REGOLAMENTO (CEE) N. 3711/86 DELLA COMMISSIONE

del 4 dicembre 1986

che modifica il regolamento (CEE) n. 625/78 relativo alle modalità di applicazione per l'ammasso pubblico di latte scremato in polvere

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

visto il regolamento (CEE) n. 804/68 del Consiglio, del 27 giugno 1968, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari (1), modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 1335/86 (2), in particolare l'articolo 7, paragrafo 5,

considerando che a norma dell'articolo 3 del regolamento (CEE) n. 1014/68 del Consiglio, del 20 luglio 1968, che stabilisce le norme generali che disciplinano l'ammasso pubblico di latte scremato in polvere (3), modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 1272/79 (4), il prezzo d'intervento si applica al latte scremato in polvere consegnato ad un deposito situato ad una distanza massima da determinarsi dal luogo in cui sarà immagazzinato; che, se il deposito dove viene consegnato il latte scremato in polvere è situato ad una distanza superiore alla distanza massima, le spese supplementari di trasporto che ne derivano, da determinarsi in misura forfettaria, sono a carico dell'organismo d'intervento;

considerando che il regolamento (CEE) n. 625/78 della Commissione (5), modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 2256/86 (6), ha fissato a 100 chilometri la distanza massima di cui sopra; che, dall'esperienza acquisita risulta che tale distanza massima non è sufficiente per consentire agli organismi d'intervento di gestire l'accesso ai depositi pubblici nelle migliori condizioni; che è pertanto opportuno portare tale distanza a 350 chilometri;

considerando che l'allegato I del regolamento (CEE) n. 625/78 relativo alla qualità del latte scremato in polvere prevede, al punto 2, i metodi di controllo utilizzati per la ricerca di talune sostanze; che è opportuno prevedere il riferimento a norme internazionali per il campionamento;

considerando che l'allegato IV del regolamento (CEE) n. 625/78 prevede il metodo di dosaggio dell'acido sialico libero per la ricerca del siero di latte presamico nel latte scremato in polvere destinato all'ammasso pubblico; che tale metodo era usato temporaneamente sino al 31 marzo 1986; che è pertanto opportuno sopprimere l'allegato IV;

considerando che il comitato di gestione per il latte e i prodotti lattiero-caseari non ha emesso un parere nei termini stabiliti dal suo presidente,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Il regolamento (CEE) n. 625/78 è modificato come segue:

1. All'articolo 5, paragrafo 1, i termini « 100 chilometri » sono sostituiti dai termini « 350 chilometri ».

2. All'allegato I, 2, lettera a), i termini « norma ISO » ogniqualvolta ricorrano sono sostituiti dai termini « norma internazionale ISO ».

3. All'allegato I, punto 2, lettera b), il testo del secondo trattino è sostituito dal testo seguente:

   « Siero di latte presamico:

   dosaggio dei glicomacropeptidi mediante cromatografia in fase liquida ad alto rendimento (3) ».

4. All'allegato I, punto 2, è aggiunta la seguente lettera c):

   « c) Il prelievo dei campioni è effettuato in base alla procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707; gli Stati membri possono tuttavia ricorrere ad un altro metodo di campionamento, purché conforme ai principi della predetta norma. »

5. Nell'allegato I, è soppressa la nota (4).

6. L'allegato IV è soppresso.

7. L'allegato V è sostituito dal testo figurante nell'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il giorno della pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee.*

I punti 4 e 7 dell'articolo 1 si applicano a decorrere dal 2 febbraio 1987.

(1) GU n. L 148 del 28. 6. 1968, pag. 13.
(2) GU n. L 119 dell'8. 5. 1986, pag. 19.
(3) GU n. L 173 del 22. 7. 1968, pag. 4.
(4) GU n. L 161 del 29. 6. 1979, pag. 11.
(5) GU n. L 84 del 31. 3. 1978, pag. 19.
(6) GU n. L 196 del 18. 7. 1986, pag. 41.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 4 dicembre 1986.

