη σε θερμοκρασία $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, και στη συνέχεια φυγοκέντρωση.

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

3. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και ειδικότερα:

- 3.1. Καταψύκτης με πεδίο τιμών θερμοκρασίας λειτουργίας -15 και $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 3.2. Σύριγγες μίας χρήσεως χωρητικότητας 2 ml.
- 3.3. Μικροδιηθητικές μεμβράνες μεγέθους πόρων 0,45 μm , ανθεκτικές σε διάλυμα περιεκτικότητας 5 % στο διάλυμα εκχύλισης (4.4).
- 3.4. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελούμενο από αντλία (παροχή 0,1 ml/min), διάταξη έγχυσης εγχυόμενη ποσότητα 20 μl , αυτόματη ή χειροκίνητη, ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (λειτουργία σε μήκος κύματος 306 nm, 0,01 AU πλήρους κλίμακας) καταγραφεία ή ολοκληρωτή και θερμοστάτη στήλης που λειτουργεί στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 3.5. Αναλυτική στήλη (μήκος 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm), η οποία έχει πληρωθεί με LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) ή ισοδύναμο υλικό.
- 3.6. Στήλη ασφαλείας (μήκος 20 mm και εσωτερικής διαμέτρου 3 mm περίπου), η οποία έχει πληρωθεί σε ξηρά κατάσταση με Perisorb RP 18 (30-40 μm) ή ισοδύναμο υλικό.

4. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας.

- 4.1. Ισοπροπανόλη
- 4.2. Αιθανόλη 96 % (v/v)
- 4.3. Ακετονιτρίλιο
- 4.4. Διάλυμα εκχύλισης

Μείγμα ισοπροπανόλης (4.1), αιθανόλης (4.2) και ακετονιτριλίου (4.3) σε αναλογία 1:1:2 (v/v).

- 4.5. Βανιλίνη (4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεύδη)

- 4.5.1. Μητρικό διάλυμα βανιλίνης (= 500 $\mu\text{g/ml}$)

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

- 4.5.2. Πρότυπο διάλυμα βανιλίνης (= 10 $\mu\text{g/ml}$)

Αναρροφώνται με σιρόνιο 5,00 ml μητρικού διαλύματος βανιλίνης (4.5.1) και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml. Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό.

- 4.6. Μεθανόλη, καθαρότητας για HPLC
- 4.7. Παγόμορφο οξικό οξύ
- 4.8. Νερό, καθαρότητας για HPLC

4.9. Κινητή φάση HPLC

Σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml αναμειγνύονται 300 ml μεθανόλης (4.6), περίπου 500 ml νερού (4.8) και 20,0 ml οξικού οξέος (4.7) και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό (4.8) μέχρι τη χαραγή. Ακολουθεί διήθηση με ηθμό 0,45 µm.

5. Εκτέλεση

5.1. Προετοιμασία του δείγματος δοκιμής

5.1.1. Βούτυρο

Το δείγμα θερμαίνεται έως ότου αρχίσει να τήκεται. Πρέπει να αποφεύγεται τοπική υπερθέρμανση άνω των 40 °C. Όταν το δείγμα μαλακώσει αρκετά ομογενοποιείται με ανακίνηση. Το βούτυρο αναδεύεται επί 15 s πριν από τη δειγματοληψία. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, περίπου 5 g (SM g) βούτυρου.

5.1.2. Συμπυκνωμένο βούτυρο

Ο περιέκτης με το συμπυκνωμένο βούτυρο τοποθετείται αμέσως πριν από τη δειγματοληψία σε πυραντήριο στους 40-50 °C μέχρις ότου πλήρως τήξεως. Το δείγμα αναμειγνύεται με περιστροφικές κινήσεις ή ανάδευση και αποφεύγεται ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα λόγω υπερβολικής ζωήρης ανάδευσης. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, περίπου 4 g (SM σε g) συμπυκνωμένου βούτυρου.

5.1.3. Κρέμα γάλακτος

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

5.2. Παρασκευή του διαλύματος δοκιμής

Στη ζυγισμένη ποσότητα δείγματος (5.1.1, 5.1.2 ή 5.1.3), προστίθενται περίπου 75 ml διαλύματος εκχύλισης (4.4). Η φιάλη αναδεύεται ή ανακινείται ζωηρά επί 15 min περίπου και ο όγκος συμπληρώνεται με διάλυμα εκχύλισης (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 min στις 2 000 rpm περίπου και ακολουθεί αμέσως απόχυση. Το διάλυμα που αποχύνεται αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Με σιφόνιο φέρονται 5,00 ml του διαλύματος που αποχύνεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό. Διηθείται κατάλληλη ποσότητα με μικροδιηθητική μεμβράνη (3.3). Το διήθημα είναι έτοιμο για τον προσδιορισμό με HPLC.

5.3. Βαθμονόμηση

Αναρροφώνται με σιφόνιο 5,00 ml προτύπου διαλύματος βανιλίνης (4.5.2) και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προστίθενται 5,0 ml διαλύματος εκχύλισης (4.4) και ο όγκος συμπληρώνεται 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 min περίπου. Εγχέεται το πρότυπο διάλυμα (5.3). Η εργασία επαναλαμβάνεται έως ότου η διαφορά ως προς το εμβαδόν ή το ύψος των κορυφών μεταξύ δύο διαδοχικών εγχύσεων είναι μικρότερη από 2 %. Στις συγκεκριμένες συνθήκες ο χρόνος κατακράτησης της βανιλίνης είναι 9 min περίπου. Το πρότυπο διάλυμα (5.3) υποβάλλεται σε ανάλυση εις διπλούν με έγχυση 20 µl. Εγχέονται 20 µl των διαλυμάτων δοκιμής (5.2). Προσδιορίζεται το εμβαδόν ή το ύψος της λαμβανόμενης κορυφής της βανιλίνης. Η ανάλυση του προτύπου διαλύματος (5.3) επαναλαμβάνεται εις διπλούν μετά από 10 εγχύσεις δειγμάτων δοκιμής (5.2).

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Υπολογίζεται ο μέσος όρος των εμβαδών (ή υψών) (AC) των κορυφών της βανιλίνης που αντιστοιχούν στις διπλές εγχύσεις προτύπων διαλύματος για κάθε παρτίδα διαλυμάτων δοκιμής (τέσσερις περιοχές συνολικά).

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:

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

όπου:

AS = το εμβαδόν της κορυφής της βανιλίνης του δείγματος δοκιμής,

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

Όταν η κρέμα γάλακτος υφίσταται ανάλυση για τον προσδιορισμό της βανιλίνης, πρέπει να εκφράζεται η συμπύκνωση του ιχνηθέτη σε mg ιχνηθέτη/kg λιπαρής ουσίας του βουτύρου, πολλαπλασιάζοντας C επί 100/f, όπου f είναι η περιεκτικότητα σε λιπαρή ουσία της κρέμας σε ποσοστό (m/m).

20 = ο συντελεστής αραιώσης του προτύπου δείγματος και του δείγματος δοκιμής,

0,96 = ο διορθωτικός συντελεστής για την περιεκτικότητα της πρώην αραιώσης του δείγματος δοκιμής σε λιπαρές ύλες.

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

7. Ακρίβεια της μεθόδου

7.1. Επαναληψιμότητα (r)

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται με τη μικρότερη εφικτή χρονική διαφορά σε πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, από τον ίδιο τεχνικό που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 16 mg/kg.

7.2. Αναπαραγωγιμότητα (R)

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται σε πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό από τους τεχνικούς διαφορετικών εργαστηρίων που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 27 mg/kg.

8. Όρια ανοχής

8.1. Από το ιχνηθετημένο προϊόν λαμβάνονται τρία δείγματα για τον έλεγχο της ομοιογένειας.

8.2. Όταν ο ιχνηθέτης έχει ληφθεί είτε από φυσική είτε από συνθετική βανίλια.

8.2.1. Ο βαθμός ενσωμάτωσης της 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΐδης είναι 250 g ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου ή βουτύρου. Όταν πρόκειται για ιχνηθετημένη κρέμα, το ποσοστό ενσωμάτωσης είναι 250 g ανά τόνο λιπαρής ουσίας του βουτύρου.

8.2.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για έλεγχο του ποσοστού και της ομοιογένειας κατανομής, της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από αυτές τις τιμές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (DCr₉₅)] :

— 221,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης),

— 159,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης).

Χρησιμοποιείται η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα η οποία δίδει τα χαμηλότερα αποτελέσματα σε συνδυασμό με παρεμβολή μεταξύ 221,0 mg/kg και 159,0 mg/kg.

8.3. Όταν ο ιχνηθέτης έχει ληφθεί αποκλειστικά από καρπούς βανίλιας ή από πλήρη εκχυλίσματα αυτών.

8.3.1. Ο βαθμός ενσωμάτωσης της 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΐδης είναι 100 g ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου ή βουτύρου. Όταν προσδιορίζεται η κρέμα γάλακτος, το ποσοστό ενσωμάτωσης είναι 100 g ανά τόνο λιπαρής ουσίας του γάλακτος.

8.3.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για έλεγχο του ποσοστού και της ομοιογένειας ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από αυτές τις τιμές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε επίπεδο πιθανότητας 95 % (CrD95)] :

— 79,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης),

— 54,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει η χαμηλότερη τιμή χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 79,0 mg/kg και 54,0 mg/kg.

9. Σημειώσεις

9.1. Η επαναληψιμότητα r είναι η τιμή κάτω από την οποία η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν εκτελεστεί με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, με την ίδια μέθοδο και τις ίδιες συνθήκες (ίδιος εξοπλισμός, ίδιο εργαστήριο, μικρή χρονική διαφορά) αναμένεται να προκύψει με δεδομένη πιθανότητα. Εκτός αντίθετων υποδείξεων, η πιθανότητα είναι 95 %.

- 9.2. Η αναπαραγωγιμότητα R είναι η τιμή κάτω από την οποία η διαφορά, σε απόλυτες τιμές, μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που έχουν εκτελεστεί με πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό, με την ίδια μέθοδο και τις ίδιες συνθήκες (ίδιος εξοπλισμός, ίδιο εργαστήριο, μικρή χρονική διαφορά) αναμένεται να προκύψει με δεδομένη πιθανότητα. Εκτός αντίθετων υποδείξεων, η πιθανότητα είναι 95 %.
- 9.3. Η ανάκτηση της βανιλίνης που έχει προστεθεί στο επίπεδο των 250 mg/kg βουτυρελαίου κυμαίνεται από 97,0 έως 103,8. Διαπιστώθηκε ότι η μέση περιεκτικότητα ήταν 99,9 % με τυπική απόκλιση 2,7 %.
- 9.4. Το πρότυπο διάλυμα περιέχει διάλυμα εκχύλισης σε αναλογία 5 % για την αντιστάθμιση της διεύρυνσης της κορυφής που οφείλεται στην παρουσία του διαλύματος εκχύλισης 5 % των δειγμάτων δοκιμής. Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό με μέτρηση του ύψους της κορυφής.
- 9.5. Η ανάλυση βασίζεται σε καμπύλη βαθμονόμησης που είναι ευθεία γραμμή διερχόμενη από το μηδέν.

Πριν από την πρώτη ανάλυση θα πρέπει να ελέγχεται η γραμμικότητα της καμπύλης χρησιμοποιώντας κατάλληλες αραιώσεις του προτύπου διαλύματος (4.5.2). Ο έλεγχος αυτός θα πρέπει να επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα καθώς και μετά από οποιαδήποτε μετατροπή ή επισκευή του εξοπλισμού HPLC.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIII

(Άρθρο 9)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ Β-ΑΠΟ-8'ΚΑΡΟΤΕΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΒΟΥΤΥΡΟ ΚΑΙ ΒΟΥΤΥΡΟ**1. Πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος περιγράφει διαδικασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αιθυλεστερά του β-απο-8'-καροτενικού οξέος (αποκαροτενικός εστέρας) σε συμπυκνωμένο βούτυρο και βούτυρο. Ο αποκαροτενικός εστέρας είναι το σύνολο όλων των ουσιών που ανευρίσκονται σε συμπύκνωμα δειγμάτων που λαμβάνεται υπό τις συνθήκες που περιγράφονται στη μέθοδο και εμφανίζουν απορρόφηση φωτός στα 440 nm.

2. Αρχή

Η λιπαρή ουσία του βουτύρου διαλύεται σε πετρελαϊκό αιθέρα και μετριέται η απορρόφηση στα 440 nm. Η περιεκτικότητα σε αποκαροτενικό εστέρα προσδιορίζεται με αναφορά σε ένα εξωτερικό πρότυπο.

3. Εξοπλισμός

- 3.1. Βαθμονομημένα σιφόνια των 0,25, 0,50, 0,75 και 1,0 ml.
- 3.2. Φασματοφωτόμετρο, κατάλληλο για χρήση στα 440 nm (και 447 — 449 nm) και με κυψελίδες μήκους οπτικής διαδρομής 1 cm.
- 3.3. Ογκομετρικές φιάλες των 20 ml και 100 ml.
- 3.4. Αναλυτικός ζυγός, ευαισθησία 0,1 mg.

4. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αποδεκτής αναλυτικής καθαρότητας.

- 4.1. Αιώρημα αποκαροτενικού εστέρα (περίπου 20 %).
- 4.1.1. Η περιεκτικότητα του αιωρήματος ρυθμίζεται ως εξής:

Περίπου 400 mg ζυγίζονται επακριβώς σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, διαλύονται σε 20 ml χλωροφορμίου (4.4) και συμπληρώνονται με κυκλοεξάνιο (4.5). 5,0 ml του διαλύματος αυτού αραιώνονται μέχρις όγκου 100 ml με κυκλοεξάνιο (διάλυμα Α). Κατόπιν, 5,0 ml του διαλύματος Α αραιώνονται μέχρις όγκου 100 ml με κυκλοεξάνιο και μετριέται η απορρόφηση του προκύπτοντος διαλύματος στα 447 — 449 nm (μετριέται η μέγιστη απορρόφηση χρησιμοποιώντας κυκλοεξάνιο ως λευκό και κυψελίδες του 1 cm).

$$\text{Περιεκτικότητα (\% σε αποκαροτενικό εστέρα)} = \frac{A_{\max} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{\max} = μέγιστη απορρόφηση του διαλύματος

A = βάρος του δείγματος (g)

2 550 = τιμή αναφοράς A (1 %, 1 cm)

Η καθαρότητα του αιωρήματος είναι P (%).

Σημείωση: Το αιώρημα του αποκαροτενικού εστέρα παρουσιάζει ευαισθησία στον αέρα, στη θερμότητα και στο φως. Στον αρχικό του περιέκτη που δεν έχει ακόμη ανοιχθεί, (σφραγισμένο σε ατμόσφαιρα αζώτου) και όταν αυτός φυλάσσεται σε ψυχρό μέρος, μπορεί να διατηρηθεί για δώδεκα μήνες περίπου. Μετά το άνοιγμα, το περιεχόμενο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα.

- 4.1.2. Πρότυπο διάλυμα αποκαροτενικού εστέρα, περίπου 0,2 mg/ml

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, περίπου 0,100 g αιωρήματος αποκαροτενικού εστέρα (4.1.1) (Wg), διαλύονται σε πετρελαϊκό αιθέρα (4.2), μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με πετρελαϊκό αιθέρα.

Το διάλυμα αυτό περιέχει (W.P) 10 mg/ml αποκαροτενικού εστέρα.

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

- 4.2. Πετρελαϊκός αιθέρας (40-60 °C).
- 4.3. Θεϊκό νάτριο, άνυδρο, κοκκώδες, που έχει ξηρανθεί προηγουμένως στους 102 °C επί δύο ώρες.
- 4.4. Χλωροφόρμιο.
- 4.5. Κυκλοεξάνιο.

5. Διαδικασία

5.1. Παρασκευή του δείγματος δοκιμής.

5.1.1. Συμπυκνωμένο βούτυρο.

Το δείγμα τήκεται σε φούρνο στους 45 °C περίπου.

5.1.2. Βούτυρο.

Το δείγμα τήκεται μέσα σε φούρνο στους 45 °C περίπου. Αντιπροσωπευτική ποσότητα του δείγματος διηθείται διαμέσου φίλτρου που περιέχει περίπου 10 g άνυδρο θειικό νάτριο (4.3) σε περιβάλλον που είναι προστατευμένο από ισχυρό φυσικό ή τεχνητό φωτισμό και διατηρείται στους 45 °C. Συλλέγεται η κατάλληλη ποσότητα λιπαρής ουσίας του βουτύρου.

5.2. Προσδιορισμός

Ζυγίζεται, με ακρίβεια 1 mg, ποσότητα 1 g περίπου συμπυκνωμένου βουτύρου [ή εκχυλισμένης λιπαρής ουσίας του βουτύρου (5.1.2)], (mg) και μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml (Vml) με πετρελαϊκό αιθέρα (4.2). Στη συνέχεια συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύεται καλά.

Κατάλληλη ποσότητα του ανωτέρω δείγματος μεταφέρεται σε κυψελίδα 1 cm και μετριέται η απορρόφηση στα 440 nm σε σχέση με πετρελαϊκό αιθέρα, ως τιμή αναφοράς. Η συγκέντρωση του αποκαροτενικού εστέρα στο διάλυμα υπολογίζεται με βάση την καμπύλη αναφοράς (C mg/ml).

5.3. Καμπύλη αναφοράς

Λαμβάνονται με σιφόνιο 0, 0,25, 0,5, 0,75 και 1,0 ml πρότυπου διαλύματος αποκαροτενικού 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 συγκεντρώσεις των διαλυμάτων κυμαίνονται από 0 έως 2 mg/ml, υπολογίζονται δε επακριβώς με αναφορά στη συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος (4.1.2) (W.P)/100 mg/ml. Μετρίωνται οι τιμές απορρόφησης στα 440 nm χρησιμοποιώντας ως τιμή αναφοράς πετρελαϊκό αιθέρα (4.2).

Οι τιμές απορροφήσεως σημειώνονται στον άξονα των Ψ ενώ οι συγκεντρώσεις του αποκαροτενικού εστέρα σημειώνονται στον άξονα των Χ.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

6.1. Η συγκέντρωση του αποκαροτενικού εστέρα, εκφραζόμενη σε mg/kg προϊόντος, δίνεται από τον τύπο:

Συμπυκνωμένο βούτυρο: $(C.V)/M$

Βούτυρο: $0,82 (C.V)M$

όπου:

C = συγκέντρωση του αποκαροτενικού εστέρα σε mg/ml με βάση την καμπύλη αναφοράς (5.3),

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

M = μάζα (g) της ποσότητας δοκιμής (5.2)

0,82 = συντελεστής διόρθωσης για να ληφθεί υπόψη η περιεκτικότητα του βουτύρου σε λιπαρή ύλη.

7. Ορθότητα της μεθόδου

7.1. Επαναληψιμότητα

7.1.1. Ανάλυση βουτύρου

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που διεξάγονται μέσα στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα, από έναν αναλυτή, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό σε ταυτόσημο υλικό δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 1,4 mg/kg.

7.1.2. Ανάλυση συμπυκνωμένου βουτύρου

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που διεξάγονται μέσα στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα, από έναν αναλυτή, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό σε ταυτόσημο υλικό δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 1,6 mg/kg.

7.2. Αναπαραγωγιμότητα

7.2.1. Ανάλυση βουτύρου

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που διεξάγονται από διαφορετικούς αναλυτές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικό εξοπλισμό σε ταυτόσημο υλικό δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 4,7 mg/kg.

7.2.2. Ανάλυση συμπυκνωμένου βουτύρου

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που διεξάγονται από διαφορετικούς αναλυτές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικό εξοπλισμό σε ταυτόσημο υλικό δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5,3 mg/kg.

7.3. Προέλευση των δεδομένων ακριβείας

Τα δεδομένα ακριβείας προσδιορίστηκαν σε κύκλο δοκιμών που διεξήχθησαν το 1995 σε ένδεκα εργαστήρια και δώδεκα ιχνηθετημένα δείγματα (έξι τυφλά εις διπλούν) για το βούτυρο και δώδεκα ιχνηθετημένα δείγματα (έξι τυφλά εις διπλούν) για το συμπυκνωμένο βούτυρο.

8. Όρια ανοχών

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

8.2. Βούτυρο

8.2.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης για το βούτυρο, λαμβανομένης υπόψη της βασικής απορρόφησης, είναι 22 mg/kg.

8.2.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που λαμβάνονται από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για να ελεγχθεί το ποσοστό και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από αυτές τις τιμές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (CrD_{95})]:

- 18,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης),
- 13,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει η χαμηλότερη τιμή χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 18,0 mg/kg και 13,0 mg/kg.

8.3. Συμπυκνωμένο βούτυρο

8.3.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης για το συμπυκνωμένο βούτυρο, λαμβανομένης υπόψη της βασικής απορρόφησης, είναι 24 mg/kg.

8.3.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για έλεγχο του ποσοστού και της ομοιογένειας ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από αυτές τις τιμές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε επίπεδο πιθανότητας 95 % (CrD_{95})]:

- 20,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης),
- 14,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει η χαμηλότερη τιμή χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 20,0 mg/kg και 14,0 mg/kg.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIV

(Άρθρο 9)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΤΟΣΤΕΡΟΛΗΣ Ή ΣΤΙΓΜΑΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΒΟΥΤΥΡΟ ΜΕ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ**1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος περιγράφει μια διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού σιτοστερόλης ή στιγμαστερόλης στο συμπυκνωμένο βούτυρο ή στο βούτυρο. Ως σιτοστερόλη λαμβάνεται το άθροισμα της β-σιτοστερόλης και της 22-διυδρο-β-σιτοστερόλης· άλλες σιτοστερόλες θεωρούνται αμελητέες.

2. Αρχή

Το συμπυκνωμένο βούτυρο ή το βούτυρο σαπωνοποιείται με υδροξείδιο του καλίου και τα μη σαπωνοποιήσιμα εκχυλίζονται με αιθέρα.

Οι στερόλες μετατρέπονται σε τριμεθυλο-σιλυλο-αιθέρες και αναλύονται με αέριο χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης με βετουλίνη ως εσωτερικό πρότυπο.

3. Εξοπλισμός

- 3.1. Φιάλη των 150 ml για τη σαπωνοποίηση εφοδιασμένη με εσφυρισμένο κάθeto ψυκτήρα.
- 3.2. Χοάνες διαχωρισμού των 500 ml.
- 3.3. Φιάλες των 250 ml.
- 3.4. Χοάνες εξיסορρόπησης πίεσης των 250 ml ή παερεμφερείς, προς συλλογή του απορριπτόμενου διαιθυλαιθέρα.
- 3.5. Υάλινη στήλη των 350 mm × 20 mm, εφοδιασμένη με υάλινο πορώδες διάφραγμα.
- 3.6. Υδρόλουτρο ή θερμοστατούμενο μανδύα.
- 3.7. Φιαλίδια αντίδρασης των 2 ml.
- 3.8. Αεριοχρωματογράφος, που να δέχεται τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα διαχωρισμού (splitting) αποτελούμενο από:
 - 3.8.1. θερμοστατικό θάλαμο για στήλες ικανό προς διατήρηση της επιθυμητής θερμοκρασίας με ακρίβεια ± 1 °C·
 - 3.8.2. είσοδο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας·
 - 3.8.3. ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και ηλεκτρόμετρο-ενισχυτή·
 - 3.8.4. ολοκληρωτή-καταγραφέα κατάλληλο προς χρήση με το ηλεκτρόμετρο-ενισχυτή (3.8.3).
- 3.9. Τριχοειδής στήλη από συντετηγμένο πυρίτιο (fused-silica) πλήρως επικαλυμμένη με BP 1 ή ισοδύναμο σε ομοιόμορφο πάχος 0,25 μm· η στήλη πρέπει να είναι ικανή να διαχωρίζει τριμεθυλο-σίλυλο παράγωγα λανοστερόλης και σιτοστερόλης κατάλληλη στήλη BP 1 μήκους 12 m και εσωτερικής διαμέτρου 0,2 mm.
- 3.10. Μικροσύριγγα του 1 μl, για αέρια χρωμογραφία, με σκληρυνθείσα βελόνα.

4. Αντιδραστήρια

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

- 4.1. Αιθανόλη, τουλάχιστον 95 %.
- 4.2. Υδροξείδιο του καλίου, διάλυμα 60 %· διαλύονται 600 g υδροξειδίου του καλίου (τουλάχιστον 85 %) σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι ενός λίτρου με νερό.
- 4.3. Βετουλίνη καθαρότητας τουλάχιστον 99 %.
 - 4.3.1. Διαλύματα βετουλίνης σε διαιθυλαιθέρα (4.4).
 - 4.3.1.1. Η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος βετουλίνης προς προσδιορισμό της σιτοστερόλης πρέπει να είναι 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. Η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος βετουλίνης προς προσδιορισμό της στιγμαστερόλης πρέπει να είναι 0,4 mg/ml.

- 4.4. Διαιθυλαιθέρας, αναλυτικής καθαρότητας (αηθλαγμένος υπεροξειδίων ή υπολειμμάτων).
- 4.5. Θεϊκό νάτριο, άνυδρο, κοκκώδες, προξηρανθέν στους 102 °C επί δύο ώρες.
- 4.6. Αντιδραστήριο σιλλύωσης, για παράδειγμα TRI-SIL (διαθέσιμο από την Pierce Chemical Co., Cat No. 49001) ή ισοδύναμο (Προσοχή: το TRI-SIL είναι εύφλεκτο, τοξικό, διαβρωτικό και πιθανώς καρκινογόνο. Το εργαστηριακό προσωπικό πρέπει να είναι εξοικειωμένο με τα στοιχεία ασφαλείας του TRI-SIL και να λαμβάνει τις απαραίτητες προφυλάξεις).
- 4.7. Λανοστερόλη.
- 4.8. Σιτοστερόλη γνωστής καθαρότητας τουλάχιστον 90 % (P).
- Σημ. 1: Η καθαρότητα των χρησιμοποιούμενων προς βαθμονόμηση πρότυπων ουσιών πρέπει να προσδιοριστεί με τη μέθοδο της κανονικοποίησης. Υποτίθεται ότι όλες οι στερόλες που υπάρχουν στο δείγμα εμφανίζονται στο χρωματογράφημα, ότι η συνολική επιφάνεια των κορυφών αντιπροσωπεύει το 100 % των συστατικών στερολών και ότι οι στερόλες έχουν την ίδια απόκριση στον ανιχνευτή. Η γραμμικότητα του συστήματος πρέπει να επαληθεύεται στις συγκεντρώσεις που ενδιαφέρουν.
- 4.8.1. Πρότυπο διάλυμα σιτοστερόλης — παρασκευάζεται διάλυμα περιέχον, με ακρίβεια 0,001 mg/ml, περίπου 0,5 mg/ml (W₁) σιτοστερόλης (4.8) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).
- 4.9. Στιγμαστερόλη γνωστής καθαρότητας, τουλάχιστον 90 % (P).
- 4.9.1. Πρότυπο διάλυμα στιγμαστερόλης παρασκευάζεται διάλυμα περιέχον, με ακρίβεια 0,001 mg/ml, περίπου 0,2 mg/ml (W₁) στιγμαστερόλης (4.9) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).
- 4.10. Μείγμα ελέγχου διαχωριστικής ικανότητας. Παρασκευάζεται διάλυμα περιέχον 0,05 mg/ml λανοστερόλης (4.7) και 0,5 mg/ml σιτοστερόλης (4.8) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

5. Πορεία εργασίας

- 5.1. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων χρωματογραφίας. Το διάλυμα εσωτερικού πρότυπου (4.3.1) πρέπει να προστεθεί στο ανάλογο πρότυπο διάλυμα στερόλης ταυτόχρονα με την προσθήκη του και στο σαπωνοποιηθέν δείγμα (5.2.2).
- 5.1.1. Πρότυπο χρωματογραφικό διάλυμα σιτοστερόλης: μεταφέρεται 1 ml πρότυπου διαλύματος σιτοστερόλης (4.8.1) σε καθένα από δύο φιαλίδια αντίδρασης (3.7) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου. Προστίθεται 1 ml διαλύματος εσωτερικού πρότυπου (4.3.1.1) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου.
- 5.1.2. Πρότυπο χρωματογραφικό διάλυμα στιγμαστερόλης: μεταφέρεται 1 ml πρότυπου διαλύματος στιγμαστερόλης (4.9.1) σε καθένα από δύο φιαλίδια αντίδρασης (3.7) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου. Προστίθεται 1 ml διαλύματος εσωτερικού πρότυπου (4.3.1.2) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου.
- 5.2. Παρασκευή των μη σαπωνοποιησίων
- 5.2.1. Τήκεται το δείγμα του βουτύρου HPLC ή του συμπυκνωμένου βουτύρου (W₂) σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 35 °C, αναμειγνύεται καλά με ανάδευση.
- Ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg, 1 g περίπου βουτύρου (W₂) ή συμπυκνωμένου βουτύρου (W₂) σε φιάλη των 150 ml (3.1). Προστίθενται 50 ml αιθανόλης (4.1) και 10 ml διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (4.2). Προσαρμόζεται ο κάθετος ψυκτήρας και το όλο θερμαίνεται στους 75 °C επί 30 λεπτά. Ο ψυκτήρας αποσυνδέεται και η φιάλη ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 5.2.2. Προστίθεται στη φιάλη 1,0 ml διαλύματος εσωτερικού πρότυπου (4.3.1.1 εάν πρόκειται να προσδιοριστεί σιτοστερόλη, ή 4.3.1.2), εάν πρόκειται να προσδιοριστεί στιγμαστερόλη. Γίνεται πλήρης ανάμειξη. Το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη των 500 ml (3.2), και εκπλύεται στη συνέχεια η φιάλη με 50 ml νερού και 250 ml διαιθυλαιθέρα (4.4). Η διαχωριστική χοάνη ανακινείται ζωηρά επί δύο λεπτά και αφήνονται οι φάσεις να διαχωριστούν. Η κατώτερη υδατική στοιβάδα αποχύνεται και η στοιβάδα του αιθέρα εκπλύεται με ανάδευση με τέσσερις διαδοχικές δόσεις νερού των 100 ml.
- Σημ. 2: Είναι ουσιώδες, προς αποφυγή σχηματισμού γαλακτώματος, να εκτελεστούν ήπια οι δύο πρώτες εκπλύσεις με νερό (10 αναστροφές). Η τρίτη εκπλύση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ζωηρή ανάδευση επί 30 δευτερόλεπτα. Εάν σχηματιστεί γαλάκτωμα μπορεί να διασπασθεί με την προσθήκη 5 έως 10 ml αιθανόλης. Εάν προστεθεί αιθανόλη, πρέπει να εκτελεστούν δύο ακόμα ζωηρές εκπλύσεις με νερό.
- 5.2.3. Η καθαρή, απαλλαγμένη σάπυνης στοιβάδα αιθέρα διαβιβάζεται μέσα από υάλινη σήλη (3.5) περιέχουσα 30 g άνυδρου θεϊκού νατρίου (4.5). Ο αιθέρας συλλέγεται σε φιάλη των 250 ml (3.3). Προστίθεται 1 σφαιρίδιο βρασμού και ακολουθεί εξάτμιση σχεδόν μέχρι ξηρού σε υδρόλουτρο ή θερμοστατούμενο μανδύα, λαμβάνοντας μέριμνα για τη συλλογή των απορριπτόμενων διαλυτών.
- Σημ. 3: Εάν τα εκχυλίσματα του δείγματος ξηραθούν πλήρως σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, πιθανόν να επέλθουν απώλειες στερόλης.

5.3. Παρασκευή τριμεθυλο-σιλυλο-αιθέρων

- 5.3.1. Το αιθερικό διάλυμα που παρέμεινε στη φιάλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο αντίδρασης των 2 ml (3.7) με 2 ml διαιθυλαιθέρα και ο αιθέρας απομακρύνεται χρησιμοποιώντας ρεύμα αζώτου. Η φιάλη εκπλύεται σε δύο ακόμη δόσεις διαιθυλαιθέρα των 2 ml, που μεταφέρονται στο φιαλίδιο και απομακρύνεται ο αιθέρας με άζωτο κάθε φορά.
- 5.3.2. Το δείγμα σιλυλιούται με προσθήκη 1 ml TRI-SIL (4.6). Το φιαλίδιο κλείνεται και αναδύεται ζωηρά ώστε να επέλθει διάλυση. Εάν η διάλυση δεν είναι πλήρης, θερμαίνεται στους 65 έως 70 °C. Αφήνεται να ηρεμήσει επί τουλάχιστον 5 λεπτά πριν ενωθεί στον αεροχρωματογράφο. Τα πρότυπα σιλυλιούνται κατά τον ίδιο τρόπο με τα δείγματα. Το μείγμα ελέγχου της διαχωριστικής ικανότητας (4.10) σιλυλιούται κατά τον ίδιο τρόπο με τα δείγματα.

Σημ. 4: Η σιλυλίωση πρέπει να λάβει χώρα σε περιβάλλον απηλλαγμένο από νερό. Η μη πλήρης σιλυλίωση της βετουλίνης εντοπίζεται από μια δεύτερη κορυφή κοντά σε αυτή της βετουλίνης.

Η παρουσία αιθανόλης στο στάδιο της σιλυλίωσης θα έχει επίδραση στη σιλυλίωση. Αυτό μπορεί να προκύψει από ανεπαρκή έκπλυση κατά το στάδιο εκχύλισης. Εάν το πρόβλημα αυτό επιμένει, μια πέμπτη έκπλυση, με ζωηρή ανάδευση επί 30 δευτερόλεπτα, μπορεί να εισαχθεί στο στάδιο εκχύλισης.

