

385R0718

Nº L 78/14

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

21. 3. 85

REGLAMENTO (CEE) Nº 718/85 DE LA COMISIÓN

de 20 de marzo de 1985

por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 625/78 relativo a las modalidades de almacenamiento público de leche desnatada en polvo

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento (CEE) nº 804/68 del Consejo, de 27 de junio de 1968, por el que se establece una organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos ⁽¹⁾, modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) nº 1557/84 ⁽²⁾, y, en particular, el apartado 5 de su artículo 7,

Considerando que el Anexo I del Reglamento (CEE) nº 625/78 de la Comisión ⁽³⁾, modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) nº 1128/84 ⁽⁴⁾, relativo a la calidad de la leche desnatada en polvo, prevé en la letra b) del apartado 2 los métodos de control utilizados para la investigación de determinados productos;

Considerando que ha sido puesto a punto un nuevo método de investigación del suero de leche en polvo para la

determinación de los glicomacropéptidos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, gracias en particular al análisis circular realizado por determinados institutos de investigación y por diversos laboratorios de control de los Estados miembros; que dicho método ofrece ventajas manifiestas, entre ellas, en particular, la rapidez de ejecución del análisis habitual de numerosas muestras por día; que es conveniente, por consiguiente, prever la utilización del mismo adaptando el Reglamento (CEE) nº 625/78;

Considerando, no obstante, que parece oportuno establecer un período transitorio y de adaptación de doce meses, durante el cual los Estados miembros puedan seguir utilizando el método del ácido siálico libre y los operadores invocarlo en caso de impugnación de los resultados del nuevo método de análisis;

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de la leche y de los productos lácteos,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Se modifica el Reglamento (CEE) nº 625/78 del modo siguiente:

1) En el Anexo I, se sustituye el segundo guión de la letra b) del apartado 2 por el texto siguiente:

«— suero de leche en polvo: determinación de los glicomacropéptidos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento ⁽²⁾. No obstante, hasta el 31 de marzo de 1981, los Estados miembros podrán utilizar asimismo la determinación por el ácido siálico libre ⁽³⁾. Hasta dicha fecha, en caso de impugnación del interesado, a su solicitud y a su cargo, se recurrirá a la determinación del ácido siálico libre. Los resultados así obtenidos serán determinantes.»

2) En el Anexo I, la nota anterior ⁽²⁾ pasa a ser la nota ⁽³⁾, y se inserta la nota ⁽²⁾ siguiente:

«⁽²⁾ El método es el que figura en el Anexo V.»

3) Se añade el Anexo del presente Reglamento, como Anexo V.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

⁽¹⁾ DO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.

⁽²⁾ DO nº L 150 de 6. 6. 1984, p. 6.

⁽³⁾ DO nº L 84 de 31. 3. 1978, p. 19.

⁽⁴⁾ DO nº L 109 de 26. 4. 1984, p. 9.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 20 de marzo de 1985.

Por la Comisión
Frans ANDRIESEN
Vicepresidente

ANEXO

*ANEXO V

INVESTIGACIÓN DEL SUERO DE LECHE EN POLVO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO DESTINADA AL ALMACENAMIENTO PÚBLICO MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LOS GLICOMACROPÉPTIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (CLHP)**1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite poner de manifiesto la presencia de suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante determinación de los glicomacropéptidos.

2. Referencias

Norma FIL 50 A: 1980 — Leche y productos lácteos — Guía de las técnicas de muestreo.

3. Definición

Contenido en glicomacropéptidos de la leche desnatada en polvo: contenido en sustancias determinado según el método descrito a continuación y expresado en porcentaje en peso.

4. Principio

- Reconstitución de la leche desnatada en polvo, eliminación de las materias grasas y de las proteínas con ácido tricloroacético, y centrifugación,
- determinación de la cantidad de glicomacropéptidos (GMP) presentes en el sobrenadante por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP),
- evaluación del resultado obtenido en relación con muestras testigos constituidas por leche desnatada en polvo exentas o con adición de un porcentaje conocido de suero de leche en polvo.

5. Reactivos

Todos los reactivos serán de calidad analítica reconocida. El agua utilizada será agua destilada o de pureza por lo menos equivalente.