Per la Commissione
Frans ANDRIESSEN
Vicepresidente

ALLEGATO

« ALLEGATO V

RICERCA DEL LATTOSIERO PRESAMICO NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE DESTINATO ALL'AMMASSO PUBBLICO ATTRAVERSO IL DOSAGGIO DEI GLICOMACROPEPTIDI MEDIANTE IL METODO PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

1. **Finalità e campo di applicazione**

Questo metodo permette di evidenziare la presenza di lattosiero presamico nel latte scremato in polvere destinato all'ammasso pubblico attraverso il dosaggio dei glicomacropeptidi.

2. **Riferimento**

Norma internazionale ISO 707 — Latte e prodotti lattieri — Metodo di campionamento, in conformità alle indicazioni di cui all'ultimo capoverso al punto 2 c) dell'allegato I.

3. **Definizione**

Contenuto in glicomacropeptidi del latte scremato in polvere : contenuto di tali sostanze determinato secondo il metodo appresso specificato ed espresso come percentuale di massa.

4. **Principio**

— Ricostituzione del latte scremato in polvere in acqua calda, eliminazione dei grassi e delle proteine con acido tricloroacetico e centrifugazione.

— Determinazione della quantità di glicomacropeptidi (GMP) presente nel surnatante mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

— Valutazione del risultato ottenuto in confronto con campioni di riferimento costituiti da latte scremato in polvere esente o addizionato di una percentuale nota di lattosiero in polvere.

5. **Reattivi**

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua da impiegare deve essere acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente.

5.1. *Soluzione di acido tricloroacetico*

Sciogliere in acqua 240 g di acido tricloroacetico (Cl_3CCOOH) e portare a 1 000 ml.

5.2. *Soluzione eluente a pH 6,0*

Sciogliere 1,74 g di fosfato dipotassico (K_2HPO_4), 12,37 g di fosfato monopotassico (KH_2PO_4) e 21,41 g di solfato di sodio (Na_2SO_4) in 700 ml d'acqua circa.

Se necessario, regolare a pH 6,0 mediante una soluzione di acido fosforico o di idrossido di potassio.

Portare a 1 000 ml con acqua e miscelare.

Prima dell'impiego, filtrare la soluzione eluente su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm.

5.3. *Soluzione di lavaggio e conservazione delle colonne*

Mescolare 1 volume di acetonitrile (CH_3CN) con 9 volumi d'acqua. Prima dell'utilizzazione, filtrare la miscela su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm.

Nota : Può essere impiegata qualsiasi altra soluzione di lavaggio dotata di effetto battericida e tale da non alterare l'efficacia di risoluzione delle colonne.

5.4. *Campioni di riferimento*

5.4.1. Latte scremato in polvere rispondente alle esigenze del regolamento (CEE) n. 625/78, indicato in seguito con [0].

5.4.2. Lo stesso latte, sofisticato al 5 % (m/m) con lattosiero in polvere di tipo presamico di composizione media, indicato in seguito con [5].

6. **Apparecchiatura**

6.1. Bilancia analitica.

6.2. Centrifuga capace di raggiungere 2 200 g e fornita di provette a tappo della capacità di 25 ml circa.

6.3. Agitatore meccanico.

6.4. Agitatore magnetico.

6.5. Imbuti in vetro del diametro di 7 cm circa.

6.6. Dischi di carta da filtro (porosità media) del diametro di 12,5 cm circa.

6.7. Dispositivo di filtrazione sotto vuoto in vetro provvisto di membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm.

6.8. Pipetta graduata da 10 ml, conforme alla norma ISO 648, classe A, od alla norma ISO/R 835.

6.9. Bagno ad acqua, termostatato a 25 ± 0,5 °C.

6.10. Apparecchiatura HPLC comprendente :

6.10.1. pompa ;

6.10.2. iniettore, manuale od automatico, da 15 a 30 µl di capacità ;

6.10.3. due colonne in serie TSK 2000 SW (lunghezza 30 cm, diametro interno 0,75 cm) o colonne di pari efficacia ed una precolonna a monte (3 cm × 0,3 cm), caricata con I 125 o con un materiale di pari efficacia ;

6.10.4. forno a colonna, termostatato a 35 ± 1 °C ;

6.10.5. rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, capace di effettuare misure a 205 nm con la sensibilità di 0,008 A ;

6.10.6. integratore capace di integrare da valle a valle.