5.4. Αεροχρωματογραφική ανάλυση

5.4.1. Επιλογή συνθηκών λειτουργίας

Ο αεροχρωματογράφος ρυθμίζεται ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι συνιστώμενες συνθήκες λειτουργίας είναι οι εξής:

- θερμοκρασία στήλης: 265 °C
- θερμοκρασία εισόδου: 280 °C
- θερμοκρασία ανιχνευτή: 300 °C
- ταχύτητα ροής φέροντας αερίου: 0,6 ml/min
- πίεση υδρογόνου: 84 kPa
- πίεση αέρα: 155 kPa
- διαχωρισμός δείγματος 10:1 έως 50:1, ο λόγος διαχωρισμού πρέπει να βελτιστοποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και κατόπιν να εξεταστεί η γραμμικότητα της απόκρισης του ανιχνευτή στην περιοχή συγκεντρώσεων που ενδιαφέρει.

Σημ. 5: Είναι εξαιρετικά σημαντικό να καθαρίζεται τακτικά ο υποδοχέας έκχυσης.

—

ποσότητα ενιόμενης ουσίας: 1 μl διαλύματος TMSE.

Το σύστημα αφήνεται να εξισορροπήσει και να αποκτήσει μια ικανοποιητικά σταθερή απόκριση, πριν αρχίσει οποιαδήποτε ανάλυση.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να μεταβάλλονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του αεροχρωματογράφου, έτσι ώστε να λαμβάνονται χρωματογραφήματα που να εκπληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- η κορυφή της σιτοστερόλης πρέπει να διαχωρίζεται επαρκώς από αυτή της λαυοστερόλης. Το σχήμα 1 δείχνει το τυπικό χρωματογράφημα που πρέπει να ληφθεί από το 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 πορεία εργασίας:

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

Ενίεται 1 μl σιλυλιωμένου πρότυπου διαλύματος προς προσδιορισμό των σχετικών συντελεστών απόκρισης ως προς βετουλίνη.

Ενίεται 1 μl σιλυλιωμένου διαλύματος και μετρώνται τα εμβαδά των κορυφών. Κάθε σειρά χρωματογραφικών αναλύσεων πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ αναλύσεων προτύπων.

Κατά κανόνα έξι εκχύσεις δειγμάτων παρεμβάλλονται μεταξύ δύο ενέσεων προτύπων.

Σημ. 6: Η ολοκλήρωση της κορυφής της στιγμαστερόλης πρέπει να συμπεριλαμβάνει κάθε τυχόν τμήμα «ουράς» όπως ορίζεται από τα σημεία 1, 2 και 3 στο σχήμα 2β.

Η ολοκλήρωση της κορυφής της σιτοστερόλης πρέπει να συμπεριλαμβάνει το εμβαδόν της κορυφής της 22-διυδρο-β-σιτοστερόλης (στιγμαστανόλης), η οποία εκλύεται αμέσως μετά τη σιτοστερόλη (βλέπε σχήμα 3β), όταν μετράται η συνολική σιτοστερόλη.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

- 6.1. Προσδιορίζεται το εμβαδόν των κορυφών των στερολών και των κορυφών βετουλίνης που συνοδεύουν μια σειρά αναλύσεων, και υπολογίζεται το R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{Μέσος όρος εμβαδού κορυφών στερόλης στο πρότυπο}}{\text{μέσος όρος εμβαδού κορυφών βετουλίνης στο πρότυπο}}$$

Προσδιορίζεται το εμβαδόν της κορυφής της στερόλης (στιγμαστερόλης ή σιτοστερόλης) και της κορυφής της βετουλίνης στο δείγμα και υπολογίζεται το R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{εμβαδόν της κορυφής της στερόλης στο δείγμα}}{\text{εμβαδόν της κορυφής της βετουλίνης στο δείγμα}}$$

W_1 = περιεκτικότητα προτύπου σε στερόλη (mg) περιεχόμενη σε 1 ml πρότυπου διαλύματος (4.8.1 ή 4.9.1)

W_2 = βάρος δείγματος (g) (5.2.1)

P = καθαρότητα πρότυπης στερόλης (4.8 ή 4.9)

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

7. Ακρίβεια της μεθόδου

7.1. Βούτυρο

7.1.1. Επαναληψιμότητα

7.1.1.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, από ένα χειριστή που χρησιμοποιεί τα ίδια όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, από ένα χειριστή που χρησιμοποιεί τα ίδια όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 23,0 mg/kg.

7.1.2. Αναπαραγωγιμότητα

7.1.2.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων από χειριστές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων από χειριστές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει το 8,7 % του μέσου των προσδιορισμών.

7.1.3. Πηγή δεδομένων ακριβείας

Τα δεδομένα ακριβείας προσδιορίστηκαν σε πείραμα εκτελεσθέν το 1992, που περιλάμβανε οκτώ εργαστήρια, έξι δείγματα (τρία από δύο τυφλές αναζητήσεις) στιγμαστερόλης και έξι δείγματα (τρία από δύο τυφλές αναζητήσεις) σιτοστερόλης.

7.2. Συμπυκνωμένο βούτυρο

7.2.1. Επαναληψιμότητα

7.2.1.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, από ένα χειριστή που χρησιμοποιεί τα ίδια όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, από ένα χειριστή που χρησιμοποιεί τα ίδια όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 3,6 % του μέσου των προσδιορισμών.

7.2.2. Αναπαραγωγιμότητα

7.2.2.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων από χειριστές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων από χειριστές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 8,9 % του μέσου των προσδιορισμών.

7.2.3. Πηγή δεδομένων ακριβείας

Τα δεδομένα ακριβείας προσδιορίστηκαν σε πείραμα εκτελεσθέν το 1992, που περιλάμβανε εννέα εργαστήρια και έξι δείγματα (3 από δύο τυφλές αναζητήσεις), στιγμαστερόλης και έξι δείγματα (3 από δύο τυφλές αναζητήσεις) σιτοστερόλης.

8. Όρια ανοχής

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

8.2. Βούτυρο

8.2.1. Στιγμαστερόλη

8.2.1.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης της στιγμαστερόλης είναι 150 γραμμάρια στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 95 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 142,5 mg/kg, ή 170 γραμμάρια στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 85 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για έλεγχο του ποσοστού και της ομοιογένειας κατανομής της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από τις τιμές αυτές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (DC_{95})]:

- 116,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %),
- 118,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %),
- 81,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %),
- 82,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτουν οι χαμηλότερες τιμές χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 116,0 mg/kg και 81,0 mg/kg ή 118,0 mg/kg και 82,0 mg/kg.

8.2.2. Σιτοστερόλη

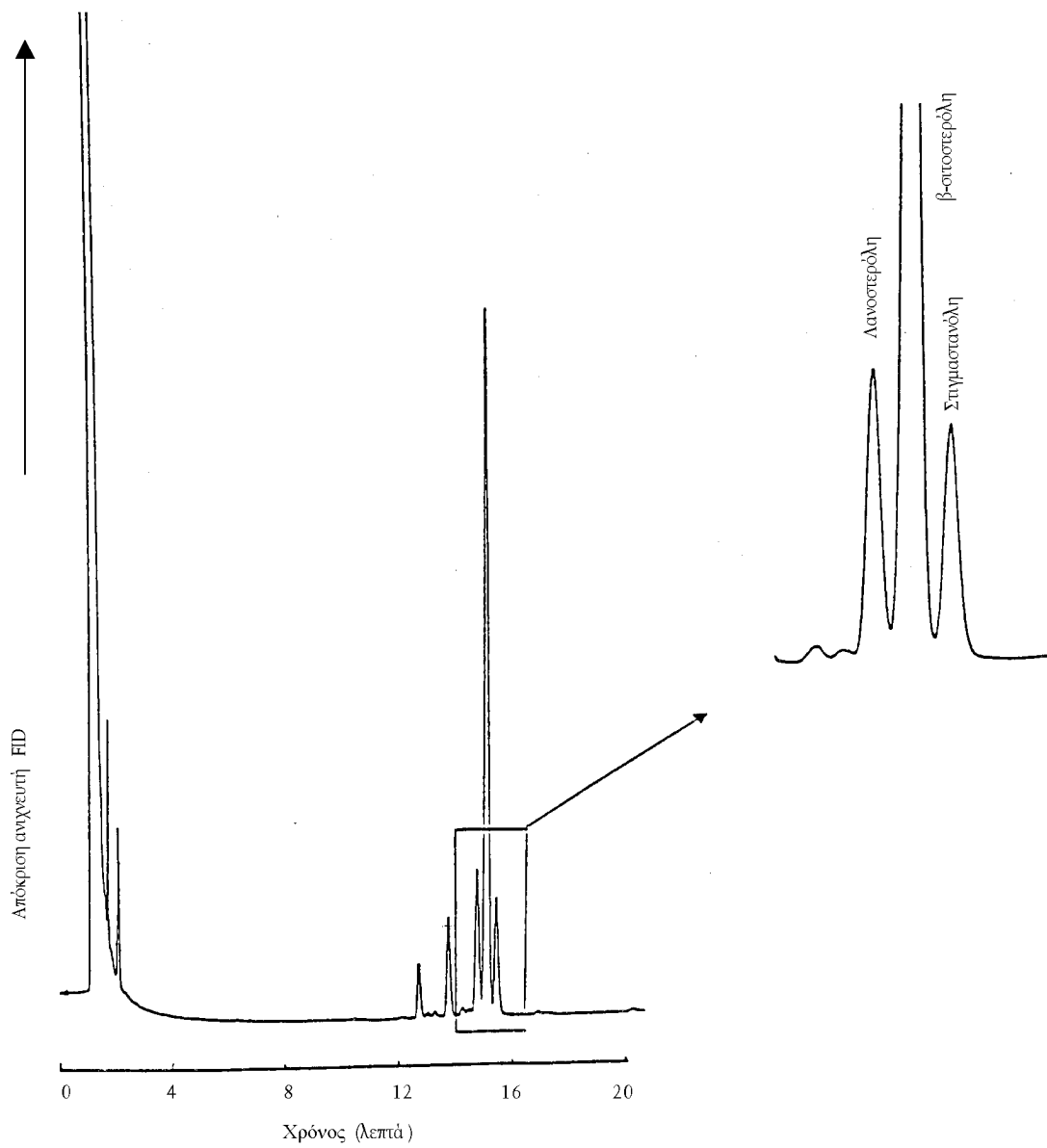
8.2.2.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης της σιτοστερόλης είναι 600 g σιτοστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 90 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 540 mg/kg.

- 8.2.2.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για έλεγχο του ποσοστού και της ομοιογένειας ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από τις τιμές αυτές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (DCr₉₅)]:
- 486,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για σιτοστερόλη καθαρότητας 90 %),
 - 358,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για σιτοστερόλη καθαρότητας 90 %).
- Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει η χαμηλότερη τιμή χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 486,0 mg/kg και 358,0 mg/kg.
- 8.3. Συμπυκνωμένο βούτυρο
- 8.3.1. Στιγμαστερόλη
- 8.3.1.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης της στιγμαστερόλης 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.
- 8.3.1.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που λαμβάνονται από την ανάλυση του προϊόντος το οποίο χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί το ποσοστό και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από τις τιμές αυτές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (DCr₉₅)]:
- 120,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %),
 - 122,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %),
 - 84,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %),
 - 86,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %).
- Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 120,0 mg/kg και 84,0 mg/kg, ή μεταξύ 122,0 mg/kg και 86,0 mg/kg.
- 8.3.2. Σιτοστερόλη
- 8.3.2.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης για τη σιτοστερόλη είναι 600 g σιτοστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 90 % ανά τόνο συμπυκνωμένου βουτύρου, ήτοι 540 mg/kg.
- 8.3.2.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που λαμβάνονται από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για έλεγχο του ποσοστού και της ομοιογένειας της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από αυτές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (DCr₉₅)]:
- 486,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για σιτοστερόλη καθαρότητας 90 %),
 - 358,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για σιτοστερόλη καθαρότητας 90 %).
- Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει η χαμηλότερη τιμή χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 486,0 mg/kg και 358,0 mg/kg.

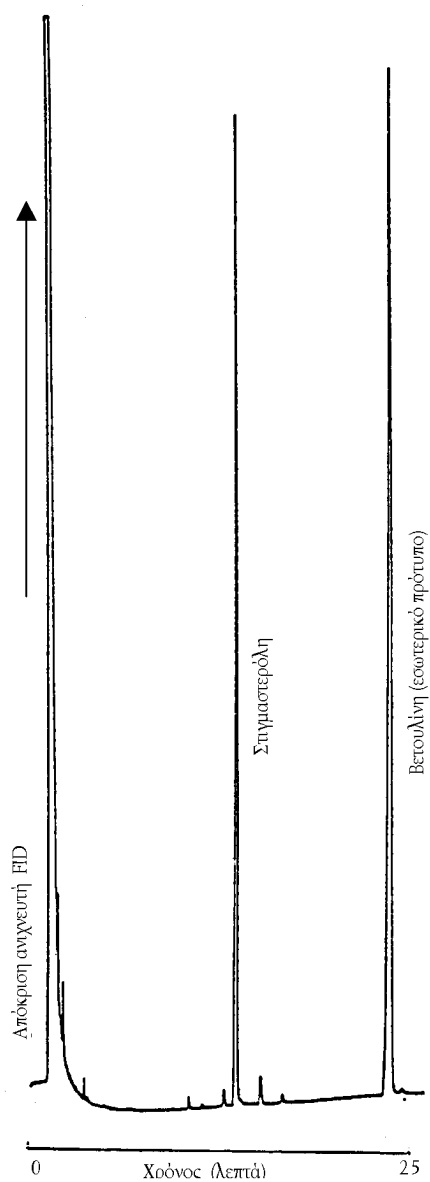
Σχήμα 1

Χρωματογράφημα μείγματος ελέγχου διαχωριστικής ικανότητας

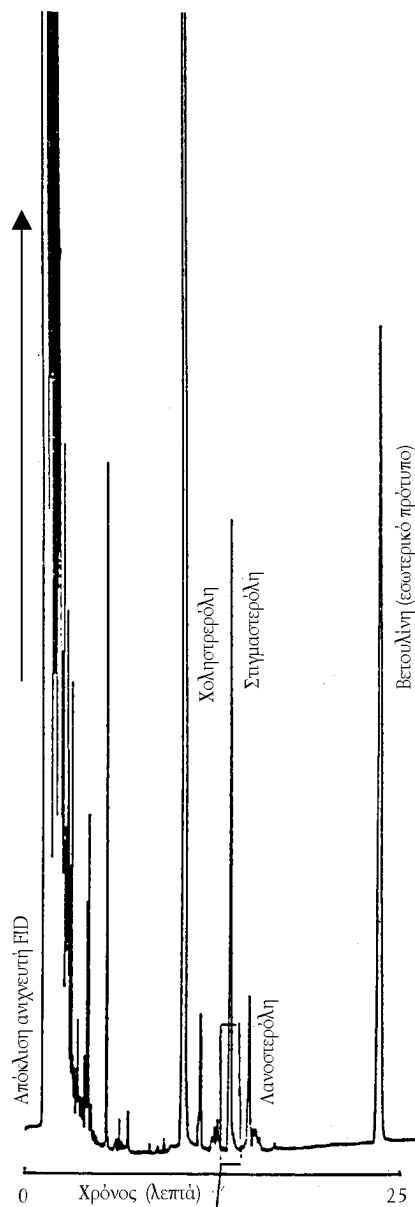
Προτιμάται ο πλήρης διαχωρισμός δηλαδή το περίγραμμα της κορυφής της λανοστερόλης πρέπει να επιστρέφει στη γραμμική βάση πριν αρχίσει η κορυφή της σιτοστερόλης, αν και είναι ανεκτός μη πλήρης διαχωρισμός



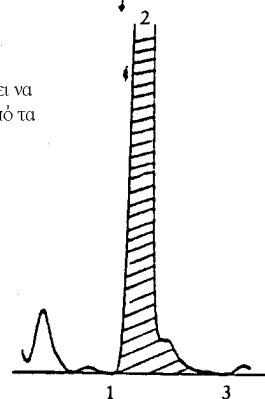
Σχήμα 2α
Πρότυπο στιγμαστερόλης



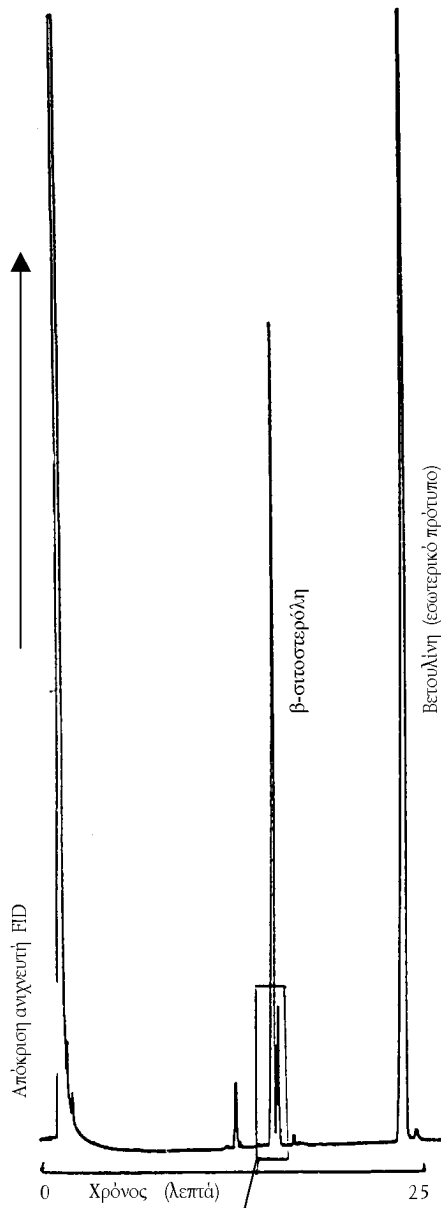
Σχήμα 2β
Δείγμα βουτύρου μετουσιωμένο με στιγμαστερόλη



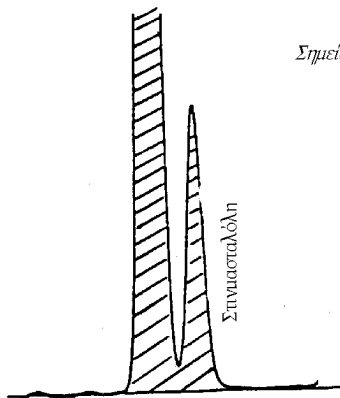
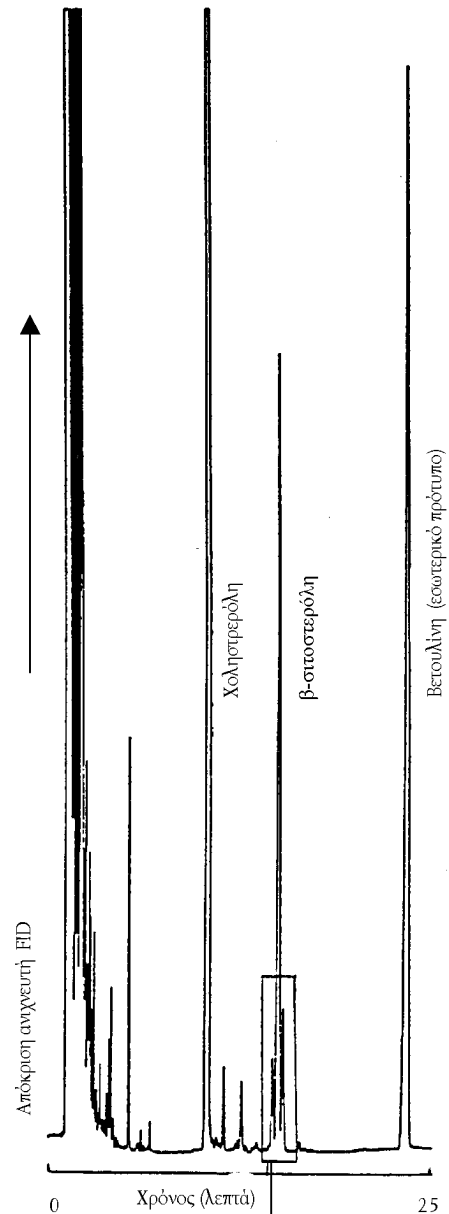
Σημείωση: Η ολοκλήρωση της κορυφής της στιγμαστερόλης πρέπει να συμπεριλαμβάνει κάθε τμήμα «ουράς» όπως ορίζεται από τα σημεία 1, 2, και 3.



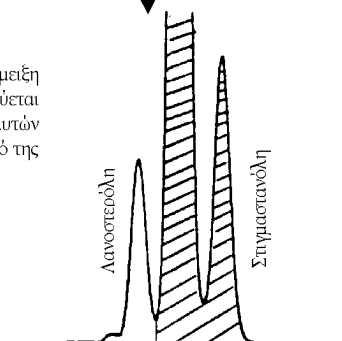
Σχήμα 3α
Πρότυπο β-σιτοστερόλη



Σχήμα 3β
Δείγμα βουτύρου μετουσιωμένο με β-σιτοστερόλη



Σημείωση: Η β-σιτοστερόλη συχνά περιέχει μία πρόμειξη (ταυτοποιηθείσα ως σιγνιστανόλη) που εκλύεται αμέσως μετά τη β-σιτοστερόλη. Τα εμβαδά των δύο αυτών κορυφών πρέπει να προστίθενται κατά τον υπολογισμό της ολικής β-σιτοστερόλης.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XV

(Άρθρο 10)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΚΑΖΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ ΣΕ ΤΥΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΠΡΟΒΕΙΟ, ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ Ή ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ ΓΑΛΑ Ή ΑΠΟ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΒΕΙΟΥ, ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟΥ Ή ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**1. Αντικείμενο**

Ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε τυριά από πρόβειο κατσικίσιο ή βουβαλίσιο γάλα ή από μείγματα πρόβειου, κατσικίσιου ή βουβαλίσιου γάλακτος με ισοηλεκτρική εστίαση γ-καζεϊνών μετά από πλασμινόλυση.

2. Πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος είναι κατάλληλη για ευαίσθητη και συγκεκριμένη ανίχνευση αυτούσιου και θερμικά επεξεργασμένου αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε νωπά και ώριμα τυριά από πρόβειο, κατσικίσιο, βουβαλίσιο γάλα ή από μείγματα πρόβειου, κατσικίσιου και βουβαλίσιου γάλακτος. Η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση της νόθευσης του γάλακτος και του τυριού, με συμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού γάλακτος βοοειδών που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία.

3. Αρχή της μεθόδου

- 3.1. Απομόνωση καζεϊνών από το τυρί και των πρότυπων αναφοράς
- 3.2. Διάλυση των καζεϊνών που έχουν απομονωθεί και υποβολή σε πλασμινόλυση (EC.3.4.21.7)
- 3.3. Ισοηλεκτρική εστίαση των καζεϊνών οι οποίες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πλασμίνη παρουσία ουρίας και χρώση πρωτεϊνών.
- 3.4. Αξιολόγηση μορφών απεικόνισης βαμένων γ_3 και γ_2 -καζεϊνών (αποδεικτικά αγελαδινού γάλακτος) δια συγκρίσεως της μορφής που προέκυψε από το δείγμα με εκείνες που προέκυψαν στην ίδια πηκτή από πρότυπα περιεκτικότητας 0 % και 1 % σε αγελαδινό γάλα.

4. Αντιδραστήρια

Πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας, εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά. Το νερά θα πρέπει να είναι διασπασταμένο ή ισοδύναμης καθαρότητας.

Σημείωση: Οι αναλογίες που ακολουθούν αφορούν πηκτές πολυακρυλαμιδίων με ουρία, διαστάσεων $265 \times 125 \times 0,25$ mm, που έχουν παρασκευαστεί εργαστηριακά. Όπου χρησιμοποιούνται πηκτές άλλων διαστάσεων και τύπων, χρειάζεται ίσως προσαρμογή των συνθηκών διαχωρισμού.

Ισοηλεκτρική εστίαση

- 4.1. Αντιδραστήρια παρασκευής 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 100 ml και το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο μέσα σε σκοτεινόχρωμη φιάλη.

Σημείωση: Αντί των νευροτοξικών ακρυλαμιδίων (στις ανωτέρω ποσότητες), προτιμότερο είναι να χρησιμοποιείται προαναμιχθέν διάλυμα ακρυλαμιδίου/BIS, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο. Αντί των ως άνω ποσοτήτων, χρειάζονται 16,2 ml ενός τέτοιου προαναμιχθέντος διαλύματος, εφόσον η περιεκτικότητά του σε ακρυλαμίδιο είναι 30 % m/v και η περιεκτικότητά του σε BIS είναι 0,8 % m/v. Ο μέγιστος χρόνος διατηρησιμότητας του μητρικού διαλύματος είναι δέκα ημέρες. Εάν η αγωγιμότητά του είναι μεγαλύτερη των 5μS, απιονίζεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά με 2 g Amberlite MB-3 και στη συνέχεια διηθείται από μεμβράνη 0,45 μm.

- 4.1.2. Διάλυμα πηκτής
- Παρασκευάζεται το διάλυμα πηκτής με ανάμειξη προσθέτων και αμφολυτών με το μητρικό διάλυμα πηκτής (βλέπε 4.1.1.).
- 9,0 ml μητρικού διαλύματος
- 24 mg β-αλανίνης
- 500 ml αμφολύτου με pH 3,5-9,5 ⁽¹⁾
- 250 ml αμφολύτου με pH 5-7 ⁽¹⁾
- 250 ml αμφολύτου με pH 6-8 ⁽¹⁾.
- Το διάλυμα πηκτής αναμειγνύεται και απαερώνεται επί 2 έως 3 λεπτά σε λουτρά υπερήχων ή σε κενό.
- Σημείωση: Το διάλυμα πηκτής παρασκευάζεται αμέσως πριν μεταφερθεί πάνω στην πλάκα (βλέπε 6.2).
- 4.1.3. Διαλύματα καταλυτών
- 4.1.3.1. N, N, N' N'- τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) 55 ml.
- 4.1.3.2. Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (PER) 40 % w/v:
- Διαλύονται σε νερό 800 mg PER και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 2 ml.
- Σημείωση: Να χρησιμοποιείται πάντοτε πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα PER.
- 4.2. Υγρό επαφής
- Κηροζίνη ή υγρή παραφίνη
- 4.3. Ανοδικό διάλυμα
- Παρασκευάζεται διάλυμα 5,77 g φωσφορικού οξέως (85 % m/m) σε 100 ml νερού.
- 4.4. Καθοδικό διάλυμα
- Διαλύονται σε νερό 2,00 g υδροξειδίου του νατρίου και το διάλυμα αραιώνεται με νερό μέχρις όγκου 100 ml.
- Παρασκευή του δείγματος
- 4.5. Αντιδραστήρια απομόνωσης πρωτεϊνών
- 4.5.1. Αραιό οξικό οξύ (25,0 ml κρυσταλλικού οξικού οξέος αραιώνονται με νερό μέχρις όγκου 100 ml)
- 4.5.2. Διχλωρομεθάνιο
- 4.5.3. Ακετόνη
- 4.6. Ρυθμιστικά διάλυμα για τη διάλυση πρωτεϊνών
- Διαλύονται σε νερό
- 5,75 g γλυκερίνης (87 % m/m)
- 24,03 g ουρίας
- 250 mg διθειοθρεϊτόλης
- και το διάλυμα αραιώνεται μέχρις όγκου 50 ml.
- Σημείωση: Φυλάσσεται στο ψυγείο — μέγιστος χρόνος διατήρησης μία εβδομάδα.
- 4.7. Αντιδραστήρια πλασμινόλυσης καζεΐνης
- 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 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. Πλασμίνη βοοειδούς (E.C. 3.4.21.7), ενεργότητας τουλάχιστον 5 U/ml.
- 4.7.3. Διάλυμα ε-αμινοκαπρονικού οξέος για αναστολή ενζύμου.
- Διαλύονται 2,624 g ε-αμινοκαπρονικού οξέος (6-αμινο-n-εξανικό οξύ) σε 100 ml αιθανόλης 40 % v/v.

⁽¹⁾ Προϊόντα Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) και Resolyte® pH 5-7 και pH 6-8 (BDH, Merck) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την επίτευξη του απαιτούμενου διαχωρισμού των γ-καζεΐνων.

4.8. Πρότυπα

4.8.1. Πιστοποιημένα πρότυπα αναφοράς από μείγμα αποκορυφωμένου πρόβειου και κατοικίσιου γάλακτος που περιέχουν 0 % και 1 % αγελαδινού γάλακτος, είναι διαθέσιμα στο Commission's Institute for Reference Materials and Measurements B 2440 Geel, Βέλγιο.

4.8.2. Παρασκευή προσωρινών προτύπων πηγμένου αποκορυφωμένου βουβαλίσου γάλακτος που περιέχουν 0 % και 1 % αγελαδινού γάλακτος.

Αποκορυφωμένο γάλα λαμβάνεται με φυγοκέντρηση βουβαλίσου ή αγελαδινού μη κατεργασμένου ασυσκευάστου γάλακτος στους 37 °C για 20 λεπτά, 2 500 g. Αφού ο σωλήνας και το περιεχόμενο ψυχθούν ταχέως μέχρι θερμοκρασίας 6-8 °C, αφαιρείται εντελώς το ανώτερο στρώμα λίπους. Για την παρασκευή του προτύπου 1 %, προστίθενται 5,00 ml αποκορυφωμένου αγελαδινού γάλακτος σε 495 ml αποκορυφωμένου βουβαλίσου γάλακτος μέσα σε ποτήρια ζέσεως 1 λίτρου και, με την προσθήκη αραιού γαλακτικού οξέος (10 % v/v), ρυθμίζεται το pH σε 6,4. Ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 35 °C και προστίθενται 100 μl πιπιάς μόσχου (ενεργότης πιπιάς 1: 10 000, περίπου 3 000 U/ml), γίνεται ανάδευση για 1 λεπτό και εν συνεχεία το ποτήριο ζέσεως, σκεπασμένο με φύλλο αλουμινίου, αφήνεται στους 35 °C επί μία ώρα για να σχηματισθεί το τυρόπηγμα. Αφού σχηματισθεί το τυρόπηγμα, το πηγμένο γάλα υφίσταται λυοφιλίωση χωρίς προηγούμενη ομοιογενοποίηση ή αποστράγγιση του ορού. Μετά τη λυοφιλίωση, κονιοποιείται προς σχηματισμό ομοιογενούς σκόνης. Για την παρασκευή του προτύπου 0 % ακολουθείται η ίδια διαδικασία με 500 ml αμιγούς αποκορυφωμένου βουβαλίσου γάλακτος. Τα πρότυπα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία - 20 °C.

Σημείωση: Πριν από την παρασκευή των προτύπων, συνιστάται ο έλεγχος του βαθμού καθαρότητας του πρόβειου γάλακτος με ισοηλεκτρική εστίαση των καζείνων οι οποίες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πλασμίνη.

Αντιδραστήρια χρέωσης πρωτεϊνών

4.9. Σταθεροποιητής

Διαλύονται σε νερό 150 g τριχλωροοξικού οξέος και το διάλυμα αραιώνεται μέχρις όγκου 1 000 ml.

4.10. Διάλυμα αποχρωματισμού

Αραιώνονται με απεσταγμένο νερά 500 ml μεθανόλης και 200 ml κρυσταλλικού οξικού οξέος μέχρις όγκου 2 000 ml.

Σημείωση: Το διάλυμα αποχρωματισμού παρασκευάζεται σε ημερήσια βάση. Μπορεί να παρασκευαστεί με ανάμειξη ίσων όγκων μητρικών διαλυμάτων μεθανόλης (50 % v/v) και κρυσταλλικού οξικού οξέος (20 % v/v).

4.11. Διαλύματα βαφής

4.11.1. Διαλύματα βαφής (μητρικά διάλυμα 1)

Διαλύονται 3,0 g Coomassie brilliant bleu G 250 (Color Index 42655) σε 1 000 ml μεθανόλης, 90 % v/v με τη χρησιμοποίηση μαγνητικού αναδευτήρα (45 λεπτά περίπου) και ακολουθεί διήθηση από δύο πυκνωτούς ηθμούς μέσης ταχύτητας.

4.11.2. Διάλυμα βαφής (μητρικό διάλυμα 2)

Διαλύονται 5,0 g ένυδρου θειικού χαλκού ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) σε 1 000 ml οξικού οξέος 20 % (v/v).

4.11.3. Διάλυμα βαφής (διάλυμα εργασίας)

Αναμειγνύονται 125 ml από κάθε μητρικά διάλυμα (4.11.1, 4.11.2) αμέσως πριν από τη βαφή.

Σημείωση: Το διάλυμα βαφής πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο την ημέρα παρασκευής του.

