

ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΟΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2018/150 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 30ής Ιανουαρίου 2018

για την τροποποίηση του εκτελεστικού κανονισμού (ΕΕ) 2016/1240, όσον αφορά τις μεθόδους ανάλυσης και ποιοτικής αξιολόγησης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων που είναι επιλέξιμα για δημόσια παρέμβαση και ενίσχυση για ιδιωτική αποθεματοποίηση

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1306/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 17ης Δεκεμβρίου 2013, σχετικά με τη χρηματοδότηση, τη διαχείριση και την παρακολούθηση της κοινής γεωργικής πολιτικής και την κατάργηση των κανονισμών (ΕΟΚ) αριθ. 352/78, (ΕΚ) αριθ. 165/94, (ΕΚ) αριθ. 2799/98, (ΕΚ) αριθ. 814/2000, (ΕΚ) αριθ. 1290/2005 και (ΕΚ) αριθ. 485/2008 του Συμβουλίου ⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 62 παράγραφος 2 στοιχείο θ),

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Ο κατ' εξουσιοδότηση κανονισμός (ΕΕ) 2016/1238 της Επιτροπής ⁽²⁾ και ο εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2016/1240 της Επιτροπής ⁽³⁾ θεσπίζουν τους κανόνες όσον αφορά τη δημόσια παρέμβαση και την ενίσχυση για ιδιωτική αποθεματοποίηση. Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 273/2008 της Επιτροπής ⁽⁴⁾ καθορίζει τις μεθόδους που πρέπει να εφαρμόζονται κατά την αξιολόγηση του κατά πόσον το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα πληρούν τις απαιτήσεις επιλεξιμότητας που προβλέπονται στους εν λόγω κανονισμούς όσον αφορά τη δημόσια παρέμβαση και την ενίσχυση για ιδιωτική αποθεματοποίηση.
- (2) Υπό το φως των τεχνικών εξελίξεων στη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την ανάλυση και την ποιοτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, θα πρέπει να επέλθουν ουσιώδεις τροποποιήσεις στον ισχύοντα κανονισμό με στόχο, αφενός, την απλούστευση και, αφετέρου, την πρόβλεψη επικαιροποίησης των παραπομπών στα πρότυπα ISO. Για λόγους σαφήνειας και αποτελεσματικότητας, και έχοντας υπόψη την έκταση και τον τεχνικό χαρακτήρα των τροποποιήσεων των διατάξεων του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 273/2008, οι σχετικές διατάξεις του εν λόγω κανονισμού θα πρέπει να ενσωματωθούν στον εκτελεστικό κανονισμό (ΕΕ) 2016/1240.
- (3) Προκειμένου να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη συμμόρφωση προς τα νέα πρότυπα και τις νέες μεθόδους σε όλα τα κράτη μέλη, θα πρέπει τα εργαστήρια να έχουν στη διάθεσή τους επαρκές χρονικό διάστημα για την επανεξέταση των διαδικασιών και την εφαρμογή των επικαιροποιημένων μεθόδων.
- (4) Επομένως, ο εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2016/1240 θα πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.
- (5) Για λόγους ασφάλειας δικαίου, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 273/2008 θα πρέπει να καταργηθεί.
- (6) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής για την κοινή οργάνωση των γεωργικών αγορών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Ο εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2016/1240 τροποποιείται ως ακολούθως:

1) Το άρθρο 4 τροποποιείται ως εξής:

α) η παράγραφος 1 τροποποιείται ως εξής:

i) το στοιχείο δ) αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«δ) για το βούτυρο: στα μέρη I και Ia του παραρτήματος IV του παρόντος κανονισμού»

ii) το στοιχείο ε) αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«ε) για το αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη: στα μέρη I και Ia του παραρτήματος V του παρόντος κανονισμού»

⁽¹⁾ ΕΕ L 347 της 20.12.2013, σ. 549.⁽²⁾ Κατ' εξουσιοδότηση κανονισμός (ΕΕ) 2016/1238 της Επιτροπής, της 18ης Μαΐου 2016, για τη συμπλήρωση του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου όσον αφορά τη δημόσια παρέμβαση και την ενίσχυση για ιδιωτική αποθεματοποίηση (ΕΕ L 206 της 30.7.2016, σ. 15).⁽³⁾ Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2016/1240 της Επιτροπής της 18ης Μαΐου 2016, για τη θέσπιση κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου όσον αφορά τη δημόσια παρέμβαση και την ενίσχυση για ιδιωτική αποθεματοποίηση (ΕΕ L 206 της 30.7.2016, σ. 71).⁽⁴⁾ Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 273/2008 της Επιτροπής, της 5ης Μαρτίου 2008, για τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1255/1999 του Συμβουλίου, όσον αφορά τις μεθόδους ανάλυσης και ποιοτικής αξιολόγησης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (ΕΕ L 88 της 29.3.2008, σ. 1).

β) η παράγραφος 2 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«2. Οι μέθοδοι που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ποιότητας των σιτηρών, του βουτύρου και του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη που είναι επιλέξιμα για δημόσια παρέμβαση και αναφέρονται στα παραρτήματα I, IV και V, αντίστοιχα, είναι εκείνες που καθορίζονται στις τελευταίες εκδόσεις των ευρωπαϊκών ή διεθνών προτύπων, κατά περίπτωση, οι οποίες ισχύουν τουλάχιστον 6 μήνες πριν από την πρώτη ημέρα της περιόδου δημόσιας παρέμβασης που ορίζεται στο άρθρο 12 του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013.».

2) Παρεμβάλλεται το ακόλουθο άρθρο 60α:

«Άρθρο 60α

Ειδική διάταξη σχετικά με τους ελέγχους που αφορούν τη δημόσια παρέμβαση και την ενίσχυση για ιδιωτική αποθεματοποίηση για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα

1. Η επιλεξιμότητα του βουτύρου, του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη και του τυριού για τη λήψη ενίσχυσης για ιδιωτική αποθεματοποίηση καθορίζεται σύμφωνα με τις μεθόδους που προβλέπονται στα παραρτήματα VI, VII και VIII αντίστοιχα.

Οι μέθοδοι αυτές καθορίζονται με βάση τις τελευταίες εκδόσεις των σχετικών ευρωπαϊκών ή διεθνών προτύπων, κατά περίπτωση, που ισχύουν τουλάχιστον 6 μήνες πριν από την πρώτη ημέρα της περιόδου δημόσιας παρέμβασης που ορίζεται στο άρθρο 12 του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013.

2. Τα αποτελέσματα των ελέγχων που πραγματοποιούνται με την εφαρμογή των μεθόδων που καθορίζονται στον παρόντα κανονισμό αξιολογούνται σύμφωνα με το παράρτημα IX.».

3) Τα παραρτήματα τροποποιούνται σύμφωνα με το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 273/2008 καταργείται.

Άρθρο 3

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

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

Βρυξέλλες, 30 Ιανουαρίου 2018.

Για την Επιτροπή
Ο Πρόεδρος
Jean-Claude JUNCKER

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τα παραρτήματα του εκτελεστικού κανονισμού (ΕΕ) 2016/1240 τροποποιούνται ως εξής:

1) Το παράρτημα IV τροποποιείται ως εξής:

α) στο μέρος I σημείο 2, το δεύτερο εδάφιο αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Κάθε δείγμα εξετάζεται χωριστά. Δεν επιτρέπεται επαναδειγματοληψία και επαναξιολόγηση.»

β) παρεμβάλλεται το ακόλουθο μέρος Ια:

«ΜΕΡΟΣ Ια

Μέθοδοι ανάλυσης μη αλατισμένου βουτύρου για δημόσια παρέμβαση

Παράμετρος	Μέθοδος
Λιπαρά ⁽¹⁾	ISO 17189 ή ISO 3727 μέρος 3
Νερό	ISO 3727 μέρος 1
Πήγματα χωρίς λίπος	ISO 3727 μέρος 2
Οξύτητα λίπους	ISO 1740
Αριθμός υπεροξειδίων	ISO 3976
Λίπος πλην του λίπους γάλακτος	ISO 17678
Γευστικά χαρακτηριστικά	ISO 22935 μέρος 2 και 3 και πίνακας βαθμολόγησης κατωτέρω.

(¹) Η εφαρμοστέα μέθοδος εγκρίνεται από τον οργανισμό πληρωμών.

Πίνακας βαθμολόγησης

Όψη		Σύσταση		Οσμή και γεύση	
Βαθμοί	Παρατηρήσεις	Βαθμοί	Παρατηρήσεις	Βαθμοί	Παρατηρήσεις
5	Πολύ καλή Ιδεώδης τύπος Ύψιστη ποιότητα (όμοιο με ξηρό)	5	Πολύ καλή Ιδεώδης τύπος Ύψιστη ποιότητα (ιση προς επάλειψη)	5	Πολύ καλή Ιδεώδης τύπος Ύψιστη ποιότητα (τελείως καθαρή ευγενέ- στατη οσμή)
4	Καλή (χωρίς εμφανή ελαττώ- ματα)	4	Καλή (χωρίς εμφανή ελαττώ- ματα)	4	Καλή (χωρίς εμφανή ελαττώ- ματα)
1, 2 ή 3	Κάθε ελάττωμα	1, 2 ή 3	Κάθε ελάττωμα	1, 2 ή 3	Κάθε ελάττωμα»

2) Στο παράρτημα V παρεμβάλλεται το ακόλουθο μέρος Ια:

«ΜΕΡΟΣ Ια

Μέθοδοι ανάλυσης αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη για δημόσια παρέμβαση

Παράμετρος	Μέθοδος
Πρωτεΐνη	ISO 8968 μέρος 1
Λιπαρά	ISO 1736
Νερό	ISO 5537
Οξύτητα	ISO 6091
Γαλακτικά οξέα	ISO 8069
Δοκιμασία φωσφατάσης	ISO 11816 μέρος 1
Δείκτης αδιαλυτότητας	ISO 8156
Καμένα σωματίδια ⁽¹⁾	ADPI
Μικροοργανισμοί	ISO 4833-μέρος 1
Βουτυρόγαλα	Προσάρτημα I
Γλυκός ορός γάλακτος ⁽²⁾	Προσαρτήματα II και III
Όξινος ορός γάλακτος ⁽³⁾	ISO 8069 ή Επιτόπιες επιθεωρήσεις
Οργανοληπτικοί έλεγχοι ⁽⁴⁾	ISO 22935 μέρος 2 και 3

⁽¹⁾ Αναλύσεις καμένων σωματιδίων μπορούν να διεξάγονται συστηματικά. Ωστόσο, οι εν λόγω αναλύσεις διεξάγονται οπωσδήποτε εάν δεν πραγματοποιούνται οργανοληπτικοί έλεγχοι.