Nota : Si può lavorare mantenendo le colonne a temperatura ambiente, ma il potere di risoluzione risulta leggermente più basso. In questo caso, le variazioni di temperatura nel corso di una stessa serie di analisi devono essere inferiori a ± 5 °C.

7. **Campionamento**

7.1. Norma internazionale ISO 707 — Latte e prodotti lattieri — Metodo di campionamento, in conformità alle indicazioni di cui all'ultimo capoverso al punto 2 c) dell'allegato I.

7.2. Conservare il campione in condizioni tali da non consentire alcuna deteriorazione o modifica di composizione.

8. **Modo di operare**

8.1. *Preparazione del campione per la prova*

Travasare il latte in polvere in un recipiente di capacità all'incirca doppia del volume della polvere, provvisto di un coperchio impermeabile all'aria.

Chiudere immediatamente il recipiente.

Mescolare bene il latte in polvere capovolgendo più volte il recipiente.

8.2. *Aliquota da analizzare*

In una provetta da centrifuga (6.2) pesare 2,000 g del campione con l'approssimazione di 0,001 g.

8.3. *Eliminazione dei grassi e delle proteine*

8.3.1. Aggiungere all'aliquota da analizzare 20,0 g di acqua tiepida (50 °C). Sciogliere la polvere agitando per 5 minuti con l'agitatore (6.3). Portare la temperatura della provetta a 25 °C.

8.3.2. Lavorando sotto agitazione magnetica (6.4), aggiungere 10,0 ml della soluzione di acido tricloroacetico (5.1) in 2 minuti. Collocare la provetta nel bagno ad acqua (6.9) e mantenervela per 60 minuti.

8.3.3. Centrifugare (6.2) a 2 200 g per 10 minuti, oppure : filtrare su carta (6.6), eliminando i primi 5 ml di filtrato.

8.4. *Determinazione cromatografica*

8.4.1. Iniettare nell'apparecchio HPLC (6.10) da 15 a 30 µl del surnatante o del filtrato (8.3.3), misurati esattamente, mantenendo la velocità di flusso della soluzione eluente (5.2) sul valore di 1,0 ml/minuto.

Nota :

1. Mantenere la soluzione eluente (5.2) alla temperatura di 85 °C durante tutta l'analisi cromatografica, per mantenere l'eluente esente da gas e prevenire ogni proliferazione batterica. Qualunque precauzione dotata di effetto analogo è accettabile.
2. Al momento di ogni interruzione, risciacquare le colonne con acqua. Non lasciarle mai sotto la soluzione eluente (5.2).

Prima di ogni interruzione superiore a 24 ore, risciacquare le colonne con acqua, poi lavarle con la soluzione (5.3) per almeno 3 ore, alla velocità di 0,2 ml/minuto.

8.4.2. I risultati dell'analisi cromatografica del campione in esame [E] sono ottenuti sotto forma di cromatogramma in cui ogni picco è identificato dal suo tempo di ritenzione RT, vale a dire :

picco II : 2° picco del cromatogramma, con RT uguale a 12,5 minuti circa ;

picco III : 3° picco del cromatogramma, corrispondente ai GMP, con RT uguale a 15,5 ± 1,0 minuti ;

picco IV : 4° picco del cromatogramma, con RT uguale a 17,5 minuti circa.

La qualità delle colonne può influire sui tempi di ritenzione dei vari picchi.

L'integratore (6.10.6) calcola automaticamente la superficie A di ogni picco :

A_{II} = superficie del picco II,

A_{III} = superficie del picco III,

A_{IV} = superficie del picco IV.

Per rilevare le eventuali anomalie dovute a un cattivo funzionamento dell'apparecchiatura o delle colonne, oppure all'origine e alla natura del campione analizzato, è necessario osservare l'aspetto di ogni cromatogramma prima di qualsiasi interpretazione quantitativa.

In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

8.5. *Taratura*

8.5.1. Applicare esattamente ai campioni di riferimento (5.4) il modo di operare descritto dal punto 8.2 al punto 8.4.2. Utilizzare soluzioni preparate di recente, in quanto, in presenza di tricloroacetico all'8 %, i GMP si degradano (alla temperatura di 30 °C, difatti, la loro concentrazione diminuisce dello 0,2 % circa ogni ora).

