Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

►B

REGLAMENTO (CE) Nº 273/2008 DE LA COMISIÓN

de 5 de marzo de 2008

por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo en lo que atañe a los métodos que deben utilizarse para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos

(DO L 88 de 29.3.2008, p. 1)

Modificado por:

		Diario Oficial		
		n°	página	fecha
►M1	Reglamento de Ejecución (UE) nº 565/2013 de la Comisión de 18 de junio de 2013	L 167	26	19.6.2013

▼B

REGLAMENTO (CE) Nº 273/2008 DE LA COMISIÓN

de 5 de marzo de 2008

por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo en lo que atañe a los métodos que deben utilizarse para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo, de 17 de mayo de 1999, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos [1], y, en particular, sus artículos 10 y 15, su artículo 26, apartado 3, su artículo 29, apartado 1, y su artículo 31, apartado 4,

Considerando lo siguiente:

(1) En el Reglamento (CE) nº 213/2001 de la Comisión [2] se establecen disposiciones específicas de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo en lo que atañe a los métodos que deben utilizarse para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos. Ante la evolución técnica en el campo de la metodología analítica, es necesario introducir nuevos cambios sustanciales. En aras de la claridad y la eficiencia, dado el número y el carácter técnico de las modificaciones, hay que derogar el Reglamento (CE) nº 213/2001 y sustituirlo por un nuevo reglamento.

(2) Hay que verificar los requisitos de composición y de calidad de la leche y los productos lácteos establecidos según las disposiciones contempladas en el Reglamento (CE) nº 1255/1999, para asegurarse de que se cumplen estrictamente.

(3) Los métodos de referencia para tales verificaciones suelen ser métodos publicados por organismos internacionales, como el Comité Europeo de Normalización (CEN), la Federación Internacional de Lechería (FIL), la Organización Internacional de Normalización (ISO) y la asociación científica dedicada a la excelencia analítica (AOAC Internacional), y estos organismos los actualizan periódicamente. En algunos casos se establece un método comunitario de referencia, pero otras veces no se especifica ningún método de referencia en las normas comunitarias. Para garantizar que los métodos de referencia se aplican uniformemente, ha de elaborarse una lista de tales métodos y establecerse que la Comisión adapte dicha lista cuando sea necesario.

(4) No debe excluirse el uso de métodos habituales. Sin embargo, deben especificarse las condiciones mínimas para utilizarlos.

(5) También deben establecerse procedimientos comunes para conseguir una práctica uniforme en la evaluación de los resultados de los análisis, en la evaluación organoléptica de los productos correspondientes y en el nuevo examen de los resultados que se hayan impugnado.

---

[1] DO L 160 de 26.6.1999, p. 48. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) nº 1152/2007 (DO L 258 de 4.10.2007, p. 3). El Reglamento (CE) nº 1255/1999 será sustituido por el Reglamento (CE) nº 1234/2007 (DO L 299 de 16.11.2007, p. 1) a partir del 1 de julio de 2008.

[2] DO L 37 de 7.2.2001, p. 1.

▼B

(6) En el caso de algunos análisis, no hay actualmente ningún método de referencia aceptado internacionalmente que se haya validado, por lo que no se dispone de información sobre la variación inter-laboratorios de los resultados analíticos. En consecuencia, han de establecerse métodos comunitarios que se hayan validado según normas adoptadas internacionalmente, y estos métodos han de aplicarse como métodos de referencia.

(7) El Reglamento (CE) nº 1898/2005 de la Comisión ([1]) establece disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999 en lo que respecta a las medidas para la salida al mercado comunitario de la nata, la mantequilla y la mantequilla concentrada y contempla la adición, en ciertas circunstancias, de marcadores a la nata, la mantequilla y la mantequilla concentrada, para garantizar que el uso final de estos productos es el correcto. La adición de marcadores es importante para el funcionamiento adecuado del régimen. A fin de que todos los operadores participantes reciban un tratamiento equitativo, han de establecerse métodos comunes para la determinación de algunos de estos marcadores.

(8) Según el artículo 9 del Reglamento (CE) nº 1255/1999, pueden concederse ayudas al almacenamiento privado de quesos de leche de oveja. En virtud del artículo 31 de dicho Reglamento se puede conceder una restitución especial a los mismos productos. Los quesos de leche de oveja, de cabra, de búfala y de sus mezclas pueden importarse a la Comunidad a partir de determinados terceros países en virtud de acuerdos preferenciales. Por tanto, es necesario aplicar los controles adecuados para garantizar que tales productos no llevan incorporada leche de vaca En consecuencia, debe establecerse un método comunitario de referencia para detectar la leche de vaca, sin perjuicio del uso de métodos habituales, siempre que cumplan ciertos criterios.

(9) Según el Reglamento (CEE) nº 2921/90 de la Comisión, de 10 de octubre de 1990, referente a la concesión de ayudas para la leche desnatada con vistas a la fabricación de caseína y de caseinatos ([2]), es necesario detectar la ausencia de coliformes. Los métodos de referencia aceptados internacionalmente para detectar los coliformes en la leche y los productos lácteos están en la norma ISO 4831. A partir de la citada norma se ha establecido un método comunitario de referencia para detectar coliformes.

(10) El Reglamento (CEE) nº 2658/87 del Consejo, de 23 de julio de 1987, relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común ([3]) contempla diferentes tipos de derecho de aduana para los piensos compuestos incluidos en la partida arancelaria nº 2309, en función de su contenido en productos lácteos. A fin de garantizar que estas normas se aplican de manera uniforme, debe fijarse un método ampliamente reconocido para analizar el contenido de lactosa cuyo uso sea obligatorio en todos los Estados miembros.

([1]) DO L 308 de 25.11.2005, p. 1. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) nº 1546/2007 (DO L 337 de 21.12.2007, p. 68).

([2]) DO L 279 de 11.10.1990, p. 22. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) nº 1487/2006 (DO L 278 de 10.10.2006, p. 8).

([3]) DO L 256 de 7.9.1987, p. 1. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) nº 1352/2007 de la Comisión (DO L 303 de 21.11.2007, p. 3).

▼B

(11) En virtud del Reglamento (CE) nº 1255/1999, la mantequilla y la leche desnatada en polvo destinadas a la intervención o, en el caso de la leche desnatada en polvo, a la alimentación animal, deben cumplir ciertos requisitos cualitativos. Hay que establecer métodos de referencia para verificar el cumplimiento de dichos requisitos.

(12) Algunos métodos se introducen por primera vez en el presente Reglamento. Debe preverse un plazo suficiente desde el momento de la entrada en vigor del presente Reglamento para que los laboratorios puedan adoptar y utilizar correctamente estos nuevos métodos. Cada vez que un método de referencia citado en el anexo I sea modificado y publicado por la organización de elaboración de normas, se dejará a los laboratorios un plazo de seis meses para actualizar sus procedimientos analíticos a fin de ajustarse a la nueva norma.

(13) 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:

CAPÍTULO I

DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1

Objeto y ámbito de aplicación

1. El presente Reglamento fija determinados métodos de referencia para el análisis químico, físico y microbiológico, y para la evaluación organoléptica, de la leche y de los productos lácteos, que deben utilizarse con arreglo a las disposiciones contempladas en la organización común del mercado de la leche y de los productos lácteos establecida en virtud del Reglamento (CE) nº 1255/1999, así como las normas de aplicación de dichos métodos.

2. El anexo I del presente Reglamento recoge la lista de métodos de referencia aplicables a los análisis contemplados en el apartado 1 del presente Reglamento.

3. La Comisión actualizará la lista con arreglo al procedimiento previsto en el artículo 42 del Reglamento (CE) nº 1255/1999.

Artículo 2

Métodos habituales

Se podrán utilizar métodos habituales para los análisis requeridos por las normas comunitarias, siempre que estén calibrados adecuadamente y se contrasten periódicamente con el método de referencia. Los resultados se compararán teniendo en cuenta el sesgo constante, la repetibilidad y la reproducibilidad.

En caso de disputa, será decisivo el resultado obtenido con el método de referencia.

Los Estados miembros informarán a la Comisión sobre el uso de métodos habituales en los análisis contemplados en el artículo 1.

▼B

CAPÍTULO II

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Artículo 3

Evaluación del cumplimiento de un envío respecto a un límite legal

Excepto en lo relativo al análisis de marcadores, se aplicará el anexo II del presente Reglamento para definir el cumplimiento de los requisitos legales de composición.

Artículo 4

Evaluación organoléptica

1. En relación con la leche y los productos lácteos, salvo la mantequilla para almacenamiento público, el método de referencia que utilizarán los Estados miembros para la evaluación organoléptica será la norma FIL 99C:1997 o bien un método comparable que notificarán a la Comisión.

Los procedimientos descritos en el anexo III se aplicarán para la comprobación de las características de los catadores y de la fiabilidad de los resultados de los análisis organolépticos.

2. En relación con la mantequilla para almacenamiento público, también se aplicarán para la comprobación de las características de los catadores y de la fiabilidad de los resultados de los análisis organolépticos, los procedimientos descritos en el anexo III.

Como método de referencia para la evaluación organoléptica se aplicará el procedimiento establecido en el anexo IV.

Artículo 5

Marcadores

1. El método de análisis establecido en el anexo V se utilizará como método de referencia para determinar el contenido de triglicérido de ácido enántico en mantequilla, butteroil y nata.

2. El método de análisis establecido en el anexo VI se utilizará como método de referencia para determinar el contenido de vainillina en mantequilla concentrada, mantequilla y nata.

3. El método de análisis establecido en el anexo VII se utilizará como método de referencia para determinar el contenido de éster etílico del ácido beta-apo-8'-caroténico en mantequilla y mantequilla concentrada.

4. El método de análisis establecido en el anexo VIII se utilizará como método de referencia para determinar el contenido de β-sitosterol o estigmasterol en mantequilla y mantequilla concentrada.

5. Se considerará que la mantequilla, la mantequilla concentrada y la nata están marcadas de conformidad con las normas comunitarias pertinentes si los resultados obtenidos se ajustan a las especificaciones de los puntos 10 y 11 del anexo V, y del punto 8 de los anexos VI, VII y VIII.

Artículo 6

Detección de la presencia de caseína de leche de vaca

1. Para garantizar que el queso hecho exclusivamente de leche de oveja, de cabra o de búfala, o de una mezcla de estas leches, no contiene caseína de leche de vaca se utilizará el método de análisis de referencia establecido en el anexo IX.

▼B

Se considera que hay presencia de caseína de leche de vaca si el contenido de caseína de leche de vaca de la muestra analizada es igual o superior al contenido de la muestra de referencia que contiene 1 % de leche de vaca, según se establece en el anexo IX.

2. Podrán utilizarse los métodos habituales para detectar la caseína de leche de vaca en los quesos citados en el apartado 1, siempre que:

a) el límite de detección sea como máximo del 0,5 %, y

b) no haya falsos positivos, y

c) la caseína de leche de vaca siga siendo detectable con la sensibilidad exigida incluso tras largos períodos de maduración, como puede suceder en condiciones comerciales normales.

Si no se cumple alguna de las condiciones citadas, se utilizarán los métodos de referencia citados en el anexo IX.

Artículo 7

Detección de la presencia de coliformes

La presencia de coliformes en mantequilla, leche desnatada en polvo, caseína y caseinatos se detectará de acuerdo con el método de referencia citado en el anexo X.

Artículo 8

Determinación del contenido en lactosa

El contenido en lactosa de los productos incluidos en el código NC 2309 se determinará de acuerdo con el método de referencia citado en el anexo XI.

Artículo 9

Detección de la presencia de suero de queso

1. La presencia de suero de queso en leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público se detectará de acuerdo con el método de referencia citado en el anexo XII.

2. La presencia de suero de queso en leche desnatada en polvo y en mezclas destinadas a la alimentación animal se detectará de acuerdo con el método de referencia citado en el anexo XII. En caso de detección de la presencia de suero de queso, se aplicará el anexo XIII.

Artículo 10

Detección de la presencia de mazada

La presencia de mazada en la leche desnatada en polvo se detectará de acuerdo con el método de referencia establecido en el anexo XIV.

Artículo 11

Detección de la presencia de residuos de sustancias antimicrobianas

La presencia de residuos de sustancias antimicrobianas en la leche desnatada en polvo se detectará de acuerdo con el método de referencia establecido en el anexo XV.

▼B

Artículo 12

Determinación del contenido en leche desnatada en polvo

El contenido en leche desnatada en polvo de los piensos compuestos se determinará de acuerdo con el método de referencia establecido en el anexo XVI.

Artículo 13

Detección de la presencia de almidón

La presencia de almidón en la leche desnatada en polvo, en la leche en polvo desnaturalizada y en los piensos compuestos se detectará de acuerdo con el método de referencia establecido en el anexo XVII.