⁽²⁾ Η εφαρμοστέα μέθοδος εγκρίνεται από τον οργανισμό πληρωμών (μία ή δύο μέθοδοι).

⁽³⁾ Η εφαρμοστέα μέθοδος εγκρίνεται από τον οργανισμό πληρωμών.

⁽⁴⁾ Οι οργανοληπτικοί έλεγχοι διεξάγονται όταν κρίνεται αναγκαίο μετά από ανάλυση κινδύνου που έχει εγκριθεί από τον οργανισμό πληρωμών.

Προσάρτημα I

ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΣΕΡΙΝΗ ΚΑΙ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗ

Μέθοδος: υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανεστραμμένης φάσης

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

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

2. ΟΡΙΣΜΟΣ

Περιεκτικότητα σε PS + PE: το κλάσμα μάζας ουσίας το οποίο προσδιορίζεται με τη διαδικασία που ορίζεται στο παρόν παράρτημα. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε χλιοστόγραμμα διπάλμητικής φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PEDP) ανά 100 g σκόνης.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εκχύλιση αμινοφωσfolιπιδίων από ανασυσταθείσα σκόνη γάλακτος με μεθανόλη. Προσδιορισμός των PS και PE ως παραγώγων που σχηματίζονται με ο-φθαλοδιαλδεύδη (OPA), με HPLC ανεστραμμένης φάσης και ανίχνευση φθορισμού. Ποσοτικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας του δείγματος δοκιμής σε PS και PE με σύγκριση με πρότυπο δείγμα που περιέχει γνωστή ποσότητα PEDP.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια είναι αναγνωρισμένες αναλυτικής καθαρότητας. Εκτός αν ορίζεται διαφορετικά, το χρησιμοποιούμενο νερό είναι αποσταγμένο ή τουλάχιστον ισοδύναμης καθαρότητας.

4.1. **Πρότυπο υλικό: PEDP, καθαρότητας τουλάχιστον 99 %.**

Σημείωση: Το πρότυπο υλικό πρέπει να αποθηκεύεται σε - 18 °C.

4.2. **Αντιδραστήρια για την προετοιμασία του πρότυπου δείγματος και του δείγματος δοκιμής**

4.2.1. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC

4.2.2. Χλωροφόρμιο καθαρότητας HPLC

4.2.3. Υδροχλωρική θρυπταμίνη

4.3. **Αντιδραστήρια για σχηματισμό παραγώγων της ο-φθαλοδιαλδεύδης**

4.3.1. Υδροξείδιο του νατρίου, υδατικό διάλυμα 12 M

4.3.2. Βορικό οξύ, υδατικό διάλυμα 0,4 M, του οποίου το pH ρυθμίζεται στην τιμή 10,0 με υδροξείδιο του νατρίου (4.3.1)

4.3.3. 2-μερκαπτοαιθανόλη

4.3.4. ο-φθαλοδιαλδεύδη (OPA)

4.4. **Διαλύτες έκλυσης HPLC**

4.4.1. Οι διαλύτες έκλυσης παρασκευάζονται με αντιδραστήρια καθαρότητας HPLC.

4.4.2. Νερό καθαρότητας HPLC

4.4.3. Μεθανόλη ελεγμένης φθορισμομετρικής καθαρότητας

4.4.4. Τετραϋδροφουράνιο

4.4.5. Δισόξινο φωσφορικό νάτριο

4.4.6. Οξικό νάτριο

4.4.7. Οξικό οξύ.

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ
 - 5.1. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης 1 mg και αναγνωσιμότητα 0,1 mg
 - 5.2. Μεζούρες, με χωρητικότητα 25 και 100 ml
 - 5.3. Σιφόνια παροχής 1 και 10 ml
 - 5.4. Μαγνητικός αναδευτήρας
 - 5.5. Βαθμολογημένα σιφόνια παροχής 0,2, 0,5 και 5 ml
 - 5.6. Ογκομετρικά χωνιά, με χωρητικότητα 10, 50 και 100 ml
 - 5.7. Σύριγγες, χωρητικότητας 20 και 100 ml
 - 5.8. Λουτρό υπερήχων
 - 5.9. Φυγόκεντρος που λειτουργεί στα 27 000 × g
 - 5.10. Γυάλινα φιαλίδια χωρητικότητας περίπου 5 ml
 - 5.11. Ογκομετρικός κύλινδρος των 25 ml
 - 5.12. Πεχάμετρο με ακρίβεια 0,1 μονάδων pH
 - 5.13. Εξοπλισμός HPLC
 - 5.13.1. 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. Θερμαντήρας στήλης, ικανός να διατηρεί τη θερμοκρασία της στους 30 °C ± 1 °C
 - 5.13.4. Ανιχνευτής φθορισμού με δυνατότητα λειτουργίας σε μήκος κύματος διέγερσης 330 nm και μήκος κύματος εκπομπής 440 nm
 - 5.13.5. Ολοκληρωτής ή λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων με δυνατότητα μέτρησης εμβαδών κορυφών
 - 5.13.6. Στήλη LiChrospher® — 100 (διαστάσεις 250 × 4,6 mm) ή ισοδύναμη στήλη που έχει πληρωθεί με δεκαοκτυλοσιλάνιο (C 18), μεγέθους σωματιδίων 5 μm.
 6. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 707.
 7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
 - 7.1. Παρασκευή του διαλύματος εσωτερικού προτύπου
 - 7.1.1. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml (5.6) ζυγίζονται 30,0 ± 0,1 mg υδροχλωρικής θρυπταμίνης (4.2.3) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (4.2.1).
 - 7.1.2. Λαμβάνεται με σιφόνιο 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού, φέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (4.2.1), ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση θρυπταμίνης 0,15 mM.
 - 7.2. Παρασκευή του διαλύματος δείγματος δοκιμής
 - 7.2.1. Σε ποτήρι ζέσεως των 25 ml (5.2) ζυγίζονται 1,000 ± 0,001 g δείγματος ΑΓΣ. Προστίθενται 10 ml απεσταγμένου νερού θερμοκρασίας 40 °C ± 1 °C με σιφόνιο (5.3) και το σύνολο αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα (5.4) επί 30 λεπτά για να διαλυθούν οι σβώλοι
 - 7.2.2. Μεταγγίζονται με σιφόνιο 0,2 ml (5.5) του ανασυσταθέντος γάλακτος σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6), προστίθενται 100 μl διαλύματος θρυπταμίνης 0,15 mM (7.1) με τη βοήθεια σύριγγας (5.7) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Το σύνολο αναμειγνύεται προσεκτικά με αναστροφή και υποβάλλεται σε κατεργασία με υπερήχους (5.8) επί 15 λεπτά
 - 7.2.3. Ακολουθεί φυγόκεντρωση (5.9) στα 27 000 g × επί 10 λεπτά και συλλογή του υπερκευμένου σε γυάλινο φιαλίδιο (5.10)
- Σημείωση: Το διάλυμα του υπό δοκιμή δείγματος πρέπει να αποθηκεύεται σε 4 °C έως τη διενέργεια της ανάλυσης HPLC.

7.3. Παρασκευή του διαλύματος εξωτερικού προτύπου

- 7.3.1. Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (5.6) ζυγίζονται 55,4 mg PEDP (4.1) και προστίθενται περίπου 25 ml χλωροφορμίου (4.2.2) με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου (5.11). Η φιάλη πωματίζεται, θερμαίνεται στους $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ και το περιεχόμενο αναμειγνύεται προσεκτικά μέχρι να διαλυθεί η PEDP. Η φιάλη ψύχεται στους $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1) και το περιεχόμενο αναμειγνύεται με αναστροφή
- 7.3.2. Μεταγγίζεται με σιφόνιο 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml (5.6) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Μεταγγίζεται με σιφόνιο 1 ml (5.3) του διαλύματος αυτού σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6), προστίθενται 100 μl (5.7) διαλύματος θρυπταμίνης 0,15 mM (7.1) και συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη (4.2.1). Το σύνολο αναμειγνύεται με αναστροφή

Σημείωση: Το πρότυπο διάλυμα δείγματος πρέπει να αποθηκεύεται σε $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη διενέργεια της ανάλυσης HPLC.

7.4. Παρασκευή του αντιδραστήριου σχηματισμού παραγώγων

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml (5.6) ζυγίζονται $25,0 \pm 0,1$ mg OPA (4.3.4), προστίθενται 0,5 ml (5.5) μεθανόλης (4.2.1) και το σύνολο αναμειγνύεται προσεκτικά για να διαλυθεί η OPA. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με διάλυμα βορικού οξέος (4.3.2) και προστίθενται 20 μl 2-μερκαπτοαιθανόλης (4.3.3) με σύριγγα (5.7).