8.5.2. Prima di procedere a qualsiasi determinazione cromatografica sui campioni, condizionare le colonne iniettando ripetutamente la soluzione (8.5.1) del campione di riferimento (5.4.2), finché la superficie e il tempo di ritenzione del picco corrispondente ai GMP risultino costanti.

8.5.3. Determinare i coefficienti di risposta R iniettando volumi di filtrati (8.5.1) uguali a quelli utilizzati per i campioni.

9. Espressione dei risultati

9.1. *Metodo di calcolo e formule*

9.1.1. Calcolo dei coefficienti di risposta R :

Picco II : $R_{II} = \frac{100}{A_{II}\,[0]}$

Picco IV : $R_{IV} = \frac{100}{A_{IV}\,[0]}$

in cui :

R_{II} ed R_{IV} = coefficienti di risposta rispettivamente dei picchi II e IV,

A_{II} [0] e A_{IV} [0] = superfici rispettivamente dei picchi II e IV del campione di riferimento [0] ottenute al punto 8.5.3.

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

in cui :

R_{III} = coefficiente di risposta del picco III ;

A_{III} [0] e A_{III} [5] = superfici del picco III nei campioni di riferimento [0] e [5] rispettivamente ottenute al punto 8.5.3 ;

W = quantità di lattosiero presente nel campione di riferimento [5], cioè 5.

9.1.2. Calcolo della superficie relativa dei picchi del campione [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]

in cui:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = superfici relative rispettivamente dei picchi II, III e IV del campione [E];

A_{II} [E], A_{III} [E], A_{IV} [E] = superfici rispettivamente dei picchi II, III e IV del campione [E] ottenute al punto 8.4.2;

R_{II}, R_{III}, R_{IV} = coefficienti di risposta calcolati al punto 9.1.1.

9.1.3. Calcolo del tempo di ritenzione relativo del picco III del campione [E]:

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

in cui:

RRT_{III} [E] = tempo di ritenzione relativo del picco III del campione [E];

RT_{III} [E] = tempo di ritenzione del picco III del campione [E] ottenuto al punto 8.4.2;

RT_{III} [5] = tempo di ritenzione del picco III del campione di riferimento [5] ottenuto al punto 8.5.3.

9.1.4. È stata sperimentalmente dimostrata l'esistenza di una relazione lineare fra il tempo di ritenzione relativo del picco III, cioè RRT_{III} [E], e la percentuale di lattosiero in polvere aggiunto fino al 10 %:

— per un contenuto < 5 %, è RRT_{III} [E] $> 1{,}000$;
— per un contenuto $\geqslant 5$ %, è RRT_{III} [E] $\leqslant 1{,}000$.

L'incertezza ammessa per i valori di RRT_{III} è di $\pm$ 0,002.

Normalmente, il valore di RRT_{III} [0] è poco diverso da 1,034. Secondo lo stato delle colonne, esso può accostarsi a 1,000, restando tuttavia sempre superiore.

9.2. *Calcolo della percentuale di lattosiero presamico in polvere contenuto nel campione:*

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

dove:

W = percentuale m/m di lattosiero presamico contenuto nel campione [E];

S_{III} [E] = superficie relativa del picco III del campione da analizzare [E] ottenuto al punto 9.1.2;

1,3 = superficie relativa media del picco III, espressa in g di lattosiero per 100 kg di prodotto determinata in campioni di latte scremato in polvere non adulterato di origine diversa. Questa cifra è stata ottenuta sperimentalmente;

S_{III} [0] = superficie relativa del picco III, che è uguale a R_{III} X A_{III} [0]. Tali valori sono ottenuti rispettivamente ai punti 9.1.1 e 8.5.3;

(S_{III} [0] — 0,9) = correzione da apportare alla superficie relativa media 1,3 quando il valore S_{III} [0] è diverso da 0,9. Sperimentalmente, la superficie relativa media del picco III del campione di riferimento [0] è di 0,9.

9.3. *Precisione del metodo*

9.3.1. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o a breve distanza di tempo dallo stesso analista, impiegando la stessa apparecchiatura e sulla stessa aliquota di campione, non deve superare 0,2 % m/m.