5. Εξοπλισμός

5.1. Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 265 × 125 × 4 mm — ελαστικός κύλινδρος (πλάτος 15 cm) — τραπέζι οριζόντιωσης

5.2. Φύλλο συγκράτησης πηκτής διαστάσεων 265 × 125 mm

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

5.4. Θάλαμος ηλεκτροεστίασης με πλάκα ψύξης (π.χ. 265 × 125 mm) με κατάλληλη πηγή τάσης μεγαλύτερη ή ίση από 2,5 kv ή αυτόματη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

5.5. Κρυστάτης κυκλοφορίας ρυθμιζόμενος στους 12 ± 0,5 °C

5.6. Συσκευή φυγοκέντρησης προσαρμοσμένη στα 3 000 g

5.7. Ταινίες ηλεκτροδίου (μήκους μεγαλύτερου ή ίσου προς 265 mm)

- 5.8. Πλαστικές σταγονομετρικές φιάλες για το ανοδικό και το καθοδικό διάλυμα
- 5.9. Φορείς δείγματος (10 × 5 mm, διηθητικός χάρτης από βισκόζη ή χαμηλής προσροφητικότητας σε πρωτεΐνες)
- 5.10. Ψαλίδια, νυστέρια και λαβίδες από ανοξείδωτο χάλυβα
- 5.11. Δοχεία βαφής και αποχρωματισμού από ανοξείδωτο χάλυβα ή από γυαλί (π.χ. δίσκοι οργάνων 280 × 150 mm)
- 5.12. Ομοιογενοποιητής με ράβδο διαμέτρου 10 mm, 8 000 έως 20 000 στροφές ανά λεπτό (rpm)
- 5.13. Μαγνητικός αναδευτήρας
- 5.14. Λουτρό υπερήχων
- 5.15. Συγκολλητής ταινίας
- 5.16. Μικροσιφόνια των 5 — 25 μl
- 5.17. Συμπυκνωτής κενού ή συσκευή λυοφιλίωσης
- 5.18. Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 35 και 40 ± 1 °C με τάρακτρο
- 5.19. Πυκνόμετρο για μήκος κύματος λ = 634 nm

6. Πορεία εργασίας

6.1. Παρασκευή δείγματος

6.1.1. Απομόνωση καζεϊνών

Ζυγίζεται ποσότητα ισοδύναμη με 5 g ξερής μάζας τυριού ή προτύπων σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 100 ml, προστίθενται 60 ml απεσταγμένου νερού και γίνεται ομοιογενοποίηση με ομοιογενοποιητή με ράβδο (8 000 έως 10 000 rpm). Ρυθμίζεται το pH σε 4,6 με αραιά οξικό οξύ (4.5.1), γίνεται φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 3 000 g), το λίπος και ο ορός απορρίπτονται, το υπόλειμμα ομοιογενοποιείται σε 20 000 rpm με 40 ml απεσταγμένου νερού προσαρμοσμένου σε pH 4 — 5 με αραιό οξικό οξύ (βλέπε 4.5.1), προστίθενται 20 ml διχλωρομεθανίου (βλέπε 4.5.2) και γίνεται εκ νέου ομοιογενοποίηση και φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 3 000 g). Το στρώμα της καζεΐνης που επιπλέει μεταξύ της υδατικής και της οργανικής φάσης (βλέπε σχήμα 2) αφαιρείται με μια σπάτουλα και απορρίπτονται και οι δύο φάσεις. Η καζεΐνη ομοιογενοποιείται εκ νέου με 40 ml απεσταγμένου νερού (βλέπε ανωτέρω) και 20 ml διχλωρομεθανίου και υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου και οι δύο φάσεις εκχύλισης γίνουν άχρωμες (2 έως 3 φορές). Το πρωτεϊνικό υπόλειμμα ομοιογενοποιείται με 50 ml άνυδρης ακετόνης (βλέπε 4.5.3) και διηθείται από πτυχωτό διηθητικό ηθμό μέσης ταχύτητας. Το υπόλειμμα εκπλύνεται πάνω στο διηθητικό ηθμό δύο φορές με 25 ml ακετόνης κάθε φορά και αφήνεται να ξεραθεί στον αέρα ή σε ρεύμα αζώτου, και στη συνέχεια κονιοποιείται σε γουδί.

Σημείωση: Οι απομονωμένες ξερές πρωτεΐνες πρέπει να διατηρηθούν σε θερμοκρασία - 20 °C.

6.1.2. Πλασμινόλυση β-καζεϊνών προς ενίσχυση γ-καζεϊνών

Ετοιμάζεται αιώρημα 25 mg απομονωθείσας καζεΐνης (βλέπε 6.1.1) σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού αμμωνίου (βλέπε 4.7.1) και ομοιογενοποιούνται επί 20 λεπτά, με υπέρηχους για παράδειγμα. Θερμαίνονται στους 40 °C και προστίθενται 10 ml πλασμίνης (βλέπε 4.7.2), αναμειγνύονται και επωάζονται επί μία ώρα στους 40 °C με συνεχή ανάδευση. Για αναστολή του ενζύμου προστίθενται 20 ml διαλύματος ε-αμινοκαπρονικού οξέος (βλέπε 4.7.3), και εν συνεχεία, προστίθενται 200 mg στερεάς ουρίας και 2 mg διθειοθρεϊτόλης.

Σημείωση: Για να προκύψει μεγαλύτερη συμμετρία στις εστιασθείσες ταινίες καζεΐνης, συνιστάται λυοφιλίωση του διαλύματος μετά την προσθήκη του ε-αμινοκαπρονικού οξέος και εν συνεχεία διάλυση των υπολειμμάτων σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ουρίας (βλέπε 4.6).

6.2. Παρασκευή ηηκτών ακρυλαμιδίου περιεχόντων ουρία

Το φύλλο συγκράτησης πήγματος (βλέπε 5.2) κυλιέται με τη βοήθεια μερικών σταγόνων νερού πάνω σε γυάλινη πλάκα (βλέπε 5.1) και απομακρύνεται το επιπλέον νερά με χαρτοπετσέτα. Το φύλλο κάλυψης (βλέπε 5.3) κυλιέται με διαχωριστήρες (0,25 mm) πάνω σε άλλη γυάλινη πλάκα κατά τον ίδιο τρόπο. Η πλάκα τοποθετείται οριζοντίως σε τραπέζι οριζοντίωσης.

Προστίθενται 10 ml καθενός από το διάλυμα TEMED (βλέπε 4.1.3.1) στο παρασκευασθέν και απερωθέν διάλυμα ηηκτικής (βλέπε 4.1.2), αναμειγνύονται και προστίθενται 10 ml διαλύματος PER (4.1.3.2), αναμειγνύονται καλά και αμέσως και μεταφέρονται ομοιόμορφα πάνω στο κέντρο του φύλλου κάλυψης. Τοποθετείται μια πλευρά της πλάκας συγκράτησης πήγματος (η πλευρά με το φύλλο προς τα κάτω) πάνω στην πλάκα με το φύλλο κάλυψης και χαμηλώνεται αργά, έτσι ώστε να σχηματίζεται μεταξύ των φύλλων ένα λεπτό στρώμα πήγματος που να απλώνεται κανονικά και να μην περιέχει φυσαλίδες (βλέπε σχήμα 3). Η πλάκα συγκράτησης ηηκτικής χαμηλώνεται προσεκτικά και τελείως με τη βοήθεια μιας λεπτής σπάτουλας και τοποθετούνται από πάνω τρεις ακόμη γυάλινες πλάκες σαν βάρος. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός (60 λεπτά περίπου), απομακρύνεται το φύλλο υποστήριξης ηηκτικής μαζί με το φύλλο κάλυψης δι' ελαφρών κτυπημάτων των γυάλινων πλακών. Η ανάστροφη πλευρά του φύλλου συγκράτησης καθαρίζεται προσεκτικά για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ηηκτικής και ουρίας. Το «sandwich» της ηηκτικής φέρεται σε κατάλληλο σωλήνα και αποθηκεύεται σε ψυγείο (επί ξη εβδομάδες το πολύ).

Σημείωση: Το φύλλο κάλυψης με τους διαχωριστήρες μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου. Η ηηκτική πολυακρυλαμιδίου μπορεί να κοπεί σε μικρότερα μεγέθη, πράγμα το οποίο συνιστάται όταν υπάρχουν λίγα δείγματα ή όταν χρησιμοποιείται αυτόματη συσκευή ηλεκτροφόρησης (δύο ηηκτικές διαστάσεων 4,5 × 5 cm).

6.3. Ισοηλεκτρική εστίαση

Ο θερμοστάτης ψύξης ρυθμίζεται στους 12 °C. Η ανάστροφη πλευρά του φύλλου συγκράτησης επαλείφεται με κηροζίνη και εν συνεχεία σταλάζονται μερικές σταγόνες κηροζίνης (βλέπε 4.2) στο κέντρο του ψυγόμενου τμήματος. Κυλιέται κατόπιν επί αυτού το «sandwich» της πηκτής με το φύλλο συγκράτησης προς τα κάτω, με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλλιών. Καθαρίζεται το τυχόν περίσσειμα κηροζίνης και αφαιρείται το φύλλο κάλυψης. Διαβρέχονται οι ταινίες των ηλεκτροδίων με τα διαλύματα ανόδου και καθόδου (βλέπε 4.3, και 4.4), κόβονται στο μήκος της πηκτής και τοποθετούνται στις προβλεπόμενες θέσεις (απόσταση ηλεκτροδίων 9,5 cm).

Συνθήκες για την ισοηλεκτρική εστίαση:

6.3.1. Διαστάσεις πήγματος 265 × 125 × 0,25 mm

Φάση	Χρόνος (λεπτά)	Τάση (V)	Ένταση ρεύματος (mA)	Ισχύς (W)	Βολτ-ώρες (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 2 500

(1) Μεταφορά δείγματος: Μετά την προεστίαση (φάση 1), μεταφέρονται με σιρόνιο 18 ml από κάθε διάλυμα δείγματος στους φορείς δείγματος (βλέπε 5.9), που τοποθετούνται επάνω στην πηκτή σε απόσταση 1 mm το ένα από το άλλο και σε απόσταση 5 mm από την επιμήκη πλευρά της ανόδου και εφαρμόζεται ελαφρά πίεση. Η εστίαση πραγματοποιείται υπό τις ανωτέρω συνθήκες και οι φορείς δείγματος αφαιρούνται προσεκτικά μετά από 60 λεπτά εστίασης του δείγματος.

Σημείωση: Εάν μεταβληθεί το πάχος ή το πλάτος των πηκτών, θα πρέπει να προσαρμοσθούν κατάλληλα οι τιμές της εντάσεως του ρεύματος και της ισχύος (π.χ. οι τιμές της εντάσεως του ρεύματος και της ισχύος διπλασιάζονται εάν χρησιμοποιηθεί πήγμα διαστάσεων 265 × 125 × 0,5 mm).

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

Φάση	Τάση	Ένταση ρεύματος	Ισχύς	Θερμοκρασία	Βολτ-ώρες
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

Κατά τη φάση 2, ο φορέας δείγματος τοποθετείται στις 0 Vh.

Κατά τη φάση 2, ο φορέας δείγματος απομακρύνεται στις 30 Vh.

6.4. Βαφή πρωτεϊνών

6.4.1. Σταθεροποίηση πρωτεϊνών

Απομακρύνονται οι ταινίες των ηλεκτροδίων αμέσως μετά τη διακοπή του ρεύματος και η πηκτή τοποθετείται αμέσως σε ένα δοχείο βαφής/αποχρωματισμού που είναι γεμάτος με 200 ml σταθεροποιητή (βλέπε 4.9) — αφήνεται επί 15 λεπτά αναδευόμενο συνεχώς.

6.4.2. Έκπλυση και βαφή της πλάκας της πηκτής

Ο σταθεροποιητής αποστραγγίζεται εντελώς και η πλάκα της πηκτής εκπλύνεται δύο φορές για 30 δευτερόλεπτα, κάθε φορά με 100 ml διαλύματος αποχρωματισμού (βλέπε 4.10). Το διάλυμα αποχρωματισμού αποχύνεται και πληρούται στο δοχείο με 250 ml διαλύματος βαφής (βλέπε 4.11.3), το οποίο και αφήνεται να ενεργήσει για 45 λεπτά υπό ελαφρή ανάδευση.

6.4.3. Αποχρωματισμός της πλάκας της πηκτής

Αποχύνεται το διαλύμα βαφής, εκπλύνεται η πλάκα της πηκτής δύο φορές με 100 ml διαλύματος αποχρωματισμού κάθε (4.10) φορά και εν συνεχεία αναδεύεται δύο φορές τουλάχιστον με 200 ml διαλύματος αποχρωματισμού επί 15 τουλάχιστον λεπτά κάθε φορά μέχρις ότου το υπόβαθρο γίνει εντελώς καθαρό και άχρωμο. Εκπλύνεται εν συνεχεία η πλάκα της πηκτής με απεσταγμένο νερό (δύο φορές × 2 λεπτά κάθε φορά) και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα (2 έως 3 ώρες) ή στεγνώνεται με ηλεκτρικό στεγνωτήρα (10 έως 15 λεπτά).

Σημείωση 1: Η σταθεροποίηση, η έκπλυση, η χρώση και ο αποχρωματισμός γίνονται στους 20 °C. Οι υψηλές θερμοκρασίες να αποφεύγονται.

Σημείωση 2: Εάν επιλεγεί πιο ευαίσθητη μέθοδος χρώσης με άργυρο (π.χ. αντιδραστήριο Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, (κωδικός αριθ. 17-1150-01), οι καζείνες που έχουν υποστεί επεξεργασία με πλασμίνη πρέπει να αραιώνονται στα 5 mg/ml.

7. Αξιολόγηση

Η αξιολόγηση γίνεται με σύγκριση των πρωτεϊνικών ταινιών του δείγματος με εκείνες δειγμάτων αναφοράς πάνω στην ίδια πηκτή. Η ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε τυριά από πρόβειο, κατσικίσιο, βουβαλίσιο γάλα ή από μείγματα πρόβειου, κατσικίσου και βουβαλίσου γάλακτος γίνεται μέσω των γ_2 και γ_3 -καζεϊνών των οποίων τα ισοηλεκτρικά σημεία βρίσκονται στην περιοχή τιμών ότι μεταξύ 6,5 και 7,5 (σχήματα 4a, 4β και 5). Το όριο ανίχνευσης είναι χαμηλότερο από 0,5 %.

7.1. Οπτική εξέταση

Για οπτική εξέταση της ποσότητας αγελαδινού γάλακτος συνίσταται η προσαρμογή των συγκεκριμένων δειγμάτων και προτύπων ώστε να προκύψει το ίδιο επίπεδο έντασης των γ_2 - και γ_3 -καζεϊνών αιγοπροβάτων ή/και βουβαλίων (βλέπε « γ_2 E,G,B» και « γ_3 E, G, B» στα σχήματα 4a, 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 εντάσεως των γ_2 - και γ_3 - καζεϊνών βοοειδών (βλέπε « γ_3 C» και « γ_2 C» στα σχήματα 4a, 4β και 5) με εκείνες των προτύπων αναφοράς 0 και 1 % (προβατίνα, αίγα) ή των προσωρινών εργαστηριακών προτύπων (βουβάλι).

7.2. Πυκνομετρική εξέταση

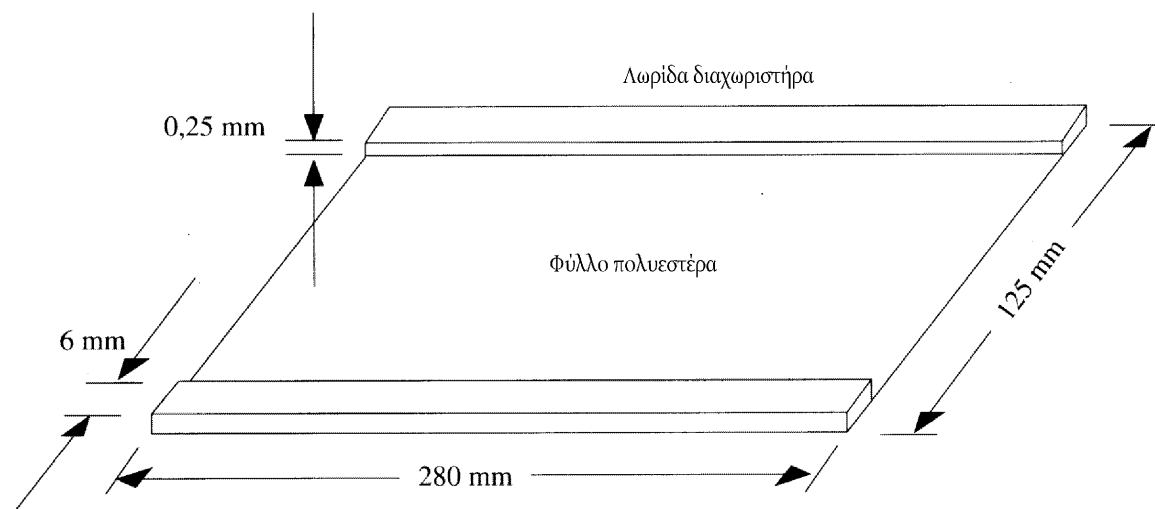
Εφόσον υπάρχει δυνατότητα, χρησιμοποιείται πυκνομετρία (βλέπε 5.19) για τον προσδιορισμό του λόγου των εμβαδών των κορυφών γ_2 - και γ_3 - καζεϊνών βοοειδών, αιγοπροβάτων ή/και βουβαλίων (βλέπε σχήμα 5). Η τιμή αυτή συγκρίνεται με το λόγο των γ_2 - και γ_3 - καζεϊνών στο πρότυπο 1 % (αίγα, προβατίνα) ή στο εργαστηριακό προσωρινό πρότυπο (βουβάλι) που αναλύθηκε επάνω στην ίδια πηκτή.

Σημείωση: Η μέθοδος δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα εφόσον υπάρξει σαφής θετική ένδειξη γ_2 - και γ_3 -καζεϊνών βοοειδών στο πρότυπο 1 %, όχι όμως και στο πρότυπο 0 %. Εάν όχι, η διαδικασία βελτιστοποιείται με επακριβή εφαρμογή των λεπτομερειών της μεθόδου.

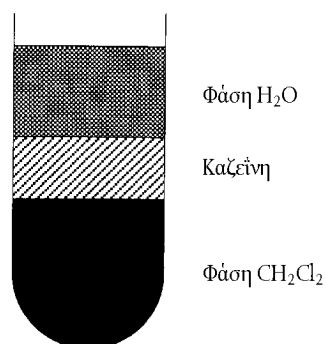
Ένα δείγμα θεωρείται θετικά, εάν οι γ_2 - και γ_3 - καζείνες βοοειδών ή οι αντίστοιχοι λόγοι των εμβαδών των κορυφών είναι ίσοι ή μεγαλύτεροι από το επίπεδο του δείγματος αναφοράς 1 %.

8. Βιβλιογραφία

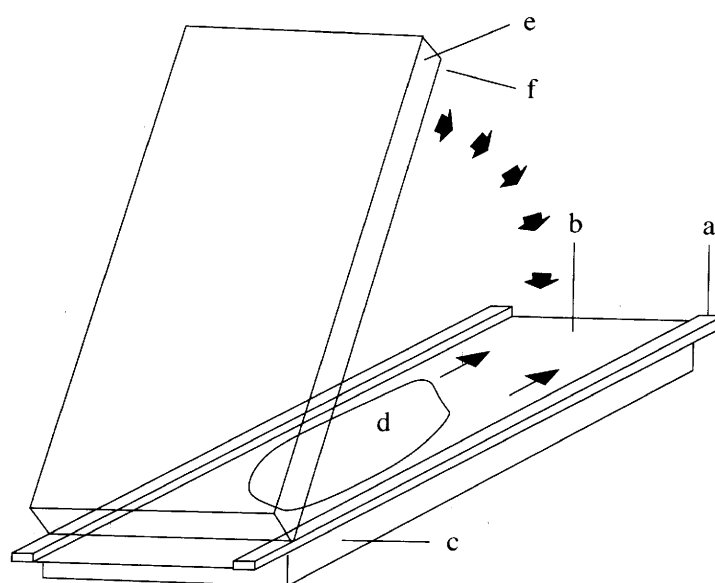
1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause L., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo 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 ampholytelimmobilised pH gradient — isoelectric focusing of γ_2 -caseins using plasmin as signal amplifier. Στο: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radota, ed.) σσ. 389-393, Bode-Verlag, München (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -kaese durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radota B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του φύλλου κάλυψης

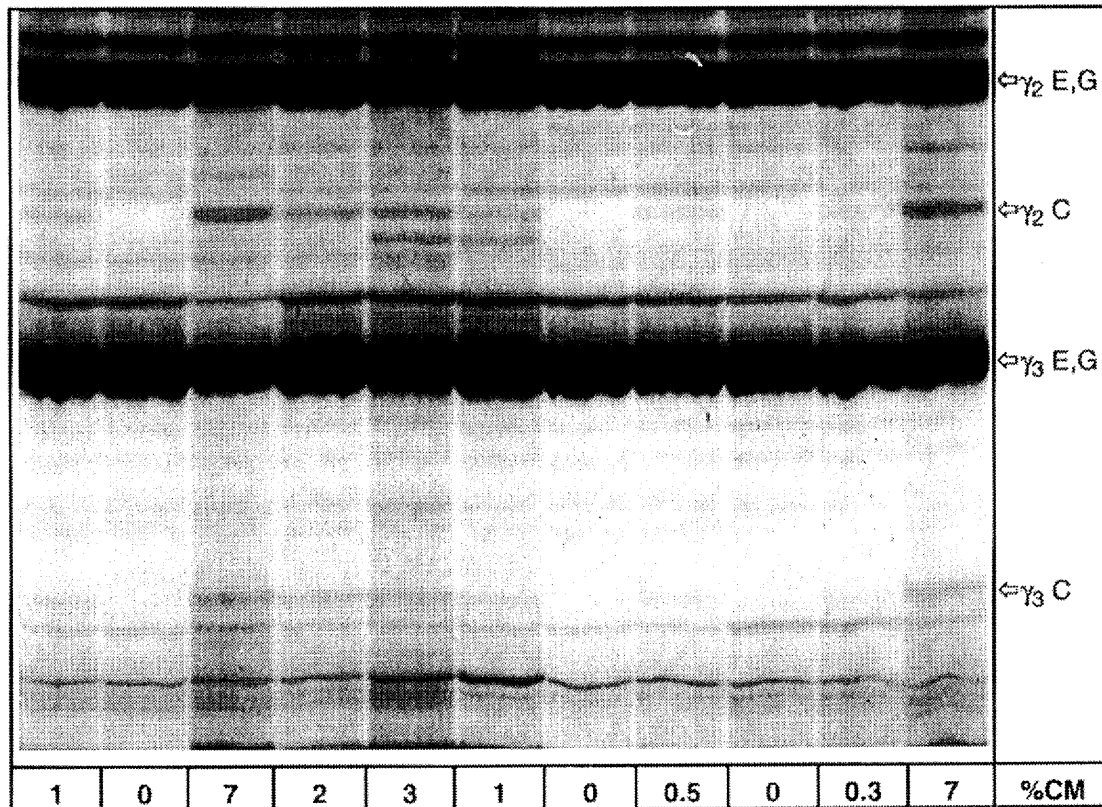


Σχήμα 2: Στρώμα καζείνης που επιπλέει μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης μετά από φυγοκέντρηση



Σχήμα 3: Τεχνική επικάλυψης για στρώση υπερλέπτων πηκτών πολυακρυλαμιδίου

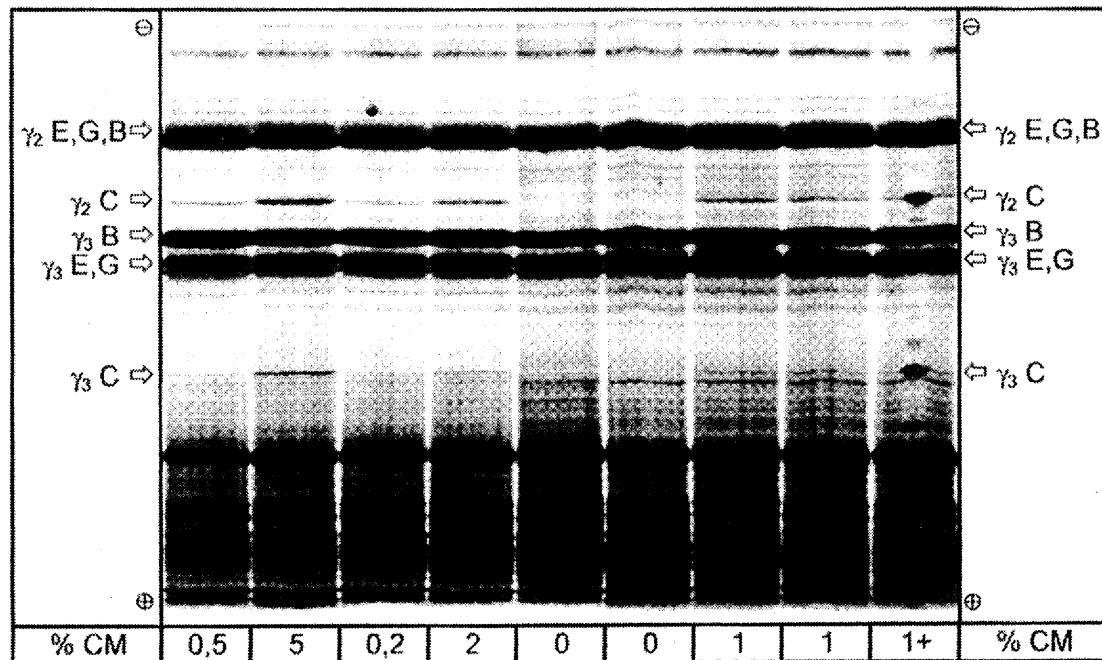
a = λωρίδα διαχωριστήρα (0,25 mm)· b = φύλλο κάλυψης (5.3)· c, e = γυάλινες πλάκες (5.1)· d = διάλυμα πηκτής (4.1.2)· f = φύλλο συγκράτησης πηκτής (5.2)



Σχήμα 4α: Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) καζεϊνών επεξεργασμένων με πλασμίνη από τυρί που προέρχεται από πρόβειο και κατοκίσιο γάλα με διαφορετικές ποσότητες αγελαδινού γάλακτος.

% CM = ποσοστό αγελαδινού γάλακτος C = αγελάδα· E = πρόβατο· G = κατοίκι.

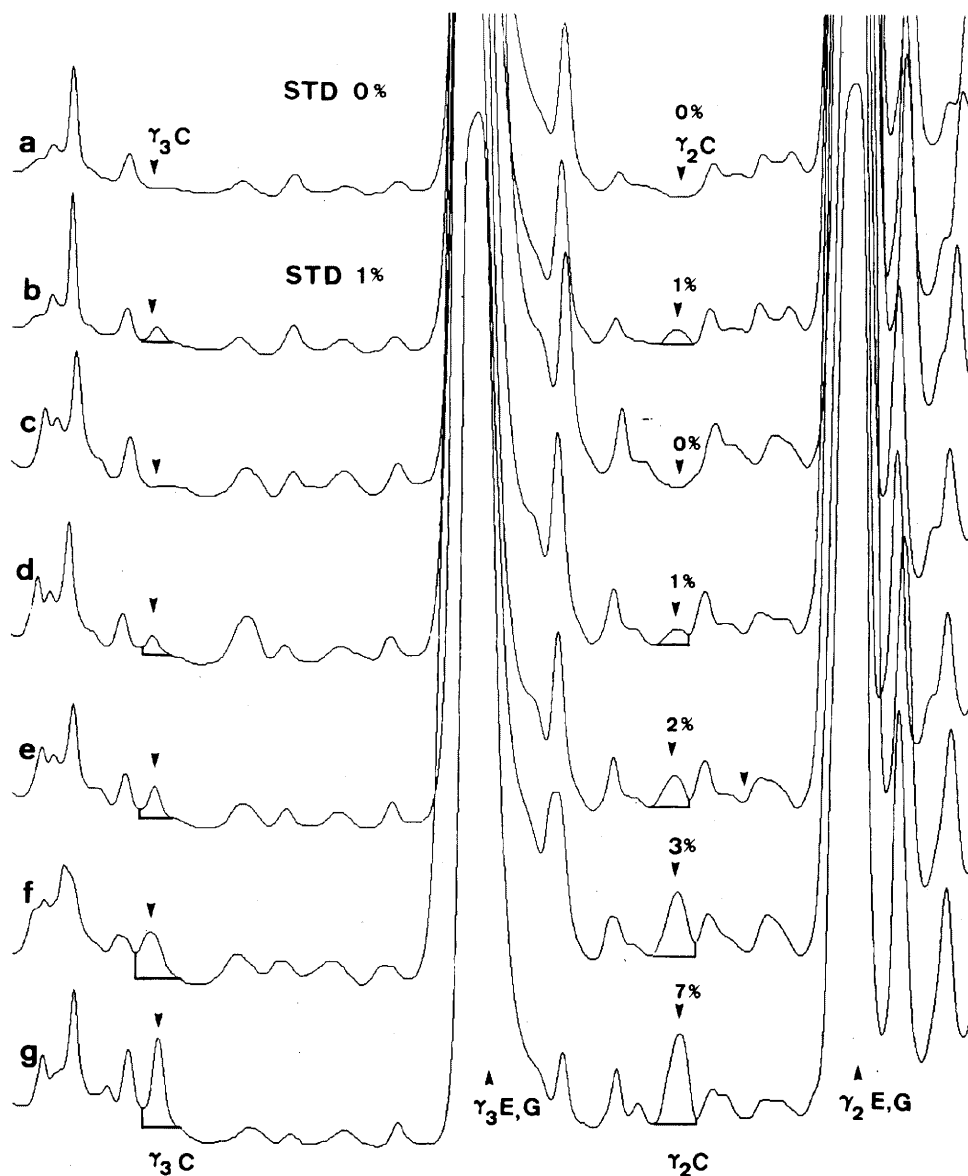
Απεικονίζεται το ... της πηκτής της IEF.



Σχήμα 4β: Ισοηλεκτρική εστίαση καζεϊνών επεξεργασμένων με πλασμίνη, από τυρί που προέρχονται από μείγματα πρόβειο, κατοκίσιου και βουβαλίσσιου γάλακτος, με διαφορετικές ποσότητες αγελαδινού γάλακτος.

% CM = ποσοστό αγελαδινού γάλακτος 1+ = δείγμα που περιέχει 1 % αγελαδινού γάλακτος και το οποίο έχει εμπλουτισθεί με καθαρή καζεΐνη βοοειδών στη μέση της διαδρομής C = αγελάδα· E = πρόβατο· G = κατοίκι· B = βουβάλι.

Απεικονίζεται η συνολική απόσταση διαχωρισμού της πηκτής της IEF.



Σχήμα 5: Τοποθέτηση των πυκνογραφημάτων των προτύπων (STD) και των δειγμάτων τυριού από μείγματα πρόβειου και κατοικίσιου γάλακτος μετά την ισοηλεκτρική εστίαση

a, b = πρότυπα που περιέχουν 0 και 1 % αγελαδινού γάλακτος αγελάδας· c-g = δείγματα τυριού που περιέχουν 0, 1, 2, 3 και 7 % αγελαδινού γάλακτος· C = αγελάδα· E = πρόβατο· G = κατσίκι.

Το ανώτερο ήμισυ της πηκτής της IEF υποβλήθηκε σε σάρωση σε μήκος κύματος $\lambda = 634 \text{ nm}$.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVI

(Άρθρο 11)

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

Πραγματοποιείται καλλιέργεια των δειγμάτων τα οποία αντιστοιχούν σε 1 γραμμάριο βουτύρου εφόσον το βούτυρο εξετάζεται για την παρουσία κολοβακτηριδίων.

Όταν το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη ή η καζεΐνη και τα καζεϊνικά άλατα εξετάζονται για την παρουσία κολοβακτηριδίων, πραγματοποιείται καλλιέργεια 0,1 γραμμαρίων δειγμάτων.

Το πρότυπο IDF 73A:1985, μέθοδος Β, εφαρμόζεται με τις ακόλουθες τροποποιήσεις:

- 1) Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται σύμφωνα με το πρότυπο IDF 122B:1992. Για την όξινη καζεΐνη, η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων που περιγράφεται στο IDF 73A:1985 χρησιμοποιείται εναλλακτικά.
- 2) Κάθε σωλήνας ο οποίος περιέχει καλλιέργεια 1 γραμμάριο δειγμάτων (βούτυρο) ή 0,1 γραμμάρια δειγμάτων (αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη, καζεΐνης/καζεϊνικών αλάτων) αντιστοίχως, παραμένει ένα ορισμένο χρονικό διάστημα για επώαση και στη συνέχεια αξιολογείται. Δεν γίνονται καλλιέργειες διαλυμάτων σε δεκαδικά ψηφία.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Τρία αρνητικά αποτελέσματα:

Έχει τηρηθεί η απαίτηση

Δύο ή τρία θετικά αποτελέσματα:

Δεν έχει τηρηθεί η απαίτηση

Δύο αρνητικά αποτελέσματα:

Πρέπει να αναλυθούν δύο συμπληρωματικά δείγματα που ζυγίζουν αντιστοίχως 1 γραμμάριο (βούτυρο) και 0,1 γραμμάριο (αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, καζεΐνη/καζεϊνικά άλατα).

Η απαίτηση έχει τηρηθεί εφόσον τα δύο τελευταία αποτελέσματα είναι αρνητικά, ενώ στην αντίθετη περίπτωση, η απαίτηση δεν έχει τηρηθεί.

Παρατήρηση

Περιεκτικότητα σε κολοβακτηρίδια: 1/10 γραμμάρια βουτύρου, 1/γραμμάριο αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη ή καζεΐνης/καζεϊνικών αλάτων κατά μέσο όρο:

Τα αποτελέσματα τα οποία δείχνουν ότι έχει εκπληρωθεί η απαίτηση επιτυγχάνονται με ποσοστό πιθανοτήτων 93 %.

Περιεκτικότητα σε κολοβακτηρίδια: 1/γραμμάριο βουτύρου, 1/0,1 γραμμάρια αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη ή καζεΐνης/καζεϊνικών αλάτων κατά μέσο όρο:

Τα αποτελέσματα τα οποία δείχνουν ότι δεν έχει εκπληρωθεί η απαίτηση επιτυγχάνονται με ποσοστό πιθανοτήτων 91 %.