Artículo 14

Determinación del contenido en humedad de la nata en polvo

El contenido en humedad de la nata en polvo se determinará de acuerdo con el método de referencia establecido en el anexo XVIII.

Artículo 15

Determinación del contenido en humedad de la mazada ácida en polvo

El contenido en humedad de la mazada ácida en polvo destinada a utilizarse en piensos se determinará de acuerdo con el método de referencia establecido en el anexo XIX.

Artículo 16

Determinación del contenido de grasa láctea

La pureza de la grasa láctea se determinará de acuerdo con el método de referencia establecido en el anexo XX.

CAPÍTULO III

DISPOSICIONES GENERALES Y FINALES

Artículo 17

Aseguramiento de la calidad

Los análisis se efectuarán en laboratorios que dispongan de un sistema de aseguramiento de la calidad analítica, con procedimientos internos de control de calidad. Los laboratorios no acreditados participarán en programas de ensayo de aptitud al menos una vez al año, y sus resultados no se desviarán en más de $2\sigma_R$ (desviación típica de la reproducibilidad del método de referencia) respecto al valor de consenso. Se dispondrá de una descripción detallada de los sistemas utilizados, que se podrá consultar en el laboratorio.

Los laboratorios acreditados según las normas contempladas en el artículo 12 del Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación

▼B

en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ([1]), estarán exentos de la obligación de participar en los ensayos de aptitud.

Artículo 18

Muestreo e impugnación de los resultados de los análisis

1. El muestreo se efectuará de acuerdo con la normativa aplicable al producto estudiado. Si no se presenta ninguna normativa de muestreo, se aplicará la norma ISO 707 FIL 50: Leche y productos lácteos. Guía de muestreo.

2. Los informes de laboratorio de los resultados de los análisis deberán incluir suficiente información para que se pueda hacer una evaluación de dichos resultados según los anexos II y XXI.

3. Para los análisis exigidos por la normativa comunitaria se tomarán muestras por duplicado.

4. En caso de que un operador no acepte los resultados de un análisis, se seguirá el procedimiento descrito en el anexo XXI.

5. Si el fabricante puede demostrar, en el plazo de cinco días laborables desde la fecha del muestreo, que este no se había efectuado de forma correcta, se repetirá el muestreo siempre que sea posible. Si no puede repetirse el muestreo, tendrá que aceptarse el envío.

▼M1

Artículo 19 bis

Notificaciones

Las notificaciones previstas en el artículo 2, en el artículo 4, apartado 1, y en el anexo III, parte C, se realizarán de conformidad con el Reglamento (CE) nº 792/2009 de la Comisión ([2]).

▼B

Artículo 20

Derogaciones

Queda derogado el Reglamento (CE) nº 213/2001.

Las referencias al Reglamento derogado se entenderán hechas al presente Reglamento según la tabla de correspondencias que figura en el anexo XXII.

Artículo 21

Entrada en vigor

El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 31 de marzo de 2008.

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

([1]) DO L 165 de 30.4.2004, p. 1.
([2]) DO L 228 de 1.9.2009, p. 3.

▼B

ANEXO I

(Artículo 1)

LISTA DE MÉTODOS DE REFERENCIA

Índice Mín. = mínimo, Máx. = máximo, Anexo = anexo del Reglamento citado, ESM = extracto seco magro, IP = índice de peróxido, A = aspecto, O = olor, C = consistencia, RTB = recuento total de bacterias, Term = recuento de bacterias termófilas, EM = Estado miembro, FIL = Federación Internacional de Lechería, ISO = Organización Internacional de Normalización, IUPAC = Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, ADPI = Instituto Americano de Productos Lácteos, LC = leche condensada, LNE = leche o nata evaporada.

PARTE A

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite (1)	Método de referencia	Observaciones
Reglamento (CE) nº 2771/1999 — Almacenamiento público	Mantequilla sin salar	Grasa	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Agua	Hasta el 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		ESM	Hasta el 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Ácidos grasos	1,2 mmol/100 g de grasa	ISO 1740:2003FIL 6:2004	
		IP (máx.)	0,3 meq. oxígeno/ 1 000 g grasa	ISO 3976:2006FIL 74:2006	Nota 1
		Coliformes	No detectados en 1 g	Anexo X	Nota 3
		Grasa no láctea	No detectada por análisis de triglicéridos	Anexo XX	
		Marcadores de esteroles	No detectados, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	Anexo VIII	
		Otros marcadores			
		— vainillina	No detectables	Anexo VI	
		— éster etílico de ácido caroténico	≤ 6 mg/kg	Anexo VII	
		— triglicéridos de ácido enántico	No detectables	Anexo V	
		Características organolépticas	Al menos 4 puntos sobre 5 en A, O y C	Anexo IV	
		Dispersión en agua	Al menos 4 puntos	ISO 7586:1985FIL 112A:1989	
Reglamento (CE) nº 2771/1999 — Almacenamiento privado	Mantequilla sin salar	Grasa	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Agua	Hasta el 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite (1)	Método de referencia	Observaciones
		ESM	Hasta el 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
Reglamento (CE) nº 2771/1999 — Almacenamiento privado	Mantequilla salada	Grasa	Mín. 80 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Agua	Hasta el 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		ESM (salvo sal)	Hasta el 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Sal	Hasta el 2 % m/m	ISO 15648:2004FIL 179:2004	
Reglamento (CE) nº 1898/2005, capítulo II	Mantequilla sin salar	Grasa	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Grasa no láctea		Anexo XX	
		Agua	Hasta el 16 % m/m	ISO 3727-1 2001FIL 80-1:2001	
		ESM	Hasta el 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Marcadores:			
		— esteroles	Véase el anexo VIII	Anexo VIII	
		— vainillina	Véase el anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico de ácido caroténico	Véase el anexo VII	Anexo VII	
		— triglicéridos de ácido enántico	Véase el anexo V	Anexo V	
Reglamento (CE) nº 1898/2005, capítulo II	Mantequilla salada	Grasa	Mín. 80 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Grasa no láctea		Anexo XX	
		Agua	Hasta el 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		ESM (salvo sal)	Hasta el 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Sal	Hasta el 2 % m/m	ISO 15648:2003FIL 179:2004	
		Marcadores:			
		— esteroles	Véase el anexo VIII	Anexo VIII	
		— vainillina	Véase el anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico de ácido caroténico	Véase el anexo VII	Anexo VII	
		— triglicéridos de ácido enántico	Véase el anexo V	Anexo V	
Reglamento (CE) nº 1898/2005, capítulo II	Mantequilla concentrada	Grasa	Mín. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite (1)	Método de referencia	Observaciones
		Agua y ESM	Hasta el 0,2 % m/m	ISO 5536:2002FIL 23:2002 (humedad) FIL 24:1964 (ESM)	
		Ácidos grasos	1,2 mmol/100 g de grasa	ISO 1740:2004FIL 6:2004	
		IP (máx.)	0,5 meq. oxígeno/ 1 000 g grasa	ISO 3976:2006FIL 74:2006	Nota 1
		Grasa no láctea	Ausencia	Anexo XX	
		Aroma	Limpio		
		Olor	Ausencia de olores extraños		
		Otros	Ausencia de neutralizantes, antioxidantes y conservantes		
		Marcadores:			
		— esteroles	Véase el anexo VIII	Anexo VIII	
		— vainillina	Véase el anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico de ácido caroténico	Véase el anexo VII	Anexo VII	
		— triglicéridos de ácido enántico	Véase el anexo V	Anexo V	
Reglamento (CE) nº 1898/2005, capítulo II	Nata	Grasa	Mínimo de 35 % m/m	ISO 2450:1999FIL 16 C:1987	
		Grasa no láctea		Anexo XX	
		Marcadores:			
		— esteroles	Véase anexo VIII		Nota 2
		— vainillina	Véase el anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico de ácido caroténico	Véase anexo VII		Nota 2
		— triglicéridos de ácido enántico	Véase el anexo V	Anexo V	
Reglamento (CE) nº 1898/2005, capítulo III	Mantequilla concentrada	Grasa	Mín. 96 % m/m		Nota 2
		Grasa no láctea		Anexo XX	
		ESM	Hasta el 2 % m/m		Nota 2

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite (1)	Método de referencia	Observaciones
		Marcadores:			
		— estigmasterol (95 % m/m)	15 g/100 kg de mantequilla concentrada	Anexo VIII	
		— estigmasterol (85 % m/m)	17 g/100 kg de mantequilla concentrada	Anexo VIII	
		— triglicéridos de ácido enántico	10,34 kg/t de mantequilla concentrada	Anexo V	
		— éster etílico de ácido butírico y estigmasterol		— éster etílico de ácido butírico — estigmasterol: anexo VIII	Nota 2
		— éster etílico de ácido butírico y triglicéridos de ácido enántico		— éster etílico de ácido butírico — triglicéridos de ácido enántico: anexo V	Nota 2
		lecitina (E 322):	Hasta el 0,5 % m/m		Nota 2
		NaC1	Hasta el 0,75 % m/m	ISO 15648:2004FIL 179:2004	
		Ácidos grasos	1,2 mmol/100 g de grasa	ISO 1740:2004FIL 6:2004	
		IP (máx.)	Hasta 0,5 meq. oxígeno/1 000 g grasa	ISO 3976:2006FIL 74:2006	Nota 1
		Aroma	Limpio		
		Olor	Ausencia de olores extraños		
		Otros	Ausencia de neutralizantes, antioxidantes y conservantes		
Reglamento (CE) nº 1898/2005, capítulo IV	Mantequilla sin salar	Grasa	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Agua	Hasta el 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		ESM	Hasta el 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
Reglamento (CE) nº 1898/2005, capítulo IV	Mantequilla salada	Grasa	Mín. 80 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Agua	Hasta el 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		ESM (salvo sal)	Hasta el 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Sal	Hasta el 2 % m/m	ISO 15648:2004FIL 179:2004	

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite (1)	Método de referencia	Observaciones
Artículo 9 y título II del Reglamento (CE) nº 1255/1999	Queso de leche de oveja o de cabra	Leche de vaca	< 1 % m/m	Anexo IX	
Reglamento (CEE) nº 2921/90	Anexo I — Caseína ácida	Agua	Hasta el 12,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Grasa	Hasta el 1,75 % m/m	ISO 5543:2004FIL127:2004	
		Acidez libre	Hasta 0,30 ml de solución de NaOH 0,1 N/g	ISO 5547:1978FIL 91:1979	
Reglamento (CEE) nº 2921/90	Anexo I — Caseína-cuajo	Agua	Hasta el 12,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Grasa	Hasta el 1,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Cenizas	Mín. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978FIL 90:1979	
Reglamento (CEE) nº 2921/90	Anexo I — Caseinatos	Agua	Hasta el 6,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Proteínas lácteas	Mín. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978FIL 92:1979	
		Grasa y cenizas	Hasta el 6,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Cenizas fijas		ISO 5544:1978 — FIL 89:1979	
		Cenizas		ISO 5545:1978 — FIL 90:1979	
Reglamento (CEE) nº 2921/90	Anexo II — Caseína ácida	Agua	Hasta el 10,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Grasa	Hasta el 1,50 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Acidez libre	Hasta 0,20 ml de solución de NaOH 0,1 N/g	ISO 5547:1978FIL 91:1979	
		RTB (máx.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausencia en 0,1 g	ANEXO X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Véanse las notas 3 y 4
Reglamento (CEE) nº 2921/90	Anexo II — Caseína de cuajo	Agua	Hasta el 8,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Grasa	Hasta el 1,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Cenizas	Mín. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978FIL 90:1979	
		RTB (máx.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausencia en 0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Véanse las notas 3 y 4

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite (1)	Método de referencia	Observaciones
Reglamento (CEE) nº 2921/90	Anexo II — Caseinatos	Agua	Hasta el 6,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Proteínas lácteas	Mín. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978FIL 92:1979	
		Grasa y cenizas	Hasta el 6,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004 ISO 5544:1978IDF 89:1979, o ISO 5545:1978FIL 90:1979	
		RTB (máx.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausencia en 0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Véanse las notas 3 y 4
Reglamento (CEE) nº 2921/90	Anexo III — Caseinatos	Agua	Hasta el 6,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Proteínas lácteas	Mín. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978FIL 92:1979	
		Grasa	Hasta el 1,50 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Lactosa	Hasta el 1,00 % m/m	ISO 5548:2004FIL 106:2004	
		Cenizas	Hasta el 6,50 % m/m	ISO 5544:1978FIL 89:1979 o ISO 5545:1978FIL 90:1979	
		RTB (máx.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausencia en 0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Véanse las notas 3 y 4
Reglamento (CE) nº 2799/1999	Piensos compuestos y leche desnatada en polvo (LDP) (para uso en piensos)	Agua (mazada ácida en polvo)	Hasta el 5 % m/m	Anexo XIX	
		Proteína	Como mínimo el 31,4 % del extracto seco magro	ISO 8968-123:2001FIL 20-123:2001	
		Agua (leche desnatada en polvo)	Hasta el 5 % m/m	ISO 5537:2004FIL 26:2004	
		Grasa (leche desnatada en polvo)	Hasta el 11 % m/m	ISO 1736:2000FIL 9C:1987	
		Suero de queso (leche desnatada en polvo)	Ausencia	Anexo XIII	Nota 6
		Almidón (leche desnatada en polvo)	Ausencia	Anexo XVII	
		Agua (mezclas)	Hasta el 5 % del extracto magro	ISO 5537:2004FIL 26:2004	

