REGLAMENTO (CEE) Nº 3711/86 DE LA COMISIÓN

de 4 de diciembre de 1986

por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 625/78, relativo a las modalidades del almacenamiento público de la 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 la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos (1), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 1335/86 (2), y, en particular, el apartado 5 de su artículo 7,

Considerando que el Reglamento (CEE) nº 1014/68 del Consejo, de 20 de julio de 1968, por el que se establecen las normas generales que rigen el almacenamiento público de la leche desnatada en polvo (3), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 1272/79 (4), establece, en su artículo 3, que el precio de intervención se aplicará a la leche desnatada en polvo entregada en un almacén situado a la distancia máxima que se determine del lugar donde estaba almacenada la leche; que, si el almacén donde se entregue la leche desnatada en polvo estuviera a una distancia superior a dicha distancia máxima, los gastos de transporte adicionales, que se determinarán a tanto alzado, recaerán en el organismo de intervención;

Considerando que el Reglamento (CEE) nº 625/78 de la Comisión (5), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 2256/86 (6), fija en 100 kilómetros la distancia máxima de que se trata; que la experiencia adquirida demuestra que dicha distancia máxima resulta insuficiente para permitir a los organismos de intervención gestionar, en las mejores condiciones posibles, el acceso a los almacenes públicos; que, por lo tanto, es conveniente que dicha distancia sea de 350 kilómetros;

Considerando que el Anexo I del Reglamento (CEE) nº 625/78, relativo a la calidad de la leche desnatada en polvo, prevé en el punto 2 los métodos de control utilizados para el análisis de determinados productos; que es conveniente prever la referencia a las normas internacionales para la toma de muestras;

Considerando que el Anexo IV del Reglamento (CEE) nº 625/78 prevé el método de determinación del ácido siálico libre para el análisis del suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público; que dicho método se utilizó, temporalmente, hasta el 31 de marzo de 1986; que, por lo tanto, es conveniente suprimir dicho Anexo;

Considerando que el Comité de gestión de la leche y de los productos lácteos no ha emitido dictamen alguno en el plazo establecido por su presidente,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CEE) nº 625/78 quedará modificado como sigue:

1. En el apartado 1 del artículo 5, las palabras « 100 kilómetros » serán sustituidas por las palabras « 350 kilómetros ».

2. En la letra a) del punto 2 del Anexo I, las palabras « Norma ISO » serán sustituidas, cada vez que aparezcan, por las palabras « Norma Internacional ISO ».

3. En la letra b) del punto 2 del Anexo I, el texto del segundo guión será sustituido por el texto siguiente:

   « Suero de leche en polvo: determinación de los glucomacropéptidos mediante la cromatografía líquida a alto rendimiento (3). »

4. En el punto 2 del Anexo I se añadirá la letra c) siguiente:

   « c) La toma de muestras se efectuará según el procedimiento previsto por la norma internacional ISO 707; no obstante, los Estados miembros podrán utilizar otro método de muestreo, siempre que este último se atenga a los principios de la norma anteriormente citada. »

5. En el Anexo I, se suprimirá la nota a pie de página (4).

6. El Anexo IV será suprimido.

7. El Anexo V será sustituido por el texto que figura en el Anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

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

Los apartados 4 y 7 del artículo 1 serán aplicables a partir del 2 de febrero de 1987.

(1) DO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.
(2) DO nº L 119 de 8. 5. 1986, p. 19.
(3) DO nº L 173 de 22. 7. 1968, p. 4.
(4) DO nº L 161 de 29. 6. 1979, p. 11.
(5) DO nº L 84 de 31. 3. 1978, p. 19.
(6) DO nº L 196 de 18. 7. 1986, p. 41.

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

Hecho en Bruselas, el 4 de diciembre de 1986.

Por la Comisión
Frans ANDRIESSEN
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. **Referencia**

Norma Internacional ISO 707 — Leche y productos lácteos — Métodos de muestreo, conforme a las líneas maestras reflejadas en el último párraf, letra c), apartado 2 del Anexo I.

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 rendimento (CLHP),

— evaluación del resultado obtenido en relación con muestras testigos constitutidas por leche desnatada en polvo exentas o con adición de un procentaje conocido de suero de leche en polvo.

5. **Reactivos**

Todos los reactivos serán de calidad analítica reconocida. El agua utilizada será 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) nº 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 µl 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 o 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. Norma Internacional ISO 707 — Leche y productos lácteos — Métodos de muestreo, conforme a las líneas maestras reflejadas en el último párraf, letra c), apartado 2 del Anexo I.

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. Cerrrar 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. Anãdir 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 µl 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 lo 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 tricloroacético 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 GMP 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 :

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

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.

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

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 ≥ 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. Podrá llegarse a la conclusión de que no existe suero de leche si la superficie relativa de la cresta III, S_{III} [E], expresada en gramos de suero de leche en polvo por 100 g de producto, es $\leq 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$, donde :

2,0 es el valor máximo admitido para la superficie relativa de la cresta III que toma en consideración la superficie relativa de la cresta III, digamos 1,3, el margen de incertidumbre debido a las variaciones en la composición de la leche descremada en polvo y la reproductibilidad del método (9.3.2),

$(S_{III}[0] - 0{,}9)$ es la rectificación que ha de hacerse cuando la superficie $S_{III}[0]$ sea diferente de 0,9 (ver el número 9.2).