Σημείωση: Το αντιδραστήριο σχηματισμού παραγώγων πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε σκοτεινόχρωμο γυάλινο φιαλίδιο και είναι σταθερό επί μία εβδομάδα.

7.5. Προσδιορισμός με HPLC**7.5.1. Διαλύτες έκλουσης (4.4)**

Διαλύτης A: Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου 0,3 mM και οξικού νατρίου 3 mM (με pH ρυθμισμένο στην τιμή $6,5 \pm 0,1$ με οξικό οξύ): μεθανόλη: τετραϋδροφουράνιο = 558:440:2 (v/v/v)

Διαλύτης B: Μεθανόλη

7.5.2. Προτεινόμενη βαθμίδωση της έκλουσης:

Χρόνος (λεπτά)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Ταχύτητα ροής (ml/min)
Αρχική	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Σημείωση: Ενδέχεται να απαιτηθεί ελαφρά τροποποίηση της βαθμίδωσης της έκλουσης για να επιτευχθεί η διαχωριστική ικανότητα που εμφανίζεται στο σχήμα 1.

Θερμοκρασία στήλης: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.5.3. Όγκος έγχυσης: 50 ml αντιδραστηρίου σχηματισμού παραγώγων και 50 ml διαλύματος δείγματος

7.5.4. Εξισορρόπηση της στήλης

Με εκκίνηση του συστήματος σε καθημερινή βάση, εκπλύνεται η στήλη με 100 % διαλύτη Β επί 15 λεπτά, στη συνέχεια ρυθμίζεται σε λόγο Α:Β = 40:60 και εξισορροπείται σε ταχύτητα ροής 1 ml/min επί 15 λεπτά. Εκτελείται τυφλή μέτρηση με έγχυση μεθανόλης (4.2.1).

Σημείωση: Πριν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, η στήλη υποβάλλεται σε έκπλυση με μεθανόλη: χλωροφόρμιο = 80:20 (v/v) επί 30 λεπτά.

7.5.5. Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος δοκιμής σε PS + PE.

7.5.6. Η σειρά των χρωματογραφικών αναλύσεων εκτελείται με τήρηση σταθερού χρόνου μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων, ώστε να επιτυγχάνονται σταθεροί χρόνοι κατακράτησης. Ανά 5-10 διαλύματα δείγματος δοκιμής, εισάγεται το διάλυμα εξωτερικού προτύπου (7.3) για τον υπολογισμό του συντελεστή απόκρισης

Σημείωση: Ανά 20-25 μετρήσεις, η στήλη πρέπει να καθαρίζεται με έκπλυση με 100 % διαλύτη Β (7.5.1) επί 30 λεπτά τουλάχιστον.

7.6. Τρόπος ολοκλήρωσης

7.6.1. Κορυφή της PEDP

Η PEDP εκλούεται ως μία και μόνο κορυφή. Προσδιορίζεται το εμβαδόν της κορυφής με ολοκλήρωση μεταξύ των “κοιλιάδων”.

7.6.2. Κορυφή της θρυπταμίνης

Η θρυπταμίνη εκλούεται ως μία και μόνο κορυφή (σχήμα 1). Προσδιορίζεται το εμβαδόν της κορυφής με ολοκλήρωση μεταξύ των “κοιλιάδων”.

7.6.3. Ομάδες κορυφών PS και PE

Υπό τις περιγραφόμενες συνθήκες (σχήμα 1), η PS εκλούεται ως δύο κύριες, εν μέρει μη διαχωρισμένες κορυφές, των οποίων προηγείται μία ελάσσων κορυφή. Η PE εκλούεται ως τρεις κύριες, εν μέρει μη διαχωρισμένες κορυφές. Προσδιορίζεται το συνολικό εμβαδόν κάθε ομάδας κορυφών με χάραξη της γραμμής βάσης όπως εμφανίζεται στο σχήμα 1.

8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

$$C = 55,36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$$

όπου:

C = η περιεκτικότητα του δείγματος δοκιμής σε PS ή PE (mg/100 g σκόνης)

A₁ = το εμβαδόν της κορυφής της PEDP του διαλύματος πρότυπου δείγματος (7.3)

A₂ = το εμβαδόν της κορυφής της PS ή της PE του διαλύματος δείγματος δοκιμής (7.2)

T₁ = το εμβαδόν της κορυφής της θρυπταμίνης του διαλύματος πρότυπου δείγματος (7.3)

T₂ = το εμβαδόν της κορυφής της θρυπταμίνης του διαλύματος δείγματος δοκιμής (7.2).

9. ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σημείωση: Οι τιμές επαναληψιμότητας υπολογίστηκαν σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο IDF (*).

9.1. Επαναληψιμότητα

Η σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας, η οποία εκφράζει τη μεταβλητότητα των ανεξάρτητων αναλυτικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον ίδιο χειριστή με χρήση των ίδιων οργάνων υπό τις ίδιες συνθήκες, με πανομοιότυπο δείγμα δοκιμής και σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 2 %. Σε περίπτωση δύο προσδιορισμών υπό τις συνθήκες αυτές, η σχετική διαφορά μεταξύ των δύο αποτελεσμάτων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 6 % του αριθμητικού μέσου των αποτελεσμάτων.

9.2. Αναπαραγωγιμότητα

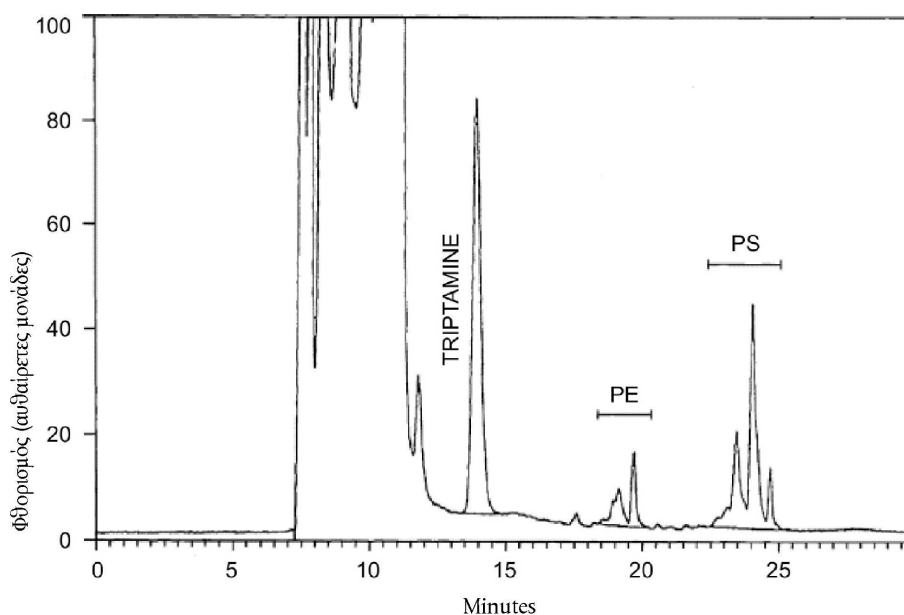
Σε περίπτωση δύο προσδιορισμών από χειριστές διαφορετικών εργαστηρίων, με διαφορετικά όργανα υπό διαφορετικές συνθήκες για την ανάλυση του ίδιου δείγματος δοκιμής, η σχετική διαφορά μεταξύ των δύο αποτελεσμάτων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 11 % του αριθμητικού μέσου των αποτελεσμάτων.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids". *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 39,395 (1988).

Σχήμα 1

Δείγμα χρωματογραφήματος HPLC των σχηματιζόμενων με OPA παραγών φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) σε μεθανολικό εκχύλισμα ανασυσταθείσας σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος. Αναφέρεται ο τρόπος ολοκλήρωσης για τις κορυφές των PS, PE και θρυπταμίνης (εσωτερικό πρότυπο)



Προσάρτημα II

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

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

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

2. ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

Διεθνές πρότυπο ISO 707 — Γάλα και προϊόντα γάλακτος — Οδηγίες δειγματοληψίας.

3. ΟΡΙΣΜΟΣ

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

4. ΑΡΧΗ

- Ανασύσταση του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη, απομάκρυνση του λίπους και των πρωτεϊνών με τη βοήθεια τριχλωροξικού οξέος και φυγοκέντρηση ή διήθηση
- Ποσοτικός προσδιορισμός των καζεΐνομακροπεπτιδίων (CMP) στο υπερκείμενο με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)
- Αξιολόγηση του αποτελέσματος που προκύπτει για τα δείγματα με σύγκριση με πρότυπα δείγματα, τα οποία συνίστανται από αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη με ή χωρίς προσθήκη γνωστής εκατοστιαίας αναλογίας ορού γάλακτος σε σκόνη.