5.1. Solución de ácido tricloroacético

Disolver 240 g de ácido tricloroacético (Cl_3CCOOH) en el agua y completar hasta 1 000 ml.

5.2. Solución eluyente pH 6,0

Disolver 1,74 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 21,41 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) en 700 ml de agua aproximadamente.

Ajustar, si es necesario, a pH 6,0 con ayuda de una solución de ácido fosfórico o de hidróxido de potasio.

Completar hasta 1 000 ml con agua y homogeneizar.

Filtrar la solución eluyente, antes de su utilización, sobre una membrana filtrante de 0,45 μm de diámetro de poro.

5.3. Solución de lavado y de conservación de las columnas

Mezclar un volumen de acetonitrilo (CH_3CN) en nueve volúmenes de agua. Filtrar la mezcla, antes de su utilización, sobre una membrana filtrante de 0,45 μm de diámetro de poro.

Nota: Puede utilizarse cualquier otra solución de lavado que tenga un efecto bactericida y que no altere la eficacia de resolución de las columnas.

5.4. Muestras testigos

- 5.4.1. Leche desnatada en polvo que responda a las exigencias del Reglamento (CEE) n° 625/78, o sea [0].
- 5.4.2. La misma leche en polvo adulterada con 5 % (m/m) por suero de leche en polvo de composición media, o sea [5].

6. **Aparatos**
 - 6.1. Balanza analítica.
 - 6.2. Centrifugadora que pueda alcanzar una fuerza centrífuga de 2 200 g y provista de tubos para centrifugar cerrados de una capacidad de 25 ml aproximadamente.
 - 6.3. Agitador mecánico.
 - 6.4. Agitador magnético.
 - 6.5. Embudos de vidrio de 7 cm de diámetro aproximadamente.
 - 6.6. Papeles de filtro, de filtración media, de 12,5 cm de diámetro aproximadamente.
 - 6.7. Dispositivo de filtración de vidrio provisto de membrana filtrante de 0,45 µm de diámetro de poro.
 - 6.8. Pipeta graduada que permita entregar 10 ml, según ISO 648, clase A, o ISO/R 835.
 - 6.9. Baño de agua con termostato regulado a 25 más menos 0,5 °C.
 - 6.10. Equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento que comprenda:
 - 6.10.1. bomba,
 - 6.10.2. inyector, manual o automático, de 15 a 30 µm de capacidad,
 - 6.10.3. dos columnas en serie TSK 2 000 SW (30 cm de longitud, diámetro interior de 0,75 cm) y/o columnas de eficacia equivalente y una precolumna previa (3 cm × 0,3 cm) rellena de I 125 ó de un material de eficacia equivalente,
 - 6.10.4. horno de columna con termostato regulado a 35 más menos 1 °C,
 - 6.10.5. detector por luz ultravioleta de longitud de onda variable, que permita efectuar mediciones de 205 nm de una sensibilidad de 0,008 A,
 - 6.10.6. integrador que pueda integrar de valle en valle

Nota: Se puede trabajar con columnas, mantenidas a temperatura ambiente, pero su poder de resolución es ligeramente menor. En este caso, las variaciones de temperatura durante una misma serie de análisis deberán ser inferiores a más menos 5 °C.
7. **Muestreo**
 - 7.1. Véase la norma 50 A: 1980.
 - 7.2. Conservar la muestra de modo que no pueda producirse deterioro ni modificación de composición.
8. **Modo operatorio.**
 - 8.1. *Preparación de la muestra para ensayo*

Trasvasar la leche en polvo a un recipiente de capacidad aproximadamente doble del volumen del polvo, provisto de tapadera hermética al aire. Cerrar el recipiente inmediatamente.

Mezclar bien la leche en polvo por sucesivas inversiones del recipiente.
 - 8.2. *Toma de ensayo*

Pesar 2 000 más menos 0,001 g de muestra para ensayo en un tubo de centrifugar (6.2).
 - 8.3. *Eliminación de las materias grasas y de las proteínas*
 - 8.3.1. Añadir 20,0 g de agua tibia (50 °C) a la toma de ensayo. Disolver el polvo agitando durante 5 minutos con ayuda del agitador (6.3). Llevar la temperatura del tubo hasta 25 °C.
 - 8.3.2. Añadir en 2 minutos, 10,0 ml de la solución de ácido tricloroacético (5.1) bajo agitación magnética (6.4). Poner el tubo en el baño de agua (6.9) y mantenerlo allí 60 minutos.
 - 8.3.3. Centrifugar (6.2) 2 200 g durante 10 minutos. O filtrar sobre papel (6.6), desechar los 5 primeros milímetros de filtrado.