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite (1)	Método de referencia	Observaciones
		Grasa (mezclas)		Directiva 84/4/CEE de la Comisión (DO L 15 de 18.1.1984, p. 29)	
		Suero de queso (mezclas)	Ausencia	Anexo XIII	
		Contenido en leche desnatada en polvo (del producto final)	Mín. 50 % m/m	Anexo XVI	
		Grasa (en el producto final)	Mín. 2,5 % m/m o 5 % m/m	Directiva 84/4/CEE de la Comisión (DO L 15 de 18.1.1984, p. 29)	Nota 7
		Almidón (en el producto final)	Mín. 2 % m/m	Anexo XVII	Nota 8
		Cobre (en el producto final)	25 ppm	Directiva 78/633/CEE de la Comisión (DO L 206 de 26.7.1987, p. 43)	
Reglamento (CE) nº 214/2001	Leche desnatada en polvo (aerosol)	Grasa	Hasta el 1,0 % m/m	ISO 1736:2000FIL 9C:1987	
		Proteína	Como mínimo el 31,4 % (2)m/m del extracto seco magro	ISO 8968-12:2001FIL 20-12:2001	
		Agua	Hasta el 3,5 % m/m	ISO 5537:2004FIL 26:2004	
		Acidez	Hasta 19,5 ml de NaOH 0,1 N, 10 g extracto seco magro	ISO 6091:1980FIL 86:1981	
		Lactatos	Hasta 150 mg/100 g de extracto seco magro	ISO 8069:2005FIL 69:2005	
		Fosfatasa	Negativo	ISO 11816-1:2006FIL 155-1:2006	
		Índice de insolubilidad	Hasta 0,5 ml a 24 °C	ISO 8156:2005FIL 129:2005	
		Partículas quemadas	Disco A o B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		RTB	40 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Negativo/0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Suero de mantequilla	Negativo	Anexo XIV	
		Suero de queso	Negativo	Anexo XII	
		Suero ácido	Negativo		Nota 2
		Agentes antimicrobianos		Anexo XV	

(1) Sin perjuicio de lo requerido en el Reglamento específico.
(2) El contenido mínimo de proteína será del 34 % a partir del 1 de septiembre de 2009.

▼B

PARTE B

Los métodos de referencia enumerados en la parte B pueden utilizarse para analizar los productos contemplados en cualquiera de los Reglamentos enumerados en la columna 1.

Reglamento de la Comisión	Producto	Código NC	Parámetro	Límite	Método de referencia	Observaciones
Reglamento (CEE) nº 2658/87 Reglamento (CE) nº 2535/2001 Reglamento (CE) nº 1282/2006	Leche y nata (crema), sin concentrar, sin adición de azúcar ni otro edulcorante	0401	Grasa (≤ 6 % m/m)	Los límites son los especificados en la descripción del código NC del producto concreto y, en su caso, en el Reglamento (CEE) nº 3846/87 de la Comisión (DO L 366 de 24.12.1987, p. 1), parte 9 de la nomenclatura de exportación o en el Reglamento (CE) nº 2535/2001 (DO L 341 de 22.12.2001, p. 29)	ISO 1211:2001FIL 1D:1996	
			Grasa (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999FIL 16C:1987	
	Leche y nata (crema) concentrada o con adición de azúcar u otro edulcorante	0402	Grasa (forma líquida)		ISO 1737:1999FIL 13C:1987	
			Grasa (forma sólida)		ISO 1736:2000FIL 9C:1987	
			Proteína		ISO 8968-123:2001FIL20-123:2001	
			Sacarosa (contenido normal)		ISO 2911:2004FIL 35:2004	
			Sacarosa (contenido bajo)			Nota 2
			Sólidos (LC)		ISO 6734:1989FIL 15B:1991	
			Sólidos (LNE)		ISO 6731:1989FIL 21B:1987	
			Agua (leche en polvo)		ISO 5537:2004FIL 26:2004	
			Agua (nata en polvo)		Anexo XVIII	

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Código NC	Parámetro	Límite	Método de referencia	Observaciones
	Suero de mantequilla, leche y nata fermentadas o acidificadas, concentradas o sin concentrar, con adición de azúcar u otro edulcorante	0403	Grasa		ISO 1211:2001FIL 1D:1996 ISO 1736:2000FIL 9C:1987 ISO 2450:1999FIL 16 C:1987 ISO 7208:1999FIL 22B:1987 ISO 8262-3:2005FIL 124-3:2005	
			Proteína		ISO 8968-123:2001FIL 20-123:2001	
			Sacarosa (contenido normal)		ISO 2911:2004FIL 35:2004	
			Sacarosa (contenido bajo)			Nota 2
			Agua (mazada ácida en polvo)		Anexo XIX	
			Agua (mazada dulce en polvo)		ISO 5537:2004FIL26:2004	
			Sólidos (otros productos)		Métodos aprobados por la autoridad competente	
	Lactosuero, incluso concentrado o con adición de azúcar u otro edulcorante; productos constituidos por los componentes naturales de la leche	0404	Grasa		ISO 1736:2000FIL 9C:1987 ISO 2450:1999FIL 16C:1987 ISO 7208:1999FIL 22B:1987	
			Proteína		ISO 8968-123:2001FIL 20-123:2001	
			Sacarosa (contenido normal)		ISO 2911:2004FIL 35:2004	
			Sacarosa (contenido bajo)			Nota 2
		0404 90	Proteína		ISO 8968 12 2001FIL 20-12:2001	
			Agua		FIL 21B:1987	
			Sólidos		ISO 6734:1989FIL 15B:1991	

▼B

Reglamento de la Comisión	Producto	Código NC	Parámetro	Límite	Método de referencia	Observaciones
			(Productos concentrados)		ISO 6731:1989FIL 21B:1987	
	Mantequilla y demás materias grasas de la leche; pastas lácteas para untar	0405	Grasa (si ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Mantequilla	Agua		ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
			ESM		ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
			NaCl		ISO 15648:2004FIL 179:2004	
			Grasa (si > 99 % m/m)		FIL 24:1964	
	Butteroil		Agua (si grasa < 99 % m/m)		ISO 5536:2002IDF 23:2002	
	Queso y cuajada	0406	Grasa		ISO 1735:2004FIL 5:2004	
			Sólidos		ISO 5534:2004FIL 4:2004	
			Sólidos (Ricotta)		ISO 2920:2004FIL 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006FIL 88:2006	
			Lactosa		ISO 5765-12:2002FIL 79-12:2002	
Reglamento (CEE) nº 2658/87	Piensos compuestos	2309	Lactosa		Anexo XI	

Notas de la lista de métodos de referencia de la Unión Europea:

Nota 1: Aislamiento de la grasa láctea según se describe en ISO 1740:1991 (protección de la luz).

Nota 2: No se ha establecido ningún método de referencia. Métodos aprobados por la autoridad competente.

Nota 3: La muestra debe prepararse según las normas ISO 8261:2001FIL 122:2001.

Nota 4: La incubación dura 48 horas a 55 °C; debe procurarse que no se seque el medio de cultivo.

Nota 5: % m/m ESM = % m/m sólidos — % m/m grasa.

Nota 6: Directiva 84/4/CEE de la Comisión.

Nota 7: Reglamento (CE) nº 2799/1999 de la Comisión (DO L 340 de 31.12.1999, p. 3-27).

Nota 8: Directiva 78/633/CEE de la Comisión.

▼B

ANEXO II

(Artículo 3)

EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE UN ENVÍO RESPECTO AL LÍMITE LEGAL

1. PRINCIPIO

En caso de que la legislación aplicable establezca métodos de muestreo detallados, serán estos métodos los que se sigan. En todos los demás casos se utilizará una muestra formada por al menos 3 unidades de muestra tomadas aleatoriamente del envío objeto de control. Podrá prepararse una muestra compuesta. El resultado obtenido se comparará con los límites legales calculando un intervalo de confianza del 95 % como dos veces la desviación típica, dependiendo la desviación típica correspondiente de si: 1) el método está validado mediante un ensayo de colaboración internacional con valores de σr y σ_R, o si 2) se ha calculado la reproducibilidad interna en caso de validación dentro del propio laboratorio. Este intervalo de confianza se iguala entonces a la incertidumbre de la medición del resultado.

2. EL MÉTODO ESTÁ VALIDADO MEDIANTE COLABORACIÓN INTERNACIONAL

En este caso, se han establecido la desviación típica de la repetibilidad σ_R y la desviación típica de la reproducibilidad σ_R y el laboratorio puede demostrar que cumple las características del método validado.

Se calcula la media aritmética $\overline{x}$ de las *n* mediciones repetidas.

Se calcula la incertidumbre ampliada ($k = 2$) de $\overline{x}$ como

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

Si el resultado final *x* de la medición se calcula utilizando una fórmula del tipo$x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ o $x = y_1 / y_2$ deben seguirse los métodos normales para combinar desviaciones típicas en tales casos.

Se considera que el envío no se ajusta al límite superior legal *UL* si

$\overline{x} - U > UL$

en caso contrario, se considera que sí cumple el *UL*.

Se considera que el envío no se ajusta al límite inferior legal *LL* si

$\overline{x} + U < LL$

en caso contrario, se considera que sí cumple el *LL*.

3. VALIDACIÓN EN EL PROPIO LABORATORIO CON CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN TÍPICA DE LA REPRODUCIBILIDAD INTERNA

En caso de que se utilicen métodos no especificados en el presente Reglamento y no se hayan establecido medidas de la precisión, deberá efectuarse una validación en el propio laboratorio. En las fórmulas para calcular la incertidumbre ampliada *U* hay que utilizar la desviación típica de la repetibilidad interna s_{ir} y la desviación típica de la reproducibilidad interna s_{iR} en lugar de σ_r y σ_R, respectivamente.

Las normas de decisión se recogen en (1). Sin embargo, si se considera que el envío no cumple el límite legal, hay que repetir las mediciones con el método especificado en el presente Reglamento, y tomar la decisión según lo indicado en (1).

▼B

ANEXO III

(Artículo 4)

EVALUACIÓN DE LOS CATADORES Y DE LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ORGANOLÉPTICOS

Si se utilizan métodos de puntuación se aplicarán los siguientes métodos (norma FIL 99C:1997).

A. DETERMINACIÓN DEL «ÍNDICE DE REPETIBILIDAD»

En un plazo de 12 meses, un catador analizará al menos 10 muestras como duplicados a ciegas. Normalmente se hará en varias sesiones. Los resultados de las distintas características del producto se evaluarán mediante la fórmula:

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

siendo:

w_I: índice de repetibilidad

x_{i1}: puntuación en la primera evaluación de la muestra x_i

x_{i2}: puntuación en la segunda evaluación de la muestra x_i

n: número de muestras

Las muestras que se evalúen deben reflejar una amplia variedad de calidades. w_I no debe exceder de 1,5 (en una escala de 5).

B. DETERMINACIÓN DEL «ÍNDICE DE DESVIACIÓN»

Este índice debe utilizarse para comprobar si un catador utiliza la misma escala de evaluación cualitativa que un grupo experimentado de catadores. Las puntuaciones obtenidas por el catador se comparan con la media de las puntuaciones obtenidas por el grupo de catadores.

Para evaluar los resultados se utiliza la fórmula siguiente:

$$D_1 = 1 + \left(\sum \left[\left(x_{i1} - \overline{x}_{i1}\right)^2 + \left(x_{i2} - \overline{x}_{i2}\right)^2\right]\right)/\left(2n\right)$$

siendo:

x_{i1}; x_{i2}: véase la sección A

$\overline{x}_{i1}$; $\overline{x}_{i2}$: puntuación media del grupo de catadores en las evaluaciones primera y segunda, respectivamente, de la muestra x_i

n: número de muestras (al menos 10 en 12 meses)

Las muestras que se evalúen deben reflejar una amplia variedad de calidades. D_I no debe exceder de 1,5 (en una escala de 5).