9.4.2. Si la superficie relativa de la cresta III, S_{III} [E], fuera $> 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$ y la superficie relativa de la cresta II, S_{II} [E] ≤ 160, calcular el contenido existente en suero de leche en polvo como se indica en el numero 9.2.

9.4.3. Si la superficie relativa de la cresta III, S_{III} [E], fuera $> 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$ y la superficie relativa de la cresta II, S_{II} [E] > 160, determinar el contenido en materias nitrosas totales (P %) y estudiar acto seguido los gráficos 1 y 2.

9.4.3.1. Los datos obtenidos tras el análisis de muestras de leches desnatadas en polvo no alteradas, con alto contenido en materias nitrosas totales, se reunirán en los gráficos 1 y 2.

La recta que aparece con un trazo continuo representa la recta de regresión lineal cuyos coeficientes se calculan mediante el método del cuadrado menor.

La recta que aparece con trazo discontinuo determina el límite superior de la superficie relativa de la cresta III, con una probabilidad de no ser sobrepasada en el 90 % de los casos.

Las ecuaciones de las rectas que aparecen con trazo discontinuo en los gráficos 1 y 2 son iguales, respectivamente, a :

gráficos :

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

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

donde :

S_{III} es la superficie relativa de la cresta III calculada bien a partir del contenido en materias nitrosas totales, bien a partir de la superficie relativa de la cresta S_{II} [E],

P % es el contenido en materias nitrosas totales expresado en porcentaje ponderal,

S_{II} [E] es la superficie relativa de la muestra calculada en el número 9.1.2.

Estas ecuaciones son equivalentes a la cifra 1,3 mencionada en el número 9.2.

La diferencia (T_1 y T_2) entre la superficie relativa S_{III} [E] hallada y la superficie relativa S_{III} viene dada por las relaciones siguientes :

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

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

9.4.3.2. Si T_1 y/o T_2 son inferiores o iguales a cero, no podrá determinarse la presencia de suero de leche en polvo.

Si T_1 y T_2 son superiores a cero, la conclusión será la presencia de suero de leche en polvo.

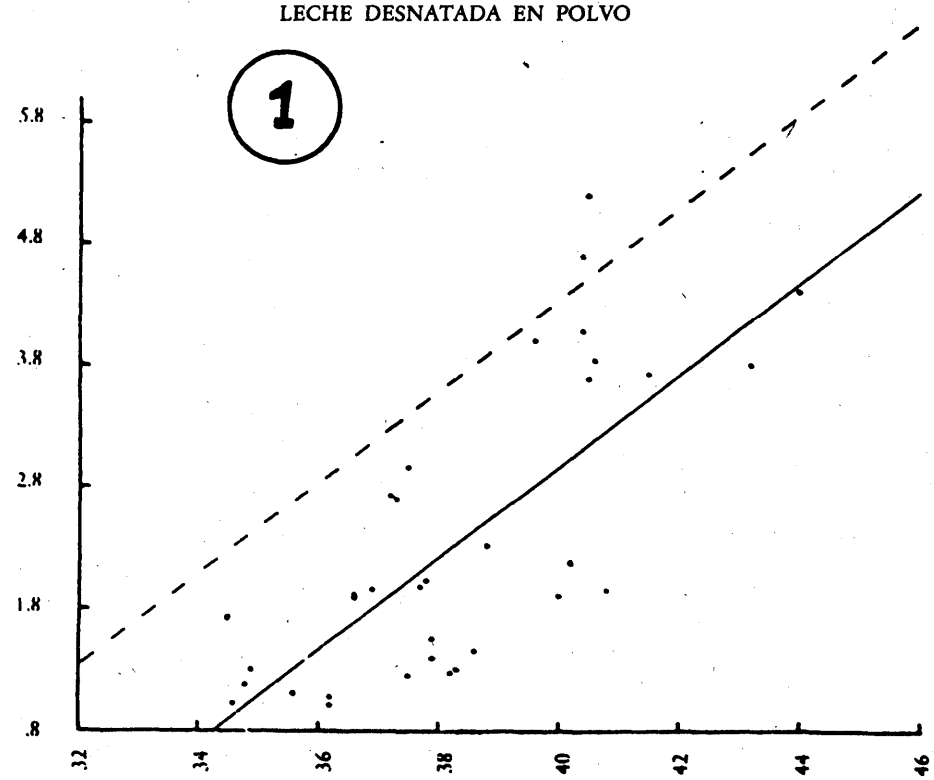
El contenido en suero de leche existente se calculará mediante la fórmula :

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

donde :

0,91 representa la separación sobre el eje vertical entre la recta que aparece con trazo continuo y la recta que aparece con trazo discontinuo.

LECHE DESNATADA EN POLVO



LECHE DESNATADA EN POLVO