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

5.1. Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος

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

5.2. Διάλυμα έκλυσης, pH 6,0

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

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

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

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

5.3. Διαλύτης έκπλυσης

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

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

5.4. Πρότυπα δείγματα

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

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

6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ
 - 6.1. Αναλυτικός ζυγός
 - 6.2. Προαιρετικά, φυγόκεντρος ικανή να επιτυγχάνει φυγόκεντρο δύναμη 2 200 g, εφοδιασμένη με πωματισμένους σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml περίπου
 - 6.3. Μηχανικό τάρακτρο
 - 6.4. Μαγνητικός αναδευτήρας
 - 6.5. Γυάλινες χοάνες, διαμέτρου περίπου 7 cm
 - 6.6. Χάρτινοι ηθμοί μέσης διηθητικής ικανότητας, διαμέτρου περίπου 12,5 cm
 - 6.7. Γυάλινη συσκευή διήθησης, εφοδιασμένη με διηθητική μεμβράνη διαμέτρου πόρων 0,45 μm
 - 6.8. Βαθμολογημένα σιφόνια παροχής 10 ml (ISO 648, κατηγορίας A ή ISO/R 835) ή σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 10,0 ml σε δύο λεπτά
 - 6.9. Σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 20,0 ml νερού θερμοκρασίας περίπου 50 °C
 - 6.10. Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 25 ± 0,5 °C
 - 6.11. Εξοπλισμός HPLC, ο οποίος περιλαμβάνει:
 - 6.11.1. Αντλία
 - 6.11.2. Σύστημα έγχυσης, χειροκίνητο ή αυτόματο, χωρητικότητας 15 έως 30 μl
 - 6.11.3. Δύο στήλες TSK 2 000-SW εν σειρά (μήκος 30 cm, εσωτερική διάμετρος 0,75 cm) ή ισοδύναμες στήλες (π.χ. μία TSK 2 000-SWx1 και μία Agilent Technologies Zorbax GF 250) και μια προστήλη (3 cm × 0,3 cm) με υλικό πλήρωσης I 125 ή υλικό ισοδύναμης αποτελεσματικότητας
 - 6.11.4. Θερμοστατούμενο κλίβανο στήλης, ρυθμισμένο στους 35 ± 1 °C
 - 6.11.5. Ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος, με δυνατότητα μετρήσεων στα 205 nm, με ευαισθησία 0,008 Å
 - 6.11.6. Ολοκληρωτή με δυνατότητα ολοκλήρωσης μεταξύ των “κοιλιάδων” του χρωματογραφήματος
Σημείωση: Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες που διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αλλά η διαχωριστική τους ικανότητα είναι κατά τι μικρότερη. Στην περίπτωση αυτή, οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας κατά την ίδια σειρά αναλύσεων πρέπει να είναι μικρότερες από ± 5 °C.
7. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ
 - 7.1. Η δειγματοληψία εκτελείται με τη διαδικασία που καθορίζεται στο διεθνές πρότυπο ISO 707. Τα κράτη μέλη μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιούν άλλη μέθοδο δειγματοληψίας, εφόσον αυτή είναι σύμφωνη με τις αρχές του προαναφερόμενου προτύπου.
 - 7.2. Το δείγμα φυλάσσεται σε συνθήκες που αποκλείουν τη φθορά ή τη μεταβολή της σύστασης
8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
 - 8.1. Παρασκευή του δείγματος δοκιμής
Η σκόνη γάλακτος μεταφέρεται σε δοχείο χωρητικότητας περίπου διπλάσιας του όγκου της σκόνης, εφοδιασμένο με αεροστεγές πώμα. Το δοχείο πωματίζεται αμέσως. Η σκόνη γάλακτος αναμειγνύεται πλήρως με επανειλημμένες αναστροφές του δοχείου.
 - 8.2. Τμήμα δείγματος δοκιμής
Σε σωλήνα φυγοκέντρου (6.2) ή κατάλληλη φιάλη με πώμα (50 ml) ζυγίζονται 2,000 ± 0,001 g δείγματος δοκιμής.
 - 8.3. Απομάκρυνση του λίπους και των πρωτεϊνών
 - 8.3.1. Στο τμήμα δείγματος προστίθενται 20,0 ml θερμού νερού (50 °C). Διαλύεται η σκόνη με ανακίνηση επί πέντε λεπτά σε μηχανικό τάρακτρο (6.3). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο (6.10) και αφήνεται να αποκτήσει ισορροπία στους 25 °C.

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

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

8.4. Χρωματογραφικός προσδιορισμός

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

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

Σημείωση 2. Σε κάθε διακοπή εκπλύνονται οι στήλες με νερό. Δεν πρέπει ποτέ να παραμένει σε αυτές το διάλυμα έκλυσης (5.2).

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

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

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

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

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

A _{II} :	εμβαδόν της κορυφής II,
A _{III} :	εμβαδόν της κορυφής III,

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

Σε περίπτωση αμφιβολίας επαναλαμβάνεται η ανάλυση.

8.5. Βαθμονόμηση

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

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

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

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

9. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

9.1. Μέθοδος υπολογισμού και τύπος

9.1.1. Υπολογισμός των συντελεστών απόκρισης R:

Κορυφή II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
------------	----------------------------

όπου:

R_{II} = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής II,

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

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

όπου:

- R_{III} = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής III,
 $A_{III}[0]$ and $A_{III}[5]$ = τα εμβαδά των κορυφών III των πρότυπων δειγμάτων [0] και [5], αντίστοιχα, που λαμβάνονται στο σημείο 8.5.3,
 W = η ποσότητα ορού γάλακτος που περιέχεται στο πρότυπο δείγμα [5], δηλαδή 5.

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

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

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

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

όπου:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = τα σχετικά εμβαδά των κορυφών II, III και IV, αντίστοιχα, του δείγματος [E],
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = τα εμβαδά των κορυφών II και III, αντίστοιχα, του δείγματος [E], που λαμβάνονται στο σημείο 8.4.2,
 R_{II} , R_{III} = οι συντελεστές απόκρισης που υπολογίζονται στο σημείο 9.1.1.

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

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E]) / (RT_{III}[5])$$

όπου:

- $RRT_{III}[E]$ = ο σχετικός χρόνος κατακράτησης της κορυφής III του δείγματος [E],
 $RT_{III}[E]$ = ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής III του δείγματος [E] που λαμβάνεται στο σημείο 8.4.2,
 $RT_{III}[5]$ = ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής III του δείγματος ελέγχου [5] που λαμβάνεται στο σημείο 8.5.3.

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

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

Η επιτρεπόμενη αβεβαιότητα για τις τιμές του RRT_{III} είναι ± 0,002.

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

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

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

όπου:

- W = η κατά μάζα (m/m) εκατοστιαία αναλογία γλυκού ορού γάλακτος στο δείγμα [E].
 $S_{III}[E]$ = το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III του δείγματος δοκιμής [E], που λαμβάνεται στο σημείο 9.1.2.
1,3 = αντιπροσωπεύει το σχετικό μέσο εμβαδόν της κορυφής III, εκφραζόμενο σε γραμμάρια γλυκού ορού γάλακτος ανά 100 g, όπως προσδιορίζεται σε ανόθευτο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη ποικίλης προέλευσης. Η τιμή αυτή έχει προκύψει πειραματικά.
 $S_{III}[0]$ = αντιπροσωπεύει το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, που ισούται με $R_{III} \times A_{III}[0]$. Οι τιμές αυτές λαμβάνονται στα σημεία 9.1.1 και 8.5.3, αντίστοιχα.
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ = αντιπροσωπεύει τη διόρθωση του σχετικού μέσου εμβαδού 1,3, σε περίπτωση που το $S_{III}[0]$ δεν ισούται με 0,9. Η πειραματική τιμή του σχετικού μέσου εμβαδού της κορυφής III του δείγματος ελέγχου [0] είναι 0,9.

9.3. **Ορθότητα της διαδικασίας**9.3.1. *Επαναληψιμότητα*

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

9.3.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

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

9.4. **Ερμηνεία**9.4.1. *Τεκμαίρεται η απουσία ορού γάλακτος εάν το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, S_{III} [E], εκφραζόμενο σε γραμμάρια γλυκού ορού γάλακτος ανά 100 γραμμάρια προϊόντος, είναι $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$*

όπου

2,0	η μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή για το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, λαμβάνοντας υπόψη το σχετικό μέσο εμβαδόν της κορυφής III, δηλαδή 1,3, την αβεβαιότητα που οφείλεται σε διακυμάνσεις της σύστασης της σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (9.3.2),
$(S_{III}[0] - 0,9)$	η διόρθωση σε περίπτωση που το εμβαδόν $S_{III}[0]$ διαφέρει από την τιμή 0,9 (βλέπε σημείο 9.2)

9.4.2. *Εάν το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, S_{III} [E], είναι $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ και το σχετικό εμβαδόν της κορυφής II, S_{II} [E], είναι ≤ 160 , προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε γλυκό ορό γάλακτος σύμφωνα με το σημείο 9.2.*9.4.3. *Εάν το σχετικό εμβαδόν της κορυφής III, S_{III} [E], είναι $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ και το σχετικό εμβαδόν της κορυφής II, S_{II} [E], είναι ≤ 160 , προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες (P %)· στη συνέχεια εξετάζονται οι γραφικές παραστάσεις 1 και 2.*9.4.3.1. *Τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση δειγμάτων ανόθευτου αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη με υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες συγκεντρώνονται στις γραφικές παραστάσεις 1 και 2.*

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

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

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

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

όπου:

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

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

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

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

Η απόκλιση (T_1 και T_2) μεταξύ της σχετικής επιφάνειας S_{III} [E] και της σχετικής επιφάνειας S_{II} 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 και/ή T_2 είναι ίση με το μηδέν ή κατώτερη, δεν είναι δυνατόν να διαπιστωθεί η παρουσία γλυκού ορού γάλακτος.

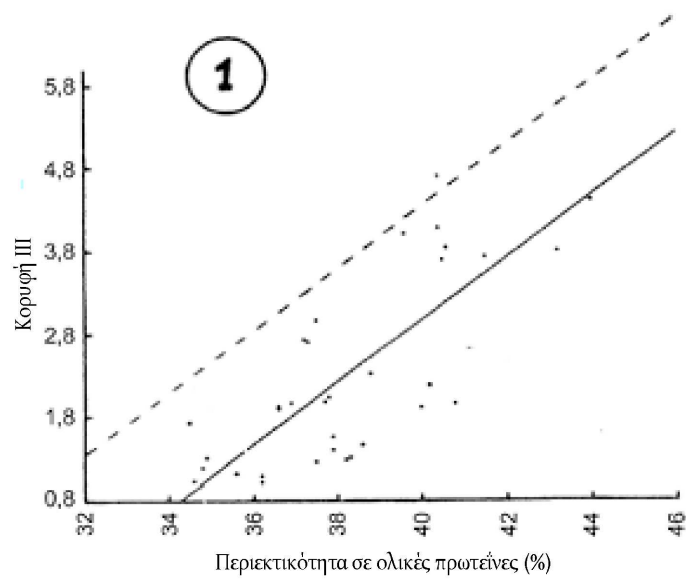
Εάν T_1 και T_2 είναι μεγαλύτερες του μηδενός, συμπεραίνεται παρουσία γλυκού ορού γάλακτος.