Los Estados miembros deben notificar las dificultades que encuentren al aplicar este método.

Cuando se vea que ciertos catadores superan el límite de 1,5 en los índices de desviación o repetibilidad, los peritos de la autoridad oficial deberán realizar una o más comprobaciones aleatorias de «repetición» con muestras graduadas por ellos a lo largo de las siguientes semanas, o realizar una o más comprobaciones «acompañadas» con tales catadores. Es necesaria una estrecha supervisión para decidir si se siguen utilizando sus servicios. Los resultados deben documentarse y conservarse como prueba del seguimiento.

▼B

C. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN DIFERENTES REGIONES DE UN ESTADO MIEMBRO Y EN DIFERENTES ESTADOS MIEMBROS

Cuando corresponda, debe organizarse una prueba al menos una vez al año para comparar los resultados obtenidos por catadores de distintas regiones. Si se observan diferencias significativas, se tomarán las medidas necesarias para descubrir las razones y llegar a resultados comparables.

Los Estados miembros podrán organizar pruebas para comparar los resultados obtenidos por sus propios catadores y por catadores de Estados miembros vecinos. Si se vieran diferencias significativas, se debería efectuar una investigación en profundidad con el objetivo de alcanzar resultados comparables.

Los Estados miembros deberán informar a la Comisión de los resultados de dichas comparaciones.

▼B

ANEXO IV

(Artículo 4)

EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LA MANTEQUILLA

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El objetivo de este método de evaluación organoléptica de la mantequilla consiste en proporcionar un método uniforme aplicable en todos los Estados miembros.

Puede obtenerse más información consultando la norma internacional sobre leche y productos lácteos de la FIL, FIL 99 — Partes 1, 2 y 3 sobre evaluación organoléptica.

2. DEFINICIONES

«Evaluación organoléptica»: El examen de los atributos de un producto mediante los órganos sensoriales.

«Comisión»: Un grupo de catadores seleccionados que trabajan durante la evaluación sin comunicarse entre sí y sin influirse mutuamente.

«Catador»: Una persona seleccionada por su capacidad de efectuar una prueba organoléptica. Este tipo de catador puede tener una experiencia limitada.

«Catador experto»: Una persona con un elevado grado de sensibilidad sensorial y experiencia de la metodología organoléptica, que puede hacer evaluaciones organolépticas coherentes y fiables de diversos productos. Este tipo de catador debe tener una buena memoria sensorial a largo plazo.

«Puntuación»: La evaluación organoléptica realizada por una comisión utilizando una escala numérica. Debe utilizarse una nomenclatura de los defectos.

«Clasificación»: Una ordenación cualitativa realizada a partir de la puntuación obtenida.

«Documentos de control»: Los documentos utilizados para registrar las distintas puntuaciones asignadas a cada atributo y la clasificación final del producto (este documento puede utilizarse también para registrar la composición química).

3. SALA DE PRUEBA

Puede obtenerse más información consultando las normas ISO 8589 e ISO/DIS 22935-2FIL 99-2 punto 7.

Deben tomarse precauciones a fin de que los catadores situados en la sala de prueba no se vean influidos por factores externos.

La sala de prueba debe estar libre de olores extraños y ser de fácil limpieza. Las paredes deben ser de color claro y no reflejar la luz.

La sala de prueba y su iluminación deben ser tales que no se vean afectadas las propiedades de los productos examinados.

La sala debe estar provista de un control termostático adecuado que permita mantener una temperatura constante de la mantequilla. La mantequilla debe tener una temperatura de 12º C (± 2 °C) en el momento de su clasificación.

4. SELECCIÓN DE LOS CATADORES

El catador debe conocer los productos de la mantequilla y ser competente para realizar la clasificación organoléptica. Su competencia debe ser evaluada de forma periódica (al menos una vez al año) por las autoridades competentes.

4.1. Deben consultarse las normas ISO/DIS 22935-1FIL 99-1 punto 4 (contratación) y punto 5.1 para tener información sobre los requisitos generales y las pruebas de cribado que pueden utilizarse antes de que un nuevo catador actúe oficialmente.

Es fundamental que haya una formación continua y se organicen periódicamente sesiones generales. En ISO 8586-1 se encuentra información sobre la formación destinada a la comisión.

▼B

4.2. La formación inicial debe cubrir los aspectos siguientes:

— teoría general e importancia práctica de la evaluación organoléptica,

— métodos, escalas y descripción de las impresiones organolépticas,

— detección y reconocimiento de los atributos organolépticos y de los términos organolépticos específicos,

— formación de base sobre la fabricación de mantequilla,

— referencias y muestras validadas para ayudar al catador a identificar aromas concretos y la intensidad del aroma en el producto.

5. REQUISITOS DE LA COMISIÓN

El número de catadores de la comisión debe ser impar, con un mínimo de tres. En su mayoría serán funcionarios de la autoridad competente o personas autorizadas que no estén empleadas en la industria láctea.

Habrá un presidente de la comisión, que será responsable de todo el procedimiento y podrá participar en la comisión.

Antes de la evaluación, ha de tenerse en cuenta una serie de factores para obtener unos resultados óptimos de los catadores:

— los catadores no deben padecer ninguna enfermedad que pueda afectar a sus resultados. En caso contrario, el catador afectado debe ser sustituido en la comisión por otro,

— los catadores deben ser puntuales para participar en la evaluación y asegurarse de tener tiempo suficiente para hacerla,

— los catadores no deben ponerse sustancias de olor pronunciado, como perfumes, lociones para el afeitado, desodorantes, etc., y han de evitar comer alimentos muy aromatizados (por ejemplo, con muchas especias), etc.,

— los catadores no pueden fumar, comer ni beber más que agua durante la media hora previa a la evaluación.

6. PRESTACIÓN

Todos los catadores deben participar en comisiones fijas de evaluación organoléptica para mantener sus competencias. La frecuencia dependerá del volumen y del flujo de mantequilla y, en la medida de lo posible, será como mínimo de una comisión al mes.

Los catadores superiores también deben participar en varias comisiones cada año y, en la medida de lo posible, al menos una vez por trimestre.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Es fundamental que se oculte la identidad de las muestras durante la evaluación, para evitar cualquier posible sesgo. Las muestras deben llevar un código.

Esta operación debe organizarse antes de la evaluación. La temperatura exigida para la mantequilla durante su transporte a la sala de prueba debe ser de 6 °C ± 2 °C.

Cuando la evaluación organoléptica se realice en el almacén frigorífico, se tomará la muestra utilizando una sonda para mantequilla. Si la evaluación organoléptica se realiza en un lugar distinto del almacén frigorífico, se tomará como mínimo una muestra de 500 g. Durante la evaluación, la mantequilla deberá estar a la temperatura de 12 °C (± 2 °C) (nota: en ISO/DIS 22935-2FIL 99-2 la temperatura de evaluación de la mantequilla es de 14 °C ± 2 °C). Deben evitarse a toda costa las desviaciones importantes de esta temperatura.

8. EVALUACIÓN DE CADA ATRIBUTO

8.1. La evaluación organoléptica debe realizarse con relación a los tres atributos siguientes: aspecto, consistencia y aroma.

El «aspecto» supone las siguientes características: color, pureza visible, ausencia de contaminación física, ausencia de crecimiento de mohos y uniformidad de la dispersión en agua. La dispersión de agua se evalúa de acuerdo con la Norma FIL 112A/1989.

▼B

La «consistencia» supone las siguientes características: cuerpo, textura y firmeza. Puede controlarse la untabilidad con medios físicos en caso de que algún Estado miembro lo desee, a fin de satisfacer los requisitos de los clientes. La Comisión puede tomar la decisión de armonizar la metodología en el futuro.

«Cuerpo» es el término que se refiere a la cohesión del producto tal como se consume. Se asocia normalmente con la firmeza y la untabilidad, y debe ser uniforme en todo el producto. Está muy relacionado con la textura y es la capacidad del producto de no desmoronarse por su propio peso. Lo indica la resistencia durante el corte y puede medirse mecánicamente y por la sensación en la boca y con el dedo.

El «sabor» es la característica tal como se percibe en la boca, predominantemente en las papilas gustativas de la lengua.

El «aroma» es la característica tal como se percibe en la nariz y el sentido del olfato.

Una desviación significativa respecto a la temperatura recomendada impide que se realice una evaluación fiable de la consistencia y del sabor. La temperatura tiene una importancia capital.

Es necesario aplazar la clasificación de la mantequilla si la temperatura está fuera del margen recomendado.

8.2. Cada atributo debe evaluarse organolépticamente por separado. La puntuación debe darse con arreglo al cuadro 1.

8.3. Puede ser conveniente que los catadores puntúen conjuntamente, antes de iniciar la evaluación, una o más muestras de referencia en cuanto a su aspecto, consistencia y sabor, a fin de aplicar criterios uniformes.

8.4. La puntuación para la aceptación es de la forma siguiente:

Véase el punto 7. Nomenclatura y descripción de los criterios aplicables a los puntos cuando se da la puntuación.

	Máximo	Obligatorio
Aspecto	5	4
Consistencia	5	4
Sabor/aroma	5	4

— Cuando no se obtenga la puntuación necesaria, deberá describirse el defecto.

— La puntuación dada por cada evaluador respecto a cada atributo debe registrarse en el documento de control.

— El producto se acepta o rechaza según la decisión de la mayoría.

— No debe ser frecuente (no más de una vez cada 20 muestras) el caso en que la diferencia entre las puntuaciones individuales de cada atributo sea mayor que la distancia entre puntos adyacentes. En caso contrario, el presidente de la comisión deberá comprobar la competencia de esta.

9. SUPERVISIÓN

Será responsable generalmente de todo el procedimiento un presidente de la comisión, que debe ser funcionario de la autoridad competente y puede ser miembro de la comisión. Debe registrar las puntuaciones individuales de cada atributo en el documento de control y certificar si el producto es aceptado o rechazado.

10. NOMENCLATURA

Véase el cuadro 2 adjunto.

11. BIBLIOGRAFÍA

FIL-IDF 99C:1997: Evaluación organoléptica de productos lácteos por puntuación — Método de referencia.

ISO/DIS 22935FIL 99: Norma internacional para la leche y los productos lácteos — Análisis organoléptico — Partes 1-3.

▼B

ISO 8586-1: Análisis organoléptico — Orientaciones generales para la sección, formación y supervisión de catadores — Parte 1.

ISO 8589: Análisis organoléptico — Orientaciones generales sobre el diseño de las salas de prueba.

FIL-IDF 112A:1989: Mantequilla — Determinación del valor de dispersión en agua.

Cuadro 1

Puntuación de la mantequilla

Aspecto			Consistencia			Sabor + aroma		
Puntos	Nº (1)	Observaciones	Puntos (clase de calidad)	Nº (1)	Observaciones	Puntos (clase de calidad)	Nº (1)	Observaciones
5		*Muy buena* tipo ideal calidad máxima (uniformemente seco)	5		*Muy buena* tipo ideal calidad máxima (fácilmente untable)	5		*Muy buena* tipo ideal calidad máxima (aroma absolutamente puro y agradable)
4		*Bueno* (2) sin defectos evidentes	4	 17 18	*Buena* (2) dura blanda	4		*Buenos* (2) sin defectos evidentes
3	 1 2 3 4 5 6 7 8	*Aceptable (defectos leves)* humedad libre no uniforme, bicolor entreverado veteado, jaspeado manchado separación de aceite exceso de color textura porosa	3	 14 15 16 17 18	*Aceptable (defectos leves)* baja, frágil, grumosa pastosa, grasienta untuosa dura blanda	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Aceptable (defectos leves)* impuros sabor extraño ácidos sabor cocido, quemado sabor a pienso acre, amargo demasiado salado
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Pobre (defectos evidentes)* humedad libre entreverado veteado, jaspeado manchado separación de aceite materia extraña enmohecido sal sin disolver	2	 14 15 16 17 18	*Pobre (defectos evidentes)* baja, frágil, grumosa pastosa, grasienta untuosa dura blanda	2	 21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Pobre (defectos evidentes)* impuros sabor extraño aroma a viejo ácido sabor oxidado, metálico sabor a pienso acre, amargo demasiado salado mohoso, soso, corrompido sabor químico
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Muy pobre (defectos graves)* humedad libre entreverado veteado, jaspeado manchado separación de aceite exceso de color granuloso materia extraña enmohecido sal sin disolver	1	 14 15 16 17 18	*Muy pobre (defectos graves)* baja, frágil, grumosa pastosa, grasienta untuosa dura blanda	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Muy pobre (defectos graves)* sabor extraño caseoso, sabor a queso ácido ácido aroma de levadura sabor a moho rancio aceitoso, sabor a pescado sabor a sebo sabor oxidado, metálico acre, amargo demasiado salado mohoso, soso, corrompido sabor a malta Sabor químico

(1) Cuadro 2.
(2) Los defectos mencionados bajo «bueno» son desviaciones muy pequeñas respecto al tipo ideal.