9.3.2. Riproducibilità

La differenza tra due risultati individuali ed indipendenti ottenuti in due laboratori diversi sulla stessa aliquota di campione, non deve superare lo 0,4 % m/m.

9.4. *Interpretazione*

9.4.1. È possibile concludere per l'assenza di lattosiero se la superficie relativa del picco III, S_{III} [E], espressa in g di lattosiero presamico per 100 g di prodotto, è ≤ a 2,0 + (S_{III} [0] — 0,9),

in cui :

2,0 è il valore massimo ammesso per la superficie relativa del picco III, che tiene conto della superficie relativa del picco III, øssia 1,3, dell'incertezza dovuta alle variazioni di composizione del latte scremato in polvere e della riproducibilità del metodo (9.3.2) ;

(S_{III} [0] — 0,9) è la correzione da apportare quando il valore S_{III} [0] è diverso da 0,9 (vedi punto 9.2).

9.4.2. Se la superficie relativa del picco III, S_{III} [E] è > di 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9) e la superficie relativa del picco II, S_{II} [E], è ≤ 160, determinare il tenore di lattosiero presamico presente nel modo indicato al punto 9.2.

9.4.3. Se la superficie relativa del picco III, S_{III} [E] è > di 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9) e la superficie relativa del picco II, S_{II} [E], è > 160, determinare il tenore di proteine totale (P %) ; in seguito esaminare i grafici 1 e 2.

9.4.3.1. I dati ottenuti dall'analisi di campioni di latte scremato in polvere non alterato che presentano un tenore elevato di proteine totale sono riportati nei grafici 1 e 2.

La retta continua rappresenta la retta di regressione lineare i cui coefficienti sono calcolati con il metodo dei minimi quadrati.

La retta tratteggiata indica il limite superiore della superficie relativa del picco III, con una probabilità del 90 % di non essere superata.

Le equazioni delle rette tratteggiate dei grafici 1 e 2 sono, rispettivamente, uguali a :

$S_{III} = 0{,}376\ P\ \% - 10{,}7$ (grafico 1)

$S_{III} = 0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93$ (grafico 2)

in cui :

S_{III} è la superficie relativa del picco III, calcolata in base al tenore di materie azotate totali o in base alla superficie relativa del picco S_{II} [E] ;

P % è il tenore di materie azotate totali espresso in percentuale in peso ;

S_{II} [E] è la superficie relativa del campione, calcolata come indicato nel punto 9.1.2.

Queste equazioni sono equivalenti a 1,3, valore menzionato al punto 9.2.

Lo scarto (T_1 e T_2) tra la superficie relativa S_{III} [E] osservata e la superficie relativa S_{III} si ricava dalle seguenti relazioni :

$$T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\ \% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$$

$$T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$$

9.4.3.2. Se T_1 e/o T_2 sono inferiori o uguali a zero, non si può concludere per la presenza di lattosiero presamico ;

Se T_1 e T_2 sono superiori a zero, si può concludere che vi è presenza di lattosiero presamico.