8.4. *Determinación cromatográfica*

- 8.4.1. Inyectar de 15 a 30 µm medidos exactamente, de sobrenadante o de filtrado (8.3.3), en el aparato de cromatografía líquida de alto rendimiento (6.10) con un caudal de 1,0 ml de solución eluyente (5.2) por minuto.

Nota:

1. Mantener la solución eluyente (5.2) a 85 °C durante todo el análisis cromatográfico con el fin de conservar el eluyente desgasificado y de evitar toda proliferación bacteriana. Es aceptable cualquier precaución que tenga un efecto similar.
2. En cada interrupción, lavar las columnas con agua. No dejarlas nunca bajo la solución eluyente (5.2).

Antes de toda interrupción superior a 24 horas, lavar las columnas con agua y después lavarlas con la solución (5.3) durante por 10 menos 3 horas con un caudal de 0,2 ml por minuto.

- 8.4.2. Los resultados del análisis cromatográfico de la muestra para ensayo [E] se obtienen en forma de un cromatograma en el que cada pico se identifica por su tiempo de retención RT, es decir:

pico II: segundo pico del cromatograma en el que el RT es de 12,5 minutos aproximadamente,

pico III: tercer pico del cromatograma, correspondiente a los GMP, cuyo RT es de 15,5 más menos 1,0 minutos,

pico IV: cuarto pico del cromatograma cuyo RT es de 17,5 minutos aproximadamente.

La calidad de las columnas puede influir en los tiempos de retención de los diferentes picos.

El integrado (6.10.6) calcula automáticamente la superficie A de cada pico, o sea:

A_{II}: superficie del pico II

A_{III}: superficie del pico III,

A_{IV}: superficie del pico IV.

Con el fin de detectar las anomalías eventuales debidas ya sea a un mal funcionamiento del aparato o de las columnas, ya sea por el origen y naturaleza de la muestra analizada, es necesario observar el aspecto de cada cromatograma antes de efectuar cualquier interpretación cuantitativa.

En caso de duda, repetir el análisis.

8.5. *Calibrado*

- 8.5.1. Aplicar exactamente a las muestras testigos (5.4) el modo operatorio descrito desde el punto 8.2 al punto 8.4.2.

Utilizar soluciones recientemente preparadas pues los GMP se degradan en medio tricloracético al 8 %. En efecto, su contenido disminuye aproximadamente 0,2 % por hora a 30 °C.

- 8.5.2. Antes de proceder a cualquier determinación cromatográfica de las muestras, acondicionar las columnas mediante inyecciones repetidas de la solución (8.5.1) de la muestra testigo (5.4.2) hasta que la superficie y el tiempo de retención del pico correspondiente a los CMP sean constantes.

- 8.5.3. Determinar los coeficientes de respuesta R inyectando el mismo volumen de filtrados (8.5.1) que el utilizado para las muestras.

9. *Expresión de los resultados*9.1. *Modo de cálculo y fórmulas*

- 9.1.1. Cálculo de los coeficientes de respuesta R:

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

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

donde:

R_{II} y R_{IV} = respectivamente los coeficientes de respuesta de los picos II y IV,

A_{II} [0] y A_{IV} [0] = respectivamente las superficies de los picos II y IV de la muestra testigo [0] obtenidas en el punto 8.5.3

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

donde:

R_{III} = el coeficiente de respuesta del pico III,

A_{III} [0] y A_{III} [5] = respectivamente las superficies del pico III en las muestras testigos [0] y [5] obtenidas en el punto 8.5.3.,

W = la cantidad de suero de leche presente en la muestra testigo [5], o sea 5,

9.1.2. Cálculo de la superficie relativa de los picos de la muestra [E]

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

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

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

donde:

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = respectivamente las superficies relativas de los picos II, III y IV de la muestra [E],

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = respectivamente las superficies de los picos II, III y IV de la muestra [E] obtenidas en el punto 8.4.2,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = los coeficientes de respuesta calculados en el punto 9.1.1.