▼B

Cuadro 2

Cuadro de defectos de la mantequilla

I.	Aspecto
1.	Humedad libre
2.	No uniforme, bicolor
3.	Entreverado
4.	Veteado, jaspeado
5.	Manchado
6.	Separación de aceite
7.	Exceso de color
8.	Textura porosa
9.	Granuloso
10.	Materia extraña
11.	Enmohecido
12.	Sal sin disolver
II.	Consistencia
14.	Corta, frágil, grumosa
15.	Pastosa, grasienta
16.	Untuosa
17.	duro
18.	Blanda
III.	Sabor y aroma
20.	Sin aroma
21.	Impuro ([1])
22.	Aroma extraño
23.	Aroma a viejo
24.	Caseoso, aroma a queso ácido
25.	Ácido
26.	Aroma de levadura
27.	a) Sabor a cocido
	b) Sabor a quemado
28.	Sabor a moho
29.	Rancio
30.	Aceitoso, sabor a pescado
31.	Sabor a sebo
32.	a) Sabor oxidado
	b) Sabor metálico
33.	Aroma de pienso
34.	Acre, amargo
35.	Demasiado salado
36.	Mohoso, soso, corrompido
37.	Aroma de malta
38.	Sabor químico

([1]) Esta designación debe utilizarse lo menos posible y sólo cuando el defecto no pueda describirse de forma más precisa.

▼B

ANEXO V

(Artículo 5)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDO DE ÁCIDO ENÁNTICO EN MANTEQUILLA, BUTTEROIL Y NATA MEDIANTE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE TRIGLICÉRIDOS

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método se aplica a la determinación del contenido del triglicérido de ácido enántico en mantequilla, butteroil y nata.

2. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Se entenderá por «contenido de ácido enántico» el contenido de triglicérido de ácido enántico determinado por el procedimiento especificado en el presente método.

Nota: El contenido de ácido enántico se expresa en kg por tonelada de producto en relación con el butteroil y la mantequilla, y en kg por tonelada de grasa láctea en relación con la nata.

3. PRINCIPIO

Se extrae la grasa láctea de los distintos productos siguiendo la norma ISO 14156 FIL 172:2001. La determinación cuantitativa del contenido del triglicérido de ácido enántico en la grasa extraída se efectúa mediante cromatografía capilar de gases (CG). El resultado obtenido con la muestra se evalúa respecto al triglicérido de ácido caproico utilizado como patrón interno.

Nota: También se ha visto que la tributirina es un patrón interno satisfactorio.

4. REACTIVOS

Solo deben utilizarse reactivos de pureza de grado analítico.

4.1. n-hexano

4.2. Patrón de triglicérido de ácido caproico, con una pureza mínima del 99 %

4.3. Patrón de triglicérido de ácido enántico, con una pureza mínima del 99 %

4.4. Sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4).

5. EQUIPO

Se empleará el material común de laboratorio y, en particular:

5.1. Balanza analítica con precisión de 1 mg

5.2. Matraces aforados, con capacidades de 10 ml y 20 ml

5.3. Tubos de centrífuga de 30 ml de capacidad

5.4. Rotavapor

5.5. Estufa que pueda mantenerse a la temperatura de 50 °C ± 5 °C

5.6. Filtros de papel de porosidad media, de aproximadamente 15 cm de diámetro

5.7. Equipo de cromatografía de gases

5.7.1. Cromatógrafo de gases provisto de un inyector con o sin fraccionamiento o en columna, y de un detector de ionización de llama

5.7.2. Columna de CG, con una fase estacionaria que se haya utilizado con éxito para separar triglicéridos (100 % de dimetilpolisiloxano o polisiloxano con -95 % de metilo y 5 % de fenilo). Se selecciona la fase estacionaria, la longitud de la columna (entre 4 y 15 m), el diámetro interior (entre 0,22 y 0,50 mm) y el espesor de la película (0,12 μm o más), teniendo en cuenta la experiencia del laboratorio y el sistema de inyección empleado. En cualquier caso, la columna seleccionada debe proporcionar tanto una separación completa entre el pico del disolvente y el triglicérido de ácido caproico como una resolución en la línea de base de los picos de triglicérido de ácido caproico y de ácido enántico. Más abajo se encuentra una lista de las condiciones aplicables.

▼B

5.7.2.1. Ejemplo de condiciones aplicables cuando se utiliza un inyector con fraccionamiento:

— Gas portador: helio

— Presión en la cabeza de la columna: 100 kPa

— Columna: columna de sílice fundida de 12 m de longitud, 0,5 mm de diámetro interior y 0,1 μm de espesor de película

— Fase estacionaria: 100 % de dimetilpolisiloxano o polisiloxano con -95 % de metilo y 5 % de fenilo (por ejemplo, HT5)

— Temperatura de la columna: temperatura inicial de 130 °C, mantenida durante 1 min, elevada a la velocidad de 20 °C/min hasta 260 °C y después elevada a la velocidad de 30 °C/min hasta 360 °C; después se mantiene a 360 °C durante 10 min

— Temperatura del detector: 370 °C

— Temperatura del inyector: 350 °C

— Relación de fraccionamiento: 1:30

— Cantidad de muestra inyectada: 1 μl.

5.7.2.2. Ejemplo de condiciones aplicables cuando se utiliza un inyector en columna:

— Gas portador: hidrógeno (sistema de flujo constante)

— Presión en la cabeza de la columna: 89 kPa

— Columna: columna de sílice fundida de 4 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interior y 0,25 μm de espesor de película

— Fase estacionaria: polisiloxano con 95 % de dimetilo y 5 % de fenilo

— Temperatura de la columna: temperatura inicial de 60 °C, mantenida durante 2 min, elevada a la velocidad de 35 °C/min hasta 340 °C, que se mantiene durante 5 min

— Temperatura del detector: 350 °C

— Cantidad de muestra inyectada: 1 μl.

5.8. Jeringa de inyección de 5 μl de capacidad.

6. MUESTREO

Es importante que el laboratorio reciba una muestra realmente representativa y que no se haya alterado ni cambiado durante su transporte o almacenamiento.

El muestreo no forma parte del método especificado en esta norma internacional. Se presenta un método recomendado de muestreo en la norma FIL 50C:1995 o ISO 707-1997 — Leche y productos lácteos — Guía de muestreo.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. **Preparación de la muestra problema y de la porción de ensayo**

Se procede de acuerdo con la norma ISO 14156 FIL 172:2001

7.1.1. *Butteroil, mantequilla*

7.1.1.1. Se funden entre 50 g y 100 g de la muestra problema en la estufa (5.5).

7.1.1.2. Se colocan entre 0,5 g y 1,0 g de sulfato sódico anhidro (5.4) en un papel de filtro plegado.

7.1.1.3. Se filtra la grasa a través del papel de filtro que contiene el sulfato sódico anhidro, y se recoge el filtrado en un vaso mantenido en la estufa (5.5). Cuando se decante la mantequilla fundida sobre el papel de filtro, ha de procurarse que no pase nada de suero.

7.1.2. *Nata*

7.1.2.1. Se pone la muestra problema a la temperatura de 20 °C ± 2 °C.

7.1.2.2. Se mezcla o se remueve a fondo la muestra.

7.1.2.3. Se diluye una cantidad adecuada de muestra problema para obtener 100 ml de porción de ensayo con un 4 % aproximado de grasa (m/m).

▼B

7.1.2.4. Se procede como con la leche cruda y la leche homogeneizada (véase la norma ISO 14156 FIL 172:2001, punto 8.3) para extraer la grasa de la nata.

7.1.2.5. En un matraz aforado de 10 ml (5.2), se pesa 1 g de la grasa extraída, con una precisión de 1 mg. Se añade 1 ml de la solución 7.2.2. Se enrasa con n-hexano (4.1) y se homogeneiza.

7.1.2.6. Se introduce 1 ml de la solución 7.1.1.2 en un matraz aforado de 10 ml (5.2) y se enrasa con n-hexano (4.1).

7.2. **Preparación de los patrones de calibración**

7.2.1. Se disuelven 100 mg de triglicérido de ácido enántico (4.3) en 10 ml de n-hexano (4.1).

7.2.2. Se disuelven 100 mg de triglicérido de ácido caproico (4.2) en 10 ml de n-hexano (4.1).

7.2.3. Se introduce 1 ml de la solución 7.2.2 en un matraz aforado de 10 ml (5.2). Se enrasa con n-hexano (4.1).

7.2.4. Se introducen 1 ml de la solución 7.2.1 y 1 ml de la solución 7.2.2 en un matraz aforado de 10 ml (5.2). Se enrasa con n-hexano (4.1).

7.2.5. Se introduce 1 ml de la solución 7.2.4 en un matraz aforado de 10 ml (5.2) y se enrasa con n-hexano (4.1).

7.3. **Determinación cromatográfica**

7.3.1. Se inyecta dos veces 1 µl de la solución patrón 7.2.5.

7.3.2. Se inyecta 1 µl de cada solución de muestra.

Nota: Si se adopta el sistema de inyector en columna, debe aplicarse una dilución mayor tanto a la solución patrón como a las de muestra.

7.3.3. Se repite la operación 7.3.1 cada tres muestras, a fin de que los grupos de muestras vayan precedidos y seguidos de inyecciones de patrón. Los resultados se basan en los factores de respuesta medios de los cromatogramas patrón.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

En cada cromatograma, se integra el área de los picos correspondientes a los triglicéridos de ácido enántico y de ácido caproico.

Se siguen estas instrucciones con cada grupo de muestras entre dos inyecciones de patrón; el patrón inyectado dos veces justo antes del grupo es STD_1 y el patrón inyectado dos veces justo después de él es STD_2.

8.1. **Calibración**

8.1.1. Se calcula el factor de respuesta de cada duplicado de STD_1, $Rf_1(a)$ y $Rf_1(b)$.

Rf_1 (a) o (b) = (área bajo el pico del triglicérido del ácido caproico/área bajo el pico del triglicérido del ácido enántico) × 100

Se calcula el factor de respuesta medio, Rf_1

$$Rf_1 = (Rf_1(a) + Rf_1(b)) / 2$$

8.1.2. Análogamente, se calcula el factor de respuesta medio de STD_2, Rf_2.

8.1.3. Se calcula el factor de respuesta medio, Rf

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) / 2$$

8.2. **Muestras problema**

Respecto a cada cromatograma obtenido entre STD_1 y STD_2, se calcula el contenido de ácido enántico, C (kg/t):

C = (área bajo el pico del triglicérido del ácido enántico × Rf × 100)/(área bajo el pico del triglicérido del ácido caproico × Wt × 1 000),

siendo:

— Wt = peso tomado de grasa (g),

— 100 = volumen de dilución de la muestra,

— 1 000 = factor de conversión (para pasar de µg/g a kg/t).

▼B

En caso de muestras de mantequilla, se tiene en cuenta el contenido de grasa de la mantequilla y se calcula un valor de concentración corregido, $C_{mantequilla}$ (kg/t de mantequilla)

$$C_{mantequilla} = C_{grasa} \times F$$

siendo F el contenido de grasa en la mantequilla.

9. PRECISIÓN

En (12) se encuentran datos de un ensayo interlaboratorios efectuado con mantequilla de acuerdo con las normas ISO 5725-1 e ISO 5725-2 sobre el método de la precisión.

Los valores de los límites de repetibilidad y de reproducibilidad se expresan en relación con una probabilidad del 95 % y pueden no ser aplicables a bandas de concentración y matrices distintas de las indicadas.

9.1. **Repetibilidad**

Las diferencias absolutas entre dos resultados particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, con el mismo equipo, dentro de un breve plazo, no superarán en más del 5 % de los casos el valor de 0,35 kg/t.

9.2. **Reproducibilidad**

Las diferencias absolutas entre dos resultados particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en distintos laboratorios, por distintos operarios, con distintos equipos, no superará en más del 5 % de los casos el valor de 0,66 kg/t.

10. LÍMITES DE TOLERANCIA: LÍMITES INFERIORES (EN CASO DE CANTIDADES INSUFICIENTES)

10.1. **Deben tomarse tres muestras del producto marcado para comprobar la corrección del marcado del producto**

10.2. **Mantequilla y mantequilla concentrada**

10.2.1. La tasa de incorporación es de 11 kg de triglicérido de ácido enántico de una pureza mínima del 95 % por tonelada de mantequilla, es decir, 10,45 kg/t.