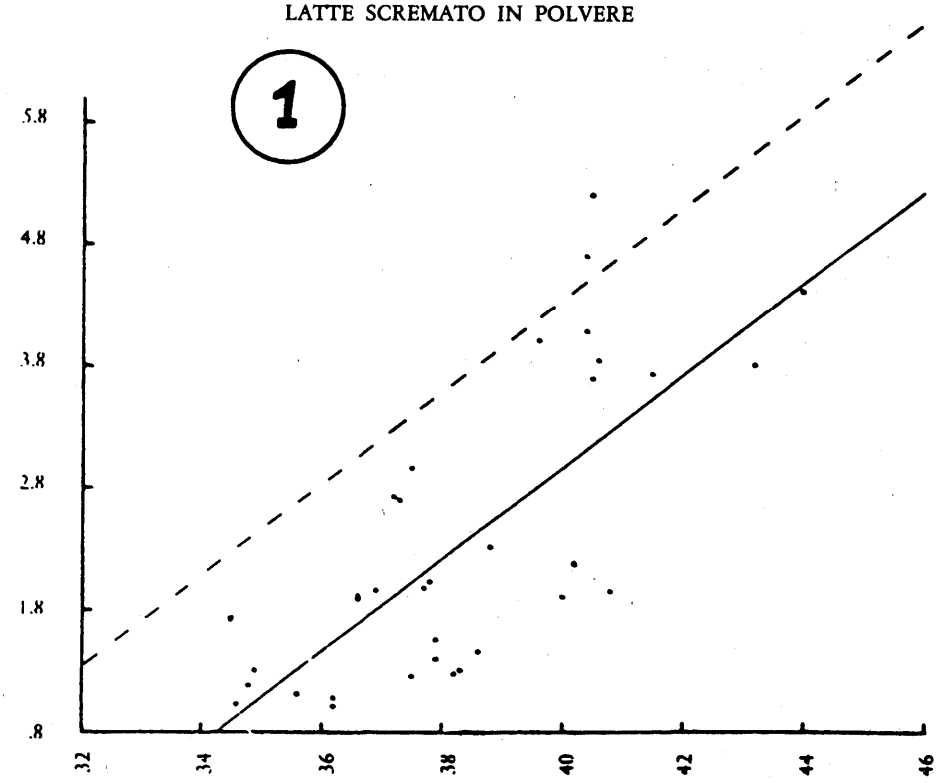
Il tenore di lattosiero presente è calcolato utilizzando la formula seguente :

$$W = T_2 + 0{,}91$$

in cui :

0,91 rappresenta lo scarto sull'asse verticale tra la retta continua e la retta tratteggiata.

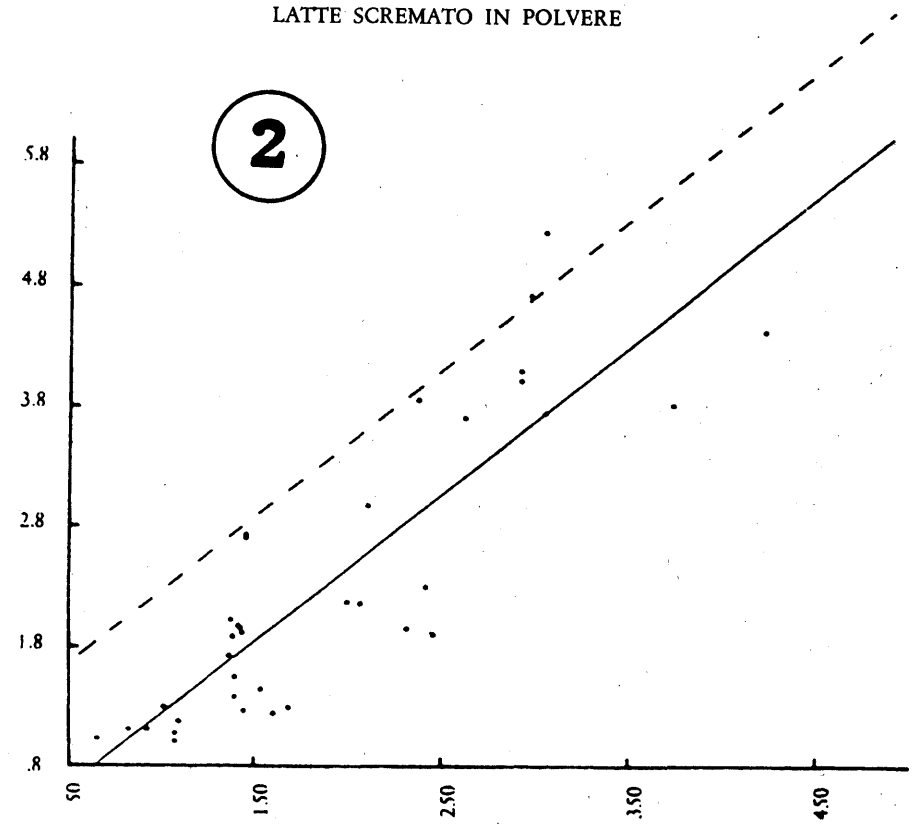
LATTE SCREMATO IN POLVERE



Picco III

% tenore totale di proteine

LATTE SCREMATO IN POLVERE



Picco III

Picco II »