9.1.3. Cálculo del tiempo de retención relativo del pico III de la muestra [E]:

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

donde:

$RRT_{III} [E]$ = el tiempo de retención relativo del pico III de la muestra [E],

$RT_{III} [E]$ = el tiempo de retención del pico III de la muestra [E] obtenido en el punto 8.4.2,

$RT_{III} [5]$ = el tiempo de retención del pico III de la muestra testigo [5] obtenido en el punto 8.5.3.

9.1.4. Por la experimentación, se ha demostrado que existe una relación lineal entre el tipo de retención relativo del pico III es decir $RRT_{III} [E]$ y el porcentaje de suero de leche en polvo añadido hasta el 10 %.

— con un contenido < 5 % el $RRT_{III} [E]$ es > 1,000,

— con un contenido \geq 5 % el $RRT_{III} [E]$ es \leq 1,000.

La incertidumbre admitida para los valores de RRT_{III} es de más menos 0,002.

Normalmente, el valor de $RRT_{III} [0]$ es poco diferente de 1,034. Según el estado de las columnas, este valor puede aproximarse a 1,000, pero siempre ha de ser superior a 1,000.

9.2. Cálculo del porcentaje de suero de leche en polvo presente en la muestra, es decir:

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

donde:

W = el porcentaje m/m de suero de leche en polvo presente en la muestra [E],

$S_{III} [E]$ = la superficie relativa del pico III de la muestra para ensayo [E] obtenida en el punto 9.1.2,

1,3 = la superficie relativa media del pico III, expresada en g por 100 g de suero de leche en polvo determinado en las leches desnatadas en polvo no adulteradas de origen diverso. Esta cifra se ha obtenido experimentalmente,

$S_{III} [0]$ = la superficie relativa del pico III que es igual a $R_{III} \times A_{III} [0]$. Estos valores se obtienen respectivamente en los puntos 9.1.1 y 8.5.3,

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = la corrección que hay que efectuar en la superficie relativa media 1,3 cuando el valor $S_{III} [0]$ se aparta en 0,9. Experimentalmente, la superficie relativa media del pico III de la muestra testigo [0] es de 0,9.

9.3. Precisión del método

9.3.1. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o en un corto intervalo de tiempo por el mismo analista que utilice los mismos aparatos, con la misma toma de muestra, no debe sobrepasar el 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproducibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales e independientes obtenidos en dos laboratorios diferentes, con la misma toma de muestra, no debe sobrepasar el 0,4 % m/m.

9.4. Interpretación

9.4.1. Concluir en la ausencia de suero de leche si la superficie relativa del pico III, $S_{III} [E]$ expresado en g de suero de leche en polvo por 100 g es $\leq 2,0 + (S_{III} [O] - 0,9)$

donde:

2,0 = el valor máximo admitido para la superficie relativa del pico III en que se tiene en cuenta la superficie relativa del pico III, es decir 1,3, de la incertidumbre debida a las variaciones de composición de las leches desnatadas en polvo y de la reproducibilidad del método (9.3.2),

$(S_{III} [O] - 0,9)$ = la corrección que se debe efectuar cuando el valor $S_{III} [O]$ es diferente de 0,9 (véase el punto 9.2).

9.4.2. Si la superficie relativa del pico III, $S_{III} [E]$ es $\geq 2,0$ y cuando la superficie relativa del pico II, $S_{II} [E]$, es ≥ 135 o la del pico IV, $S_{IV} [E]$, es ≥ 135 , determinar el contenido en proteínas.

9.4.2.1. El contenido en proteínas es < 37 g para 100 g: la muestra analizada ha sido probablemente fabricada partiendo de leche de mala calidad bacteriológica. No puede llegarse a ninguna conclusión relativa a la presencia eventual de suero de leche. La resolución de los picos II, III y IV debe no obstante ser tan definida como para las muestras testigos y el tiempo de retención relativo del pico III $S_{III} [O]$.