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

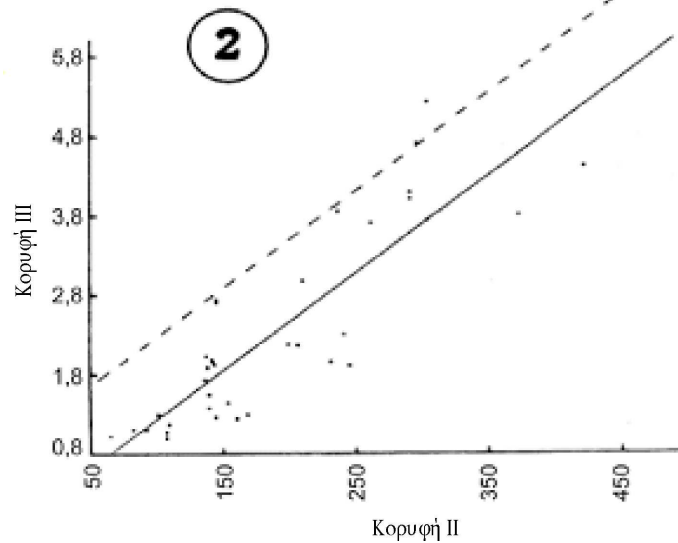
όπου:

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

Αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη



Αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη



Προσάρτημα III

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (ΤΥΡΟΓΑΛΑ ΠΥΤΙΑΣ) ΣΤΟ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

1. ΣΚΟΠΟΣ: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΟ ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΣΚΟΝΗ
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΡΟΤΥΠΟ ISO 707
3. ΟΡΙΣΜΟΣ
Η περιεκτικότητα σε στερεό υπόλειμμα γλυκού ορού γάλακτος ορίζεται ως η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία που προσδιορίζεται μέσω της περιεκτικότητας σε καζεΐνομακροπεπτιδία η οποία προκύπτει από την περιγραφόμενη διαδικασία.
4. ΑΡΧΗ
Τα δείγματα υποβάλλονται σε ανάλυση για την ανίχνευση καζεΐνομακροπεπτιδίου Α με υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανεστραμμένης φάσης. Το αποτέλεσμα αξιολογείται με σύγκριση με πρότυπα δείγματα, τα οποία συνίστανται από αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη με ή χωρίς προσθήκη γνωστής εκατοστιαίας αναλογίας σκόνης ορού γάλακτος. Τα αποτελέσματα που υπερβαίνουν το 1 % (m/m) αποδεικνύουν την παρουσία στερεού υπολείμματος γλυκού ορού γάλακτος.
5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
Όλα τα αντιδραστήρια είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό είναι απεσταγμένο ή τουλάχιστον ισοδύναμης καθαρότητας. Το ακετονιτρίλιο πρέπει να είναι καθαρότητας φασματοσκοπικής ή HPLC.
 - 5.1. **Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος**
Διαλύονται 240 g τριχλωροξικού οξέος (CCl₃COOH) σε νερό και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml. Το διάλυμα πρέπει να είναι διαυγές και άχρωμο.
 - 5.2. **Διαλύματα έκλουσης Α και Β**
Διάλυμα έκλουσης Α: σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml φέρονται 150 ml ακετονιτρίλιου (CH₃CN), 20 ml ισοπροπανόλης (CH₃CHOHCH₃) και 1,00 ml τριφθοροξικού οξέος (CF₃COOH ή TFA). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό.
Διάλυμα έκλουσης Β: σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml φέρονται 550 ml ακετονιτρίλιου, 20 ml ισοπροπανόλης και 1,00 ml TFA. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό. Πριν χρησιμοποιηθεί, το διάλυμα έκλουσης διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm.
 - 5.3. **Διατήρηση της στήλης**
Μετά τις αναλύσεις η στήλη εκπλύνεται με το διάλυμα έκλουσης Β (με βαθμίδωση) και, στη συνέχεια, με ακετονιτρίλιο (με βαθμίδωση επί 30 λεπτά). Η στήλη φυλάσσεται σε ακετονιτρίλιο.
 - 5.4. **Πρότυπα δείγματα**
 - 5.4.1. Αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη το οποίο ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις για δημόσια αποθεματοποίηση (δηλαδή [0]).
 - 5.4.2. Το ίδιο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, νοθευμένο σε αναλογία 5 % (m/m) με σκόνη γλυκού ορού γάλακτος πρότυπης σύστασης (δηλαδή [5]).
 - 5.4.3. Το ίδιο αποκορυφωμένο γάλα σε σκόνη, νοθευμένο σε αναλογία 50 % (m/m) με σκόνη γλυκού ορού γάλακτος πρότυπης σύστασης (δηλαδή [50]).
6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ
 - 6.1. **Αναλυτικός ζυγός**
 - 6.2. Προαιρετικά, φυγόκεντρος ικανή να επιτυγχάνει φυγόκεντρο δύναμη 2 200 g, εφοδιασμένη με πωματισμένους σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml περίπου
 - 6.3. **Μηχανικό τάρακτρο**
 - 6.4. **Μαγνητικός αναδευτήρας**
 - 6.5. **Γυάλινες χοάνες, διαμέτρου περίπου 7 cm**

- 6.6. Χάρτινοι ηθμοί μέσης διηθητικής ικανότητας, διαμέτρου περίπου 12,5 cm
- 6.7. Γυάλινη συσκευή διήθησης, εφοδιασμένη με διηθητική μεμβράνη διαμέτρου πόρων 0,45 μm
- 6.8. Βαθμολογημένα σιφόνια παροχής 10 ml (ISO 648, κατηγορίας A ή ISO/R 835) ή σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 10,0 ml σε δύο λεπτά
- 6.9. Σύστημα διανομής ικανό να παρέχει 20,0 ml νερού θερμοκρασίας περίπου 50 °C
- 6.10. Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 25 ± 0,5 °C
- 6.11. **Εξοπλισμός HPLC, ο οποίος περιλαμβάνει:**
- 6.11.1. Σύστημα αντλίας διπλής βαθμίδωσης
- 6.11.2. Σύστημα έγχυσης, χειροκίνητο ή αυτόματο, χωρητικότητας 100 μl
- 6.11.3. Στήλη Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρος 0,46 cm) ή ισοδύναμη στήλη ανεστραμμένης φάσης από διοξείδιο του πυριτίου με ευρείς πόρους
- 6.11.4. Θερμοστατούμενο κλίβανο στήλης, ρυθμισμένο στους 35 ± 1 °C
- 6.11.5. Ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος, με δυνατότητα μετρήσεων στα 210 nm (εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερο μήκος κύματος, με ανώτατο όριο τα 220 nm), ευαισθησίας 0,02 AU
- 6.11.6. Ολοκληρωτή με δυνατότητα ρύθμισης της ολοκλήρωσης στην κοινή γραμμή βάσης ή μεταξύ των “κοιλιάδων” του χρωματογραφήματος
- Σημείωση: Είναι δυνατή η λειτουργία της στήλης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό τον όρο ότι η θερμοκρασία αυτή δεν παρουσιάζει διακυμάνσεις μεγαλύτερες του 1 °C, ειδώς ο χρόνος κατακράτησης του CMR_A παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα.

7. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

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

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

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

8.1. Παρασκευή του δείγματος δοκιμής

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

8.2. Τμήμα δείγματος δοκιμής

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

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

8.3. Απομάκρυνση του λίπους και των πρωτεϊνών

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

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

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

8.4. Χρωματογραφικός προσδιορισμός

- 8.4.1. Η μέθοδος HPLC ανεστραμμένης φάσης αποκλείει τη δυνατότητα ψευδοθετικών αποτελεσμάτων λόγω της παρουσίας σκόνης όξινου βουτυρογάλακτος.
- 8.4.2. Πριν από την ανάλυση με HPLC ανεστραμμένης φάσης, πρέπει να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες βαθμίδωσης. Για συστήματα βαθμίδωσης με νεκρό όγκο περίπου 6 ml (ο όγκος από το σημείο όπου συναντώνται οι διαλύτες μέχρι και τον όγκο του βρόχου του συστήματος έγχυσης), ο βέλτιστος χρόνος κατακράτησης είναι 26 ± 2 λεπτά για το CMP A. Στην περίπτωση των συστημάτων βαθμίδωσης με μικρότερο νεκρό όγκο (π.χ. 2 ml) πρέπει να χρησιμοποιούνται ως βέλτιστος χρόνος κατακράτησης τα 22 λεπτά

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

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

Πίνακας 1

Συνθήκες διερευνητικής βαθμίδωσης για τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφίας

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

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

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

Όπου:

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

10: το αρχικό % B της διερευνητικής βαθμίδωσης

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

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

26: απαιτούμενος χρόνος κατακράτησης για το CMP_A

6: λόγος των κλίσεων της διερευνητικής και της κανονικής βαθμίδωσης

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

27: χρόνος διαδρομής της διερευνητικής βαθμίδωσης.