(Υπόθεση: Διανομή του Poisson)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVII

(Άρθρο 12)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΛΑΚΤΟΖΗ ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ 2309 ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ (1)

ΜΕΡΟΣ Ι

1. Πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος εφαρμόζεται στις περιπτώσεις περιεκτικότητας σε λακτόζη ανωτέρας του 0,5 %.

2. Αρχή

Διαλύουμε τα σάκχαρα στο νερό. Ανακινούμε τη ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*) η οποία αφήνει τη λακτόζη ανέπαφη. Προσδιορίζουμε την περιεκτικότητα του διαλύματος σε λακτόζη κατά τη μέθοδο Luff-Schoorl, κατόπιν διυλίσσεως και διηθήσεως.

3. Αντιδραστήρια

Θειοθειικό νάτριο 0,1 N

Δείκτης: διάλυμα αμύλου. Μείγμα 5 γραμμαρίων διαλυτού αμύλου (προσθέτομε ενδεχομένως 10 mg ιωδιούχου υδραργύρου ως παράγοντος συντηρήσεως) και 30 ml νερού προστίθενται σε 1 λίτρο ζέοντος νερού. Διατηρούμε το μείγμα αυτό σε βρασμό επί τρία λεπτά — το αφήνομε να ψυχθεί.

Διάλυμα ιωδιούχου καλίου p.a. σε 30 % (p/v).

Διάλυμα θειικού οξέος 6 N

Αντιδραστήριο κατά Luff-Schoorl:

α) Διαλύουμε 25 g θειικού χαλκού p.a. απηλλαγμένου σιδήρου·

β) Διαλύουμε 50 ml κιτρικού οξέως p.a. ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) σε 50 ml ύδατος·

γ) Διαλύουμε σε 300 ml περίπου θερμού νερού, 143,8 γραμ. ανύδρου ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3).

Αποχέομε το β) εντός του γ) (κατόπιν ψύξεως) ανακινώντας προσεκτικά και προσθέτοντας εν συνεχεία το α). Συμπληρώνομε μέχρι 1 λίτρο και το αφήνομε να ηρεμήσει επί μία νύχτα και κατόπιν το διηθούμε. Πρέπει να διαπιστωθούν οι κανονικότητες του ούτω επιτυγχανομένου αντιδραστηρίου (0,1 N σε Cu, 2 N σε Na_2CO_3). Το pH πρέπει να πλησιάζει το 9,4.

Διάλυμα Carrez I: Διαλύομε 23,8 γραμμάρια Zn ($C_2H_3O_2$) $2.2H_2O$ και 3 γραμμάρια οξικού οξέος (glacial) και συμπληρώνομε 100 ml.

Διάλυμα Carrez II: Διαλύομε 10,6 γραμμάρια $K_4F_2(CN)_6 \cdot 3H_2O$ σε νερό και συμπληρώνομε 100 ml.

Τμήματα ελαφρόπετρας, επεξεργασμένα δια βρασμού με υδροχλωρικό οξύ, πλυμένα με νερό και αποξηραμένα. Αιώρημα *Saccharomyces cerevisiae*: 25 γραμμάρια νωπής ζύμης σε 100 ml ύδατος. (Να μη διατηρηθεί στο ψυγείο πλέον της μιας εβδομάδος).

4. Τρόπος χρήσεως

Ζυγίζομε, με ακρίβεια 1 ml, 1 g του προς ανάλυση δείγματος και θέτομε την ποσότητα αυτή εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml. Προσθέτομε 25 έως 30 ml νερού, τοποθετούμε τη φιάλη επί 30 λεπτά εντός ζέοντος υδρολούτρου. Την ψύχομε, εν συνεχεία σε 35 °C περίπου.

Προσθέτομε 5 ml του αιωρήματος ζύμης (2) και ανακινούμε. Διατηρούμε τη φιάλη και το περιεχόμενό της επί 2 ώρες στο υδρόλουτρο στη θερμοκρασία των 38 έως 40 °C.

Έπειτα από τη ζύμωση ψύχομε σε θερμοκρασία περίπου 20 °C. Προσθέτομε 2,5 ml του διαλύματος Carrez I και ανακινούμε επί 30 δευτερόλεπτα— προσθέτομε εν συνεχεία 2,5 ml του διαλύματος Carrez II και ανακινούμε εκ νέου επί 30 δευτερόλεπτα. Συμπληρώνομε μέχρι 100 ml με νερό, ανακινούμε και διηθούμε. Λαμβάνομε με σιφόνιο ποσότητα διηθήματος μη υπερβαίνουσα τα 25 ml, και περιέχουσα κατά προτίμηση 40 έως 80 mg λακτόζη. Αν είναι αναγκαίο, συμπληρώνομε στα 25 ml με νερό και προσδιορίζομε την περιεκτικότητα σε άνυδρη λακτόζη κατά Luff-Schoorl.

Προβαίνομε σε πλήρη λευκό προσδιορισμό μόνο με τη ζύμη.

(1) Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 222/88

(2) Στην περίπτωση προϊόντων που περιέχουν περισσότερο του 40 % ζυμομένων σακχάρων αυξάνομε την ποσότητα του αιωρήματος ζύμης.

ΜΕΡΟΣ II

1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λακτόζη κατά Luff-Schoorl

Λαμβάνουμε με σιφόνιο 25 ml αντιδραστήριου Luff-Schoorl σε κωνική φιάλη των 300 ml. Προσθέτουμε 25 ml επακριβώς μετρηθέντα του κατασταλαγμένου διαλύματος.

Αφού προσθέσουμε δύο τμήματα ελαφρόπετρας, θερμαίνουμε, αναδεύοντας με το χέρι, επάνω από ελεύθερη φλόγα μέσου ύψους και φέρομε το υγρό σε βρασμό επί 2 λεπτά περίπου. Τοποθετούμε αμέσως την κωνική φιάλη επί μεταλλικού πλέγματος εφοδιασμένου με οδόνη από αμίαντο κάτω από το οποίο, έχουμε προηγουμένως, ανάψει φλόγα. Αυτή είναι ρυθμισμένη κατά τέτοιο τρόπο ώστε η κωνική φιάλη να θερμαίνεται αποκλειστικά κάτω από τη βάση. Προσαρμόζουμε, εν συνεχεία, ένα ψυκτήρα με οπισθοδρομική κίνηση. Από τη στιγμή αυτή, βράζουμε επί 10 λεπτά ακριβώς. Ψύχομε αμέσως σε ψυχρό νερό και μετά 5 λεπτά περίπου τιτλοδοτούμε ως ακολούθως:

Προσθέτουμε στο υγρό 10 ml ιωδιούχου καλίου και ευθύς αμέσως, αλλά προσεκτικά (λόγω σχηματισμού άφθονου αφρού) 25 ml θειικού οξέως 6 N.

Τιτλοδοτούμε, εν συνεχεία, με θειοθειικό νάτριο μέχρι της εμφανίσεως ενός κιτρινού απαλού χρώματος και, προς το τέλος της τιτλοδοτήσεως, προσθέτουμε το δείκτη αμύλου.

Πραγματοποιούμε την ίδια τιτλοδότηση επί ενός μείγματος, επακριβώς μετρηθέντος 25 ml αντιδραστήριου κατά Luff-Schoorl και 25 ml νερού, αφού πρώτα προσθέσουμε 10 ml ιωδιούχου καλίου και 25 ml θειικού οξέως 6 N, χωρίς να το φέρομε αυτή τη φορά σε βρασμό.

Καταρτίζουμε με τη βοήθεια του κατωτέρω πίνακος την ποσότητα σε χιλιόγραμμα λακτόζης που ανταποκρίνεται στη διαφορά των αποτελεσμάτων των δύο τιτλοδοτήσεων (εκφραζομένων σε ml θειοθειικού νατρίου 0,1 N).

ΠΙΝΑΚΑΣ

Πίνακας για 25 ml αντιδραστήριου Luff-Schoorl

(βλέπε συνθήκες ως έχουν στο κείμενο)

1. Θειοθειικό νάτριο 0,1 N

2. Λακτόζη $C_{12}H_{22}O_{11}$

1	2		1	2	
ml	mg	Διαφορά	ml	mg	Διαφορά
1	3,6	3,7	12	44,6	3,8
2	7,3	3,7	13	48,4	3,8
3	11,0	3,7	14	52,2	3,8
4	14,7	3,7	15	56,0	3,9
5	18,4	3,7	16	59,9	3,9
6	22,1	3,7	17	63,8	3,9
7	25,8	3,7	18	67,7	4,0
8	29,5	3,7	19	71,7	4,0
9	33,2	3,8	20	75,7	4,1
10	37,0	3,8	21	79,8	4,1
11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
		3,8	23	88,0	4,1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVIII

(Άρθρο 13)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΡΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΤΥΠΟΥ ΠΥΤΙΑΣ ΣΤΟ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ, ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΚΡΑΤΙΚΗ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΜΑΚΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΕΩΣ (ΥΧΥΑ)**1. Θέμα και τομέας εφαρμογής**

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να διαπιστωθεί η παρουσία ορού γάλακτος τύπου πυτίας στο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που προορίζεται για κρατική αποθεματοποίηση διά του προσδιορισμού των γλυκομακροπεπτιδίων.

2. Αναφορές

Διεθνές πρότυπο ISO 707 — Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα — Μέθοδοι δειγματοληψίας σύμφωνα με τις ενδείξεις που αναφέρονται στο τελευταίο εδάφιο σημείο 2 στοιχείο γ) του παραρτήματος I.

3. Ορισμός

Περιεκτικότητα σε γλυκομακροπεπτιδία του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη: περιεκτικότητα σε ουσίες προσδιοριζόμενη σύμφωνα με τη μέθοδο που ορίζεται παρακάτω και εκφραζόμενη σε επί τοις εκατό, ποσοστό κατά μάζα.

4. Αρχή

- Ανασύσταση του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη: απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των πρωτεϊνών, με τη βοήθεια τριχλωροξικού οξέος και φυγοκέντρηση.
- Ποσοτικός προσδιορισμός των γλυκομακροπεπτιδίων (GMP) του επιπλέοντος μέρους, με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (ΥΧΥΑ).
- Αξιολόγηση του αποτελέσματος σε συνάρτηση με δείγματα αναφοράς τα οποία συνίστανται από αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη απηλλαγμένο από γνωστό ποσοστό ορού γάλακτος σε σκόνη ή στο οποίο έχει προστεθεί γνωστό ποσοστό ορού γάλακτος σε σκόνη.

5. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αποδεδειγμένου αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό είναι αποσταγμένο ή τουλάχιστον ισοδύναμης καθαρότητας.

5.1. Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος

Διαλύονται 240 g τριχλωροξικού οξέος (Cl_3CCOOH) σε νερό και συμπληρώνονται μέχρι τελικού όγκου 1 000 ml.

5.2. Διάλυμα εκλούσεως, pH 6,0

Διαλύονται 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) σε 700 ml νερού περίπου. Εφόσον αυτό είναι αναγκαίο, προστίθεται διάλυμα φωσφορικού οξέος ή υδροξειδίου του νατρίου μέχρι pH 6,0.

Προστίθεται νερό μέχρι τελικού όγκου 1 000 ml και επακολουθεί ομογενοποίηση.

Διηθείται το διάλυμα εκλούσεως, πριν από τη χρησιμοποίησή του, με τη βοήθεια ηθμού διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

5.3. Διάλυμα εκπλύσεως και διατήρησης των στηλών

Αναμιγνύεται ένας όγκος κυανιούχου μεθυλίου ακετονιτριλίου (CH_3CN) με εννέα όγκους νερού. Διηθείται το μείγμα, προτού χρησιμοποιηθεί, σε ηθμό διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

Σημείωση: Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε άλλο διάλυμα εκπλύσεως το οποίο έχει βακτηριοκτόνες ιδιότητες και δεν μεταβάλλει τη διαχωριστική ικανότητα των στηλών.

5.4. Δείγματα αναφοράς

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

5.4.2. Το ίδιο γάλα, νοθευμένο σε ποσοστό 5 % (m/m) με ορό γάλακτος σε σκόνη τύπου πυτίας, μέσης σύνθεσης, δηλαδή [5].

6. Όργανα

- 6.1. Αναλυτικός ζυγός.
- 6.2. Συσκευή φυγοκεντρήσεως η οποία μπορεί να επιτύχει δύναμη φυγοκεντρήσεως 2 200 g, εφοδιασμένη με πωματισμένους σωλήνες φυγοκεντρήσεως, χωρητικότητας 25 ml περίπου.
- 6.3. Μηχανικός αναδευτήρας.
- 6.4. Μαγνητικός αναδευτήρας.
- 6.5. Υάλινο χωνί, διαμέτρου περίπου 7 cm.
- 6.6. Χάρτινοι ηθμοί μέσης διηθητικής ικανότητας, διαμέτρου 12,5 cm περίπου.
- 6.7. Υάλινη διάταξη διηθήσεως εφοδιασμένη με ηθμό διαμέτρου πόρων 0,45 μm.
- 6.8. Βαθμονομημένο σιφόνιο χωρητικότητας 10 ml, σύμφωνο με το ISO 648, κατηγορία A, ή το ISO/R 835.
- 6.9. Υδρόλουτρο, με θερμοστάτη ρυθμισμένο στους $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. Εξοπλισμός υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως, ο οποίος περιλαμβάνει:
 - 6.10.1. αντλία·
 - 6.10.2. εγχυτήρα, χειροκίνητο ή αυτόματο, χωρητικότητας 15 έως 30 μl·
 - 6.10.3. δύο στήλες εν σειρά TSK 2 000 SW (μήκος 30 cm, εσωτερική διάμετρος 0,75 cm) και μια στήλη αρχικής φάσεως άναρτα (3 cm × 0,3 cm) εφοδιασμένη με I 125 ή με υλικό αντίστοιχης απόδοσης·
 - 6.10.4. κλίβανο με στήλη που φέρει θερμοστάτη ρυθμιζόμενο στους 35 ± 1 °C·
 - 6.10.5. ανιχνευτή υπεριωδών διαφόρου μήκους κύματος, με δυνατότητες διενέργειας μετρήσεων στα 205 nm, ευαισθησίας 0,008 A·
 - 6.10.6. ολοκληρωτής με δυνατότητες υλοκλήρωσης από τη μία πτωτική περιοχή της καμπύλης στην άλλη.

Σημείωση: Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες που έχουν διατηρηθεί σε θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η διαχωριστική τους ικανότητα όμως είναι κατά τι μικρότερη. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν, οι διακυμάνσεις θερμοκρασίας κατά την ίδια σειρά αναλύσεων πρέπει να είναι μικρότερες των ± 5 °C.

7. Δειγματοληψία

- 7.1. Διεθνές πρότυπο ISO 707 — Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα — Μέθοδοι δειγματοληψίας σύμφωνα με τις ενδείξεις που αναφέρονται στο τελευταίο εδάφιο σημείο 2 στοιχείο γ) του παραρτήματος I.
- 7.2. Το δείγμα διατηρείται σε συνθήκες τέτοιες ώστε να μη σημειωθεί αλλοίωση ή μεταβολή της σύστασης.

8. Τρόπος εργασίας

- 8.1. Προετοιμασία του υπό δοκιμασία μείγματος
Μεταφέρεται το γάλα σε σκόνη σε περιέκτη διπλάσιας περίπου χωρητικότητας από τον όγκο της σκόνης, εφοδιασμένο με αεροστεγές κάλυμμα. Κλείνουμε τον περιέκτη αμέσως. Αναδεύεται καλά το γάλα σε σκόνη διά διαδοχικών αναστροφών του περιέκτη.
- 8.2. Δειγματοληψία
Ζυγίζονται $2,000 \pm 0,001$ g υπό δοκιμασία δείγματος, σε σωλήνα φυγοκεντρώσεως (6.2).
- 8.3. Απομάκρυνση των λιπαρών και πρωτεϊνικών ουσιών
 - 8.3.1. Στο δείγμα προστίθενται 20 g χλιαρού νερού (50 °C). Διαλύεται η σκόνη αναδεύοντας επί πέντε λεπτά με τη βοήθεια του αναδευτήρα (6.3). Η θερμοκρασία του σωλήνα ρυθμίζεται στους 25 °C.
 - 8.3.2. Προστίθενται, σε διάστημα δύο λεπτών, 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξικού οξέος (5.1) υπό μαγνητική ανάδευση (6.4). Τοποθετείται ο σωλήνας στο υδρόλουτρο (6.9) και διατηρείται επί 60 λεπτά.
 - 8.3.3. Διενεργείται φυγοκέντρωση (6.2) στα 2 200 g επί δέκα λεπτά. Η διήθηση επί χάρτου (6.6) και απομακρύνονται τα 5 πρώτα ml του διηθήματος.

- 8.4. Χρωματογραφικός προσδιορισμός
- 8.4.1. Ενίενται 15 έως 30 ml ακριβώς, υπερκείμενης στιβάδας ή διηθήματος (8.3.3) στη συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (6.10), υπό παροχή 1,0 ml διαλύματος εκλούσεως (5.2) ανά λεπτό.
- Σημείωση:
1. Η θερμοκρασία του διαλύματος εκλούσεως (5.2) διατηρείται στους 85 °C καθ' όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης προκειμένου να διατηρηθεί απειρωμένο το διάλυμα εκλούσεως και να προβλεφθεί κάθε ανάπτυξη βακτηριδίων. Κάθε προληπτικό μέτρο με ανάλογο αποτέλεσμα είναι αποδεκτό.
 2. Σε κάθε διακοπή εκπλύνονται οι στήλες με νερό. Δεν πρέπει να αφήνονται υπό το διάλυμα εκλούσεως (5.2). Πριν από κάθε διακοπή πέραν των 24 ωρών, εκπλύνονται οι στήλες με νερό και στη συνέχεια καθορίζονται με το διάλυμα (5.3) για τρεις ώρες τουλάχιστον, υπό παροχή 0,2 ml ανά λεπτό.
- 8.4.2. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης του υπό δοκιμασία δείγματος [E] λαμβάνονται υπό μορφήν χρωματογράμματος, όπου κάθε κορυφή αναγνωρίζεται υπό το χρόνο κατακρατήσεως της (RT), δηλαδή:
- Κορυφή II: δεύτερη κορυφή του χρωματογράμματος, του οποίου ο χρόνος κατακρατήσεως (RT) είναι 12,5 λεπτά περίπου,
- Κορυφή III: τρίτη κορυφή του χρωματογράμματος, η οποία αντιστοιχεί στα γλυκομακροπεπτιδία (GMP), των οποίων ο χρόνος κατακρατήσεως είναι $15,5 \pm 1,0$ λεπτά.
- Κορυφή IV: τέταρτη κορυφή του χρωματογράμματος της οποίας ο χρόνος κατακρατήσεως είναι περίπου 17,5 λεπτά.
- Η ποιότητα των στηλών μπορεί να επηρεάσει το χρόνο κατακρατήσεως των διαφόρων κορυφών.
- Ο ολοκληρωτής (6.10.6) υπολογίζει αυτόματα την επιφάνεια A κάθε κορυφής δηλαδή:
- A_{II} : επιφάνεια της κορυφής II,
 A_{III} : επιφάνεια της κορυφής III,
 A_{IV} : επιφάνεια της κορυφής IV.
- Προκειμένου να εντοπισθούν οι τυχόν ανωμαλίες που οφείλονται είτε στην κακή λειτουργία των οργάνων ή των στηλών είτε στην προέλευση και τη φύση του υπό ανάλυση δείγματος, είναι αναγκαίο να μελετάται η μορφή κάθε χρωματογράμματος προτού επιχειρηθεί οποιαδήποτε ποσοτική ερμηνεία.
- Σε περίπτωση αμφιβολιών επαναλαμβάνεται η ανάλυση.
- 8.5. Προτυποποίηση
- 8.5.1. Εφαρμόζεται ακριβώς στα δείγματα αναφοράς (5.4) ο τρόπος εργασίας που περιγράφεται στα σημεία 8.2 και 8.4.2. Χρησιμοποιούνται προσφάτως παρασκευασθέντα διαλύματα, δεδομένου ότι τα γλυκομακροπεπτιδία (GMP) προσβάλλονται σε περιβάλλον τριχλωροξικού οξέως 8 %. Η περιεκτικότητά τους ελαττώνεται κατά 0,2 % περίπου ανά ώρα στους 30 °C.
- 8.5.2. Προτού επιχειρηθεί οποιοσδήποτε χρωματογραφικός προσδιορισμός των δειγμάτων, ενίεται επανειλημμένως στις στήλες διάλυμα (8.5.1) του δείγματος αναφοράς (5.4.2) μέχρι σταθεροποίησεως της επιφάνειας και του χρόνου κατακρατήσεως της κορυφής που αντιστοιχεί στα γλυκομακροπεπτιδία (GMP).
- 8.5.3. Καθορίζονται οι συντελεστές ανταποκρίσεως R εγχέοντας τον ίδιο όγκο διηθημάτων (8.5.1) με αυτόν των δειγμάτων.

9. Έκφραση των αποτελεσμάτων

- 9.1. Τρόπος υπολογισμού και τύποι
- 9.1.1. Υπολογισμός των συντελεστών ανταποκρίσεως R:

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

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

όπου:

R_{II} και R_{IV} = είναι αντιστοίχως οι συντελεστές κορυφών II και IV.
 $A_{II}[0]$ και $A_{IV}[0]$ = είναι αντιστοίχως οι επιφάνειες των κορυφών II και IV του δείγματος αναφοράς [0] που λαμβάνονται υπό 8.5.3

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

όπου:

R_{III} = ο συντελεστής ανταποκρίσεως της κορυφής III,
 $A_{III}[0]$ και $A_{III}[5]$ = είναι αντιστοίχως οι επιφάνειες της κορυφής III στα δείγματα αναφοράς [0] και [5] που λαμβάνονται υπό 8.5.3.

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

- 9.1.2. Υπολογισμός της σχετικής επιφάνειας 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:

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = είναι αντιστοίχως οι σχετικές επιφάνειες των κορυφών II, III και IV του δείγματος [E],

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = είναι αντιστοίχως οι επιφάνειες των κορυφών II, III και IV του δείγματος [E] οι οποίες λαμβάνονται υπό 8.4.2,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = είναι οι συντελεστές ανταποκρίσεως που υπολογίζονται στο σημείο 9.1.1.

- 9.1.3. Υπολογισμός του σχετικού χρόνου κατακρατήσεως της κορυφής III του δείγματος [E]:

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

όπου:

$RRT_{III} [E]$ = είναι ο σχετικός χρόνος κατακρατήσεως της κορυφής III του δείγματος [E],

$RT_{III} [E]$ = είναι ο χρόνος κατακρατήσεως της κορυφής III του δείγματος [E] που λαμβάνεται υπό 8.4.2,

$RT_{III} [E]$ = είναι ο χρόνος κατακρατήσεως της κορυφής III του δείγματος αναφοράς [5] που λαμβάνεται υπό 8.5.3.

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

— σε περιεκτικότητα > 5 % το $RRT_{III} [E]$ είναι < 1,000,

— σε περιεκτικότητα ≤ 5 %, το $RRT_{III} [E]$ είναι ≥ 1,000.

Το επιτρεπόμενο περιθώριο αβεβαιότητας για τις τιμές του RRT_{III} είναι ± 0,002.

Κανονικά, η τιμή του $RRT_{III} [0]$ λίγο διαφέρει από 1,034. Ανάλογα με την κατάσταση των στηλών, η τιμή αυτή μπορεί να προσεγγίσει το 1,000, αλλά πρέπει πάντοτε να είναι μεγαλύτερη από αυτό.

- 9.2. Υπολογισμός του επί τοις εκατό ποσοστού ορού γάλακτος σε σκόνη, τύπου πυτίας, που περιέχεται στο δείγμα:

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

όπου:

W = το επί τοις εκατό ποσοστό m/m ορού γάλακτος τύπου πυτίας, που περιέχεται στο δείγμα [E].

$S_{III} [E]$ = η σχετική επιφάνεια της κορυφής III του υπό δοκιμασία δείγματος [E] που λαμβάνεται υπό 9.1.2.

1,3 = η μέση σχετική επιφάνεια της κορυφής III, εκφρασμένη σε g ανά 100 g ορού γάλακτος τύπου πυτίας, που καθορίζεται σε ανόθευτα αποκορυφωμένα γάλατα σε σκόνη διαφορετικής προελεύσεως. Ο αριθμός αυτός ελήφθη πειραματικά.

$S_{III} [0]$ = η σχετική επιφάνεια της κορυφής III που αντιστοιχεί με $R_{III} \times A_{III} [0]$, των οποίων οι τιμές λαμβάνονται υπό 9.1.1 και 8.5.3.

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = είναι η διόρθωση που πρέπει να γίνει στη μέση σχετική επιφάνεια 1,3, όταν η τιμή του $S_{III} [0]$ απέχει του 0,9. Πειραματικά, η μέση σχετική επιφάνεια της κορυφής III του δείγματος αναφοράς [0] είναι 0,9.

- 9.3. Ακρίβεια της μεθόδου

- 9.3.1. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που διεξάγονται ταυτόχρονα ή με μικρή διαφορά μεταξύ τους, από τον ίδιο αναλυτή και με τα ίδια όργανα, επί του ίδιου δείγματος, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,2 % m/m.

- 9.3.2. Αναπαραγωγικότητα

Η διαφορά μεταξύ δύο μεμονωμένων και ανεξαρτήτων αποτελεσμάτων από δύο διαφορετικά εργαστήρια επί του ίδιου δείγματος, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,4 % m/m.

9.4. Ερμηνεία

9.4.1. Τεκμαίρεται η απουσία ορού γάλακτος εφόσον η σχετική επιφάνεια της κορυφής III, S_{III} [E], εκφρασμένη σε γραμμάρια ορού γάλακτος τύπου πυτιάς, ανά 100 γραμμάρια προϊόντος είναι $\leq 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$

όπου:

$2,0 =$ είναι η μέγιστη τιμή για τη σχετική επιφάνεια της κορυφής III που λαμβάνει υπόψη της σχετική επιφάνεια της κορυφής III, ήτοι 1,3 του περιθωρίου αβεβαιότητας που οφείλεται στις διακυμάνσεις της συστάσεως του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (9.3.2),

$(S_{III} [0] - 0,9) =$ είναι η διόρθωση που πρέπει να γίνει όταν η επιφάνεια $S_{III} [0]$ είναι διάφορη του 0,9 (βλέπε σημείο 9.2).

9.4.2. Εάν η σχετική επιφάνεια της κορυφής III, S_{III} [E] είναι $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ και η σχετική επιφάνεια της κορυφής II, S_{II} [E] ≤ 160 , υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε ορό γάλακτος τύπου πυτιάς που υπάρχει όπως αναφέρεται στο σημείο 9.2.

9.4.3. Εάν η σχετική επιφάνεια της κορυφής III, S_{III} [E] είναι $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ και η σχετική επιφάνεια της κορυφής II, S_{II} [E] $> 2,0$ και η επιφάνεια της κορυφής II, S_{II} [E] > 160 , προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες (P %)· στη συνέχεια εξετάζονται οι γραφικές παραστάσεις 1 και 2.

9.4.3.1. Τα στοιχεία που λαμβάνονται μετά από ανάλυση των μη αλλοιωμένων δειγμάτων του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη, με υψηλή ή περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες συγκεντρώνονται στις γραφικές παραστάσεις 1 και 2.

Η ευθεία που εμφανίζεται με συνεχή γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία της γραμμικής παλινδρομήσεως της οποίας οι συντελεστές υπολογίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Η ευθεία που εμφανίζεται με διακεκομμένη γραμμή καθορίζει το ανώτατο όριο της σχετικής επιφάνειας της κορυφής III, με μια πιθανότητα να μην ξεπεραστεί στο 90 % των περιπτώσεων.

Οι ισότητες των ευθειών με διακεκομμένη γραμμή των γραφικών παραστάσεων 1 και 2 ισούνται αντίστοιχα με:

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

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

όπου:

S_{III} είναι η σχετική επιφάνεια της κορυφής III υπολογιζόμενη είτε σύμφωνα με την περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες, είτε σύμφωνα με τη σχετική επιφάνεια της κορυφής S_{III} [E],

P % είναι η περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες εκφρασμένη σε σταθμισμένο ποσοστό·

$(S_{II} [E])$ είναι η σχετική επιφάνεια του δείγματος που υπολογίζεται στο σημείο 9.1.2.

Οι εξισώσεις αυτές ισούνται με τον αριθμό 1,3 που μνημονεύονται στο σημείο 9.2.

Η απόκλιση (T_1 και T_2) μεταξύ της σχετικής επιφάνειας S_{III} [E] και της σχετικής επιφάνειας 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 κατώτερα ή ίσα με μηδέν, δεν μπορεί να καθορισθεί η παρουσία ορού γάλακτος τύπου πυτιάς.

Εάν T_1 και T_2 είναι ανώτερα του μηδενός, το συμπέρασμα είναι η ύπαρξη ορού γάλακτος τύπου πυτιάς.

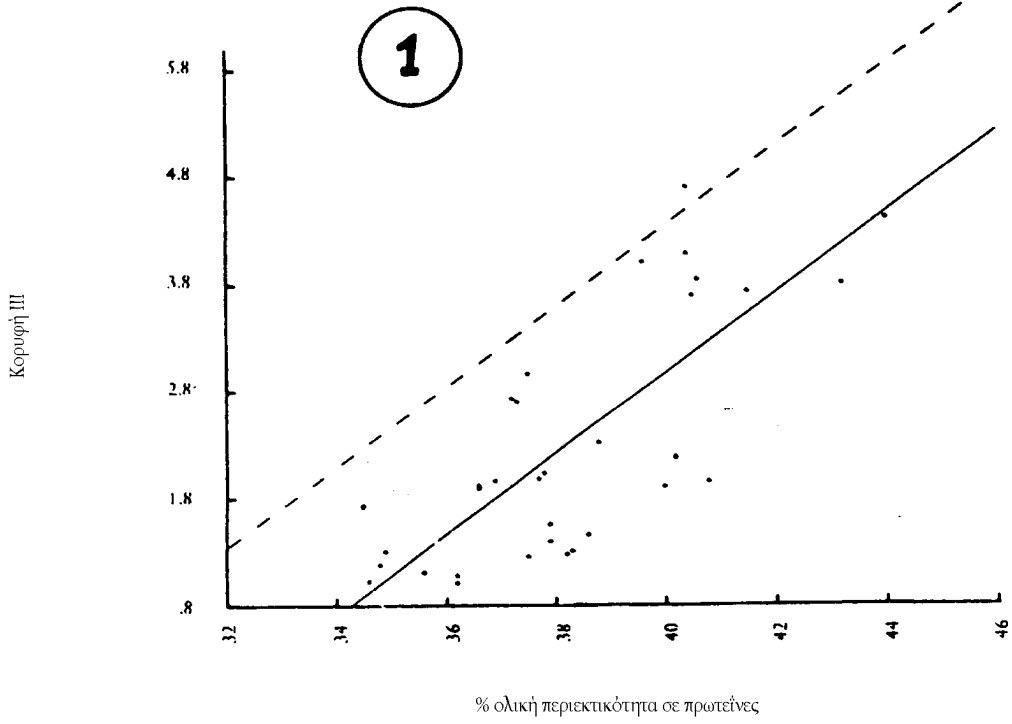
Η περιεκτικότητα σε υπάρχοντα ορό γάλακτος υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$W = T_2 + 0,91$$

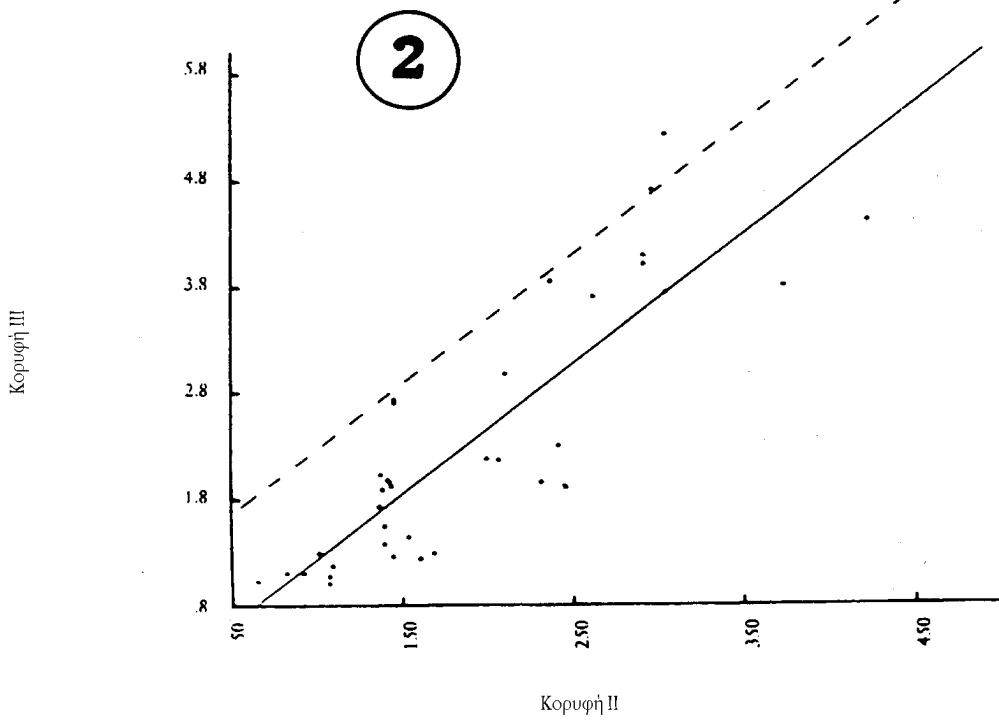
όπου:

0,91 αντιπροσωπεύει την απόκλιση από τον κάθετο άξονα μεταξύ της ευθείας με συνεχή γραμμή και της ευθείας με διακεκομμένη γραμμή.