10.2.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el menor de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 9,51 kg/t (95 % de la tasa mínima de incorporación de triglicérido de ácido enántico con una pureza del 95 %, una sola determinación),

— 6,89 kg/t (70 % de la tasa mínima de incorporación de triglicérido de ácido enántico con una pureza del 95 %, una sola determinación),

— la concentración del marcador en la muestra que arroje el resultado más bajo se utiliza en conjunción con la interpolación entre 9,51 kg/t y 6,89 kg/t.

10.3. **Nata**

10.3.1. La tasa de incorporación es de 10 kg de triglicérido de ácido enántico de una pureza mínima del 95 % por tonelada de grasa láctea, es decir, 9,50 kg/t de grasa láctea marcada.

10.3.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 8,60 kg/t (95 % de la tasa mínima de incorporación de triglicérido de ácido enántico con una pureza del 95 %, una sola determinación),

— 6,23 kg/t (70 % de la tasa mínima de incorporación de triglicérido de ácido enántico con una pureza del 95 %, una sola determinación),

▼B

— la concentración del marcador en la muestra que arroje el resultado más bajo se utiliza en conjunción con la interpolación entre 8,60 kg/t y 6,23 kg/t.

11. LÍMITES DE TOLERANCIA: LÍMITES SUPERIORES (EN CASO DE CANTIDADES EXCESIVAS EN MÁS DEL 20 %)

11.1. **Deben tomarse tres muestras del producto marcado para comprobar la corrección del marcado del producto**

11.2. **Mantequilla y mantequilla concentrada**

11.2.1. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— el límite superior es de 12,96 kg/t.

11.3. **Nata**

11.3.1. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— el límite superior es de 11,82 kg/t.

12. INFORMACIÓN ADICIONAL: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE TRIENANTOATO EN GRASA BUTÍRICA MEDIANTE ANÁLISIS DE TRIGLICÉRIDOS

Se han efectuado cuatro ensayos en colaboración para determinar el contenido de trienantoato en mantequilla marcada.

En el primer ensayo circular participaron nueve laboratorios y no se dieron instrucciones sobre los métodos analíticos que se debían usar.

En el segundo ensayo circular participaron diez laboratorios y se aplicaron cuatro métodos diferentes:

— cuantificación de heptanoato de metilo utilizando n-nonano o nonanoato de metilo como patrón interno,

— cuantificación de trienantoato utilizando tricaproato como patrón interno,

— cuantificación de heptanoato de metilo utilizando una mezcla o muestra de calibración,

— cuantificación de heptanoato de metilo utilizando una mezcla de calibración.

Por otra parte, en los casos en que se analizaron ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), se aplicaron dos métodos diferentes de metilación (De Francesco y Christopherson & Glass).

Dados los resultados obtenidos, se seleccionaron dos métodos para efectuar el tercer ensayo circular:

— cuantificación de heptanoato de metilo utilizando n-nonano o nonanoato de metilo como patrón interno,

— cuantificación de trienantoato utilizando tricaproato como patrón interno.

Los resultados de siete laboratorios mostraron que el método FAME daba una mayor variabilidad y, por tanto, se decidió utilizar solo la determinación de trienantoato como triglicérido, siguiendo el procedimiento de la cuantificación q de trienantoato, con tricaproato como patrón interno. Por otra parte, el análisis de triglicéridos ha de efectuarse en columna capilar.

En el cuarto ensayo circular, se pasaron cuatro muestras (A, B, C y D) y dieron sus resultados nueve laboratorios (cuadros 1-2).

▼B

Dos laboratorios (DE y UE) analizaron las muestras con el método FAME.

Debido al reducido número de laboratorios, el cálculo estadístico se ha efectuado tanto con el conjunto completo de datos (figuras 1-2) incluidos los resultados FAME como con los datos obtenidos del análisis de triglicéridos.

Pruebas de valores anómalos:

— Muestra A: Las pruebas Dixon, Cochran y Grubbs a niveles 1 y 5 %, revelaron un laboratorio anómalo.

— Muestra B: La prueba de Grubbs a nivel del 5 % reveló un laboratorio anómalo.

— Muestra C: Las pruebas de Dixon y Grubbs a niveles 1 y 5 % revelaron un laboratorio anómalo.

— Muestra D: Las pruebas de Dixon y Grubbs a niveles 1 y 5 % revelaron un laboratorio anómalo.

El anómalo se excluyó de los cálculos.

Merece la pena observar que los resultados obtenidos con el método FAME no se consideraron nunca valores anómalos por las pruebas aplicadas.

Parámetros de precisión

Los cuadros 1 y 2 recogen los resultados de todos los laboratorios y los parámetros de precisión calculados a partir de un número aceptable (8) de laboratorios, pero que, desgraciadamente, no corresponden al mismo método analítico.

Los cuadros 3 y 4 recogen los resultados obtenidos solo con el método de triglicéridos y los parámetros de precisión correspondientes. La aceptación de estos parámetros está sujeta a la aceptación del bajo número de laboratorios (6).

Las figuras 2 y 3 muestran la tendencia de Sr y SR calculados con las cuatro muestras de los dos conjuntos de datos descritos más arriba.

El cuadro 5 muestra los valores de Sr y SR, junto con los valores reunidos correspondientes y los parámetros r y R generales.

Finalmente se ha calculado la diferencia crítica al nivel de probabilidad del 95 %.

Cuadro 1

Resultados estadísticos de los métodos de triglicéridos y FAME*

Muestra A		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Anómalos	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Valor medio	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valor real	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr%)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Repetibilidad r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Repetibilidad relativa r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,23
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR%)	2,04
					Reproducibilidad R (95 %)	0,84
					Reproducibilidad relativa R %	5,71

▼B

Muestra B		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Anómalos	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Valor medio	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valor real	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Repetibilidad r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Repetibilidad relativa r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,35
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR %)	2,61
					Reproducibilidad R (95 %)	0,99
					Reproducibilidad relativa R %	7,31

Cuadro 2

Resultados estadísticos de los métodos de triglicéridos y FAME*

Muestra C		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Anómalos	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Valor medio	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valor real	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Repetibilidad r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Repetibilidad relativa r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,17
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR %)	1,82
					Reproducibilidad R (95 %)	0,47
					Reproducibilidad relativa R %	5,10
Muestra D		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Anómalos	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Valor medio	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valor real	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repetibilidad r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Repetibilidad relativa r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,24
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR %)	11,43
					Reproducibilidad R (95 %)	0,67
					Reproducibilidad relativa R %	32,00

▼B

Cuadro 3

Resultados estadísticos de los métodos de triglicéridos y FAME*

Muestra A		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Anómalos	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valor medio	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Valor real	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Repetibilidad r (95 %)	0,25
					Repetibilidad relativa r %	2,24
					Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,13
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR %)	1,16
					Reproducibilidad R (95 %)	0,36
					Reproducibilidad relativa R %	3,25
Muestra B		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Anómalos	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valor medio	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Valor real	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Repetibilidad r (95 %)	0,42
					Repetibilidad relativa r %	3,16
					Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,33
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR %)	2,48
					Reproducibilidad R (95 %)	0,93
					Reproducibilidad relativa R %	6,94

Cuadro 4

Resultados estadísticos del método de triglicéridos

Muestra C		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Anómalos	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valor medio	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Valor real	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Repetibilidad r (95 %)	0,42
					Repetibilidad relativa r %	4,51
					Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,19
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR %)	2,04
					Reproducibilidad R (95 %)	0,53
					Reproducibilidad relativa R %	5,71

▼B

Muestra D		R_1	R_2	Media	Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los anómalos	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Número de anómalos	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Anómalos Media	DK
					Valor medio	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valor real	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Desviación típica de la repetibilidad (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repetibilidad r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Repetibilidad relativa r %	12,01
					Desviación típica de la reproducibilidad (SR)	0,25
					Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSDR %)	11,90
					Reproducibilidad R (95 %)	0,69
					Reproducibilidad relativa R %	33,32

Cuadro 5

Repetibilidad y reproducibilidad (con FAME)

	Número de laboratorios	Número de anómalos	Repetibilidad Sr (95 %)	Reproducibilidad SR (95 %)
Muestra A	8	1	0,09	0,23
Muestra B	8	1	0,14	0,35
Muestra C	8	1	0,14	0,17
Muestra D	8	1	0,08	0,24
Valor reunido			0,116	0,256
			R	**R**
Valor reunido* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Pureza mínima indicada del trienantoato = 95 %.
Límite mínimo indicado del trienantoato en grasa butírica = 11 kg/t.
Teniendo en cuenta la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD95), la media de los tres resultados no será inferior a:
en caso de incorporación de trienantoato del 95 % de pureza, 10,05 kg/t.

Repetibilidad y reproducibilidad (sin FAME)

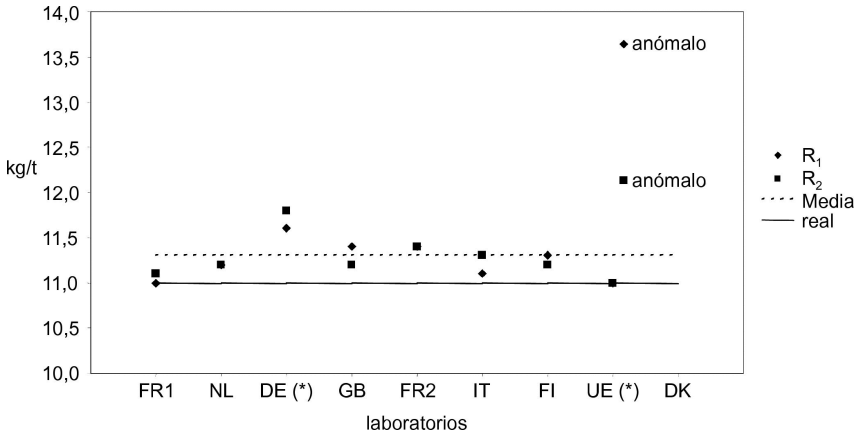
	Número de laboratorios	Número de anómalos	Repetibilidad Sr (95 %)	Reproducibilidad SR (95 %)
Muestra A	6	1	0,09	0,13
Muestra B	6	1	0,15	0,33
Muestra C	6	1	0,15	0,19
Muestra D	6	1	0,09	0,25
Valor reunido			0,124	0,237
			r	**R**
Valor reunido* 2,8			**0,347**	**0,663**

CrD95 = 0,36
Pureza mínima indicada del trienantoato = 95 %.
Límite mínimo indicado del trienantoato en grasa butírica = 11 kg/t.
Teniendo en cuenta la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD95), la media de los tres resultados no será inferior a:
en caso de incorporación de trienantoato del 95 % de pureza, 10,09 kg/t.

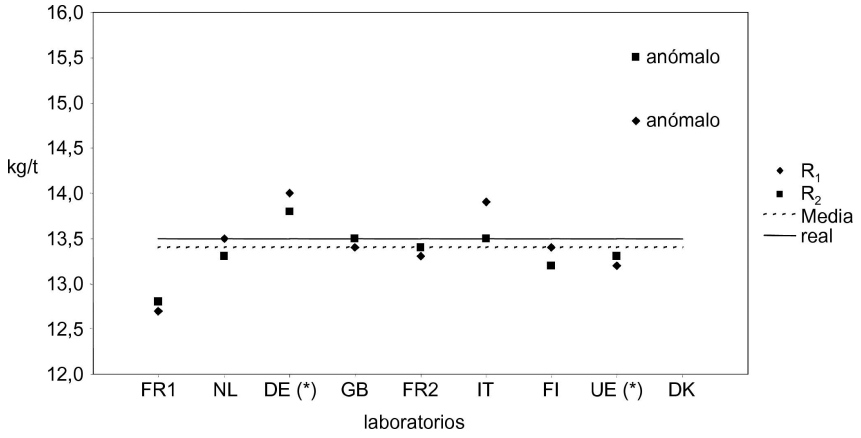
▼B

Figura 1 (*)

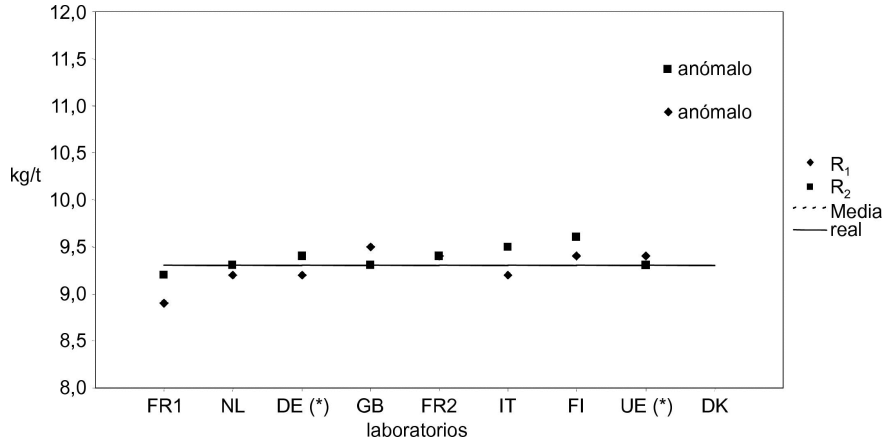
Resultados experimentales: Muestra A



Resultados experimentales: Muestra B



Resultados experimentales: Muestra C



(*) = Método FAME.