8.4.3. Λήψη διαλυμάτων των δειγμάτων δοκιμής

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

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

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

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

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

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

Ο ολοκληρωτής (6.11.6) υπολογίζει αυτόματα το ύψος H της κορυφής του CMP_A . Σε κάθε χρωματογράφημα πρέπει να ελέγχεται η θέση της γραμμής βάσης. Εάν η γραμμή βάσης δεν βρίσκεται στη σωστή θέση, πρέπει να επαναλαμβάνεται η ανάλυση ή η ολοκλήρωση.

Σημείωση: Εάν η κορυφή του CMP_A είναι επαρκώς διαχωρισμένη από τις υπόλοιπες κορυφές, χρησιμοποιείται η γραμμή βάσης μεταξύ των "κοιλιάδων". Σε αντίθετη περίπτωση, φέρονται κάθετοι σε κοινή γραμμή βάσης, η οποία πρέπει να αρχίζει από ένα σημείο κοντά στην κορυφή του CMP_A (συνεπώς, όχι από το σημείο $t=0$ λεπτά!). Χρησιμοποιείται ο ίδιος τύπος ολοκλήρωσης για το πρότυπο δείγμα και για τα δείγματα δοκιμής και, στην περίπτωση της κοινής γραμμής βάσης, ελέγχεται η σταθερότητά της για τα δείγματα δοκιμής και το πρότυπο δείγμα.

Πριν από την ποσοτική ερμηνεία, είναι απαραίτητο να εξετάζεται η μορφή κάθε χρωματογράφηματος για να εντοπιστούν τυχόν ανωμαλίες που οφείλονται είτε σε ελαττωματική λειτουργία της συσκευής ή της στήλης είτε στην προέλευση και το είδος του αναλυθέντος δείγματος. Σε περίπτωση αμφιβολίας επαναλαμβάνεται η ανάλυση.

8.5. Βαθμονόμηση

- 8.5.1. Εφαρμόζεται κατά γράμμα στα πρότυπα δείγματα (5.4.1 έως 5.4.2) η διαδικασία που περιγράφεται στα σημεία 8.2 έως 8.4.4. Χρησιμοποιούνται διαλύματα που έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα, δεδομένου ότι τα CMP αποικοδομούνται σε περιβάλλον τριχλωροξικού οξέος 8 % σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στους 4 °C το διάλυμα παραμένει σταθερό επί 24 ώρες. Στην περίπτωση μακρών σειρών αναλύσεων είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται ένας ψυχόμενος δίσκος δειγμάτων στο αυτόματο σύστημα έγχυσης.

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

Το χρωματογράφημα του δείγματος αναφοράς [5] πρέπει να είναι ανάλογο με το σχήμα. 1. Στο σχήμα αυτό, πριν από την κορυφή του CMP_A εμφανίζονται δύο μικρές κορυφές. Είναι απαραίτητο να επιτυγχάνεται συγκρίσιμος διαχωρισμός.

- 8.5.2. Πριν από τον χρωματογραφικό προσδιορισμό στα δείγματα, εισάγονται 100 μl του προτύπου δείγματος χωρίς γλυκό ορό γάλακτος [0] (5.4.1)

Το χρωματογράφημα δεν πρέπει να παρουσιάζει κορυφή στον χρόνο κατακράτησης που αντιστοιχεί στην κορυφή του CMP_A .

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

9. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

9.1. Μέθοδος υπολογισμού και τύπος

- 9.1.1. Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης R:

$$\text{Κορυφή } CMP_A: R = W/H$$

Όπου:

R = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής του CMP_A

H = το ύψος της κορυφής του CMP_A

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

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

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

Όπου:

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

R = ο συντελεστής απόκρισης της κορυφής του CMP_A (9.1.1)

$H(E)$ = το ύψος της κορυφής του CMP_A του δείγματος (E)

Εάν η τιμή $W(E)$ υπερβαίνει το 1 % και η διαφορά μεταξύ του χρόνου κατακράτησης και του αντίστοιχου χρόνου του πρότυπου δείγματος [5] είναι μικρότερη από 0,2 λεπτά, το δείγμα περιέχει στερεό υπόλειμμα γλυκού ορού γάλακτος.

9.3. Ορθότητα της διαδικασίας

9.3.1. Επαναληψιμότητα

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

9.3.2. Αναπαραγωγιμότητα

Δεν έχει προσδιοριστεί.

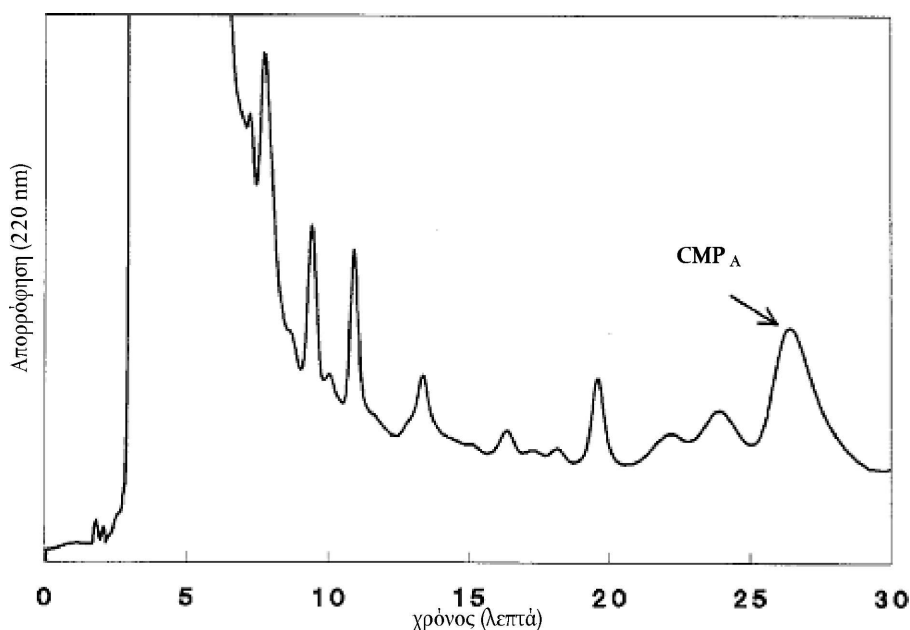
9.3.3. Γραμμικότητα

Στο πεδίο τιμών εκατοστιαίας αναλογίας γλυκού ορού γάλακτος 0 έως 16 % πρέπει να προκύπτει γραμμική σχέση με συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο του 0,99.

9.4. Ερμηνεία

Το όριο 1 % περιλαμβάνει την αβεβαιότητα λόγω αναπαραγωγιμότητας.

Σχήμα 1
πρότυπο δείγμα Ni -4.6



(*) International IDF-Standard 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure (Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Χαρακτηριστικά ακρίβειας των αναλυτικών μεθόδων. Συνοπτική περιγραφή διαδικασίας ομαδικής μελέτης).».

3) Προστίθενται τα ακόλουθα παραρτήματα:

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

Μέθοδοι ανάλυσης βουτύρου στο πλαίσιο ιδιωτικής αποθεματοποίησης

Παράμετρος	Μέθοδος
Λιπαρά ⁽¹⁾	ISO 17189 ή ISO 3727 μέρος 3
Νερό	ISO 3727 μέρος 1
Στερεά υπολείμματα χωρίς λίπος (εξαιρουμένου του αλατιού)	ISO 3727 μέρος 2
Αλάτι	ISO 15648

(¹) Η εφαρμοστέα μέθοδος εγκρίνεται από τον οργανισμό πληρωμών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

Μέθοδοι ανάλυσης αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη στο πλαίσιο ιδιωτικής αποθεματοποίησης

Παράμετρος	Μέθοδος
Λιπαρά	ISO 1736
Πρωτεΐνη	ISO 8968 μέρος 1
Νερό	ISO 5537

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII

Μέθοδοι ανάλυσης τυριών στο πλαίσιο ιδιωτικής αποθεματοποίησης

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

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

2. Για την ανίχνευση της καζείνης αγελαδινού γάλακτος στα τυριά που αναφέρονται στην παράγραφο 1, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται μέθοδοι υπό τους εξής όρους:
 - α) το μέγιστο όριο ανίχνευσης είναι 0,5 % και
 - β) δεν προκύπτουν ψευδοθετικά αποτελέσματα και
 - γ) η καζείνη αγελαδινού γάλακτος είναι ανιχνεύσιμη με την απαιτούμενη ευαισθησία, ακόμη και μετά από μακρές περιόδους ωρίμασης, οι οποίες μπορεί να παρατηρηθούν στις συνήθεις συνθήκες εμπορίας.

Εάν δεν ικανοποιείται οποιαδήποτε από τις προαναφερόμενες απαιτήσεις, χρησιμοποιείται η μέθοδος που καθορίζεται στο προσάρτημα.

Προσάρτημα

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

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

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

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

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

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

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

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

3.4. Αξιολόγηση του αποτελέσματος της χρώσης των γ₃- και γ₂-καζεϊνών (ένδειξη παρουσίας αγελαδινού γάλακτος) με σύγκριση του αποτελέσματος που προκύπτει από το δείγμα με εκείνα που προκύπτουν στην ίδια πηκτή από τα πρότυπα υλικά αναφοράς που περιέχουν αγελαδινό γάλα σε αναλογία 0 % και 1 %.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες αναλυτικής καθαρότητας, εκτός αντίθετων υποδείξεων. Το νερό είναι διασπασταγμένο ή ισοδύναμη καθαρότητας.

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

Ισοηλεκτρική εστίαση

4.1. Αντιδραστήρια για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδιου που περιέχουν ουρία

4.1.1. Μητρικό διάλυμα πηκτής

Διαλύονται σε νερό:

4,85 g ακρυλαμίδιου

0,15 g N, N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιου (BIS)

48,05 g ουρίας

15,00 g γλυκερίνης (87 % w/w),

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

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

4.1.2. Διάλυμα πηκτής

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

9,0 ml μητρικού διαλύματος

24 mg β-αλανίνης

500 ml αμφολύτη με pH 3,5-9,5

250 ml αμφολύτη με pH 5-7

250 ml αμφολύτη με pH 6-8

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

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

4.1.3. Διαλύματα καταλυτών

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

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

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

Σημείωση: Να χρησιμοποιείται πάντοτε πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα PER.