ΑΠΟΚΟΥΡΥΦΜΕΝΟ ΓΑΛΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ



ΑΠΟΚΟΥΡΥΦΜΕΝΟ ΓΑΛΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIX

(Άρθρο 13)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΗΞΗ, ΣΤΟ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ (ΕΚ) ΑΡΙΘ. 2799/1999**1. Στόχος: ανίχνευση προσθήκης ξηρών εκχυλισμάτων ορού γάλακτος που προκύπτει μετά από πήξη στα ακόλουθα προϊόντα:**

- α) αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που ορίζεται στο άρθρο 2 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2799/1999,
- β) τα μείγματα που ορίζονται στο άρθρο 4 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2799/1999.

2. Αναφορές: Διεθνής προδιαγραφή ISO 707**3. Ορισμός**

Η περιεκτικότητα σε ξηρά εκχυλίσματα του ορού γάλακτος που προκύπτει μετά από πήξη ορίζεται ως η ποσοστιαία αναλογία (κατά μάζα) που προσδιορίζεται με την παραπάνω τεχνική.

4. Αρχή

Προσδιορισμός της ποσότητας σε γλυκομακροπεπτιδία Α σύμφωνα με το παράρτημα XVIII. Τα δείγματα που δίδουν θετικά αποτελέσματα υποβάλλονται σε ανάλυση για την ανίχνευση των γλυκομακροπεπτιδίων Α με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανεστραμμένης φάσεως (τεχνική HPLC). Τα αποτελέσματα που υπερβαίνουν το 1 % (m/m) αποδεικνύουν την παρουσία ξηρών εκχυλισμάτων ορού γάλακτος που προκύπτει μετά από πήξη.

5. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένες αναλυτικής καθαρότητας. Το νερό που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι αποσταγμένο ή νερό ισοδύναμης καθαρότητας. Το ακετονιτρίλιο πρέπει να είναι φασματοσκοπικής καθαρότητας ή HPLC.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την τεχνική περιγράφονται στο παράρτημα XVIII του παρόντος κανονισμού.

Αντιδραστήρια για την τεχνική HPLC.

5.1. Διάλυμα τριχλωρικού οξέος

Διαλύονται 240 γραμμάρια τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COOH) σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 1 000 ml.

5.2. Εκλούσματα Α και Β

Έκλουσμα Α: σε διαβαθμισμένη φιάλη των 1 000 ml προστίθενται 150 ml ακετονιτρίου (CH_3CN), 20 ml ισοπροπανώλης ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) και 1,00 ml τριφθοροξικού οξέος (CF_3COOH). Αραιώνουμε μέχρι 1 000 ml με νερό. Έκλουσμα Β: σε διαβαθμισμένη φιάλη των 1 000 ml προστίθενται 550 ml ακετονιτρίου, 20 ml ισοπροπανώλης και 1,00 ml του TFA. Αραιώνουμε με νερό μέχρι 1 000 ml. Το εκρέον διάλυμα διηθείται πριν από τη χρησιμοποίηση με μια διηθητική μεμβράνη που έχει διάμετρο πόρων 0,45 μικρομέτρων (μm).

5.3. Διατήρηση της στήλης

Μετά τις αναλύσεις η στήλη εκπλύνεται με το εκλούσμα Β (με τη βοήθεια κλίσης παροχών) κατόπιν εκπλύνεται με το ακετονιτρίλιο (με τη βοήθεια κλίσης παροχών κατά τη διάρκεια 30 λεπτών). Η στήλη διατηρείται σε ακετονιτρίλιο.

5.4. Δείγματα μάρτυρες

- 5.4.1. Αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη που ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις για τη δημόσια αποθεματοποίηση, δηλαδή (0).
- 5.4.2. Το ίδιο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη αναμειγμένο με 5 % (m/m) με τον ορό γάλακτος σε σκόνη που προκύπτει μετά από πήξη, πρότυπης σύνθεσης, δηλαδή (5).
- 5.4.3. Το ίδιο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη αναμειγμένο με 50 % (m/m) με τον ορό γάλακτος σε σκόνη που προκύπτει μετά από πήξη, πρότυπης σύνθεσης, δηλαδή (50) ⁽¹⁾.

6. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για τον τρόπο εργασίας περιγράφεται στο παράρτημα XVIII του παρόντος κανονισμού.

6.1.1. Αναλυτικός ζυγός.

- 6.2. Φυγοκεντρική μηχανή που μπορεί να επιτύχει μια κεντρόφυγο δύναμη 2 200 γραμμαρίων και εξοπλισμένη με κεντρόφυγους σωλήνες με πόμα, χωρητικότητας περίπου 50 ml.

⁽¹⁾ Ο ορός γάλακτος σε σκόνη που προκύπτει μετά από πήξη πρότυπης σύνθεσης, καθώς και το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη μπορούν να ληφθούν από τον NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης σκόνες που παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα με τις σκόνες NIZO.

- 6.3. Μηχανικός αναδευτήρας με δυνατότητα λειτουργίας στους 50 °C.
- 6.4. Μαγνητικός αναδευτήρας.
- 6.5. Γυάλινα χωνιά διαμέτρου περίπου 12,5 εκατοστών.
- 6.6. Διηθητικά χαρτιά μέσης διηθητικής ικανότητας διαμέτρου περίπου 12,5 εκατοστών.
- 6.7. Διάταξη γνάμνης διήθησης εξοπλισμένης με διηθητική μεμβράνη της οποίας η διάμετρος πόρων είναι 0,45 μικρόμετρα.
- 6.8. Βαθμολογικά σιφώνια που επιτρέπουν την παροχή 10 ml (ISO 648, κατηγορίας A ή ISO/R 835) ή σύστημα που μπορεί να παρέχει 10,0 ml σε δύο λεπτά.
- 6.9. Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο που ρυθμίζεται στους $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. Εξοπλισμός HPLC που περιλαμβάνει:
 - 6.10.1. Αντλία διπλής κλήσεως παροχών,
 - 6.10.2. Διάταξη έκχυσης χειροκίνητη ή αυτόματη, δυναμικότητας 100 μικρολίτρων (μl),
 - 6.10.3. Στήλη Dupont Protein Plus (μήκους 25 εκατοστών, εσωτερικής διαμέτρου 0,46 εκατοστών) ή ισοδύναμη στήλη ανεστραμμένης φάσεως με βάση διοξείδιο του πυριτίου με διευρυμένους πόρους,
 - 6.10.4. Κλίβανος με θερμοστατημένη στήλη που ρυθμίζεται σε 35 ± 1 °C,
 - 6.10.5. Ανιχνευτής UV με μεταβλητό μήκος κύματος, που επιτρέπει μετρήσεις έως 210 nm (σε περίπτωση ανάγκης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μήκος κύματος μεγαλύτερο το οποίο μπορεί να επιτύχει 220 nm) με ευαισθησία 0,02 Å,
 - 6.10.6. Ολοκληρωτής που μπορεί να σχηματίζει ολοκληρώματα από κοιλάδα σε κοιλάδα.

Σημείωση

Μπορεί κανείς να εργασθεί με στήλες που διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό τον όρο ότι η θερμοκρασία αυτή δεν παρουσιάζει διακυμάνσεις μεγαλύτερες του 1 °C· αλλιώς, διαπιστώνονται μεγάλες μεταβολές στο χρόνο κατακράτησης των GMP_A.

7. Δειγματοληψία

- 7.1. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο ISO 707. Τα κράτη μέλη μπορούν ωστόσο να εφαρμόσουν άλλη μέθοδο δειγματοληψίας εφόσον αυτή είναι σύμφωνη με τις αρχές του προαναφερθέντος προτύπου.
- 7.2. Το δείγμα διατηρείται σε συνθήκες κατάλληλες ώστε να μη προκληθεί αλλοίωση ή μεταβολή της σύνθεσης.

8. Τρόπος εργασίας

- 8.1. *Παρασκευή του δείγματος για δοκιμή*

Το γάλα σε σκόνη μεταγγίζεται σε δοχείο χωρητικότητας διπλής περίπου του όγκου της σκόνης, εξοπλισμένου με αεροστεγές πώμα. Το δοχείο κλείνεται αμέσως. Το γάλα σε σκόνη αναμιγνύεται καλά με διαδοχικές αναστροφές του δοχείου.
- 8.2. *Δείγμα δοκιμής*

Σε φυγόκεντρους σωλήνες ζυγίζονται $2 \pm 0,001$ γραμμάρια δείγματος για δοκιμή (6.2) ή σε κατάλληλη σφαιρική φιάλη, με συμριμένο πώμα (50 ml).
- 8.3. *Απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των πρωτεϊνών*
 - 8.3.1. Στο δείγμα δοκιμής προστίθενται 20,0 γραμμάρια ζεστού νερού (50 °C). Η σκόνη διαλύεται με ανακίνηση πέντε λεπτών με τη βοήθεια ενός αναδευτήρα ή κατά τη διάρκεια 30 λεπτών, στην περίπτωση του όξινου βουτυρογάλακτος, με τη βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα (6.3). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο (6.9) και ρυθμίζεται η θερμοκρασία του σωλήνα σε 25 °C.
 - 8.3.2. Σε δύο λεπτά προστίθενται 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξικού οξέος στους 25 °C (5.1) ανακινώντας ζωρά με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (6.4). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο (6.9) και διατηρείται σ' αυτό κατά τη διάρκεια 60 λεπτών.
 - 8.3.3. Φυγοκέντριση (6.2) 2 200 γραμμάρια κατά τη διάρκεια 10 λεπτών ή διήθηση σε χαρτί (6.6), και απορρίπτονται τα πέντε πρώτα ml του διηθήματος.
- 8.4. *Χρωματογραφικός προσδιορισμός*
 - 8.4.1. Η ανάλυση HPLC πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στο παράρτημα XVIII. Εάν προκύψει αρνητικό αποτέλεσμα αυτό σημαίνει ότι το αναλυόμενο δείγμα δεν περιέχει ξηρά εκχυλίσματα ορού γάλακτος που προέκυψε από πήξη σε ανιχνεύσιμες ποσότητες. Σε περίπτωση θετικών αποτελεσμάτων πρέπει να εφαρμοστεί η τεχνική HPLC ανεστραμμένης φάσεως που περιγράφεται παρακάτω. Η παρουσία όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη μπορεί να δώσει ψευδοθετικά αποτελέσματα. Η μέθοδος HPLC ανεστραμμένης φάσεως αποκλείει αυτήν τη δυνατότητα.

- 8.4.2. Πριν να εφαρμοστεί η ανάλυση CLHP ανεστραμμένης φάσεως, πρέπει να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της κλήσης παροχών. Ο ιδανικός χρόνος κατακράτησης για τα συστήματα της κλήσης παροχών νεκρού όγκου περίπου 6 ml (όγκος του σημείου όπου τα διαλύματα βρίσκονται στον όγκο του δακτυλίου της διάταξης έγχυσης) είναι 26 λεπτά ± 2 λεπτά για τα GMP_A. Στην περίπτωση των συστημάτων κλήσης παροχών που έχουν νεκρό όγκο χαμηλότερο (για παράδειγμα 2 ml) πρέπει να εφαρμοσθεί ως ιδανικός χρόνος κατακράτησης ο χρόνος των 22 λεπτών.

Τα διαλύματα των τύπων δειγμάτων λαμβάνονται (5.4) με ή χωρίς ορό γάλακτος που προκύπτει μετά τη πήξη κατά 50 %.

Στη διάταξη CLHP εκχύνονται 100 μl υπερκείμενου υγρού ή διηθήματος (8.3.3) με τη χρησιμοποίηση συνθηκών κλήσεως παροχών αναφοράς που αναφέρονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Συνθήκες κλήσεως παροχών αναφοράς για τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφίας

Χρόνος (σε λεπτά)	Παροχή (ml/λεπτό)	% A	% B	Καμπύλη
INIT	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

Μια σύγκριση των δύο χρωματογραφημάτων θα έπρεπε να φαίνεται εκεί όπου βρίσκεται η κορυφή των GMP_A.

Με τη βοήθεια του τύπου που αναφέρεται παρακάτω, η σύνθεση του αρχικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί για την κανονική κλήση παροχών (8.4.3) μπορεί να υπολογισθεί ως εξής:

$$\% B = 10 - 2,5 + [13,5 + (RT_{GMPA} - 26)/6] * 30/27$$

$$\% B = 7,5 + [13,5 + (RT_{GMPA} - 26)/6] * 1.11.$$

όπου:

RT_{GMPA}: χρόνος κατακράτησης του GMP_A στην κλήση παροχών αναφοράς

10: το αρχικό ποσοστό B της κλήσης παροχών αναφοράς

2,5: το ποσοστό B στο κεντρικό σημείο μείον το ποσοστό B στην αρχή στην κανονική κλήση παροχών

13,5: ο χρόνος στα μισά της διαδρομής της κλήσης παροχών αναφοράς

26: αναγκαίος χρόνος κατακράτησης για τα GMP_A

6: λόγος των κλήσεων παροχών αναφοράς και της κανονικής κλήσης παροχών

30: ποσοστό B στην αρχή μείον το ποσοστό B σε 27 λεπτά. Στην κλήση παροχών αναφοράς

27: χρόνος διαδρομής της κλήσης παροχών αναφοράς.

- 8.4.3. Λήψη διαλυμάτων των δοκιμών

Στο σκεύος CLHP εκχύνονται ακριβώς 100 ml υπερκείμενου υγρού ή διηθήματος (8.3.3) και παροχή 1,0 ml ρέοντος διαλύματος (5.2) ανά λεπτό.

Η σύνθεση του εκλούσματος στην αρχή της ανάλυσης προκύπτει από το 8.4.2. Προσεγγίζει συνήθως το A: B = 76: 24 (5.2). Αμέσως μετά την έγχυση αρχίζει μια γραμμική κλήση παροχών που δίδει μετά από 25 λεπτά ποσοστό B μεγαλύτερο του 5 %. Στη συνέχεια αρχίζει μια γραμμική κλήση παροχών που οδηγεί στη σύνθεση του εκλούσματος μέχρι 95 % του B σε διάστημα 5 λεπτών. Η σύνθεση αυτή διατηρείται κατά τη διάρκεια 5 λεπτών, στη συνέχεια μεταβάλλεται η σύνθεση με γραμμική κλήση παροχής 5 λεπτών για να επιτευχθεί η αρχική σύνθεση. Σύμφωνα με τον εσωτερικό όγκο του συστήματος άντλησης, η επόμενη έγχυση μπορεί να γίνει σε 15 λεπτά αφού έχουν επιτευχθεί οι αρχικές συνθήκες.

Παρατηρήσεις

- Ο χρόνος κατακράτησης των γλυκομακροπεπτιδίων θα έπρεπε να είναι 26 λεπτά ± 2 λεπτά, γεγονός που μπορεί να επιτευχθεί με τη μεταβολή των αρχικών συνθηκών και των τελικών συνθηκών της πρώτης κλήσης παροχών. Ωστόσο η διαφορά στο % B για τις αρχικές συνθήκες και τις τελικές συνθήκες της πρώτης κλήσης παροχών πρέπει να παραμείνουν στο 5 % B.
- Τα εκλούσματα πρέπει να απαφέρονται επαρκώς και επίσης να διατηρούνται απαερωμένα. Αυτό είναι απαραίτητο για την καλή λειτουργία του συστήματος άντλησης της κλήσης παροχών. Η τυπική απόκλιση που αφορά το χρόνο κατακράτησης στην κορυφή του GMP πρέπει να είναι κατώτερη από 0,1 λεπτό (n = 10).
- Για όλα, τα πέντε δείγματα πρέπει να εγχυθεί και να χρησιμοποιηθεί το δείγμα αναφοράς (5) για να υπολογισθεί ο νέος συντελεστής απόκρισης R (9.1.1).

- 8.4.4. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης του δείγματος για δοκιμή (E) λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος όπου κάθε κορυφή GMP αναγνωρίζεται από το χρόνο κατακράτησης περίπου 26 λεπτών.

Ο ολοκληρωτής (6.10.1) υπολογίζει αυτόματα το ύψος της κορυφής H της κορυφής GPM. Η βασική γραμμή πρέπει να επαληθευθεί σε κάθε χρωματογράφημα. Η ανάλυση ή το ολοκληρωμα θα έπρεπε να επαναληφθούν εάν η γραμμή δεν είναι σωστή.

Για την ανίχνευση των ενδεχόμενων ανωμαλιών που οφείλονται είτε στην κακή λειτουργία του εξοπλισμού ή στη στήλη, είτε στη φύση του αναλυόμενου δείγματος, είναι αναγκαίο να εξεταστεί η μορφή κάθε χρωματογραφήματος πριν από κάθε ποσοτική ερμηνεία. Σε περίπτωση αμφιβολίας θα επαναληφθεί η ανάλυση.

8.5. Καμπύλη αναφοράς

- 8.5.1. Να εφαρμοσθεί επακριβώς στα δείγματα μάρτυρες (5.4.1-5.4.2) ο τρόπος εργασίας που περιγράφεται στο σημείο 8.2 στο σημείο 8.4.4. Να χρησιμοποιηθούν πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα διότι τα GMP αποικοδομούνται σε τριχλωροξικό περιβάλλον μέχρι ποσοστού 8 %, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε 4 °C το διάλυμα παραμένει σταθερό κατά τη διάρκεια 24 ωρών. Στην περίπτωση μακρών σειρών ανάλυσης είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί ένας ψυχόμενος δίσκος δειγμάτων στην αυτόματη διάταξη έγχυσης.

Σημείωση:

Το σημείο 8.4.2 μπορεί να παραληφθεί εάν το % B στις αρχικές συνθήκες είναι γνωστό από προηγούμενες αναλύσεις.

Το χρωματογράφημα του δείγματος αναφοράς (5) πρέπει να είναι σύμφωνο με το σχέδιο 1. Σ' αυτήν τη γραφική αναπαράσταση, η κορυφή του GMP_A ακολουθεί μετά από δύο μικρές κορυφές. Είναι αναγκαίο να γίνει ένας συγκρίσιμος διαχωρισμός.

- 8.5.2. Πριν από κάθε χρωματογραφικό προσδιορισμό των δειγμάτων, να χυθούν 100 μικρολίτρα του προτύπου δείγματος χωρίς ορό γάλακτος (0) (5.4.1).

Το χρωματογράφημα δεν θα έπρεπε να παρουσιάζει κορυφή στο χρόνο κατακράτησης της κορυφής του GMP_A .

- 8.5.3. Να προσδιοριστούν οι συντελεστές απόκρισης R με έγχυση του ίδιου όγκου διηθήματος (8.5.1) όπως και για τα δείγματα.

9. Αποτέλεσμα

9.1. Τρόπος υπολογισμού και τύποι

- 9.1.1. Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης R:

Κορυφή GMP: $R = W/H$

όπου:

R = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής GMP

H = στο ύψος της κορυφής GMP

W = η ποσότητα του ορού γάλακτος που περιέχεται στο δείγμα μάρτυρα (5)

- 9.2. Υπολογισμός του ποσού του ορού γάλακτος που προκύπτει μετά την πήξη και βρίσκεται μέσα στο δείγμα:

$W(E) = R \times H(E)$

όπου:

W(E) = το ποσοστό του ορού γάλακτος που προκύπτει μετά από πήξη και βρίσκεται στο δείγμα: (E)

R = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής GMP (9.1.1)

H(E) = το ύψος της κορυφής GMP του δείγματος (E).

Εάν W(E) είναι ανώτερο από 1 % και η διαφορά μεταξύ του χρόνου κατακράτησης και του χρόνου του δείγματος μάρτυρα (5) είναι κατώτερος από 0,2 λεπτά, αποδεικνύεται η παρουσία ξηρών εκχυλισμάτων ορού γάλακτος.

9.3. Ακρίβεια της μεθόδου

- 9.3.1. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα ή με μικρό χρονικό διάστημα από τον ίδιο τεχνικό εργαστηρίου που χρησιμοποίησε τον ίδιο εξοπλισμό, επί της ίδιας δειγματοληψίας δεν μπορεί να υπερβαίνει το 0,2 % m/m.

9.3.2. Αναπαραγωγιμότητα

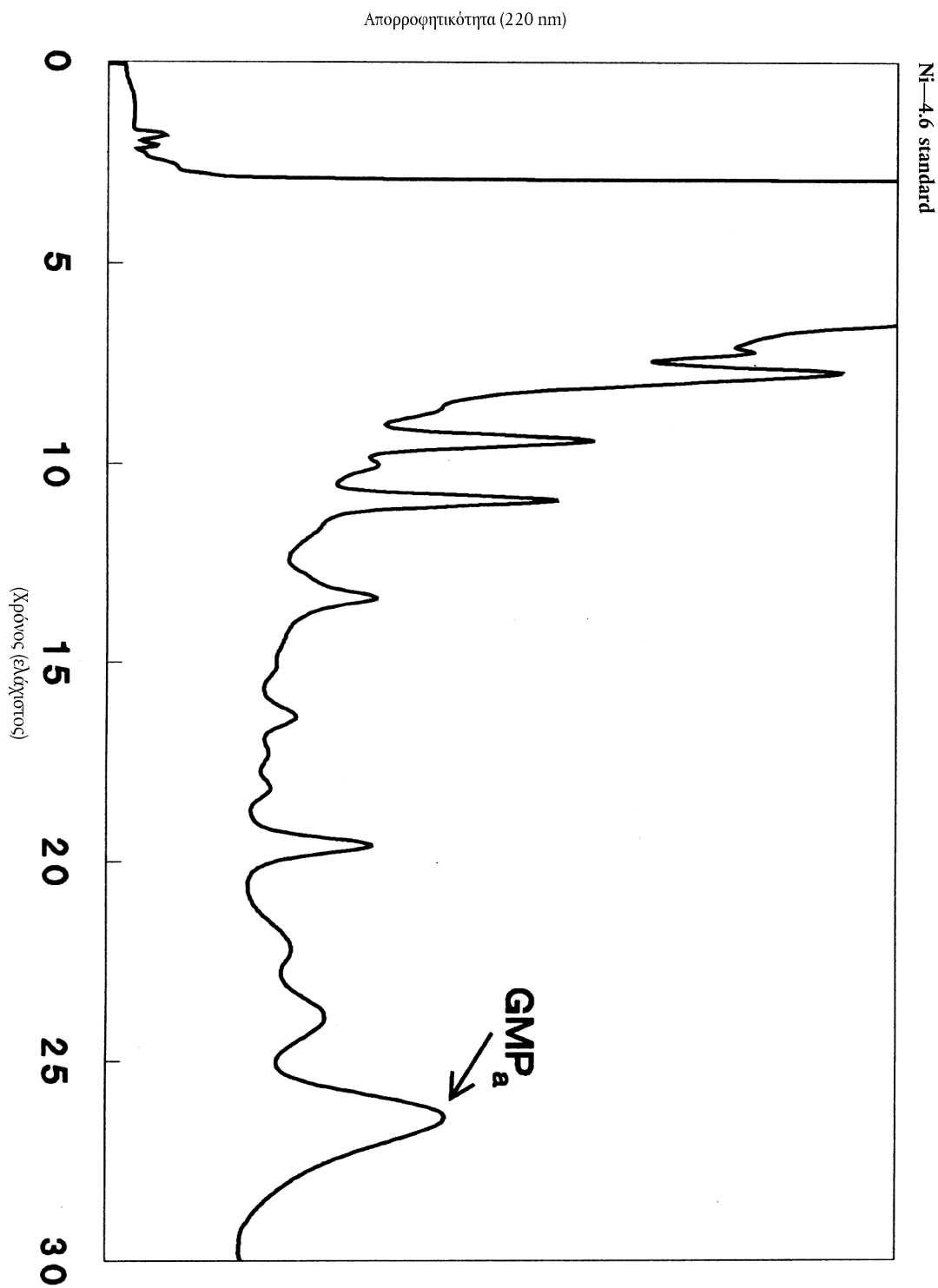
Δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα.

9.3.3. Γραμμικότητα

Έως ποσοστού 16 % ορού γάλακτος μετά από πήξη θα ληφθεί μια γραμμική σχέση με συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερου του 0,99.

9.4. Ερμηνεία

- 9.4.1. Αποδεικνύεται η παρουσία του ορού γάλακτος εάν το αποτέλεσμα που λαμβάνεται στο σημείο 9.2 είναι μεγαλύτερο από 1 % m/m και εάν ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής GMP διαφέρει κατά 0,2 τουλάχιστον λεπτά από εκείνον του πρότυπου δείγματος (5). Το όριο του 1 % καθορίζεται σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 625/78 παράρτημα V σημεία 9.2 και 9.4.1.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΧ

(Άρθρο 14)

ΑΠΟΚΟΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΣΕΡΙΝΗ ΚΑΙ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗ**Μέθοδος CLHT αναστροφής φάσης****1. ΘΕΜΑ ΚΑΙ ΤΟΜΕΑΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Η μέθοδος περιγράφει μία διαδικασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φωσφατιδυλσερίνης (PS) και φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) σε αποκουφωμένο γάλα σε σκόνη (ΑΓΣ) και είναι κατάλληλη για την ανίχνευση πηγμάτων βουτυρογάλακτος στο ΑΓΣ.

2. ΟΡΙΣΜΟΣ

Περιεκτικότητα σε PS + PE: η κατανομή μάζας ουσίας προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που ορίζεται στο παρόν παράρτημα. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg/g διπалаμμελαϊκής φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PEDP) ανά 100 g σκόνης.

3. ΑΡΧΗ

Απόσταξη αμινοφωσφολιπιδίων με μεθανόλη από ανασυσταθείσα σκόνη γάλακτος. Προσδιορισμός PS και PE ως παραγώγων της ο-φθαλδιαλδεύδης (OPA) με CLHT αναστροφής φάσης (RP) και ανίχνευση φθορισμού. Ποσοτικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας PS και PE στο εξεταζόμενο δείγμα σε σχέση με πρότυπο δείγμα που περιέχει γνωστή ποσότητα PEDP.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αποδεδειγμένου αναλυτικού βαθμού. Το χρησιμοποιούμενο νερό είναι αποσταγμένο ή τουλάχιστον ισοδύναμης καθαρότητας.

4.1. Πρότυπο υλικό: PEDP, τουλάχιστον 99 % καθαρό.

Σημείωση: Το πρότυπο υλικό πρέπει να αποθηκεύεται σε $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. Αντιδραστήρια για την προετοιμασία πρότυπου δείγματος και εξεταζόμενου δείγματος

4.2.1. Μεθανόλη CLHP βαθμού

4.2.2. Χλωροφόρμιο CLHP βαθμού

4.2.3. Τρυπταμίνη — μονοϋδροχλωρίδιο

4.3. Αντιδραστήρια για σχηματισμό παραγώγων ο-φθαλδιαλδεύδης

4.3.1. Υδροξείδιο του νατρίου, υδάτινο διάλυμα 12 M

4.3.2. Βορικό οξύ, υδάτινο διάλυμα 0,4 M προσαρμοσμένο σε pH 10,0 με υδροξείδιο του νατρίου (4.3.1)

4.3.3. 2-μερκαπτοαιθανόλη

4.3.4. Ο-φθαλδιαλδεύδη (OPA)

4.4. Διαλύτες έκλυσης CLHP

Οι διαλύτες έκλυσης πρέπει να παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια βαθμού CLHP.

4.4.1. Νερό CLHP βαθμού

4.4.2. Μεθανόλη φθορομετρικά ελεγχόμενης καθαρότητας

4.4.3. Τετραϋδροφουράνιο

4.4.4. Φωσφατικό διάλυμα διυδρογόνου του νατρίου

4.4.5. Οξικό άλας του νατρίου

4.4.6. Οξικό οξύ

5. Όργανα

5.1. Αναλυτικός ζυγός

5.2. Μεζούρες, με χωρητικότητα 25 και 100 ml

5.3. Σιφόνια έγχυσης 1 και 10 ml

5.4. Μαγνητικός αναδευτήρας

- 5.5. Βαθμονομημένα σιφόνια έγχυσης 0,2, 0,5 και 5 ml
- 5.6. Ογκομετρικά χωνιά, με χωρητικότητα 10, 50 και 100 ml
- 5.7. Σύριγγες, χωρητικότητας 20 και ml
- 5.8. Λουτρό υπερήχων
- 5.9. Φυγόκεντρος που λειτουργεί σε $27\ 000 \times g$
- 5.10. Γυάλινες φιάλες, χωρητικότητας περίπου 5 ml
- 5.11. Βαθμονομημένος κύλινδρος, χωρητικότητας 25 ml
- 5.12. pH-μέτρο
- 5.13. Εξοπλισμός CLHP
 - 5.13.1. Βαθμονομημένο σύστημα άντλησης, ικανό να λειτουργεί σε 1,0 ml ανά λεπτό σε 200 bar
 - 5.13.2. Αυτόματος δειγματολήπτης με δυνατότητα σχηματισμού παραγώγων
 - 5.13.3. Θερμαντής στήλης σε 30 °C
 - 5.13.4. Ανιχνευτής φθορισμού σε 330 nm μήκος κύματος διέγερσης και 440 nm μήκος κύματος εκπομπής
 - 5.13.5. Ολοκληρωτής ή ηλεκτρονικός υπολογιστής επεξεργασίας δεδομένων ικανός για μετρήσεις στην περιοχή σχηματισμού κορυφής
 - 5.13.6. Λιχροσφαίρα — 100 στήλες (250 X 4,6 mm) ή ισοδύναμη στήλη γεμάτη με οκταδεκυλοσιλάνη (C18), μέγεθος μορίου 5 μm

6. Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με το πρότυπο IDF 50B 1985.

7. Διαδικασία

7.1. Προετοιμασία του πρότυπου διαλύματος του εργαστηρίου

Ζυγίζονται $30,0 \pm 0,1$ mg τριπταμίνης-μονοϋδροχλωριδίου (4.2.3) σε ογκομετρικό χωνί 100 ml (5.6) και γεμίζεται έως τη χαραγή με μεθανόλη (4.2.1). Εγχύεται με πιπέτα 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού σε ογκομετρικό χωνί 10 ml (5.6) και γεμίζεται, ως τη χαραγή με μεθανόλη (4.2.1) έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 0,15 mM τριπταμίνης.

7.2. Προετοιμασία του υπό δοκιμασία διαλύματος

Ζυγίζονται $1,000 \pm 0,001$ g δείγματος ΑΓΣ σε μεζούρα 25 ml (5.2). Προστίθενται 10 ml αποσταγμένου νερού σε 40 °C με πιπέτα (5.3) και αναδεύονται με μαγνητικό αναδευτήρα (5.4) για 30 λεπτά με σκοπό τη διάλυση οιονδήποτε συσσωρευμάτων. Εγχύεται με πιπέτα 0,2 ml (5.5) του ανασυσταθέντος γάλακτος σε ογκομετρικό χωνί 10 ml (5.6), προστίθενται 100 μl του διαλύματος 0,15 mM τριπταμίνης (7.1) χρησιμοποιώντας σύριγγα (5.7) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Αναμειγνύονται προσεκτικά με αναστροφή και υποβάλλονται σε υπερήχους (5.8) για 15 λεπτά. Διενεργείται φυγόκεντρωση (5.9) σε $27\ 000 \times g$ για 10 λεπτά και συγκεντρώνεται το υπερπλέον διάλυμα σε γυάλινη φιάλη (5.10).

Σημείωση: Το διάλυμα του υπό δοκιμή δείγματος πρέπει να αποθηκεύεται σε 4 °C έως τη διενέργεια της ανάλυσης CLHP.

7.3. Προετοιμασία του εξωτερικού προτύπου διαλύματος

Ζυγίζονται 55,4 mg PEDP (4.1) σε ογκομετρικό χωνί 50 ml (5.6) και προστίθενται περίπου 25 ml χλωροφορμίου (4.2.2) χρησιμοποιώντας βαθμονομημένο κύλινδρο (5.11). Θερμαίνεται το ποματισμένο χωνί σε 50 °C και αναμειγνύεται προσεκτικά έως τη διάλυση των PEDP. Ψύχεται το χωνί σε 20 °C, συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1) και αναμειγνύεται με αναστροφή. Εγχύεται με πιπέτα 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού σε ογκομετρικό χωνί 100 ml (5.6) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Εγχύεται με πιπέτα 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού σε ογκομετρικό χωνί 10 ml (5.6), προστίθενται 100 μl (5.7) του διαλύματος τριπταμίνης 0,15 mM (7.1) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Αναμειγνύεται με αναστροφή.

Σημείωση: Το πρότυπο διάλυμα δείγματος πρέπει να αποθηκεύεται σε 4 °C μέχρι τη διενέργεια της ανάλυσης CLHP.

7.4. Προετοιμασία του αντιδραστηρίου σχηματισμού παραγώγων

Ζυγίζονται $25,0 \pm 0,1$ mg OPA (4.3.4) σε ογκομετρικό χωνί 10 ml (5.6), προστίθενται 0,5 ml (5.5) μεθανόλης (4.2.1) και αναμειγνύονται προσεκτικά για τη διάλυση της OPA. Συμπληρώνεται ως τη χαραγή με διάλυμα βορικού οξέος (4.3.2) και προστίθενται 20 μl 2-μερκαπτοαιθανόλης (4.3.3) με σύριγγα (5.7).

N.B.: Το αντιδραστήριο σχηματισμού παραγώγων πρέπει να αποθηκεύεται σε 4 °C σε σκοτεινή φιάλη και είναι σταθερό για μία εβδομάδα

- 7.5. Προσδιορισμός CLHP
7.5.1. Διαλύτες έκπλυσης (4.4)

Διαλύτης Α:

0,3 mM ορθοφωσφορικό μονονάτριο και 3 mM οξικό άλας (προσαρμοσμένα σε pH 6,5 με οξικό οξύ): μεθανόλη: τετραϋδροφουράνιο = 558: 440: 2.