▼B

Resultados experimentales: Muestra D

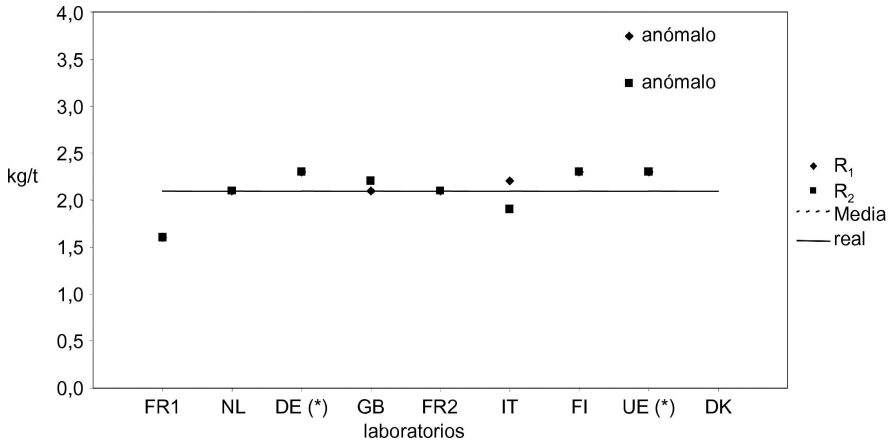


Figura 2

Desviación típica de la repetibilidad y reproducibilidad a diferentes niveles (TG+FAME)

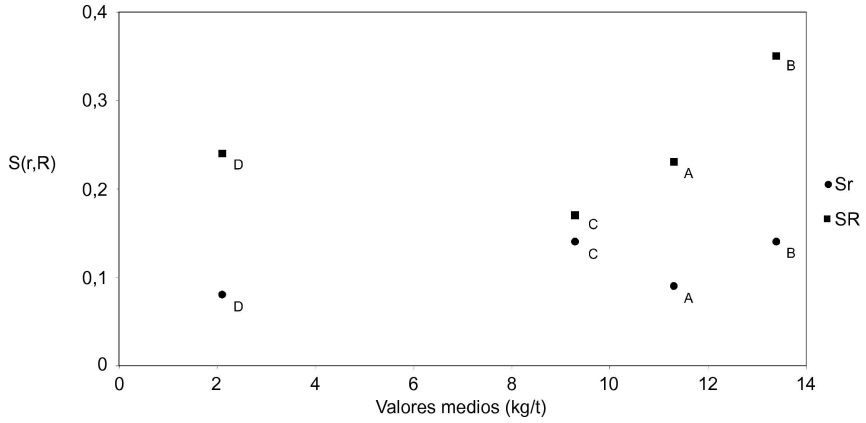
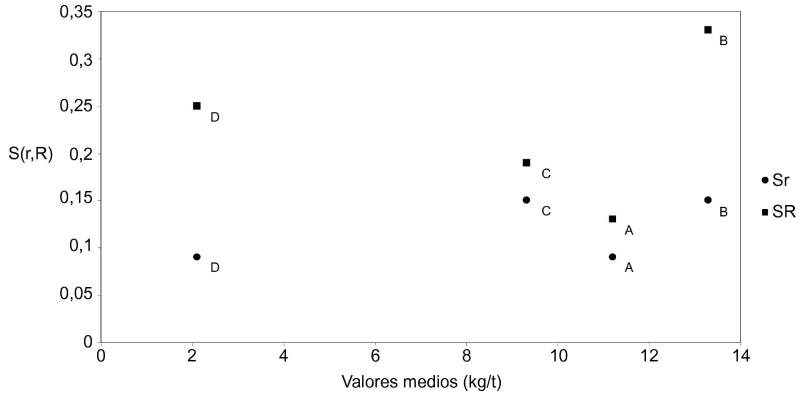


Figura 3

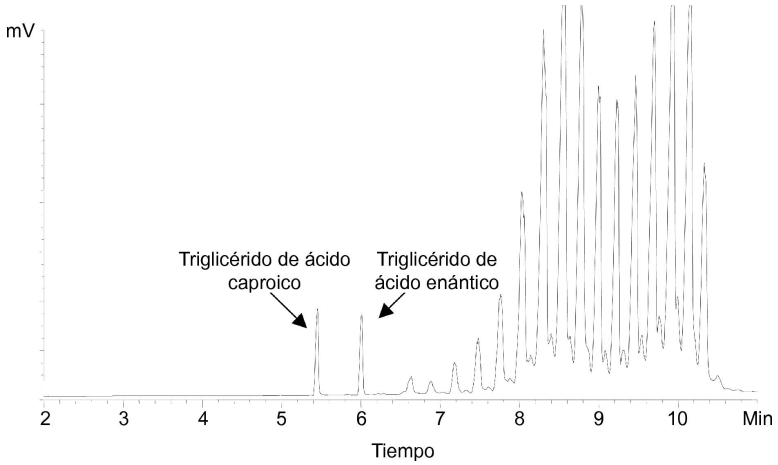
Desviación típica de la repetibilidad y reproducibilidad a diferentes niveles (TG)



▼B

Figura 4

Ejemplo de uso de un inyector en columna



▼B

ANEXO VI

(Artículo 5)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE VAINILLINA EN LA MANTEQUILLA CONCENTRADA, LA MANTEQUILLA O LA NATA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTO RENDIMIENTO

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El presente método describe un procedimiento para la determinación cuantitativa de la vainillina en la mantequilla concentrada, la mantequilla o la nata.

2. PRINCIPIO

Extracción de una cantidad conocida de muestra mediante una mezcla de isopropanol/etanol/acetonitrilo (1:1:2). Precipitación de la mayor parte de la grasa mediante enfriamiento a una temperatura que oscile entre – 15 °C y – 20 °C, seguida de centrifugación.

Previa dilución en agua, determinación del contenido de vainillina mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

3. EQUIPO

Instrumental habitual de laboratorio y, en particular, el siguiente:

3.1. Congelador, que funcione a una temperatura comprendida entre – 15 °C y – 20 °C.

3.2. Jeringas desechables de 2 ml de capacidad.

3.3. Microfiltros de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro, resistentes a una solución que contenga un 5 % de la solución de extracción (4.4).

3.4. Cromatógrafo de líquidos provisto de una bomba (flujo de 1,0 ml/min), un inyector (inyección automática o manual de 20 µl), un detector de UV [regulado a 306 nm, escala completa de 0,01 UA (unidades de absorbancia)], un registrador o integrador y un termostato de columna regulado a 25 °C.

3.5. Columna analítica (250 mm × 4,6 mm de diámetro interior), rellenada con LiChrospher RP 18 (Merck, 5 µm), o equivalente.

3.6. Precolumna (aproximadamente 20 mm × 3 mm de diámetro interior) con un relleno seco de LiChrospher RP 18 (5 a 10 µm), o equivalente.

3.7. Centrifugadora que funcione a 2 000 rpm.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados deben ser de calidad para análisis.

4.1. Isopropanol

4.2. Etanol 96 % (v/v)

4.3. Acetonitrilo

4.4. Solución de extracción

Mezclar isopropanol (4.1), etanol (4.2) y acetonitrilo (4.3) en la proporción de 1:1:2 (v/v).

4.5. Vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) ≥ 98 %

4.5.1. *Solución madre de vainillina (= 500 µg/ml)*

En un matraz aforado de 100 ml se pesan, con una precisión de 0,1 mg, unos 50 mg (CM mg) de vainillina (4.5), se añaden 25 ml de la solución de extracción (4.4) y se enrasa con agua.

4.5.2. *Solución patrón de vainillina (= 10 µg/ml)*

En un matraz aforado de 250 ml se introducen con una pipeta 5 ml de la solución madre de vainillina (4.5.1) y se enrasa con agua.

4.5.3. *Metanol de calidad para HPLC*

4.5.4. *Ácido acético glacial*

4.5.5. *Agua de calidad para HPLC*

▼B

4.5.6. *Fase móvil para la HPLC*

En un matraz aforado de 1 000 ml se mezclan 300 ml de metanol (4.5.3) con unos 500 ml de agua (4.5.5) y 20 ml de ácido acético (4.5.4), y se enrasa con agua (4.5.5). Se filtra por un filtro de 0,45 µm (3.3).

5. PROCEDIMIENTO

5.1. **Preparación de la muestra problema**

5.1.1. *Mantequilla*

Calentar la muestra hasta que comience a derretirse. Ha de evitarse calentar en exceso, a unos 30 °C. En ningún caso puede separarse la mantequilla en dos fases. Cuando la muestra alcance una plasticidad suficiente, agitar para homogeneizarla. Remover la mantequilla durante 15 segundos antes de tomar la muestra. En un matraz aforado de 100 ml pesar, con una precisión de 1 mg, aproximadamente 5 g (SM g) de mantequilla.

5.1.2. *Mantequilla concentrada*

Inmediatamente antes de tomar la muestra, introducir el recipiente con la mantequilla concentrada en una estufa regulada a 40-50 °C hasta que se encuentre totalmente derretida. Agitar o remover la muestra para homogeneizarla, aunque no enérgicamente con el fin de evitar la formación de burbujas de aire. En un matraz aforado de 100 ml pesar, con precisión de 1 mg, aproximadamente 4 g (SM g) de mantequilla concentrada.

5.1.3. *Nata*

Se calienta la muestra en un baño María o incubadora a la temperatura de 35-40 °C. La grasa se distribuye homogéneamente agitando el recipiente y, en caso necesario, removiendo con un agitador. Se enfría la muestra rápidamente a 20 ± 2 °C. Debe presentar aspecto homogéneo; en caso contrario, debe repetirse el procedimiento. En un matraz aforado de 100 ml, pesar, con precisión de 1 mg, aproximadamente 10 g (SM g) de nata.

5.2. **Preparación de la solución de ensayo**

Añadir unos 75 ml de la solución de extracción (4.4) a la muestra problema (5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3), remover o agitar enérgicamente durante 15 minutos aproximadamente y enrasar con la solución de extracción (4.4). Transferir unos 10 ml de esta solución a un tubo de ensayo provisto de un tapón. Colocar el tubo de ensayo en el congelador (3.1) y mantenerlo allí durante 30 minutos aproximadamente. Centrifugar la solución fría durante 5 minutos a 2 000 rpm aproximadamente y decantar de inmediato. Se espera a que la solución decantada alcance la temperatura ambiente. En un matraz aforado de 100 ml se introducen con pipeta 5 ml de la solución decantada y se enrasa con agua. Se filtra una alícuota por un microfiltro de membrana (3.3) utilizando una jeringa (3.2). El filtrado obtenido ya está listo para efectuar la determinación mediante HPLC.

5.3. **Calibración**

En un matraz aforado de 100 ml se introducen con pipeta 5 ml de la solución patrón de vainillina (4.5.2). Se añaden 5 ml de la solución de extracción (4.4) y se enrasa con agua. Esta solución contiene 0,5 µg/ml de vainillina.

5.4. **Determinación por HPLC**

Se deja que se estabilice el sistema cromatográfico durante 30 minutos aproximadamente. Se inyecta la solución patrón (5.3). Se repite la operación hasta que la diferencia de área bajo los picos o de altura de los picos entre dos inyecciones sucesivas sea inferior al 2 %. En las condiciones descritas, el tiempo de retención de la vainillina es de 9 minutos aproximadamente. Se analiza la solución patrón (5.3) por duplicado inyectando 20 µl. Se inyectan 20 µl de las soluciones problema (5.2). Se determina el área o la altura del pico obtenido correspondiente a la vainillina. Se repite la inyección duplicada de la solución patrón (5.3) después de efectuar 10 inyecciones de muestras problema (5.2).

6. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Se calcula el área (o la altura) media (AC) de los picos de vainillina asociados a las inyecciones duplicadas que preceden y siguen a cada lote de soluciones problema (cuatro áreas o alturas en total).

▼B

Se calcula el factor de respuesta (R):

$$R = AC/CM$$

siendo CM la masa de vainillina expresada en mg (4.5.1).