4.2. Λιπαντικό ρευστό

Κηροζίνη ή υγρή παραφίνη

4.3. Διάλυμα της ανόδου

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

4.4. Διάλυμα της καθόδου

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

Προετοιμασία του δείγματος

4.5. Αντιδραστήρια για την απομόνωση των πρωτεϊνών

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

4.5.2. Διχλωρομεθάνιο

4.5.3. Ακετόνη

4.6. Ρυθμιστικό διάλυμα για τη διάλυση πρωτεϊνών

Διαλύονται σε νερό

5,75 g γλυκερίνης (87 % w/w)

24,03 g ουρίας

250 mg διθειοθρεϊτόλης,

και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 ml.

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

4.7. Αντιδραστήρια για την πλασμιδόλυση των καζεϊνών**4.7.1. Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού αμμωνίου**

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

4.7.2. Βόειος πλασμίνη (EC. 3.4.21.7), δραστηκότητας τουλάχιστον 5 U/ml**4.7.3. Διάλυμα ε-αμινοκαπρονικού οξέος για αναστολή ενζύμου**

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

4.8. Πρότυπα υλικά

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

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

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

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

Αντιδραστήρια για τη χρώση των πρωτεϊνών**4.9. Αντιδραστήριο στερέωσης**

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

4.10. Διάλυμα αποχρωματισμού

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

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

4.11. Διαλύματα χρώσης**4.11.1. Διάλυμα χρώσης (μητρικό διάλυμα 1)**

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

4.11.2. Διάλυμα χρώσης (μητρικό διάλυμα 2)

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

4.11.3. Διάλυμα χρώσης (διάλυμα εργασίας)

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

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

5. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ
- 5.1. Γυάλινες πλάκες (διαστάσεις 265 × 125 × 4 mm), ελαστικός κύλινδρος (πλάτος 15 cm), τραπέζι οριζοντίωσης
- 5.2. Φύλλο συγκράτησης πηκτής (διαστάσεις 265 × 125 mm)
- 5.3. Φύλλο κάλυψης (διαστάσεις 280 × 125 mm). Σε κάθε μεγάλη πλευρά επικολλάται λωρίδα αυτοκόλλητης ταινίας διαστάσεων 280 × 6 × 0,25 mm (βλέπε σχήμα 1)
- 5.4. Θάλαμος ηλεκτροεστίασης με ψυκτική πλάκα (π.χ. 265 × 125 mm) και κατάλληλο τροφοδοτικό (τάσης ≥ 2,5 kV) ή αυτόματη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- 5.5. Κρυστάτης κυκλοφορίας, ρυθμισμένος στους 12 ± 0,5 °C
- 5.6. Φυγόκεντρος, ρυθμιζόμενη σε 3 000 g
- 5.7. Ταινίες ηλεκτροδίων (μήκος ≥ 265 mm)
- 5.8. Πλαστικές σταγονομετρικές φιάλες για το διάλυμα της ανόδου και της καθόδου
- 5.9. Εφαρμογείς δείγματος (διαστάσεις 10 × 5 mm, διηθητικός χάρτης βισκόζης ή χαμηλής προσρόφησης πρωτεϊνών)
- 5.10. Τρυβλία χρώσης και αποχρωματισμού από ανοξειδωτο χάλυβα ή γυαλί (π.χ. δίσκοι οργάνων, διαστάσεων 280 × 150 mm)
- 5.12. Ρυθμιζόμενος ομοιογενοποιητής με ράβδο (διάμετρος ατράκτου 10 mm), που λειτουργεί στις 8 000 έως 20 000 rpm
- 5.13. Μαγνητικός αναδευτήρας
- 5.14. Λουτρό υπερήχων
- 5.15. Συγκολλητής μεμβράνης
- 5.16. Μικροσιφόνια των 25 μl
- 5.17. Συμπυκνωτής κενού ή συσκευή λυοφιλίωσης
- 5.18. Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο ρυθμιζόμενο στους 35 και 40 ± 1 °C με τάρακτρο
- 5.19. Πυκνόμετρο για μήκος κύματος λ = 634 nm

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1. Προετοιμασία του δείγματος

6.1.1. Απομόνωση καζεϊνών

Σε σωλήνα φυγόκεντρου των 100 ml ζυγίζεται ποσότητα ισοδύναμη με 5 g ξηρής μάζας τυριού ή προτύπων υλικών αναφοράς, προστίθενται 60 ml απεσταγμένου νερού και το σύνολο ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή με ράβδο (8 000 έως 10 000 rpm). Ρυθμίζεται το pH σε 4,6 με αραιό οξικό οξύ (4.5.1) και ακολουθεί φυγόκεντρωση (5 λεπτά, 3 000 g). Το λίπος και ο ορός αποχύνονται, το υπόλειμμα ομογενοποιείται στις 20 000 rpm με 40 ml απεσταγμένου νερού του οποίου το pH έχει ρυθμιστεί σε 4,5 με αραιό οξικό οξύ (4.5.1), προστίθενται 20 ml διχλωρομεθανίου (4.5.2) και ακολουθεί νέα ομογενοποίηση και φυγόκεντρωση (5 λεπτά, 3 000 g). Αφαιρείται με στάπυλα η σταβάδα της καζεΐνης που επιπλέει μεταξύ της υδατικής και της οργανικής φάσης (βλέπε σχήμα 2) και απορρίπτονται οι δύο αυτές φάσεις. Η καζεΐνη ομογενοποιείται εκ νέου με 40 ml απεσταγμένου νερού (βλέπε ανωτέρω) και 20 ml διχλωρομεθανίου (4.5.2) και φυγοκεντρείται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου και οι δύο εκχυλιστικές φάσεις είναι άχρωμες (2 έως 3 φορές). Το πρωτεϊνικό υπόλειμμα ομογενοποιείται με 50 ml ακετόνης (4.5.3) και διηθείται μέσω πτυχωτού χάρτινου ηθμού μεσαίας ταχύτητας. Το υπόλειμμα εκπλύνεται πάνω στον ηθμό δύο φορές με 25 ml ακετόνης κάθε φορά, αφήνεται να ξηρανθεί στον αέρα ή σε ρεύμα αζώτου και κατόπιν κονιοποιείται σε γουδί.

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

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

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

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

6.2. Παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμιδίου που περιέχουν ουρία

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

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

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

6.3. Ισοηλεκτρική εστίαση

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

Συνθήκες ισοηλεκτρικής εστίασης:

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

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

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

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

- 6.3.2. Παράδειγμα προγραμματισμού τάσης για αυτόματη συσκευή ηλεκτροφόρησης (2 πηκτές διαστάσεων $5,0 \times 4,5 \text{ cm}$) με ηλεκτρόδια που εφαρμόζονται κατευθείαν στην πηκτή, χωρίς ταινίες ηλεκτροδίων

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

Ο εφαρμογέας δείγματος τοποθετείται στο στάδιο 2 στις 0 Vh.

Ο εφαρμογέας δείγματος απομακρύνεται στο στάδιο 2 στις 30 Vh.

6.4. Χρώση πρωτεϊνών

6.4.1. Στερέωση πρωτεϊνών

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

6.4.2. Έκπλυση και χρώση της πλάκας της πηκτής

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

6.4.3. Αποχρωματισμός της πλάκας της πηκτής

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

Σημείωση 1: Η στερέωση, η έκπλυση, η χρώση και ο αποχρωματισμός εκτελούνται σε θερμοκρασία 20 °C.

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

7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

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

7.1. Οπτική εκτίμηση

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

7.2. Πυκνομετρικός υπολογισμός

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

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

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

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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).

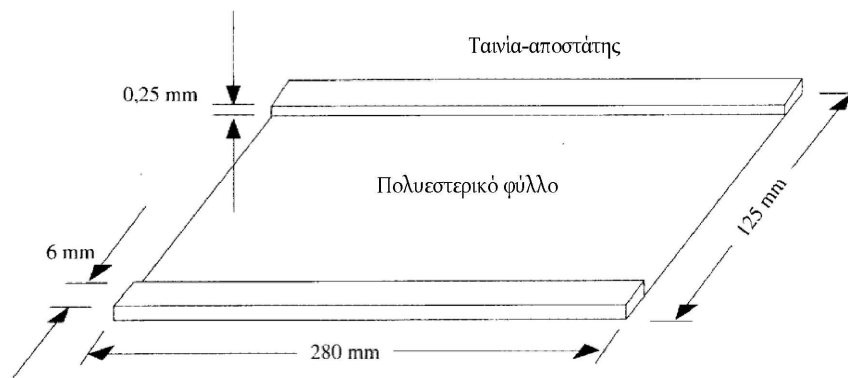
Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393,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

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

Radola 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).