Διαλύτης Β:

μεθανόλη

- 7.5.2. Προτεινόμενη βαθμονόμηση της έκπλυσης:

Χρόνος (ελάχ.)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)	Παροχή (ml/min)
Αρχικός	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: Η βαθμονόμηση της έκπλυσης είναι δυνατόν να απαιτεί ελαφρά τροποποίηση με σκοπό να επιτευχθεί το αποτέλεσμα που δεικνύεται στο σχήμα 1.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C

- 7.5.3. Όγκος έγχυσης: 50 μl του αντιδραστηρίου σχηματισμού παραγώνων και 50 μl του διαλύματος δείγματος
- 7.5.4. Εξισορρόπηση στήλης
Αρχίζοντας το σύστημα σε ημερήσια βάση, εκπλύεται η στήλη με 100 % διαλύτη Β για 15 λεπτά, στη συνέχεια τίθεται σε Α:Β = 40:60 και ισορροπεί σε 1 ml ανά λεπτό για 15 λεπτά. Πραγματοποιείται μία σειρά τυφλού διαλύματος με έγχυση μεθανόλης (4.2.1).
Σημείωση: Πριν από μακράς διάρκειας αποθήκευση υποβάλλετε σε έκπλυση τη στήλη με μεθανόλη: χλωροφόρμιο = 80: 20 (%) για 30 λεπτά.
- 7.5.5. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας PS και PE στο υπό δοκιμασία δείγμα
- 7.5.6. Πραγματοποιήσατε τη σειρά των χρωματογραφικών αναλύσεων κρατώντας σταθερό από σειρά σε σειρά το χρόνο με σκοπό να λάβετε σταθερούς χρόνους κατακράτησης. Εγχύσατε το εξωτερικό πρότυπο διάλυμα (7.3) κάθε 5 έως 10 διαλύματα του υπό δοκιμασία δείγματος με σκοπό να εκτιμήσετε τον παράγοντα αντίδρασης.
N.B.: Η στήλη πρέπει να καθαρίζεται με έκπλυση με 100 % διαλύτη Β (7.5.1) για τουλάχιστον 30 λεπτά κάθε 20 έως 25 σειρές.

- 7.6. Μέθοδος ολοκλήρωσης

- 7.6.1. Κορυφή PEDP

Το PEDP εγχύεται σε μία απλή κορυφή. Προσδιορίστε την περιοχή της κορυφής από καμπύλη σε καμπύλη ολοκλήρωσης.

- 7.6.2. Κορυφή τρυπταμίνης

Η τρυπταμίνη εγχύεται ως μονή κορυφή (σχήμα 1). Προσδιορίστε το εμβαδόν της κορυφής με από καμπύλη σε καμπύλη ολοκλήρωσης.

7.6.3. Ομάδες κορυφών PS και PE

Υπό τις περιγραφόμενες συνθήκες (σχήμα 1), η PS εγχύεται ως δύο βασικές μερικές άλυτες κορυφές των οποίων προηγείται μία ελάσσων κορυφή. Η PE εγχύεται ως τρεις βασικές μερικές άλυτες κορυφές. Προσδιορίστε το συνολικό εμβαδόν κάθε συγκέντρωσης κορυφών θέτοντας τη γραμμή βάσης όπως αναφέρεται στο σχήμα 1.

8. Υπολογισμός και έκφραση των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα PS και PE στο υπό διαδικασία δείγμα πρέπει να υπολογίζονται ως εξής:

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

όπου:

- C = περιεκτικότητα PS ή PE (mg/100 g σκόνης στο υπό δοκιμασία δείγμα)
 A₁ = εμβαδόν κορυφής PEDP του πρότυπου διαλύματος δείγματος (7.3)
 A₂ = εμβαδόν κορυφής PS ή PE του διαλύματος του υπό δοκιμασία δείγματος (7.2)
 T₁ = εμβαδόν κορυφής τρυπταμίνης του πρότυπου διαλύματος δείγματος (7.3)
 T₂ = εμβαδόν κορυφής τρυπταμίνης του διαλύματος του υπό δοκιμασία δείγματος (7.2).

9. ΔΙΕΥΚΡΙΝΗΣΗ

Σημείωση: Οι τιμές για την επαναληψιμότητα υπολογίστηκαν σύμφωνα με το IDF Διεθνές Πρότυπο ⁽¹⁾. Το προσωρινό όριο αναπαραγωγιμότητας υπολογίστηκε σύμφωνα με το παράρτημα III, σημείο β.

9.1. Επαναληψιμότητα

Η σχετική πρότυπη απόκλιση της επαναληψιμότητας, η οποία εκφράζει την ποικιλότητα των διαφόρων αναλυτικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τα ίδια όργανα υπό τις ίδιες συνθήκες επί του ίδιου υπό δοκιμασία δείγματος και εντός σύντομου παρεμβαλλόμενου διαστήματος χρόνου, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 2 %. Σε περίπτωση που δύο προσδιορισμοί προκύπτουν υπό αυτούς τους όρους, η σχετική διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 6 % του αριθμητικού μέσου των αποτελεσμάτων.

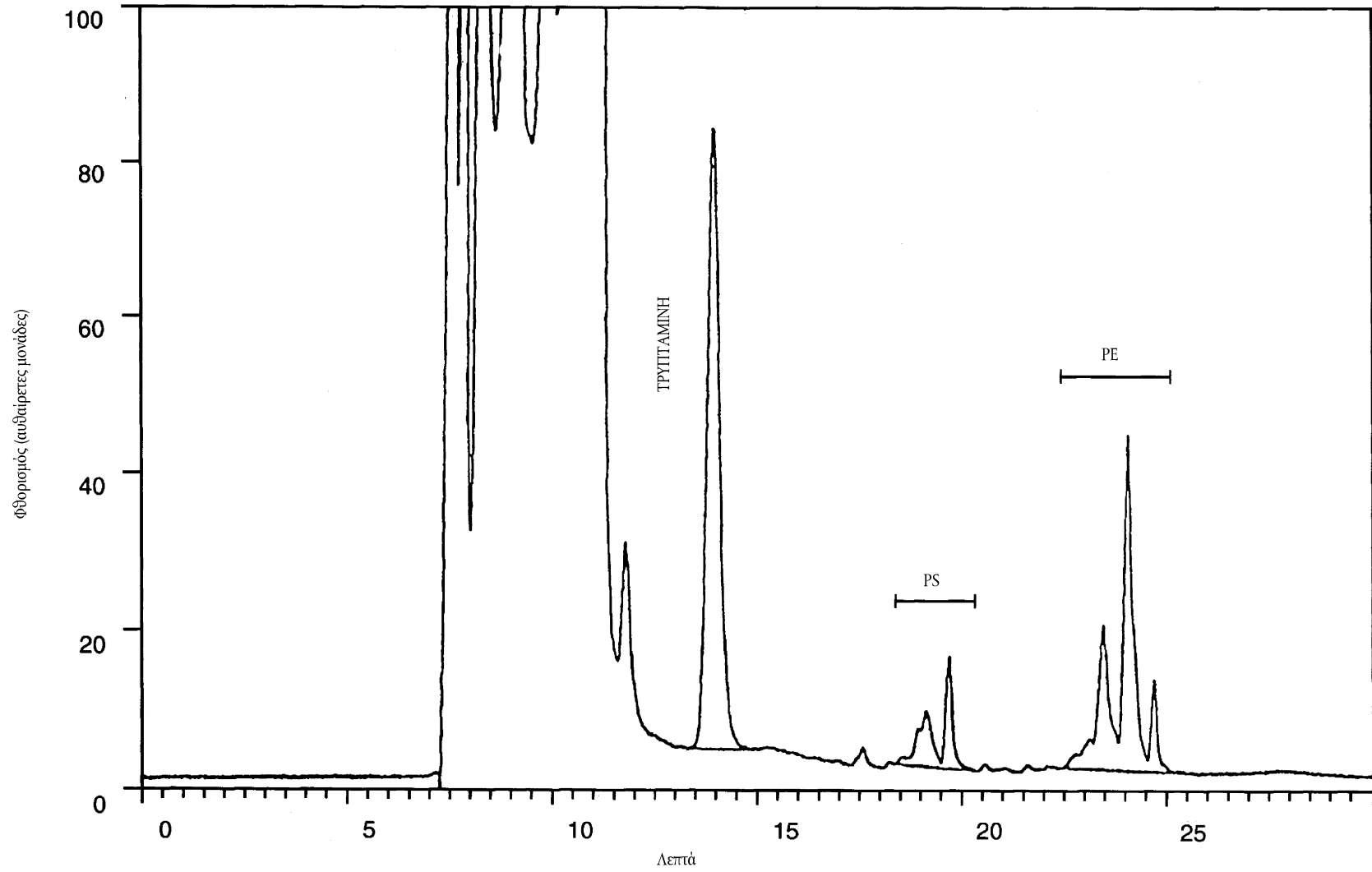
9.2. Αναπαραγωγιμότητα

Σε περίπτωση που δύο προσδιορισμοί προκύπτουν από δύο χειριστές σε διαφορετικά εργαστήρια χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα υπό διαφορετικές συνθήκες για την ανάλυση του ίδιου υπό δοκιμασία δείγματος, 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.), «Détection des solides du babeurre danw le lait écrémé en poudre par dosage des aminophospholipides á la CLHP», Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39, 395 (1988).

⁽¹⁾ International IDF-Standard 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure (περιγραφή συλλογικής διαδικασίας μελέτης).



Σχήμα 1: Σχεδιάγραμμα ΥΧΥΑ των παραγωγών ΟΡΑ φωσφατιδυλσερίνης (PS) και φωσφατιδυλαιθινολαμίνης (PE) σε εκχύλισμα ανασυσταθείσας σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος. Αναφέρεται ο τρόπος ολοκλήρωσης για τις κορυφές PS, PE και τρυπταμίνης (εργαστηριακό πρότυπο).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXI

(Άρθρο 15)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΗΣ/DAPSON ΣΕ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

Χρησιμοποιείται μία μικροβιακή ανασταλτική δοκιμή διαχωρισμού χρησιμοποιώντας *Bacillus stearotherophilus* var. *calidolactis* C953 ως μικρο-οργανισμό δοκιμής και η οποία είναι αρκετά ευαίσθητη για την ανίχνευση 4 µg βενζυλπενικιλίνης ανά λίτρο γάλακτος και 100 µg σουλφαδιμιδίνης ανά λίτρο γάλακτος. Υπάρχουν εμπορικά kit δοκιμών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εφόσον έχουν την απαραίτητη ευαισθησία για βενζυλπενικιλίνη και σουλφαδιμιδίνη⁽¹⁾.

Για τη δοκιμή, χρησιμοποιείται ανασυσταθέν αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη (1 g σκόνη + 9 ml απεσταγμένο ύδωρ). Η δοκιμή διενεργείται όπως περιγράφεται στο IDF (Δελτίο αριθ. 258/1991, τομέας 1, κεφάλαιο 2), ή σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή του δοκιμαστικού kit.

Τα θετικά αποτελέσματα ερμηνεύονται ως εξής:

1. Επαναλάβετε τη δοκιμή προσθέτοντας πενικιλινάση στο σύστημα δοκιμής:
Θετικό αποτέλεσμα: ανασταλτική ουσία δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με αυτή τη διαδικασία.
Αρνητικό αποτέλεσμα: ανασταλτική ουσία είναι αντιβιοτικό β-λακτάμη.
2. Επαναλάβετε τη δοκιμή προσθέτοντας π-αμινοβενζοϊκό οξύ στο σύστημα δοκιμής:
Θετικό αποτέλεσμα: ανασταλτική ουσία δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη διαδικασία αυτή.
Αρνητικό αποτέλεσμα: ανασταλτική ουσία είναι σουλφοναμίδη/dapson.
3. Επαναλάβετε τη δοκιμή προσθέτοντας πενικιλινάση + π-αμινοβενζοϊκό οξύ στο σύστημα δοκιμής:
Θετικό αποτέλεσμα: ανασταλτική ουσία δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη διαδικασία αυτή.
Αρνητικό αποτέλεσμα: ανασταλτικές ουσίες είναι αντιβιοτικό β-λακτάμη και σουλφοναμίδη/dapson.

⁽¹⁾ Σημαντική σημείωση: είναι δυνατόν να προκύψουν λανθασμένα θετικά αποτελέσματα, όταν αναλύεται αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να εξακριβώνεται ότι το σύστημα δοκιμής που χρησιμοποιείται δεν παράγει λανθασμένα θετικά αποτελέσματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXII

(Άρθρο 16)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΤΑΙ ΣΤΙΣ ΣΥΝΘΕΤΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΠΗΞΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΤΥΡΙΝΗΣ (ΠΑΡΑΚΑΖΕΪΝΗΣ)**1. Αντικείμενο**

Προσδιορισμός της ποσότητας του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη που περιέχεται στις σύνθετες ζωοτροφές με ενζυματική θρόμβωση της παρακαζεΐνης.

2. Πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στις σύνθετες ζωοτροφές που περιέχουν τουλάχιστον 10 % αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη. Η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων αποβουτυρωμένου γάλακτος (babeurre) ή/και ορισμένων μη γαλακτικών πρωτεϊνών δύναται να προκαλέσει αλλοίωση των αποτελεσμάτων.

3. Αρχή της μεθόδου

- 3.1. Διάλυση της τυρίνης που περιέχεται στη σύνθετη ζωοτροφή δι' εκχύλισης με διάλυμα κιτρικού νατρίου.
- 3.2. Επαναφορά της συγκεντρώσεως ιόντων ασβεστίου που είναι αναγκαία για την καταβύθιση της παρακαζεΐνης. Μετατροπή, διά πυτίας, της τυρίνης σε παρακαζεΐνη.
- 3.3. Προσδιορισμός του αζώτου της παρακαζεΐνης κατόπιν εξαλατώσεως κατά τη μέθοδο Kjeldahl, που αναφέρεται «στην προδιαγραφή IDF 20A 1986» υπολογισμός της ποσότητας του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη βάσει της ελαχίστης περιεκτικότητας σε τυρίνη 27,5 % (βλέπε σημείο 9.1).

4. Αντιδραστήρια

Τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια πρέπει να παρουσιάζουν τον απαιτούμενο βαθμό καθαρότητας για τους σκοπούς της ανάλυσης. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή να παρουσιάζει ανάλογο βαθμό καθαρότητας. Εξαιρέσει της πυτίας (σημείο 4.5), όλα τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και τα διαλύματα πρέπει να είναι απαλλαγμένα αζωτούχων ουσιών.

- 4.1. Δίυδρο κιτρικό τρινάτριο (διάλυμα 1 % p/v).
- 4.2. Αντικαταστείτε από χλωριούχο ασβέστιο (διάλυμα 2M). Βάρος 20,018 g ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3) (αναλυτικού βαθμού) σε κάψα πορσελάνης κατάλληλου μεγέθους (150-200 ml) ή σε ποτήρι ζέσεως. Συμπληρώστε με αποσταγμένο νερό και μεταφέρετε σε ζέον υδατόλουτρο. Προσθέστε 50-60 ml διαλύματος HCl (πυκνό HCl: νερό = 1:1) μέχρι να διαλυθεί πλήρως το ανθρακικό. Διατηρείστε σε ζέον υδατόλουτρο μέχρι ξηρού το CaCl_2 και μέχρι τελείας αποβολής του υδροχλωρίου (HCl) που δεν έχει αντιδράσει. Μεταφέρετε με αποσταγμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνετε μέχρι τη χαραγή. Ελέγχετε την τιμή pH η οποία δεν πρέπει να είναι κατώτερη από 4,0. Διατηρείστε το διάλυμα σε ψυγείο.
- 4.3. Υδροξείδιο του νατρίου 0,1 N.
- 4.4. Χλωρικό οξύ 0,1 N.
- 4.5. 1: 10 000 πρότυπο διάλυμα πυτίας (εκχύλισμα τετάρτου στομάχου μόσχων), διατηρούμενο εντός ψυγείου στους 4-6 °C.
- 4.6. Αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό του αζώτου κατά τη μέθοδο Kjeldahl που αναφέρεται στην προδιαγραφή IDF 20A 1986.

5. Όργανα

Συνήθη όργανα εργαστηρίου. Ειδικότερα τα εξής:

- 5.1. Ιγδίο ή μύλος ομογενοποίησης.
- 5.2. Ζυγός ανάλυσεως.
- 5.3. Επιτραπέζιος συσκευή φυγοκεντρήσεως (2 000-3 000 στροφές/λεπτό) εφοδιασμένες με σωλήνες φυγοκεντρήσεως των 50 ml.
- 5.4. Μαγνητικός αναδευτήρας με ράβδους των 10-15 mm.
- 5.5. Ποτήρια ζέσεως των 150-200 ml.
- 5.6. Φιάλες αποστάξεως 250 ml και 500 ml.
- 5.7. Γυάλινες χοάνες διαμέτρου 60 έως 80 mm.
- 5.8. Ηθμοί ταχείας διηθήσεως κυκλικής διανομής απαλλαγμένοι τέφρας, διαμέτρου 150 mm (S.S.589² S.S. 595 1/2).
- 5.9. Σιφόνια διαφόρων μεγεθών.

- 5.10. Υδρόλουτρο με θερμοστατική ρύθμιση στους 37 °C.
- 5.11. Συσκευή μετρήσεως pH.
- 5.12. Συσκευή εξαλατώσεως και αποστάξεως για τη μέθοδο Kjeldahl με τα αντίστοιχα εξαρτήματα.
- 5.13. Βαθμολογημένη προχοίδα των 25 ml για τιτλοδότηση.
- 5.14. Πλαστική φιάλη για το απεσταγμένο νερό.
- 5.15. Σπάτουλα αναδέυσεως από ανοξείδωτο χάλυβα.
- 5.16. Θερμόμετρο.
- 5.17. Πυριατήριο με θερμοστατική ρύθμιση της θερμοκρασίας.

6. Τρόπος εργασίας

- 6.1. Προετοιμασία του δείγματος.
10-20 g του δείγματος συνθλίβονται σε ιγδίο ή σε συσκευή ομογενοποίησης, ώστε να ληφθεί ομογενές μείγμα.
- 6.2. Η σκόνη γάλακτος διαλύεται και διαχωρίζεται το αδιάλυτο υπόλειμμα.
 - 6.2.1. Ζυγίζονται $1,000 \pm 0,002$ g της ομογενοποιημένης συνθέτου ζωτροφής (σημείο 6.1) απευθείας σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml. Προστίθενται 30 ml διαλύματος κιτρικού τρινατρίου (σημείο 4.1), κατόπιν προθερμάνσεως στους 45 °C. Η σκόνη διαλύεται δι' αναδέυσεως επί 5 λεπτά με τον μαγνητικό αναδευτήρα.
 - 6.2.2. Το διάλυμα φυγοκεντρείται επί 10 λεπτά στα 500 g (2 000-3 000 στροφές/λεπτό) και η υπερκείμενη υδατική στοιβάδα μεταγγίζεται σε ποτήριο ζέσεως των 150-200 ml. Λαμβάνεται μέριμα ώστε να αποφευχθεί η απώλεια των αδιαλύτων μερών κατά τη μετάγγιση.
 - 6.2.3. Κατά τον αυτόν τρόπο λαμβάνονται δύο ακόμη εκχυλίσματα του υπολείμματος. Τα τρία ληφθέντα εκχυλίσματα αναμειγνύονται.
 - 6.2.4. Στην περίπτωση αποχωρισμού του λίπους το εκχύλισμα ψύχεται μέχρι στερεοποίησης της λιπαρής φάσεως, η οποία ακολούθως αφαιρείται με τη βοήθεια σπάτουλας.
- 6.3. Προκαλείται πήξη της τυρίνης με τη βοήθεια των ενζύμων της πυτίας.
 - 6.3.1. Στο αναδευόμενο ολικό υδατικό εκχύλισμα (περίπου 100 ml) προστίθεται υπό μορφή σταγόνων 3,4 ml κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (σημείο 4.2). Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6,4-6,5 με τη βοήθεια αραιού διαλύματος NaOH (σημείο 4.3) ή HCl (σημείο 4.4). Το εκχύλισμα εισάγεται σε υδρόλουτρο με θερμοστατική ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 37 °C, επί 15 ως 20 λεπτά, μέχρι αποκαταστάσεως της ισορροπίας του άλατος. Αυτό διαπιστώνεται από τη γαλακτώδη όψη που αποκτά το εκχύλισμα.
 - 6.3.2. Μεταφέρετε το υγρό σε ένα (ή δύο) φυγοκεντρικούς σωλήνες και φυγοκεντρίτε σε 2 000 g για 10 λεπτά για να απομακρυνθεί το ίζημα. Μεταφέρετε το υπερκείμενο υγρό δίχως να αποπλυθεί το ίζημα σε ένα (ή δύο) φυγοκεντρικούς σωλήνες.
 - 6.3.3. Επαναφέρετε τη θερμοκρασία του υπερκείμενου υγρού σε 37 °C. Αναδύοντας το εκχύλισμα, προσθέστε, στάγδην, 0,5 ml του ενζυματικού υγρού (πυτία) (σημείο 4.5). Η πήξη επιτυγχάνεται σε ένα ή δύο λεπτά.
 - 6.3.4. Επαναφέρετε το δείγμα στο υδατόλουτρο και το αφήνετε σε θερμοκρασία 37 °C για 15 λεπτά. Αφαιρείτε το δείγμα από το υδατόλουτρο και διασπάτε το πήγμα με ανάδευση. Φυγοκεντρίτε σε 2 000 g για 10 λεπτά. Διηθείτε το υπερκείμενο υγρό με κατάλληλο διηθητικό χαρτί⁽¹⁾, whatman αριθ. 541 ή παρόμοιο και φυλάσσετε το διηθητικό χαρτί. Πλένετε το ίζημα σε φυγοκεντρικό σωλήνα με νερό 50 ml σε 35 °C περίπου, αναδύοντας το ίζημα.

Φυγοκεντρίτε πάλι σε 2 000 g για 10 λεπτά. Διηθείτε το υπερκείμενο υγρό με το διηθητικό χαρτί που φυλάξατε προηγουμένως.
- 6.4. Προσδιορισμοί των αζώτων της τυρίνης.
 - 6.4.1. Μετά από την πλήρη διήθηση, ο ηθμός εισάγεται στη φιάλη Kjeldahl και προσδιορίζεται το άζωτο κατά τη μέθοδο Kjeldahl, που αναφέρεται στην προδιαγραφή IDF 20A 1986.

7. Τυφλό πείραμα

- 7.1. Διεξάγεται τυφλό πείραμα κατά τρόπο συστηματικό με τη βοήθεια ηθμού απαλλαγμένου τέφρας (σημείο 5.8), εμποτισμένου σε μείγμα 90 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου (σημείο 4.1), 1 ml κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (σημείο 4.2), 0,5 ml υγρής πυτίας (σημείο 4.5) και εκτελουμένου με 3×15 ml νερού πριν από την εξαλάτωση κατά τη μέθοδο Kjeldahl, που αναφέρεται στην προδιαγραφή IDF 20A 1986.
- 7.2. Ο όγκος του οξέος (σημείο 4.4) που απαιτείται για τη διεξαγωγή του τυφλού πειράματος αφαιρείται από τον όγκο του οξέος, που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση του προτύπου δείγματος.

⁽¹⁾ Πρέπει να χρησιμοποιείται σταθμικό χαρτί ταχείας διήθησης.

8. Δοκιμή ελέγχου

- 8.1. Για τον έλεγχο της αναλυτικής μεθόδου και των αναφερθέντων αντιδραστηρίων, διενεργείται ο προσδιορισμός μιας προτύπου ζωοτροφής, της οποίας η γνωστή περιεκτικότητα σε αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη έχει προσδιορισθεί με τη βοήθεια κυκλικής ανάλυσης. Η μέση τιμή που προκύπτει από τον διπλό προσδιορισμό, δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από 1 % από την τιμή που προκύπτει από την κυκλική ανάλυση.

9. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

- 9.1. Η περιεκτικότητα επί τοις εκατό της σύνθεσης ζωοτροφής σε αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ MMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) 2,81}{0,908}$$

όπου N είναι το ποσοστό του αζώτου της παρακαζείνης, 27,5 ο συντελεστής μετατροπής της καζείνης σε ποσοστό επί τοις εκατό του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη, 2,81 και 0,908 είναι οι συντελεστές διόρθωσης που λαμβάνονται από την καμπύλη παλινδρόμησης.

10. Ακρίβεια της μεθόδου**10.1. Επαναληψιμότητα**

Σε 95 % τουλάχιστον των εξεταζομένων περιπτώσεων, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων, που λαμβάνονται από την ανάλυση του ίδιου δείγματος, στο ίδιο εργαστήριο και από τον ίδιο ερευνητή, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2,3 g αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη ανά 100 g της εξεταζομένης συνθέτου ζωοτροφής.

10.2. Αναπαραγωγιμότητα

Σε 95 % τουλάχιστον των εξεταζομένων περιπτώσεων, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων, που λαμβάνονται από την ανάλυση ενός παρομοίου δείγματος σε δύο διαφορετικά εργαστήρια, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 6,5 g αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη ανά 100 g εξεταζομένης συνθέτου ζωοτροφής.

11. Όριο ανοχής

Η τιμή CrD₉₅ (κρίσιμη διαφορά· όριο αξιοπιστίας 95 %) υπολογίζεται με τη χρησιμοποίηση του τύπου (ISO 5725):

$$\text{CrD}_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 + r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

(R: αναπαραγωγιμότητα r: επαναληπτικότητα)

Διπλός προσδιορισμός: CrD₉₅ = 4,5 g

Όταν το αποτέλεσμα της χημικής ανάλυσης διαφέρει από τη δηλωθείσα περιεκτικότητα σε αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη όχι περισσότερο από 4,5 g (διπλός προσδιορισμός), η αποστολή των σύνθετων ζωοτροφών θεωρείται ότι είναι σύμφωνη με αυτήν τη διάταξη του κανονισμού.

12. Παρατηρήσεις

- 12.1. Η πρόσθεση σημαντικών ποσοτήτων ορισμένων μη γαλακτικών πρωτεϊνών, ιδίως των προερχομένων από σόγια, όταν έχουν θερμανθεί μαζί με το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερες τιμές, λόγω της συγκαθίζσεως των πρωτεϊνών αυτών με την παρακαζείνη του γάλακτος.
- 12.2. Η πρόσθεση αποβουτυρωμένου γάλακτος δύναται ενδεχομένως να οδηγήσει σε πολύ χαμηλές τιμές, επειδή ο προσδιορισμός πραγματοποιείται επί του εκχυλίσματος που είναι απαλλαγμένο λίπους. Η πρόσθεση ορισμένων ειδών αποβουτυρωμένου γάλακτος λαμβανομένων από όξινη κρέμα δύναται να οδηγήσει σε αισθητά χαμηλότερες τιμές, επειδή δεν είναι πλήρως διαλυτά στο κιτρικό διάλυμα.
- 12.3. Η πρόσθεση 0,5 % τουλάχιστον λικιθίνης δύναται επίσης να οδηγήσει σε μικρότερες τιμές.
- 12.4. Η ενσωμάτωση σκόνης γάλακτος που έχει θερμανθεί σε υψηλή θερμοκρασία (high-heat) δύναται να οδηγήσει σε τιμές πολύ υψηλές, λόγω της συγκαθίζσεως ορισμένων πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος με την παρακαζείνη του γάλακτος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXIII

(Άρθρο 17)

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΟΥ ΣΤΟ ΑΠΟΒΟΥΤΥΡΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ, ΜΕΤΟΥΣΙΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ**1. Πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στην ανίχνευση του αμύλου που χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης σε μετουσιωμένο γάλα σε σκόνη. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι περίπου 0,05 g αμύλου ανά 100 g δείγματος.

2. Στοιχεία

Η αντίδραση βασίζεται στην αντίδραση που χρησιμοποιείται στην ιωδιομετρία:

- δέσμευση από τα κολλοειδή σωματίδια ιωδίου σε υδατικό διάλυμα,
- απορρόφηση από τα κολλοειδή συσσωματώματα αμύλου και με χρωματισμό.

3. Αντιδραστήρια**3.1. Διάλυμα ιωδίου**

- ιώδιο: 1 g,
- ιωδιούχο νάτριο: 2 g,
- απεσταγμένο ύδωρ: 100 ml.

4. Όργανα

- 4.1. Αναλυτικός ζυγός
- 4.2. Λουτρό ύδατος
- 4.3. Δοκιμαστικοί σωλήνες, 25 mm × 200 mm

5. Διαδικασία

Ζυγίζουμε 1 g του δείγματος και το μεταφέρουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα (σημείο 4.3).

Προσθέτουμε 20 ml απεσταγμένου ύδατος και ανακινούμε προκειμένου να διασπαρεί το δείγμα.

Το τοποθετούμε στο λουτρό ύδατος που βράζει (σημείο 4.2) και το αφήνουμε 5 λεπτά της ώρας.

Το βγάζουμε από το λουτρό και το ψύχουμε σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθέτουμε 0,5 ml διαλύματος ιωδίου (σημείο 3.1), ανακινούμε και παρατηρούμε το χρώμα που εμφανίζεται.

6. Διατύπωση των αποτελεσμάτων

Ο κυανός χρωματισμός δείχνει την παρουσία φυσικού αμύλου στο δείγμα.

Όταν το δείγμα περιέχει τροποποιημένο άμυλο τότε το χρώμα μπορεί να μην είναι κυανούν.

7. Παρατηρήσεις

Το χρώμα, η ένταση του χρώματος και η μικροσκοπική εμφάνιση του αμύλου θα ποικίλλουν ανάλογα με την προέλευση του φυσικού αμύλου (π.χ. αραβόσιτος ή γεώμηλα) και το είδος του τροποποιημένου αμύλου που περιέχεται στο δείγμα.

Παρουσία τροποποιημένων αμύλων το παραγόμενο χρώμα γίνεται ιώδες, ερυθρό ή φαιό, ανάλογα με το βαθμό τροποποίησης της κρυσταλλικής δομής του φυσικού αμύλου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXIV

(Άρθρο 18)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΟΞΙΝΟ ΒΟΥΤΥΡΟΓΑΛΑΚΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

1. Θέμα

Ο προσδιορισμός της υγρασίας του όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη που προορίζεται για τη διατροφή των ζώων.

2. Γενική αρχή

Το δείγμα υφίσταται ξήρανση εν κενώ. Η απώλεια βάρους προσδιορίζεται με ζύγιση.

3. Συσκευές

3.1. Αναλυτικός ζυγός.

3.2. Στεγνά μεταλλικά δοχεία που αντέχουν στην οξείδωση ή δοχεία από γυαλί με πώματα που κλείνουν ερμητικά· χρήσιμη επιφάνεια που επιτρέπει την κατανομή του δείγματος σε 0,3 g/cm².

3.3. Ρυθμιζόμενος ηλεκτρικός κλίβανος κενού με ελαιοαντλία και με μηχανισμό εισαγωγής ξηρού και ζεστού αέρα ή αφυδατικού μέσου (για παράδειγμα: οξείδιο του ασβεστίου).

3.4. Ξηραντήρας που περιέχει δραστικό αφυδατικό μέσο.

3.5. Ξηραντήρας με αερισμό ελεγχόμενης θερμοκρασίας, με ρύθμιση θερμοκρασίας σε 102 ± 2 °C.

4. Διαδικασία

Θερμαίνεται δοχείο (σημείο 3.2) με το πώμα του στον ξηραντήρα (σημείο 3.5) επί μία ώρα τουλάχιστον. Τοποθετείται το πώμα στο δοχείο, μεταφέρεται αμέσως το δοχείο σε ξηραντήρα (σημείο 3.4), αφήνεται να κρυώσει έως τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και ζυγίζεται με προσέγγιση 0,5 mg.

Ζυγίζεται, με προσέγγιση 0,5 mg, δοχείο (σημείο 3.2) με το πώμα του. Ζυγίζεται, με προσέγγιση 1 mg, στο δοχείο που έχει ζυγιστεί, που έχει περίπου 5 g του δείγματος και κατανέμεται ενιαία. Τοποθετείται το δοχείο χωρίς το πώμα του στον κλίβανο κενού (σημείο 3.3) ο οποίος έχει θερμανθεί προηγουμένως σε 83 °C. Για να μην κατεβεί πολύ η θερμοκρασία του κλιβάνου πρέπει να εισαχθεί το δοχείο το συντομότερο δυνατό.

Δημιουργείται πίεση 100 Torr (13,3 kPa) και αφήνεται να ξηρανθεί στην πίεση αυτή επί τέσσερις ώρες, είτε με ρεύμα ζεστού και ξηρού αέρος, είτε με την βοήθεια αφυδατικού μέσου (περίπου 300 g για 20 δείγματα). Στην τελευταία αυτή περίπτωση, σταματάει η σύνδεση με την αντλία κενού όταν επιτευχθεί η προαναφερόμενη πίεση. Υπολογίζεται η διάρκεια της ξήρανσης από τη στιγμή που η θερμοκρασία του κλιβάνου φθάσει τους 83 °C. Επαναφέρουμε στη συνέχεια με προσοχή τον κλίβανο στην ατμοσφαιρική πίεση. Ανοίγεται ο κλίβανος, τοποθετείται αμέσως το πώμα στο δοχείο, αποσύρεται το δοχείο από τον κλίβανο, αφήνεται να κρυώσει επί 30 έως 45 λεπτά στον ξηραντήρα (σημείο 3.4) και ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg. Υποβάλλεται σε συμπληρωματική ξήρανση 30 λεπτών στον κλίβανο κενού (σημείο 3.3), σε θερμοκρασία 83 °C και ζυγίζεται εκ νέου. Η διαφορά μεταξύ των δύο ζυγισμάτων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % υγρασίας.