9.4.2.2. — El contenido de proteínas es ≥ 37 g para 100 g:

— si las superficies relativas de los picos II, III y IV de la muestra [E] están dentro de los límites admitidos (trazo discontinuo; estos valores indicados en los gráficos 1 al 6 del Anexo han sido establecidos según análisis estadístico de los datos experimentales) no puede establecerse la presencia de suero de leche en polvo;

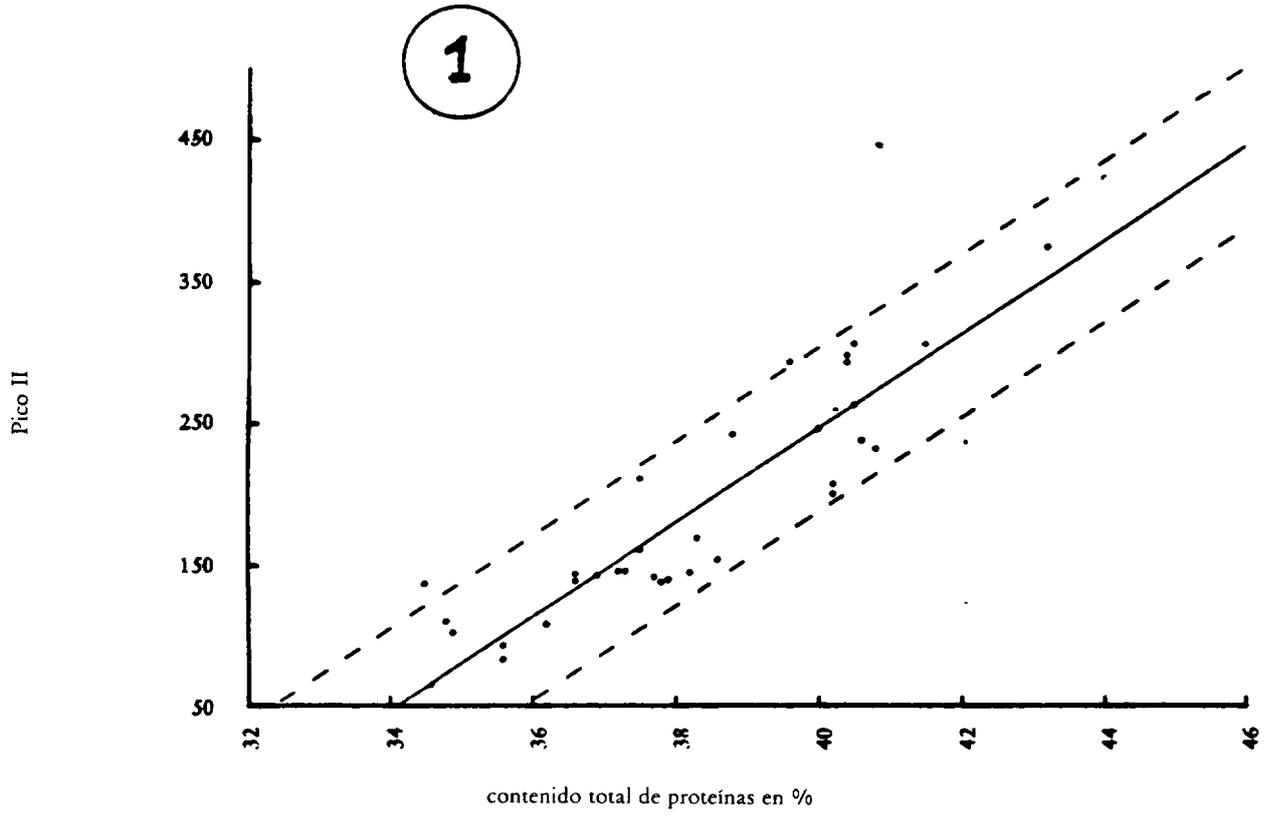
— en caso en que sólo la superficie relativa del pico III esté fuera de los límites superiores en los gráficos 2, 3 y 6, la conclusión es: presencia de suero de leche.

El contenido de suero de leche en polvo se calcula deduciendo de $S_{III} [E]$ (calculado según 9.1.2.), el valor medio del pico III se manifiesta en el gráfico 2 (trazo continuo) en función del contenido de proteínas de la muestra [E].

El valor de $RRT_{III} [E]$ debe estar de acuerdo con el contenido de suero de leche en polvo determinado;

— en todos los demás casos, no debe deducirse ninguna conclusión sobre la presencia eventual de suero de leche en polvo.

LECHE DESNATADA EN POLVO



LECHE DESNATADA EN POLVO