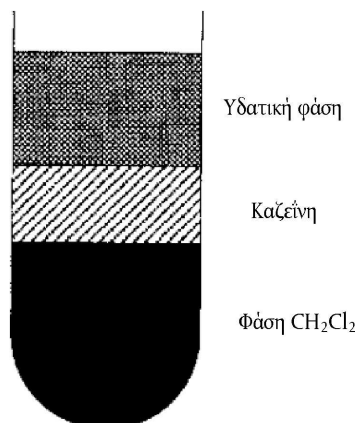
Σχήμα 1

Σχεδιάγραμμα του φύλλου κάλυψης



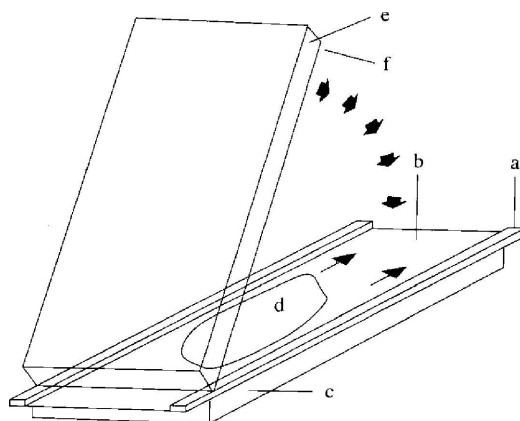
Σχήμα 2

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



Σχήμα 3

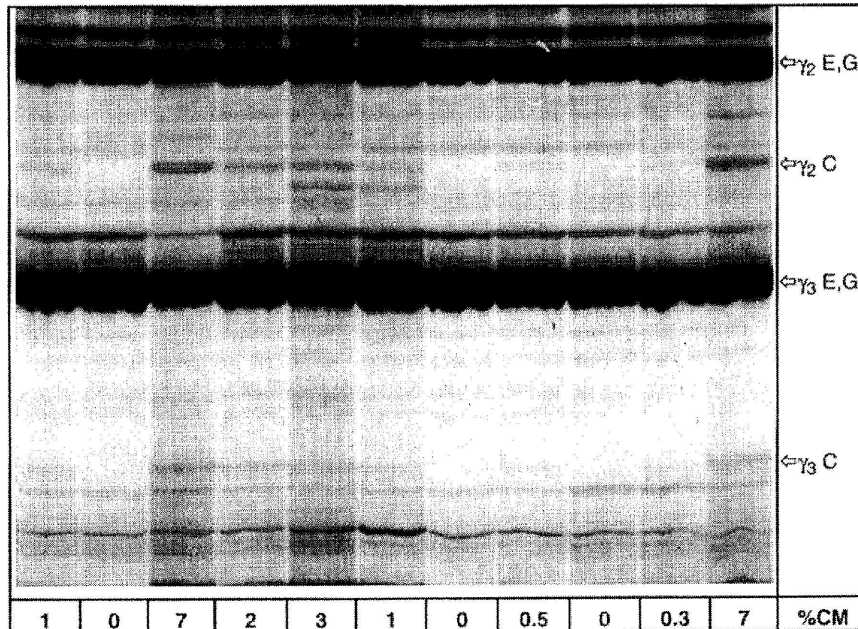
Τεχνική επικάλυψης για στρώση υπέρλεπτων πηκτών πολυακρυλαμιδίου



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

Σχήμα 4α

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

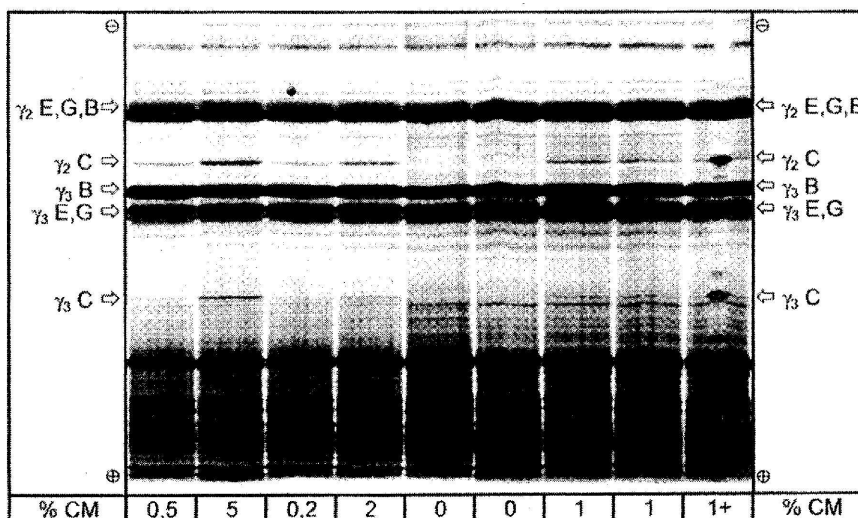


% CM = εκατοστιαία αναλογία αγελαδινού γάλακτος, C = αγελάδων, E = προβάτων, G = αιγών

Απεικονίζεται το άνω ήμισυ της πηκτής της IEF.

Σχήμα 4β

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

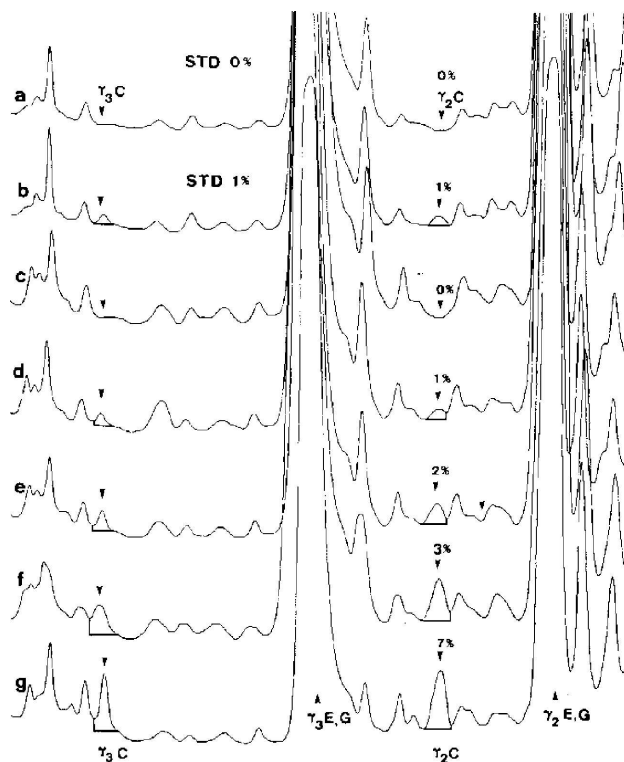


% CM = εκατοστιαία αναλογία αγελαδινού γάλακτος· 1+ = δείγμα που περιέχει αγελαδινό γάλα σε αναλογία 1 % και εμπλουτίστηκε με καθαρή βόεια καζεΐνη στο μέσο της διαδρομής, C = αγελάδων, E = προβάτων, G = αιγών, B = βουβάλων.

Απεικονίζεται η συνολική απόσταση διαχωρισμού της πηκτής της IEF.

Σχήμα 5

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



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

Το άνω ήμισυ της πηκτής της IEF σαρώθηκε σε μήκος κύματος $\lambda = 634 \text{ nm}$.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΧ

Αξιολόγηση των αναλύσεων**1. Διασφάλιση ποιότητας**

Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται από εργαστήρια που ορίζονται σύμφωνα με το άρθρο 12 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 882/2004 (**), ή που ορίζονται από τις αρμόδιες αρχές του κράτους μέλους.

2. Δειγματοληψία και αμφισβήτηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων

1. Η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με τη σχετική νομοθετική ρύθμιση για το εξεταζόμενο προϊόν. Εάν δεν προβλέπονται ρητά διατάξεις περί δειγματοληψίας, τότε ισχύουν οι διατάξεις που ορίζονται στο πρότυπο ISO 707, Γάλα και προϊόντα γάλακτος — Οδηγίες δειγματοληψίας.
2. Οι εκθέσεις του εργαστηρίου σχετικά με τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να περιέχουν επαρκή στοιχεία για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με το προσάρτημα.
3. Για τις αναλύσεις που απαιτούνται βάσει των κοινοτικών διατάξεων λαμβάνονται διπλά δείγματα.
4. Σε περίπτωση διαφοράς όσον αφορά τα αποτελέσματα, ο οργανισμός πληρωμών υποβάλλει εκ νέου το εν λόγω προϊόν στην αναγκαία ανάλυση και οι σχετικές δαπάνες βαρύνουν τον ηττηθέντα.

Η ανωτέρω ανάλυση πραγματοποιείται υπό τον όρο ότι υπάρχουν σφραγισμένα διπλά δείγματα του προϊόντος τα οποία φυλάσσονται καταλλήλως στην αρμόδια αρχή. Ο κατασκευαστής υποβάλλει αίτημα στον οργανισμό πληρωμών για διενέργεια της ανάλυσης εντός 7 εργάσιμων ημερών από την κοινοποίηση των αποτελεσμάτων της πρώτης ανάλυσης. Η ανάλυση διεξάγεται από τον οργανισμό πληρωμών εντός 21 εργάσιμων ημερών από την παραλαβή του αιτήματος.

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

Προσάρτημα

Αξιολόγηση της συμμόρφωσης φορτίων με το νομοθετικά κατοχυρωμένο όριο

1. Αρχή

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

2. Η μέθοδος έχει επικυρωθεί με διεθνή συνεργασία

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

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

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

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

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

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

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

σε αντίθετη περίπτωση, θεωρείται σύμφωνο με το UL.

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

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

σε αντίθετη περίπτωση, θεωρείται σύμφωνο με το LL.

3. Εσωτερική επικύρωση, με υπολογισμό της τυπικής απόκλισης σε συνθήκες εσωτερικής αναπαραγωγιμότητας

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

Οι κανόνες που πρέπει να ακολουθούνται για τον καθορισμό της συμμόρφωσης με το νομοθετικά κατοχυρωμένο όριο ορίζονται στο σημείο 1. Εάν ωστόσο κριθεί ότι το φορτίο δεν είναι σύμφωνο με το νομοθετικά κατοχυρωμένο όριο, οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται με τη μέθοδο που καθορίζεται στον παρόντα κανονισμό και το αποτέλεσμα αξιολογείται σύμφωνα με το σημείο 1.

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

(**) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, για τη διενέργεια επίσημων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων (ΕΕ L 165 της 30.4.2004, σ. 1).».