5. Τρόπος υπολογισμού

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

όπου:

E = αρχική μάζα, σε γραμμάρια του δείγματος,

m = μάζα, σε γραμμάρια, του ξηρού δείγματος.

6. Ακρίβεια

6.1. Όριο επαναληπτικότητας

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά ο ένας από τον άλλο, από αναλυτή που χρησιμοποιεί τις ίδιες συσκευές σε παρόμοιο υλικό δοκιμής, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,4 g νερού ανά 100 g όξινου βουτυρογάλακτος σε σκόνη.

6.2. Όριο αναπαραγωγιμότητας

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται από αναλυτές σε διαφορετικά εργαστήρια, οι οποίοι χρησιμοποιούν διαφορετικές συσκευές σε παρόμοιο υλικό δοκιμής, δεν πρέπει να υπερβαίνει 0,6 g νερού ανά 100 g ξένου βουτυρογάλακτος σε σκόνη.

6.3. Πηγή των δεδομένων ακριβείας

Τα δεδομένα ακριβείας προσδιορίζονται από πείραμα που πραγματοποιήθηκε το 1995 σε οκτώ εργαστήρια και αφορούσε δώδεκα δείγματα (έξι σε διπλό τυφλό προσδιορισμό).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXV

(Άρθρο 19)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΞΕΝΩΝ ΛΙΠΩΝ ΣΕ ΛΙΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ**1. Εύρος και πεδίο εφαρμογής**

Το πρότυπο αυτό θεσπίζει μέθοδο για την ανίχνευση ξένων λιπών, τόσο φυτικών όσο και ζωικών όπως το βόειο λίπος και το χοίρειο λίπος, σε λίπος γάλακτος και γαλακτοκομικά προϊόντα χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφική ανάλυση τριγλυκεριδίων.

Χρησιμοποιώντας καθορισμένους τύπους τριγλυκεριδίων, τα φυτικά και ζωικά λίπη ανιχνεύονται ποιοτικά και ποσοτικά σε καθαρό λίπος γάλακτος άσχετα με τις συνθήκες διατροφής ή γαλουχίας.

Σημείωση 1: Αν και το βουτυρικό οξύ (C4) που συναντάται αποκλειστικά στο λίπος του γάλακτος παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης ποσοτικών εκτιμήσεων μικρών έως μέσων ποσοτήτων λιπών γάλακτος σε φυτικά λίπη, πολύ δύσκολα μπορούν να ληφθούν ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες σε περιπτώσεις προσθήκης μέχρι τουλάχιστον 20 % (κ.β.) ξένου λιπών σε καθαρό λίπος γάλακτος λόγω της μεγάλης διακύμανσης στην περιεκτικότητα του λιπών γάλακτος σε C4 που κυμαίνεται περίπου από 3,5 έως 4,5 % (κ.β.).

Σημείωση 2: Ποσοτικά αποτελέσματα μπορούν στην πράξη να ληφθούν μόνον σε αναλύσεις τριγλυκεριδίων, διότι η περιεκτικότητα των φυτικών λιπών σε στερόλες είναι διαφορετική εξαρτώμενη από τις συνθήκες παραγωγής και κατεργασίας.

2. Σημείωση

Ξένα λίπη σε λίπος γάλακτος: τα ξένα λίπη όπως ορίζονται στο πρότυπο αυτό είναι όλα τα φυτικά και ζωικά λίπη εκτός από το λίπος του γάλακτος.

3. Αρχή της μεθόδου

Μετά από εκχύλιση του λιπών γάλακτος παρασκευάζεται ένα προς ανάλυση διάλυμα. Από το διάλυμα αυτό, τα τριγλυκερίδια (ολικού αριθμού ατόμων άνθρακα) προσδιορίζονται αεροχρωματογραφικά σε (συμβατικές) στήλες. Εισάγοντας το % βάρος των διαφόρων μεγεθών μορίων λιπών (C24 — C54 — μόνον ζυγοί αριθμοί) στον τριγλυκεριδικό τύπο, προσδιορίζονται ποσοτικά ή ανιχνεύονται ποιοτικά τα ξένα λίπη.

Σημείωση: Τηρώντας την αξιολόγηση που περιγράφεται στο παρόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και τριχοειδής αέρια χρωματογραφία, εάν διασφαλίζεται ότι επιτυγχάνονται συγκρίσιμα αποτελέσματα (1).

4. Αντιδραστήρια

Πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας.

- 4.1. Φέρον αέριο: άζωτο, βαθμός καθαρότητας $\geq 99,996\%$.
- 4.2. Πρότυπα τριγλυκερίδια (2), κορεσμένα, όπως επίσης και χοληστερόλη για την τυποποίηση προτύπου λιπών γάλακτος σύμφωνα με το 6.5.4.
- 4.3. Μεθανόλη, απηλλαγμένη νερού.
- 4.4. n-Εξάνιο.
- 4.5. n-Επτάνιο.
- 4.6. Τολουόλιο.
- 4.7. Διάλυμα διμεθυλοχλωροσιλανίου: 50 ml διμεθυλοχλωροσιλανίου διαλύονται σε 283 ml τολουολίου.
- 4.8. Αέριο καύσεως: υδρογόνο και συνθετικός αέρας.
- 4.9. Στατική φάση, 3 % OV-1 GasChromQ (3) 125/150 μm (100/120 mesh).
- 4.10. Διάλυμα βουτύρου κακάο 10 %.

5. Όργανα

Συνήθεις εργαστηριακές συσκευές και ιδιαίτερα τα ακόλουθα:

- 5.1. Αέριος χρωματογράφος υψηλών θερμοκρασιών κατάλληλος για θερμοκρασίες τουλάχιστον 400-450 °C, εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) και διάταξη ελέγχου ροής σταθερής μάζας για το φέρον αέριο. Αέριο καύσεως: 30 ml/min H₂, 270 ml/min συνθετικός αέρας.

(1) Κατάλληλες μέθοδοι έχουν ήδη περιγραφεί, βλέπε D. Precht και J. Molkentin: Quantitative triglycerid analysis using short capillary columns, Chrompack News 416-17 (1993).

(2) Κατάλληλα προϊόντα υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο.

(3) Κατάλληλα προϊόντα διαθέσιμα στο εμπόριο είναι π.χ. τα με τις εμπορικές ονομασίες Extrelut, Gas ChromQ, Chrompack. Οι πληροφορίες αυτές αποσκοπούν στο να δώσουν τη δυνατότητα εύκολου χειρισμού του προτύπου από τον χρήστη και δεν αποτελούν απαίτηση του προϊόντος. Η ένδειξη της κοκκομετρικής σύστασης εκφράστηκε στη μονάδα μm του SI σύμφωνα με το BS 410:1988 «British Standard Specification for test sieves».

Λόγω του υψηλού βαθμού ροής του φέροντος αερίου, το ακροφύσιο πρέπει να είναι ιδιαίτερα ευρύ.

Σημείωση: Λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που παρατηρούνται κατά την ανάλυση των τριγλυκεριδίων, τα γυάλινα μέρη στο FID ή στο σύστημα εγχύσεως πρέπει να καθαρίζονται συχνά.

Ο αέριος χρωματογράφος πρέπει να είναι εφοδιασμένος με διαφράγματα (serta) ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες, που μπορεί να χρησιμοποιούνται συχνά και που εμφανίζουν πολύ χαμηλό βαθμό «διαρροής».

Σημείωση: Κατάλληλα είναι τα διαφράγματα Chromblue™ (Chrompack).

Τα διαφράγματα πρέπει να αλλάζονται σε τακτικά διαστήματα, π.χ. μετά από 100 περίπου ενέσεις ή ευθύς ως αρχίσει να φθίνει η αναλυτική ικανότητα (βλέπε εικόνα 4).

5.2. Χρωματογραφική στήλη

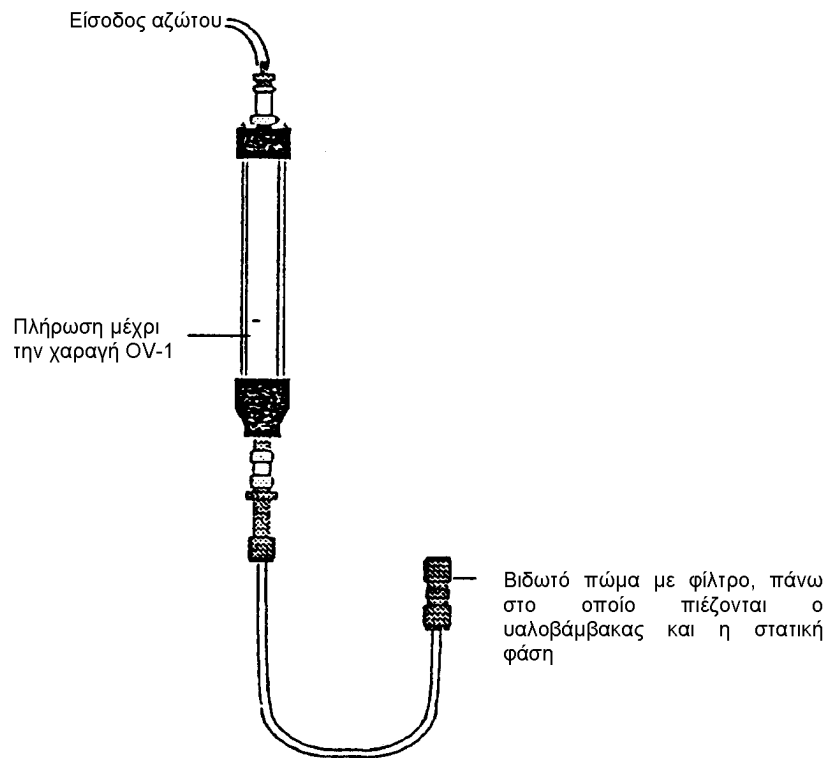
Υάλινη στήλη σχήματος U (εσωτερική διάμετρος 2 mm, μήκος 50 cm), η οποία καταρχήν υποβάλλεται σε κατεργασία με σιλάνιο (σιλάνωση) σύμφωνα με το 6.1 διμεθυλοχλωροσιλάνιο για την απενεργοποίηση της υάλινης επιφάνειας.

Σημείωση: Κατάλληλες είναι επίσης και κάπως μεγαλύτερου μήκους (800-2000 mm) συμβατικές στήλες. Με αυτές, μπορεί να επιτευχθεί μία ελαφρώς καλύτερη αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Από την άλλη μεριά, στατική φάση εμφανίζει περιοδικώς σπασίματα μετά τη λειτουργία, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν, με τη σειρά τους, σε επιδείνωση των ποσοτικών αποτελεσμάτων. Περαιτέρω, η φλόγα του FID σβήνει εύκολα λόγω της απαιτούμενης εξαιρετικά υψηλής ροής φέροντος αερίου από 75-85 ml/min.

5.3. Διάταξη για την πλήρωση της στήλης (βλέπε εικόνα 1).

Εικόνα 1

Πλήρωση της στήλης



Υάλινη στήλη προς πλήρωση

- 5.3.1. Πλαστική στήλη με βιδωτά στα άκρα πώματα, φέρουσα χαραγή μέχρι την οποία μπορεί να φθάσει η απαιτούμενη ποσότητα στατικής φάσης.
- 5.3.2. Λεπτό πλέγμα (mesh περίπου 100 μm) με βιδωτό πώμα, κατάλληλο για την σφράγιση της υάλινης στήλης σύμφωνα με την εικόνα 1.
- 5.3.3. Απενεργοποιημένος, επεξεργασμένος με σιλάνιο υαλοβάμβακας.
- 5.3.4. Δονητής για την ομοιόμορφη κατανομή της στατικής φάσης κατά την πλήρωση.
- 5.4. Στήλη Extrelut⁽¹⁾ 1-3 ml με silica gel. Η στήλη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικώς για την εκχύλιση λίπης γάλακτος.

(¹) Βλέπε υποσημείωση 3 στην σελίδα 86.

- 5.5. Σφράγιση από γραφίτη 6,4 mm (1/4") με σπή 6 mm.
- 5.6. Διατάξεις για τη επεξεργασία με σιλάνιο της υάλινης επιφάνειας της στήλης σύμφωνα με το 6.1.
 - 5.6.1. Φιάλη Woulff.
 - 5.6.2. Αντλία αναρρόφησης νερού.
- 5.7. Υδρόλουτρο, δυνάμενο να ρυθμίζεται στους 50 (\pm 2) °C.
- 5.8. Θάλαμος ξηράνσεως, δυνάμενος να ρυθμίζεται στους 50 (\pm 2) °C και 100 (\pm 2) °C.
- 5.9. Μικρομετρικό σιφόνιο.
- 5.10. Βαθμονομημένο σιφόνιο των 5 ml για την δοσομετρική παροχή 1,5 ml μεθανόλης.
- 5.11. Φιάλη των 50 ml με στρογγυλό πυθμένα.
- 5.12. Φιάλη Erlenmeyer, ονομαστικού όγκου 50 ml.
- 5.13. Χοάνη.
- 5.14. Λεπτόπορο φίλτρο.
- 5.15. Περιστροφικός εξατμιστήρας.
- 5.16. Φύσιγγες, ονομαστικού όγκου 1 ml, που σφραγίζονται με πώμα αλουμινίου, με διάφραγμα στο εσωτερικό τους.
- 5.17. Σύριγγα εγχύσεως, το έμβολο της χρησιμοποιούμενης σύριγγας δεν πρέπει να φθάνει στο άκρο της βελόνας.

Σημείωση: Με τις σύριγγες αυτές επιτυγχάνεται καλύτερη αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων.

Για την αποφυγή φθοράς του διαφράγματος, η άκρη της βελόνας θα πρέπει να ελέγχεται σε τακτά χρονικά διαστήματα (παραδείγματος χάρι, με ένα στερεομικροσκόπιο).

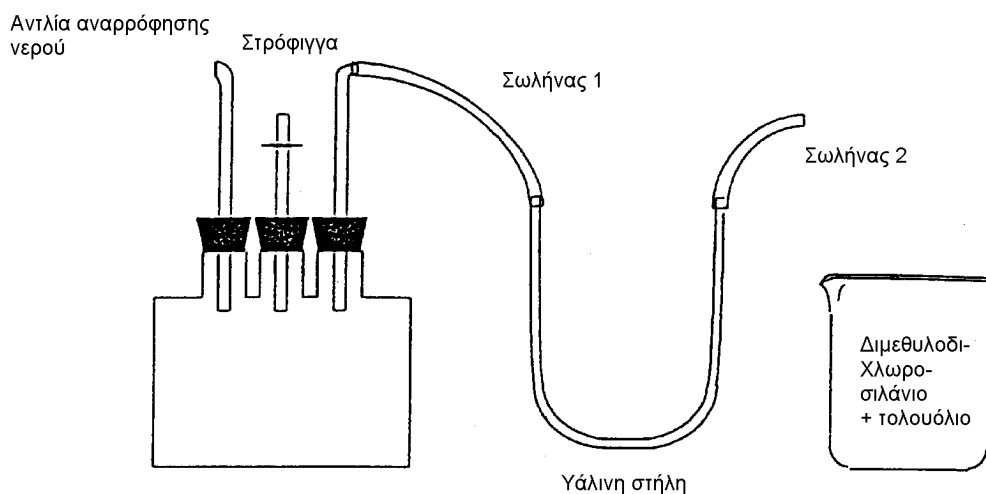
6. Διαδικασία

- 6.1. Προετοιμασία της στήλης (κατεργασία με σιλάνιο):

Μετά τη σύνδεση της φιάλης Woulff, όπως φαίνεται στην εικόνα 2, με την αντλία αναρρόφησης νερού ο σωλήνας 2 βυθίζεται στο διάλυμα που αναφέρεται στο 4.7. Κλείνοντας την στρόφιγγα, η στήλη πληρούται. Ακολούθως οι δύο σωλήνες απομακρύνονται.

Εικόνα 2

Διάταξη για σιλάνωση



Η στήλη στερεώνεται σε ένα υποστήριγμα και γεμίζεται τελείως με το διάλυμα διμεθυλοδιχλωροσιλάνιου με τη βοήθεια σιφονιού.

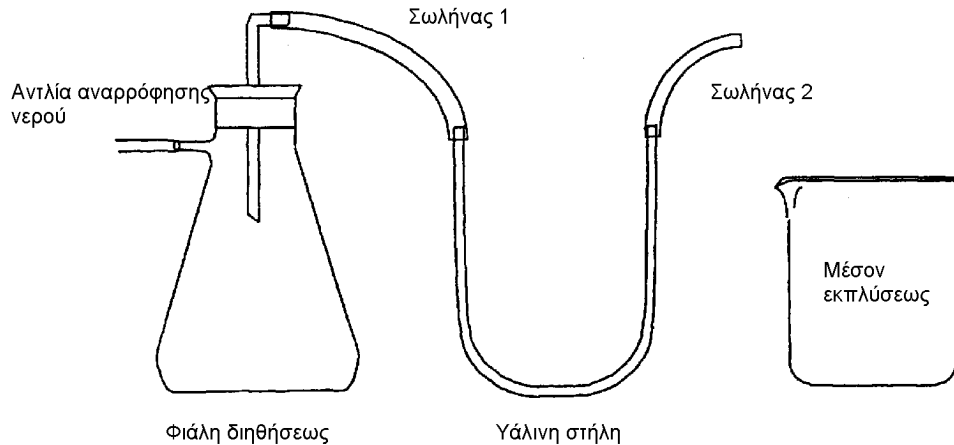
Μετά 20-30 min η φιάλη Woulff αντικαθίσταται από μία κωνική φιάλη διηθήσεως και η στήλη αδειάζεται συνδέοντάς την με την αντλία αναρρόφησης νερού (βλέπε εικόνα 3).

6.2. Πλήρωση της στήλης:

Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές χρησιμοποιώντας 75 ml τολουόλιο και 50 ml μεθανόλη. Κατόπιν η άδεια στήλη ξηραίνεται στο θάλαμο ξηράσεως στους 100 °C για 30 min περίπου.

Εικόνα 3

Διάταξη για έκπλυση



Για την πλήρωση της στήλης χρησιμοποιείται η διάταξη που εικονίζεται στην εικόνα 1. Η στατική φάση όπως περιγράφεται στο 4.9 εισάγεται στην πλαστική στήλη μέχρι τη χαραγή.

Το κάτω άκρο της προς πλήρωση υάλινης στήλης σφραγίζεται με βύσμα από υαλοβάμβακα μήκους περίπου 1 cm, το οποίο έχει προηγουμένως υποβληθεί σε σιλάνωση και το οποίο ωθείται χρησιμοποιώντας μία χαλύβδινη ράβδο. Κατόπιν το άκρο της στήλης κλείεται με το πλέγμα που αναφέρεται στο 5.3.2.

Η στήλη πληρούται υπό πίεση (3 bar, με N₂) με στατική φάση. Για να επιτευχθεί ομοιόμορφο, συνεχές και στερεό γέμισμα, ένας δονητής κινείται πάνω-κάτω της υάλινης στήλης κατά την πλήρωση. Μετά την πλήρωση, στερεό βύσμα από υποστάντα κατεργασία με σιλάνιο υαλοβάμβακα ωθείται στο άλλο άκρο της γεμάτης στήλης, τα προεξέχοντα άκρα αποκόπτονται και το βύσμα ωθείται μέσα στη στήλη για λίγα χιλιοστόμετρα με μία σπάτουλα.

6.3. Παρασκευή των δειγμάτων:

Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιείται μία από τις ακόλουθες τρεις μεθόδους:

6.3.1. Απομόνωση του λίπους γάλακτος από βούτυρο.

5 έως 10 g βουτύρου τήκονται σε κατάλληλο δοχείο μέσα σε υδρόλουτρο σύμφωνο με το 5.7 στους 50 °C.

Φιάλη Erlenmeyer 50 ml και χοάνη με εισηγμένο φίλτρο σύμφωνο με το 5.14 θερμαίνονται στο θάλαμο ξηράσεως στους 50 °C. Η στιβάδα λίπους του τηγμένου δείγματος βουτύρου διηθείται χρησιμοποιώντας την προθερμασμένη διάταξη.

Ένα τέτοιο λίπος γάλακτος είναι απηλλαγμένο φωσφολιπιδίων.

6.3.2. Εκχύλιση του λιπαρού κλάσματος σύμφωνα με τη μέθοδο Rôse-Gottlieb.

Η εκχύλιση πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρότυπο IDF 1C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 ή 22B: 1987.

Τα φωσφολιπίδια σε ένα τέτοιο λίπος γάλακτος δίνουν μία κορυφή χοληστερόλης που είναι αυξημένη περίπου κατά 0,1 %.

Το τριγλυκεριδικό φάσμα τυποποιημένο στα 100 με την χοληστερόλη επηρεάζεται έτσι σε αμελητέο μόνο βαθμό.

6.3.3. Εκχύλιση από γάλα χρησιμοποιώντας στήλες silica gel.

0,7 ml δείγματος γάλακτος θερμασμένο στους 20 °C φέρονται στη στήλη Extrelut 1-3 ml με μικρομετρικό σιφόνιο σύμφωνα με το 5.4 και αφήνεται να κατανεμηθεί ομοιόμορφα πάνω στο silica gel για 5 min περίπου.

Για τη μετουσίωση των πρωτεϊνολιπιδικών συμπλόκων, προστίθενται με σιφόνιο 1,5 ml μεθανόλης. Ακολούθως το δείγμα εκχυλίζεται με 20 ml n-εξάνιο. Το n-εξάνιο προστίθεται αργά σε μικρές ποσότητες και ο διαλύτης στραγγίζει συλλεγόμενο σε μία φιάλη των 50 ml με στρογγυλό πυθμένα που έχει ξηραθεί μέχρι σταθερού, γνωστού βάρους.

Μετά την εκχύλιση, η στήλη αφήνεται να στραγγίσει μέχρι να αδιάσει.

Από το έκλουσμα, οι διαλύτες απομακρύνονται δι' αποστάξεως με περιστροφικό εξάτμιστρά σε υδρόλουτρο με θερμοκρασία 40 έως 50 °C.

Η φιάλη ξηραίνεται και η απόδοση σε λίπος προσδιορίζεται με ζύγισμα.

Σημείωση: Οι εκχυλίσσεις λίπους κατά Gerber, Weibull-Berntrop, Schmidt-Bondzynski-Ratzlaff ή η απομόνωση του λίπους γάλακτος χρησιμοποιώντας απορρυπαντικά (μέθοδος BDI) δεν είναι κατάλληλες για ανάλυση τριγλυκεριδίων, διότι με τις μεθόδους αυτές μπορούν να περάσουν στην λιπαρή φάση ποσότητες, περισσότερο ή λιγότερο μεγάλες μερικών τριγλυκεριδίων ή φωσφολιπιδίων.

6.4. Ετοιμασία του διαλύματος δείγματος

Για την αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιείται διάλυμα 5 % του λίπους σε n-επτάνιο λαμβανομένου σύμφωνα με το 6.3. Για την ετοιμασία του διαλύματος αυτού του δείγματος κατάλληλες ποσότητες του υλικού του δείγματος που λαμβάνονται κατά τα 6.3.1 και 6.3.2 ζυγίζονται και διαλύονται σε κατάλληλες ποσότητες n-επτανίου.

Με την παρασκευή του δείγματος σύμφωνα με το 6.3.3 η προς προσθήκη στη φιάλη με το δείγμα ποσότητα n-επτανίου υπολογίζεται με ζύγισμα και το υπόλοιπο διαλύεται σε αυτό.

1 ml περίπου του διαλύματος δείγματος φέρεται σε φύσιγγα όπως αυτή που αναφέρεται στο 5.16.

6.5. Χρωματογραφικός προσδιορισμός τριγλυκεριδίων

Με θερμοκρασίες μέχρι 350 °C για την έκλυση των τριγλυκεριδίων με μακρά αλυσίδα C52-C56 επέρχεται αύξηση στη γραμμή βάσεως ιδιαίτερα εάν οι στήλες δεν έχουν σταθεροποιηθεί (κοντισιοναριστεί) καταλλήλως στην αρχή. Η ανύψωση της γραμμής βάσεως σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να αποφευχθεί πλήρως είτε συνδέοντας δύο στήλες είτε με αφαίρεση της γραμμής βάσεως.

Με τον αντισταθμιστικό τρόπο ή με μία μόνο στήλη, όπως επίσης και για τα γυάλινα ενδέματα στον εγχυτήρα και στον ανιχνευτή, πρέπει να χρησιμοποιούνται πώματα γραφίτη όπως το 5.5.

6.5.1. Διόρθωση γραμμής βάσεως

Για την αποφυγή ανύψωσης της γραμμής βάσεως χρησιμοποιείται μία από τις ακόλουθες τέσσερις μεθόδους:

6.5.1.1. Συνδυασμός στηλών

Χρησιμοποιούνται δύο συμβατικές στήλες με αντισταθμιστικό τρόπο.

6.5.1.2. Διόρθωση γραμμής βάσεως από τον αέριο χρωματογράφο

Δι' εφαρμογής ενός κύκλου διαδικασίας αέριας χρωματογραφίας χωρίς έγχυση διαλύματος λίπους και εν συνεχεία αφαιρέσεως της αποθηκευμένης γραμμής βάσεως μπορεί να αποφευχθεί η ανύψωση της γραμμής βάσεως.

6.5.1.3. Διόρθωση της γραμμής βάσεως με λογισμικό ολοκλήρωσης

Δι' εφαρμογής ενός κύκλου διαδικασίας αέριας χρωματογραφίας χωρίς έγχυση διαλύματος λίπους και εν συνεχεία αφαιρέσεως της αποθηκευμένης γραμμής βάσεως μπορεί να αποφευχθεί η ανύψωση της γραμμής βάσεως.

6.5.1.4. Διόρθωση της γραμμής βάσεως με κατάλληλη σταθεροποίηση (κοντισιονάρισμα)

Με κατάλληλη αρχική σταθεροποίηση της στήλης και 20 περίπου εκχύσεις με διαλύματα λίπους γάλακτος η ανύψωση της γραμμής βάσεως σε υψηλές θερμοκρασίες είναι συχνά τόσο χαμηλή ώστε να μην χρειάζονται διορθώσεις της γραμμής βάσεως.

6.5.2. Τεχνική εγχύσεως

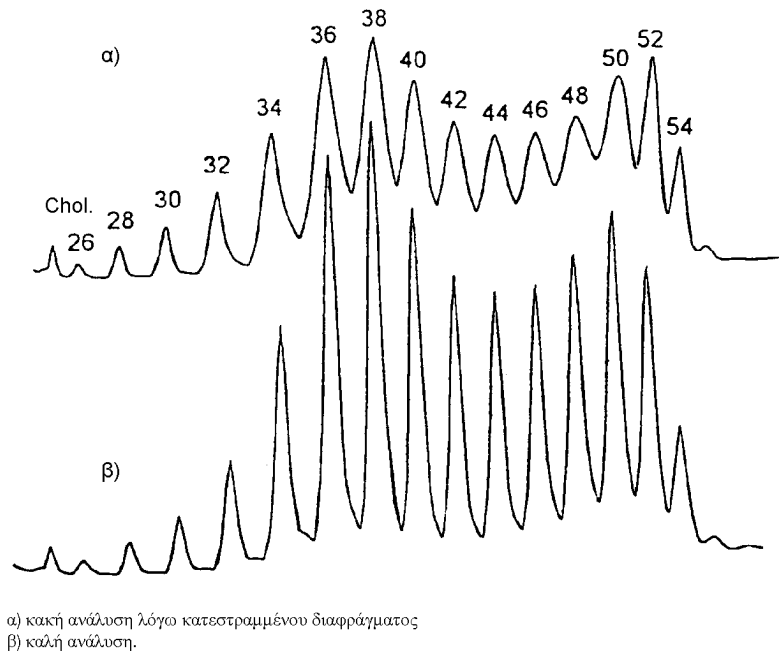
Για την αποφυγή φαινομένων διακρίσεως εφαρμόζεται η τεχνική της «θερμής εγχύσεως» για την επίτευξη καλύτερων ποσοτικών αποτελεσμάτων με τα υψηλού σημείου ζέσεως τριγλυκεριδικά συστατικά. Εδώ, το διάλυμα λίπους αναρροφάται σε μία σύριγγα και η κρύα βελόνα της σύριγγας θερμαίνεται πριν από την έγχυση για 3 sec περίπου στην κεφαλή του εγχυτήρα. Κατόπιν, το περιεχόμενο της σύριγγας εγχύεται ταχέως.

Σημείωση: Με την τεχνική αυτή εγχύσεως, μειώνεται ο κίνδυνος φαινομένων κλασματώσεων μέσα στη σύριγγα ή στο σύστημα εγχύσεως. Δεν εφαρμόζεται η επί της στήλης απ' ευθείας έγχυση στο πάνω, προεκταμένο θερμαινόμενο μέρος της στήλης, διότι τα θραύσματα του διαφράγματος που συσσωρεύονται εδώ, καθώς και τυχόν μολύνσεις μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν με την χρησιμοποιούμενη τεχνική αλλάζοντας σε τακτικά χρονικά διαστήματα ένα ένδεμα του εγχυτήρα χωρίς αποσυναρμολόγηση της στήλης.

Πρέπει να αποφεύγεται απολύτως τυχόν κάμψη του άκρου της βελόνας προκαλούμενη από τυχόν επαφή της με τον πυθμένα του δοχείου του δείγματος (ακόμη και αν με δυσκολία φαίνεται με το μάτι) για να αποφεύγεται καταστροφή του διαφράγματος.

Εικόνα 4

Χρωματογράφημα τριγλυκεριδίων δείγματος λίπους γάλακτος



6.5.3. Ρύθμιση συμβατικής στήλης

Κατά τη διάρκεια των σταδίων α) έως γ), η κορυφή της στήλης δεν συνδέεται με τον ανιχνευτή για την αποφυγή μόλυνσας.

Οι γεμισμένες σύμφωνα με το 6.2 στήλες σταθεροποιούνται ως ακολούθως:

- 15 min 40 ml/min N_2 -ροή στους 50 °C.
- θέρμανση με 1 K/min μέχρι τους 355 °C με 10 ml N_2 /min.
- διατήρηση για 12 έως 15 ώρες στους 355 °C.
- δύο εκχύσεις με 1 μl διαλύματος βουτύρου κακάο σύμφωνα με το 4.10 και αντίστοιχο πρόγραμμα θερμοκρασίας.
- 20 εκχύσεις με 0,5 μl διαλύματος λίπους γάλακτος για δύο έως τρεις ημέρες σύμφωνα με το 6.4.

Σημείωση: Το βούτυρο του κακάο συνίσταται σχεδόν αποκλειστικά από υψηλού σημείου ζέσεως τριγλυκερίδια C50-C56. Η έκχυση του βουτύρου κακάο χρησιμεύει για ειδική σταθεροποίηση στην περιοχή αυτή που αντιστοιχεί σε μακρές αλυσίδες. Με τα υψηλού σημείου ζέσεως τριγλυκερίδια C50 έως C54 μπορούν να απαντηθούν εν μέρη συντελεστές αποκρίσεως μέχρι περίπου 1,20. Κανονικά με επανειλημμένη έκχυση διαλύματος λίπους γάλακτος, αναμένεται μείωση των αρχικών υψηλής αποκρίσεως συντελεστών για τα C50 έως C54. Με τριγλυκερίδια με μικρό αριθμό ακυλιωμένων ανθράκων οι συντελεστές είναι περίπου 1.

Ετοιμάζονται τρία ζεύγη, αντιστοίχως, των πεπληρωμένων κατά το 6.2 στηλών. Τα σταθεροποιημένα ζεύγη ελέγχονται, αντιστοίχως με ανάλυση λίπους γάλακτος για δοκιμή ρουτίνας. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται το ζεύγος που εμφανίζει τα καλύτερα ποσοτικά αποτελέσματα (συντελεστές αποκρίσεως περίπου 1). Σε περίπτωση συντελεστών αποκρίσεως > 1,20, η στήλη δεν χρησιμοποιείται.

6.5.4. Βαθμονόμηση

Για τη βαθμονόμηση, οι συντελεστές αποκρίσεως των αντίστοιχων τριγλυκεριδίων, όπως επίσης και της χοληστερόλης λίπους γάλακτος (τυποποιημένο λίπος) θα πρέπει να προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τα τυποποιημένα τριγλυκερίδια (τουλάχιστον τα κορεσμένα τριγλυκερίδια C24, C30, C36, C42, C48 και C54, όπως επίσης και χοληστερόλη· ακόμη καλύτερα και τα C50 και C52). Οι ενδιάμεσοι συντελεστές αποκρίσεως μπορούν να ευρεθούν με μαθηματική διάκταση.

Χρησιμοποιώντας το τυποποιημένο λίπος, πρέπει να εκτελούνται κάθε ημέρα δύο έως τρεις βαθμονομήσεις. Εάν λαμβάνονται σχεδόν ταυτόσημα αποτελέσματα, στην ανάλυση τριγλυκεριδίων των δειγμάτων επιτυγχάνονται καλώς αναπαραγόμενα ποσοτικά αποτελέσματα.

Το τυποποιημένο λίπος γάλακτος έχει διάρκεια ζωής αρκετούς μήνες σε θερμοκρασία αποθήκευσης το πολύ -18 °C, και μπορεί έτσι να χρησιμοποιείται ως πρότυπο.

Σημείωση: Ο συντελεστής απόκρισης κάθε συστατικού μπορεί επίσης να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας μία λιπαρή ουσία αναφοράς, της οποίας η σύνθεση σε τριγλυκερίδια πιστοποιείται, ως CRM 519 (άνυδρη λιπαρή ουσία του γάλακτος) που διατίθεται προς πώληση από το «Ινστιτούτο Υλικών Αναφοράς και Μέτρων» στο Geel/Βέλγιο.

- 6.5.5. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα, φέρον αέριο και άλλες προϋποθέσεις για την ανάλυση τριγλυκεριδίων.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: αρχική θερμοκρασία στήλης 210 °C, διατήρηση επί 1 min, κατόπιν πρόγραμμα με 6 °C/min μέχρι τους 350 °C και διατήρηση στην τελική θερμοκρασία για 5 min.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή και εγχυτήρα: 370 °C αντίστοιχα.
- Σημείωση: Οι θερμοκρασίες του ανιχνευτή, του εγχυτήρα και του φούρνου (αρχική θερμοκρασία) θα πρέπει να διατηρούνται σε σταθερό επίπεδο (επίσης και κατά τη διάρκεια της νύκτας, του σαββατοκύριακου και των αργιών).
- Φέρον αέριο: άζωτο, ταχύτητα ροής 40 ml/min.
- Σημείωση: Αν χρησιμοποιούνται στήλες των 80 cm, η ροή πρέπει να είναι τουλάχιστον 75 ml/min N₂. Η ροή του φέροντος αερίου πρέπει να διατηρείται επίσης σταθερή (επίσης και κατά τη διάρκεια της νύκτας, όπως επίσης και κατά τα σαββατοκύριακα και τις αργίες). Η ακριβής ροή του φέροντος αερίου πρέπει να προσαρμόζεται έτσι ώστε ανεξάρτητα από το μήκος της στήλης το C54 να εκλύεται στους 341 °C.
- Διάρκεια της ανάλυσης: 29,3 min.
- Ποσότητα ενιομένης ουσίας: 0,5 μl.
- Σημείωση: Η σύριγγα, μετά από κάθε έγχυση, πρέπει να εκπλένεται μερικές φορές με καθαρό επτάνιο.
- Συνθήκες για τον FID: κατά το 5.1.
- Σημείωση: Ο ανιχνευτής ιονισμού ανάβεται, αντίστοιχα, στην αρχή κάθε εργάσιμης ημέρας.

7. Ολοκλήρωση, αξιολόγηση και έλεγχος των συνθηκών μετρήσεως

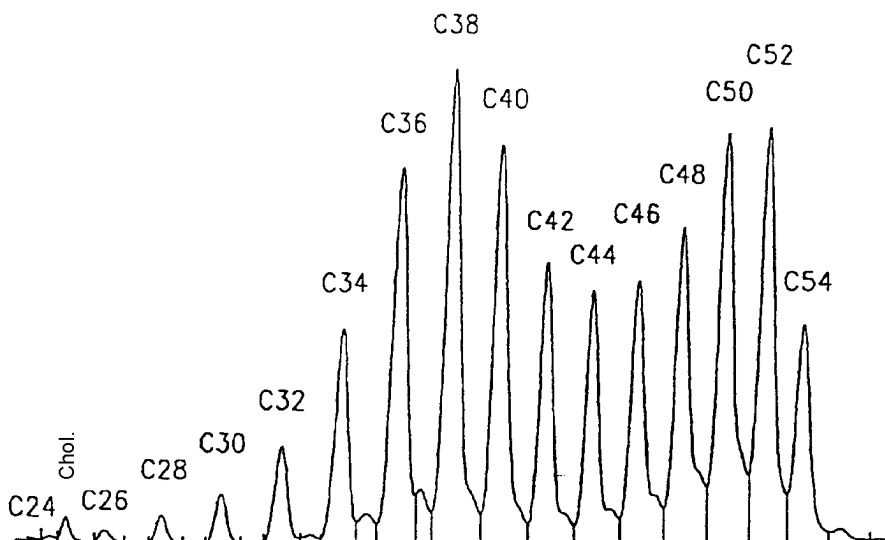
Τα τριγλυκερίδια με μονό αριθμό ακυλιωμένων ανθράκων ($2n + 1$) συνδυάζονται με τα προηγούμενα ζυγού αριθμού τριγλυκερίδια ($2n$). Δεν λαμβάνονται υπόψη οι χαμηλού βαθμού αναπαραγωγιμότητας περιεκτικότητες σε C56. Τα παραμέμονα στο χρωματογράφημα τριγλυκερίδια (εμβασόν κορυφής), συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης (κορυφή κοντά στο C24) πολλαπλασιάζονται επί τον αντίστοιχο συντελεστή αποκρίσεως του τυποποιημένου λίπους (τελευταία βαθμονόμηση) και όλα μαζί ανάγονται στο 100. Έτσι, εκτός από την ελεύθερη χοληστερόλη, αξιολογούνται και τα τριγλυκερίδια C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 και C54. Τα αποτελέσματα δίδονται κ.β. % (g/100g).

Η εκτίμηση των κορυφών του χρωματογραφήματος πρέπει να γίνεται με έναν ολοκληρωτή, με τον οποίο μπορεί να χαραχθεί η γραμμή βάσεως, θα πρέπει να είναι δυνατή και η επανολοκλήρωση με βελτιστοποιημένες παραμέτρους ολοκλήρωσης.

Στις εικόνες 5 και 6 εμφανίζονται δύο παραδείγματα τριγλυκεριδικών χρωματογραφήματων. Στην εικόνα 5 εμφανίζεται χρωματογράφημα που μπορεί να εκτιμηθεί καλώς, ενώ στην εικόνα 6 εμφανίζεται σποραδικό σφάλμα στην περιοχή C50 έως C54, αφού η γραμμή βάσεως εκτείνεται κατά μη ορθό τρόπο σε σχέση με την εικόνα 5. Τέτοια τυπικά σφάλματα μπορούν να ανιχνευθούν με υψηλό βαθμό βεβαιότητας και αποφεύγονται μόνο με τη χρήση ολοκληρωτή με τον οποίο χαράσσεται η γραμμή βάσεως.

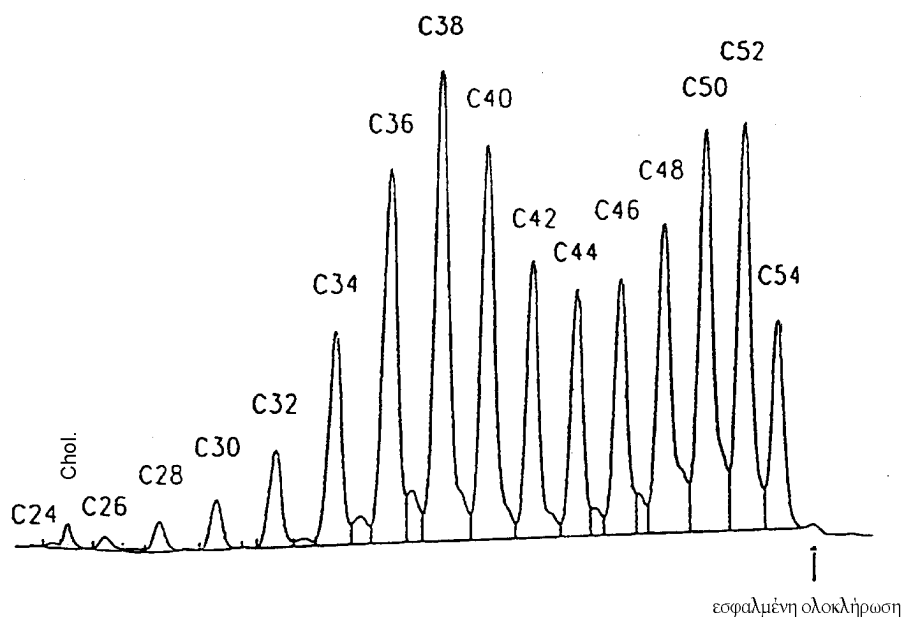
Εικόνα 5

Εύκολο για εκτίμηση χρωματογράφημα τριγλυκεριδίων λίπους γάλακτος με χαραγμένη γραμμή βάσεως



Εικόνα 6

Κατά εσφαλμένο τρόπο ολοκληρωμένο χρωματογράφημα λίπους γάλακτος



Για να ελεγχθούν οι συνθήκες μέτρησης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD: συντελεστής μεταβολής $\times 100$) που παρατίθενται στον πίνακα 1 για τα διάφορα τριγλυκερίδια. Έχουν υπολογισθεί βάσει 19 διαδοχικών αναλύσεων της ίδιας λιπαρής ουσίας του γάλακτος.

Πίνακας 1

Σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) της περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια (n=19)

Τριγλυκερίδιο	RSD (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Όταν οι RSD είναι σαφώς ανώτερες από τις αξίες που εμφανίζονται στον πίνακα 1, οι συνθήκες χρωματογραφίας δεν είναι κατάλληλες και θα πρέπει να ελέγχονται τα διαγράμματα ή και ακόμη η παροχή του φέροντος αερίου. Επιπλέον, μικρά συστατικά του διαγράμματος μπορεί να έχουν δημιουργήσει αποθέσεις στον υαλοβάμβακα στην είσοδο της στήλης ή η στήλη να έχει καταστεί ακατάλληλη για χρήση λόγω γηράσκων, θερμοκρασιακών επιδράσεων κ.λπ. (βλέπε εικόνα 3).

Σημείωση: Οι τιμές που παρατίθενται στο πίνακα 1 δεν έχουν δεσμευτικό χαρακτήρα και παρέχουν απλώς μία κατεύθυνση για τον ποιοτικό έλεγχο. Εφόσον γίνονται αποδεκτές υψηλότερες RSD, θα πρέπει παρόλ' αυτά να τηρηθούν τα όρια επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας που αναφέρονται στο σημείο 11.

8. Ποιοτική ανίχνευση ξένου λίπους

Για την ανίχνευση ξένων λιπών έχουν αναπτυχθεί τριγλυκεριδικοί τύποι (πίνακας 2) με όρια S (πίνακας 3), στους οποίους μπορούν να παίζουν οι τιμές S των καθαρών λιπών γάλακτος. Εάν τα όρια αυτά παραβιάζονται, αυτό θα πρέπει να αποδίδεται στην παρουσία ξένων λιπών.

Ο πλέον ευαίσθητος τύπος για την ανίχνευση προσθήκης χοιρείου λίπους είναι, παραδείγματος χάρι:

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$$

Σημείωση: Χρησιμοποιώντας 755 διαφορετικά δείγματα λίπους γάλακτος επιτεύχθηκε μία περιοχική αξιοπιστίας 99 % για $S = 97,96-102,04$ για δείγματα καθαρού λίπους γάλακτος με τυπική απόκλιση για όλες τις τιμές S $SD = 0,39897$.

Ξεκινώντας από την τριγλυκεριδική σύσταση ενός άγνωστου δείγματος λίπους, ένας τέτοιος τύπος μας δίνει τη δυνατότητα, χωρίς τη χρήση υπολογιστή, να επαληθευθεί με απλό τρόπο αν το άθροισμα των περιεκτικότητων σε τριγλυκερίδια που αναφέρεται στο παρόν με τους αντίστοιχους συντελεστές πέφτει εκτός της περιοχής 97,96-102,04 περίπτωση στην οποία κατά πάσαν πιθανότητα έχουμε να κάνουμε με προσθήκη ξένου λίπους.

Για την ανίχνευση διαφόρων ξένων λιπών, στον πίνακα 2 εμφανίζονται διάφοροι τριγλυκεριδικοί τύποι. Για την ανίχνευση των ξένων λιπών σογιελαίου, ηλιανθέλαιου, ελαιολάδου, κραμβελαίου, λινελαίου, σιτελαίου, αραβοσιτελαίου, βαμβακελαίου και υδρογονωμένων ιχθυελαίων, για τα φυτικά λίπη κοκοφοινικελαίου και φοινικοκυρηγέλαιου, όπως επίσης και για το φοινικέλαιο και βόειο λίπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί, αντίστοιχα, ένας κοινός τύπος.

Εφόσον η τριγλυκεριδική σύσταση των ξένων λιπών μπορεί επίσης να παίζει, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά, πειραματικούς υπολογισμένα στοιχεία τριγλυκεριδίων ξένων λιπών του ίδιου τύπου. [Με τους ίδιους τύπους ξένων λιπών, ελήφθησαν υπόψη τα λιγότερο ευνοϊκά όρια, αντιστοίχως (βλέπε πίνακα 4)].

Μπορούν επίσης να ληφθούν το ίδιο καλά αποτελέσματα για όλα τα ξένα λίπη με τον ακόλουθο «ολικό τύπο»:

$$- 2,7575 \cdot C26 + 6,4077 \cdot C28 + 5,5437 \cdot C30 - 15,3247 \cdot C32 + 6,2600 \cdot C34 + 8,0108 \cdot C40 - 5,0336 \cdot C42 + 0,6356 \cdot C44 + 6,0171 \cdot C46 = S$$

Υπολογισμοί για την ανίχνευση οποιωνδήποτε συνδυασμών ξένων λιπών σε λίπος γάλακτος έδειξαν ότι, παραδείγματος χάρι, αν και με τον τύπο για το χοίρειο λίπος που δίδεται στον πίνακα 2 το όριο για το ξένο αυτό λίπος είναι χαμηλό, συγκεκριμένα 2,7 %, άλλα λίπη όπως το κοκοφοινικέλαιο, το φοινικέλαιο ή το φοινικοκυρηγέλαιο με όρια ανιχνεύσεως 26,8, 12,5 και 19,3 %, αντίστοιχα, μπορούν να ανιχνευθούν μόνον εάν έχουν προστεθεί στο λίπος γάλακτος σε εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες. Αυτό ισχύει επίσης και για άλλους τύπους στον πίνακα 2.

Πίνακας 2

Τριγλυκεριδικοί τύποι για την ανίχνευση διαφόρων ξένων λιπών σε λίπος γάλακτος, με τις τυπικές αποκλίσεις SD για S

Τύπος για σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο και ιχθυέλαιο
$2,0983 \cdot C30 + 0,7288 \cdot C34 + 0,6927 \cdot C36 + 0,6353 \cdot C38 + 3,7452 \cdot C40 - 1,2929 \cdot C42 + 1,3544 \cdot C44 + 1,7013 \cdot C46 + 2,5283 \cdot C50 = S$, $SD = 0,38157$
Τύπος για κοκοφοινικέλαιο και φοινικοκυρηγέλαιο
$3,7453 \cdot C32 + 1,1134 \cdot C36 + 1,3648 \cdot C38 + 2,1544 \cdot C42 + 0,4273 \cdot C44 + 0,5809 \cdot C46 + 1,2926 \cdot C48 + 1,0306 \cdot C50 + 0,9953 \cdot C52 + 1,2396 \cdot C54 = S$, $SD = 0,11323$
Τύπος για φοινικέλαιο και βόειο λίπος
$3,6644 \cdot C28 + 5,2297 \cdot C30 - 12,5073 \cdot C32 + 4,4285 \cdot C34 - 0,2010 \cdot C36 + 1,2791 \cdot C38 + 6,7433 \cdot C40 - 4,2714 \cdot C42 + 6,3739 \cdot C46 = S$, $SD = 0,81094$
Τύπος για χοίρειο λίπος
$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$, $SD = 0,39897$

Συνεπώς, για τον έλεγχο ενός δείγματος άγνωστου λίπους πρέπει να χρησιμοποιηθούν όλοι οι τύποι του πίνακα 2 και ο ολικός τύπος (2), εάν το δείγμα είναι μείγμα λίπους γάλακτος και ενός από τα 14 διαφορετικά ξένα λίπη ή συνδυασμού των ξένων αυτών λιπών. Εάν, με την εισαγωγή των τριγλυκεριδίων ενός προς ανάλυση δείγματος λίπους ληφθεί μία τιμή S, η οποία πέφτει έξω από τις περιοχές του πίνακα 3 για ένα μόνο από τους πέντε τύπους, τότε το δείγμα είναι πιθανότατα ένα τροποποιημένο λίπος γάλακτος. Η ανίχνευση ξένου λίπους σε λίπος γάλακτος μέσω ενός των τεσσάρων τύπων στον πίνακα 2 δεν δίνει τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων για τύπο του προσμειγμένου ξένου λίπους.

Πίνακας 3
Όρια S για λίπη γάλακτος

Τύπος για ανίχνευση	Περιοχή S
Σογιελαίου, ηλιανθελαίου, ελαιολάδου, κραμβελαίου, λινελαίου, στελαίου, αραβοσιτελαίου, βαμβακελαίου, ιχθυελαίων	98,05-101,95
Κοκοφοινικέλαιο και φοινικοπυρηγέλαιο	99,42-100,58
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος	95,90-104,10
Χοίρειο λίπος	97,96-102,04
Ολικός τύπος	95,68-104,32

Στον πίνακα 4 δίδονται τα όρια ανιχνεύσεως για τα διάφορα ξένα λίπη με αξιοπιστία 99 %. Η πρώτη στήλη δείχνει τα ελάχιστα όρια ανιχνεύσεως για τους καλύτερους τύπους λίπους γάλακτος στον πίνακα 2. Στη δεύτερη στήλη δίδονται τα όρια ανιχνεύσεως για τον ολικό τύπο. Αν και τα όρια είναι κάπως υψηλότερα, μόνον ο τύπος αυτός χρειάζεται για την ανίχνευση λίγο μεγαλύτερων ποσοτήτων ξένων λιπών. Με όλους τους τύπους, μπορούν να ανιχνευθούν και συνδυασμοί των διαφόρων ξένων λιπών. Οι περιοχές δακτύμανσης των τριγλυκεριδίων των διαφόρων ξένων λιπών ενός τύπου δεν έχουν σημαντική επίδραση στα όρια ανιχνεύσεως.

Πίνακας 4
Όρια ανιχνεύσεως 99 % διά προσθήκης ξένου λίπους σε λίπος γάλακτος σε %

	Επιμέρους τύπος	Ολικός τύπος
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
Φοινικοπυρηγέλαιο	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
Χοίρειο λίπος	2,7	4,7
Βόειο λίπος	5,2	5,4
Υδρογονωμένο ιχθυέλαιο	5,4	6,1

Σημείωση: Οι περιοχές S υπολογίζονται με τον τρόπο αυτό, ότι αναμένεται η ύπαρξη ενός ξένου λίπους εάν επέλθει υπέρβαση των ορίων των επιμέρους τύπων (βλέπε πίνακα 4).

9. Ποσοτικός προσδιορισμός ξένου λίπους

Για να ληφθούν ποσοτικές πληροφορίες για τη συγκέντρωση του ξένου λίπους σε δείγμα λίπους γάλακτος, χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$X (\%) = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)(3)}{(100 - S_f)} \right|,$$

όπου X είναι η ποσότητα ενός άγνωστου ξένου λίπους ή μείγματος ξένων λιπών σε ένα άγνωστο λίπος γάλακτος. Το S προκύπτει από την προσθήκη ενός άγνωστου ξένου λίπους δια εισαγωγής των τριγλυκεριδίων του μείγματος ξένου λίπους γάλακτος στον ανωτέρω ολικό τύπο τριγλυκεριδίων. Εάν στο λίπος του γάλακτος προστεθεί ένα άγνωστο ξένο λίπος, για το S_f επιλέγεται η μέση τιμή S των διαφόρων ξένων λιπών για τον ολικό τύπο. Η μέση τιμή S λαμβάνεται δια εισαγωγής των στοιχείων για τα τριγλυκερίδια των καθαρών ξένων λιπών στον τύπο αυτό δια υπολογισμού μίας μέσης τιμής ($S_f = 7,46$). Καλά ποσοτικά αποτελέσματα για οποιεσδήποτε προσθήκες ξένων λιπών λαμβάνονται επίσης και χρησιμοποιώντας τον τύπο φοινικελαίου/βόειου λίπους (πίνακα 2) και μία μέση τιμή S_f 10,57.

Με γνωστά είδη ξένων λιπών, στον ανωτέρω τύπο πρέπει να εισάγονται οι παρακάτω τιμές $S_f =$ και να επιλέγεται ο αντίστοιχος τύπος ξένου λίπους από τον πίνακα 2.

Πίνακας 5

Τιμές S_F διαφόρων ξένων λιπών

Ξένο λίπος	S_F
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
Λαρδί	177,55
Βόειο λίπος	17,56
Ιχθυέλαιο	64,12

10. Εύρος εφαρμογής της μεθόδου ανίχνευσης

Η περιγραφή α μέθοδος έχει εφαρμογή σε χύμα γάλατα και βασίζεται στην αντιπροσωπευτικότητα των δειγμάτων του λίπους γάλακτος.

Θα ήταν δυνατή η με μεγάλη εξειδίκευση ανίχνευση εάν, για ένα αντιπροσωπευτικό αριθμό λιπών γάλακτος, υπήρχαν τύποι που περιγράψαν ανωτέρω προερχόμενοι από διάφορες χώρες.

Θα μπορούσαν να επιτευχθούν ιδιαίτερα επιτυχημένες δυνατότητες ανίχνευσης, εάν οι τύποι για τις διάφορες χώρες, όπως περιγράφονται εδώ, συγκροτούνταν από ένα αντιπροσωπευτικό αριθμό λιπών γάλακτος. Στην περίπτωση αυτή, δεν απαιτείται η χρήση πολύπλοκων προγραμμάτων υπολογισμού, εάν εφαρμόζονται οι συνδυασμοί τριγλυκεριδίων που χρησιμοποιούνται στον πίνακα 2 και επαναπροσδιορίζονται οι συντελεστές χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων.

Εφαρμόζοντας τις κλίμακες S όπως φαίνεται στον πίνακα 3, οι τύποι μπορούν να εφαρμοστούν κάτω από διάφορες συγκεκριμένες συνθήκες εκτροφής όπως, παραδείγματος χάρη, υποσιτισμός ή διατροφή αγελάδων με ζύμες ή σάβωνες Ca . Μόνο στην περίπτωση ακραίων συνθηκών διατροφής (παραδείγματος χάρη, υψηλή πρόσληψη καθάρων ελαίων διατροφής κ.λπ.) οι τύποι εν μέρει δείχνουν τροποποιημένο λίπος γάλακτος.

Σημείωση: Τα κλασματοποιημένα λίπη γάλακτος αναγνωρίζονται εν γένει ως μη τροποποιημένο λίπος γάλακτος, εάν υποτίθεται ότι υπάρχει μόνο μία τροποποίηση, όταν εμφανίζεται υπέρβαση των ορίων. Μόνο με κλασματοποιημένα λίπη γάλακτος με ασυνήθη σύνθεση λιπών γάλακτος όπως παραδείγματος χάρη, η περίπτωση με σκληρό κλάσμα, που λαμβάνονται με κλασματοποίηση με φυσικές μεθόδους σε υψηλές θερμοκρασίες περίπου 30 °C με χαμηλές αποδόσεις λίγων εκατοστιαίων μονάδων ή με κλασμάτωση με άνω του κρίσιμου σημείου CO_2 , οι τύποι δείχνουν μία τροποποίηση.

Η κλασμάτωση λίπους γάλακτος μπορεί, εντούτοις, να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας άλλες διαδικασίες, παραδείγματος χάρη, θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης.

11. Ορθότητα της μεθόδου

Προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας λίπος γάλακτος με βάση τους τύπους από τον πίνακα 2 και τις περιοχές S στον πίνακα 3.

11.1. Επαναληψιμότητα

Ως διαφορά των τιμών S δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται μέσα στο συντομότερο εφικτό χρονικό διάστημα από ένα άτομο χρησιμοποιώντας την ίδια διαδικασία και ταυτόσημο υλικό δείγματος υπό τις ίδιες συνθήκες (ίδιο πρόσωπο, ίδια όργανα/ίδιες, συσκευές/ίδιο εργαστήριο):

Πίνακας 6

Όρια επαναληψιμότητας (r) για τους διάφορους τύπους

Τύπος για ανίχνευση	r
Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ιχθυέλαιο.	0,67
Κοκοφοινικέλαιο, και φοικικοπυρηνέλαιο	0,12
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος	1,20
Χοίρειο λίπος	0,58
Ολικός τύπος	1,49

11.2. Αναπαραγωγιμότητα

Ως διαφορά των τιμών S δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται από άτομα σε διαφορετικά εργαστήρια, σύμφωνα με την ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας ταυτόσημο υλικό δείγματος από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικό πρόσωπο, διαφορετικά όργανα) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Πίνακας 7

Όρια αναπαραγωγιμότητας (R) για τους διάφορους τύπους

Τύπος για ανίχνευση	R
Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ιχθυέλαιο.	1,08
Κοκοφοινικέλαιο, και φοικικοπυρηνέλαιο	0,40
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος	1,81
Χοίρειο λίπος	0,60
Ολικός τύπος	2,07

11.3. Κρίσιμη διαφορά

Με τα όρια επαναληψιμότητας (r) και αναπαραγωγιμότητας (R) μπορούν να υπολογιστούν οι κρίσιμες διαφορές για όλες τις περιοχές S του πίνακα 3 (διπλές αναλύσεις). Οι αντίστοιχες τιμές δίδονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8

Κρίσιμες διαφορές για όλους τους τριγλυκεριδικούς τύπους

Τύπος για ανίχνευση	Περιοχή S
Σογιέλαιο, ηλιανθέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, λινέλαιο, σιτέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ιχθυέλαιο.	97,43-102,57
Κοκοφοινικέλαιο, και φοικικοπυρηνέλαιο	99,14-100,86
Φοινικέλαιο και βόειο λίπος	94,91-105,09
Χοίρειο λίπος	97,65-102,35
Ολικός τύπος	94,58-105,42

11.4. Αποδεξιμότητα των αποτελεσμάτων

Όλες οι βαθμονομούμενες με στρωγγυλοποίηση στο δεύτερο δεκαδικό ψηφίο, υπολογιζόμενες περιεκτικότητες σε τριγλυκερίδια C24, C26, C28 έως C54 πρέπει να ανάγονται ακριβώς στο 100.

Τα αποτελέσματα της διπλής ανάλυσης χρησιμοποιούνται ως έλεγχος για την επαναληψιμότητα. Εάν οι απόλυτες διαφορές μεταξύ των δύο αποτελεσμάτων για το S για όλους τους τριγλυκεριδικούς τύπους δεν παραβιάζουν τα όρια επαναληψιμότητας r του πίνακα 6, αυτό σημαίνει ότι τηρείται η απαίτηση της επαναληψιμότητας.

Για τον έλεγχο των άριστων αεροχρωματογραφικών συνθηκών και ειδικά της ποιότητας της στήλης, θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι σε δέκα κύκλους επανάληψης οι διαφορές των μέγιστων και ελαχίστων τιμών S και των 5 τριγλυκεριδικών τύπων δεν παραβιάζουν την κλίμακα $x \cdot r$ με $x = 1,58$ (για δέκα κύκλους βλέπε βιβλιογραφία 16) και τα όρια επαναληψιμότητας r για τους διάφορους τύπους του πίνακα 6.

12. Αναφερόμενα πρότυπα

DIN 10 336: 1994	Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse
IDF-norm IC: 1987	Milk, determination of Fat content — Röse Gottlieb gravimetric method
IDF-norm 16C: 1987	Cream. Determination of fat Content — Röse Gottlieb gravimetric method
IDF-norm 116A: 1987	Milk-Based edible ices and ice mixes. Determination of fat content-Röse Gottlieb gravimetric method
IDF-norm 22B: 1987	Skimmed milk, whey & buttermilk. Determination of fat content-Röse Gottlieb gravimetric method.

13. Βιβλιογραφία

1. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων: Ανίχνευση ξένων λιπών σε λίπος γάλακτος με αεροχρωματογραφική ανάλυση τριγλυκεριδίων, Doc. No. VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων: Έλεγχος καθαρότητας λίπους βουτύρου 100 διαφορετικών δειγμάτων περιόδων διατροφής από 11 κοινοτικά κράτη, Doc. No. VI/4577/93.
3. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων: Εξέταση αποτελεσμάτων από την πρώτη, δεύτερη, τρίτη, τέταρτη, πέμπτη και έκτη συνεργασιακή δοκιμή EOK: Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων σε λίπος γάλακτος, Doc. No. VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92 και VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. Dairy Research 4 72 95-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen 4 14 06-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 20-35 (1987).
7. Precht, D.: Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchfett. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 4 21 43/157 (1989).
8. Precht D.: Schnelle Extraktion von Milchfett, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 4 21 19-128 (1990).
9. Precht, D.: Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchfett. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 4 21 39-154 (1990).
10. Precht, D.: Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis. Fat Sci. Technol. 9 35 38-544 (1991).
12. Precht, D.: Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992).
13. Precht, D.: Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns in CRC Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids, p. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkentin, J.: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molkentin, J., Precht, D.: Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme, Springer-Verlag, Berlin, p. 378 (1970).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXVI

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΚΑΝΟΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΔΙΠΤΟΛΟΓΙΚΗ ΣΚΕΨΗ

- Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1216/68 της Επιτροπής, της 9ης Αυγούστου 1968, περί καθορισμού της μεθόδου διαπιστώσεως της περιεκτικότητας σε λακτόζη των τροφών που παρασκευάζονται για τα εισαγόμενα ζώα προελεύσεως τρίτων χωρών ⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 222/88 της Επιτροπής της 22ας Δεκεμβρίου 1987 για την τροποποίηση ορισμένων πράξεων στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων στη συνέχεια της καθιέρωσης της συνδυασμένης ονοματολογίας ⁽²⁾.
- Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 3942/92 της Επιτροπής, της 22ας Δεκεμβρίου 1992, για τη θέσπιση μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης στο βουτυρέλαιο ⁽³⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 175/1999 της Επιτροπής για την τροποποίηση των κανονισμών (ΕΟΚ) αριθ. 3942/92, (ΕΚ) αριθ. 86/94, (ΕΚ) αριθ. 1082/96 και (ΕΚ) αριθ. 1459/98 σχετικά με τη θέσπιση μεθόδων αναφοράς για τον προσδιορισμό ορισμένων ιχνηθετών στο βούτυρο, το βουτυρέλαιο και στην κρέμα γάλακτος ⁽⁴⁾.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 86/94 της Επιτροπής, της 19ης Ιανουαρίου 1994, σχετικά με τη θέσπιση μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης στο βούτυρο ⁽⁵⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 175/1999.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2721/95 της Επιτροπής, της 24ης Νοεμβρίου 1995, περί θέσπισης κανόνων για την εφαρμογή των συνήθων μεθόδων και των μεθόδων αναφοράς για την ανάλυση και την ποιοτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων στο πλαίσιο της οργάνωσης κοινής αγοράς ⁽⁶⁾.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1080/96 της Επιτροπής, της 14ης Ιουνίου 1996, σχετικά με τον καθορισμό μίας μεθόδου αναφοράς για την ανίχνευση κολοβακτηριδίων στο βούτυρο, το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη και την καζείνη-καζείνικα άλατα ⁽⁷⁾.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1081/96 της Επιτροπής, της 14ης Ιουνίου 1996, που αφορά τη θέσπιση μεθόδου αναφοράς για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και, καζείνικων αλάτων σε τυριά από πρόβειο, κατσικίσιο ή βουβαλίσιο γάλα ή από μείγματα πρόβειο, κατσικίσιο και βουβαλίσιο γάλακτος και περί κατάργησης του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 690/92 ⁽⁸⁾.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1082/96 της Επιτροπής, της 14ης Ιουνίου 1996, για τη θέσπιση μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό του αιθυλεστερά του β-από-8'-καροτενικού οξέος σε συμπυκνωμένο βούτυρο και βούτυρο ⁽⁹⁾, όπως τροποποιήθηκε από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 175/1999.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1854/96 της Επιτροπής, της 26ης Σεπτεμβρίου 1996, για τον καθορισμό πίνακα μεθόδων αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και ποιοτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων στο πλαίσιο της κοινής οργάνωσης αγοράς ⁽¹⁰⁾, όπως τροποποιήθηκε από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 881/1999 ⁽¹¹⁾.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 880/98 της Επιτροπής, της 24ης Απριλίου 1998, σχετικά με τη θέσπιση μεθόδων αναφοράς για τον προσδιορισμό περιεκτικότητας του βουτύρου σε υγρασία, σε στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος και σε λίπος ⁽¹²⁾.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1459/98 της Επιτροπής, της 8ης Ιουλίου 1998, σχετικά με τη θέσπιση μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό της βανιλίνης στο συμπυκνωμένο βούτυρο, στο βούτυρο ή στην κρέμα γάλακτος ⁽¹³⁾, όπως τροποποιήθηκε με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 175/1999.

⁽¹⁾ ΕΕ L 198 της 10.8.1968, σ. 13.
⁽²⁾ ΕΕ L 28 της 1.2.1988, σ. 1.
⁽³⁾ ΕΕ L 399 της 31.12.1992, σ. 29.
⁽⁴⁾ ΕΕ L 20 της 27.1.1999, σ. 22.
⁽⁵⁾ ΕΕ L 17 της 20.1.1994, σ. 7.
⁽⁶⁾ ΕΕ L 283 της 25.11.1995, σ. 7.
⁽⁷⁾ ΕΕ L 142 της 15.6.1996, σ. 13.
⁽⁸⁾ ΕΕ L 142 της 15.6.1996, σ. 15.
⁽⁹⁾ ΕΕ L 142 της 15.6.1996, σ. 26.
⁽¹⁰⁾ ΕΕ L 246 της 27.9.1996, σ. 5.
⁽¹¹⁾ ΕΕ L 111 της 29.4.1999, σ. 24.
⁽¹²⁾ ΕΕ L 124 της 25.4.1998, σ. 16.
⁽¹³⁾ ΕΕ L 193 της 9.7.1998, σ. 16.