El contenido (mg/kg) de vainillina (C) en la muestra problema viene dado por la fórmula:

$$C = [(AS \times 20 \times 0,96)/(SM \times R)]$$

siendo:

AS = el área del pico de vainillina de la muestra problema

SM = la masa de la muestra problema en g (5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3).

Nota: Si se analiza la presencia de vainillina en nata, la concentración del marcador ha de expresarse en mg de marcador/kg de grasa láctea. Esto se hace multiplicando C por 100/f, siendo f el contenido en grasa de la nata en porcentaje (m/m).

20 = factor que tiene en cuenta las diluciones del patrón y de la muestra problema,

0,96 = factor de corrección del contenido de grasa en la primera dilución de la muestra problema.

Nota: En lugar del área bajo el pico puede utilizarse la altura del pico (véase el punto 8.3).

7. PRECISIÓN DEL MÉTODO

7.1. **Repetibilidad (r)**

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas con el menor intervalo posible de tiempo por el mismo operario, utilizando el mismo equipo y el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 16 mg/kg.

7.2. **Reproducibilidad (R)**

La diferencia ente los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas por operarios de distintos laboratorios, utilizando equipos diferentes pero el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 27 mg/kg.

8. LÍMITES DE TOLERANCIA

8.1. Deben tomarse tres muestras del producto marcado para comprobar su homogeneidad.

8.2. Marcador obtenido a partir de vainilla o de vainillina sintética:

8.2.1. La tasa de incorporación del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído es de 250 g por tonelada de mantequilla concentrada o sin concentrar. Si lo que se marca es nata, la tasa de incorporación es de 250 g por tonelada de grasa láctea.

8.2.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 220,8 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación),

— 158,3 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación).

La concentración del marcador en la muestra que dé el resultado más bajo se utilizará junto con la interpolación entre 220,8 mg/kg y 158,3 mg/kg.

8.3. Marcador obtenido exclusivamente a partir de vainas de vainilla o de sus extractos integrales:

8.3.1. La tasa de incorporación del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído es de 100 g por tonelada de mantequilla concentrada o sin concentrar. Si lo que se marca es nata, la tasa de incorporación es de 100 g por tonelada de grasa láctea.

▼B

8.3.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 78,3 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación),

— 53,3 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación).

La concentración del marcador en la muestra que dé el resultado más bajo se utilizará junto con la interpolación entre 78,3 mg/kg y 53,3 mg/kg.

9. NOTAS

9.1. La recuperación de la vainillina añadida a un nivel de 250 mg/kg de butteroil oscila entre 97,0 y 103,8. El contenido medio hallado fue del 99,9 %, con una desviación típica del 2,7 %.

9.2. La solución patrón contiene un 5 % de la solución de extracción para compensar el ensanchamiento de los picos provocado por la presencia de un 5 % de solución de extracción de las muestras problema. Ello permite efectuar la cuantificación mediante la altura de los picos.

9.3. El análisis se basa en una curva de calibrado lineal con una ordenada en el origen igual a cero.

9.4. Utilizando diluciones adecuadas de la solución patrón (4.5.2), la linealidad debe comprobarse la primera vez que se efectúa el análisis y después a intervalos regulares, así como cuando se haya cambiado o reparado algo del equipo de HPLC. La vainillina puede degradarse a ácido vaníllico, divanillina y otros compuestos debido a la actividad de enzimas intrínsecas de la nata sin pasteurizar o de sus productos.

▼B

ANEXO VII

(Artículo 5)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÉSTER ETÍLICO DEL ÁCIDO BETA-APO-8'-CAROTÉNICO EN MANTEQUILLA Y MANTEQUILLA CONCENTRADA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El método describe un procedimiento para la determinación cuantitativa del éster etílico del ácido beta-apo-8'-caroténico (éster apo-caroténico) en mantequilla y mantequilla concentrada. El éster apocaroténico es la suma de todas las sustancias presentes en un extracto de muestras obtenidas en las condiciones descritas en el método, que absorben luz a 440 nm.

2. PRINCIPIO

La grasa butírica se disuelve en éter de petróleo y se mide su absorbancia a 440 nm. El contenido de éster apocaroténico se determina recurriendo a un patrón externo.

3. EQUIPO

3.1. Pipetas graduadas de 0,25, 0,50, 0,75 y 1,0 ml de capacidad.

3.2. Espectrofotómetro apto para utilizarlo a 440 nm (y 447-449 nm) y provisto de cubetas de 1 cm de espesor óptico.

3.3. Matraces aforados de 20 ml y 100 ml.

3.4. Balanza analítica, con una sensibilidad de 0,1 mg, capaz de pesar con una precisión de 1 mg y con una legibilidad de 0,1 mg.

3.5. Estufa a 45 °C ± 1 °C.

3.6. Filtros sin cenizas, de filtración rápida.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza de grado analítico.

4.1. Suspensión de éster apocaroténico (aproximadamente 20 %)

4.1.1. Establecer el contenido de la suspensión como sigue:

Se calienta la suspensión entre 45 °C y 50 °C y se homogeneiza en el recipiente inicial sin abrir. Se pesan unos 400 mg en un matraz aforado (100 ml), se disuelven en 20 ml de cloroformo (4.4) y se enrasa con ciclohexano (4.5). Se diluyen 5 ml de esta solución hasta 100 ml con ciclohexano (solución A). Se diluyen 5 ml de la solución A hasta 100 ml con ciclohexano. Se mide la absorbancia a 447-449 nm (se mide el máximo frente a un blanco de ciclohexano utilizando cubetas de 1 cm de espesor óptico).

Contenido de éster apocaroténico P (%) = $(Abs_{máx} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **o** desarrollado: $(Abs_{máx} /2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

$Abs_{máx}$ = absorbancia de la solución que se mide en el máximo

M_{susp} = masa de la suspensión (g)

2 550 = valor de Abs (1 %, 1 cm) de referencia

P = pureza (contenido) de la suspensión (%)

▼B

Nota: La suspensión de éster apocaroténico es sensible al aire, al calor y a la luz. Puede conservarse durante unos 12 meses en su envase original (sellado con nitrógeno) sin abrir, en un lugar fresco. Una vez abierto el envase, es conveniente utilizar el contenido en un breve plazo.

4.1.2. Solución patrón de éster apocaroténico, de unos 0,2 mg/ml

Se pesan con precisión de 1 mg unos 0,100 g de suspensión de éster apocaroténico (4.1.1) (W), se disuelven en éter de petróleo (4.2), se trasladan cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml de capacidad y se enrasa con éter de petróleo.

Esta solución contiene (W × P)/10 mg/ml de éster apocaroténico.

Nota: Esta solución debe conservarse en un lugar fresco y a oscuras. La solución que no se haya utilizado al cabo de un mes debe eliminarse.

4.2. Éter de petróleo (40-60 °C)

4.3. Sulfato sódico anhidro granular, desecado previamente a 102 °C durante dos horas

4.4. Cloroformo

4.5. Ciclohexano

5. PROCEDIMIENTO

5.1. **Preparación de la muestra problema**

5.1.1. *Mantequilla concentrada*

Se funde la muestra en un horno a unos 45 °C.

5.1.2. *Mantequilla*

Se funde la muestra en un horno a unos 45 °C y se filtra una parte representativa mediante un filtro que contenga unos 10 g de sulfato sódico anhidro (4.3) en un medio que se halle al abrigo de la luz natural y artificial fuerte y que se mantenga a 45 °C. Se recoge una cantidad adecuada de grasa butírica.

5.2. **Determinación**

Se pesa con una precisión de 1 mg alrededor de 1 g de mantequilla concentrada [o de grasa butírica extraída (5.1.2)], (M). Se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 20 ml (V) utilizando éter de petróleo (4.2), se enrasa y se mezcla a fondo.

Se transfiere una parte alícuota a una cubeta de 1 cm y se mide la absorbancia a 440 nm, frente a un blanco de éter de petróleo. Se obtiene la concentración de éster apocaroténico en la solución mediante la curva patrón elaborada (C µg/ml).

5.3. **Calibración**

Se llevan con pipeta 0, 0,25, 0,5, 0,75 y 1,0 ml de solución patrón de éster apocaroténico (4.1.2) a cinco matraces aforados de 100 ml. Se enrasa con éter de petróleo (4.2) y se mezcla.

Las concentraciones aproximadas de las soluciones oscilan entre 0 y 2 µg/ml y se calculan de manera precisa en función de la concentración de la solución patrón (4.1.2) (W × P)/10 mg/ml. Se miden las absorbancias a 440 nm frente a un blanco de éter de petróleo (4.2).

Se llevan los valores de absorbancia al eje de ordenadas y la concentración del éster apocaroténico al de abscisas. Se calcula la ecuación de la curva de calibración.

▼B

6. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

6.1. El contenido de éster apocaroténico, expresado en mg/kg de producto, viene dado por la fórmula siguiente:

Mantequilla concentrada: (C × V)/M

Mantequilla: 0,82 (C × V)M

siendo:

C = contenido de éster apocaroténico, en µg/ml, obtenido de la curva de calibración (5.3)

V = volumen (ml) de las soluciones problema (5.2)

M = masa (g) de la porción de prueba (5.2)

0,82 = factor de corrección para tener en cuenta el contenido de grasa butírica de la mantequilla

7. PRECISIÓN DEL MÉTODO

7.1. **Repetibilidad**

7.1.1. *Análisis de la mantequilla*

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas con el menor intervalo posible de tiempo por el mismo operario, utilizando el mismo equipo y el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Análisis de la mantequilla concentrada.*

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas con el menor intervalo posible de tiempo por el mismo operario, utilizando el mismo equipo y el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 1,6 mg/kg.

7.2. **Reproducibilidad**

7.2.1. *Análisis de la mantequilla*

La diferencia ente los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas por operarios de distintos laboratorios, utilizando equipos diferentes pero el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 4,7 mg/kg.

7.2. **Análisis de la mantequilla concentrada**

La diferencia ente los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas por operarios de distintos laboratorios, utilizando equipos diferentes pero el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 5,3 mg/kg.

7.3. **Fuentes de los datos de precisión**

Los datos de precisión se obtuvieron en un experimento realizado en 1995 en el que participaron 11 laboratorios y en el que se utilizaron 12 muestras marcadas (seis duplicados a ciegas) en el caso de la mantequilla y otras tantas (seis duplicados a ciegas) en el de la mantequilla concentrada.

8. LÍMITES DE TOLERANCIA

8.1. Deben tomarse tres muestras del producto marcado para comprobar la corrección del marcado del producto.

8.2. **Mantequilla**

8.2.1. Teniendo en cuenta la absorción de fondo, la tasa de incorporación de la mantequilla es de 22 mg/kg.

8.2.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 17,7 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación),

— 12,2 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación).

▼B

La concentración del marcador en la muestra que dé el resultado más bajo se utilizará junto con la interpolación entre 17,7 mg/kg y 12,2 mg/kg.

8.3. **Mantequilla concentrada**

8.3.1. Teniendo en cuenta la absorbancia de fondo, la tasa de incorporación en la mantequilla concentrada es de 24 mg/kg.

Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 19,2 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación),

— 13,2 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación).

La concentración del marcador en la muestra que dé el resultado más bajo se utilizará junto con la interpolación entre 19,2 mg/kg y 13,2 mg/kg.

▼B

ANEXO VIII

(Artículo 5)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SITOSTEROL O DE ESTIGMASTEROL EN MANTEQUILLA O MANTEQUILLA CONCENTRADA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES EN COLUMNA CAPILAR

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de sitosterol o de estigmasterol en la mantequilla y en la mantequilla concentrada. Se considera sitosterol la suma de β-sitosterol y 22-dihidro-β-sitosterol; los demás sitosteroles se consideran sin importancia.

2. PRINCIPIO

La mantequilla o la mantequilla concentrada se saponifican con hidróxido de potasio en solución etanólica, y el insaponificable se extrae con éter dietílico.

Los esteroles se transforman en trimetil-silil-éteres y se analizan mediante cromatografía de gases en columna capilar utilizando un patrón interno de betulina.

3. EQUIPO

3.1. Matraz de saponificación de 150 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas

3.2. Ampollas de decantación de 500 ml

3.3. Matraces de 250 ml

3.4. Embudos compensadores de presión, de 250 ml o similares, para recoger el sobrante de éter dietílico

3.5. Columna de vidrio de 350 mm × 20 mm provista de un tapón de vidrio sinterizado

3.6. Baño María u otro sistema termostatizado

3.7. Viales para reacción de 2 ml

3.8. Cromatógrafo de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de fraccionamiento y formado por:

3.8.1. una cámara termostática para columnas, capaz de mantener la temperatura deseada con una precisión de ± 1 °C

3.8.2. una unidad de vaporización de temperatura ajustable

3.8.3. un detector de ionización de llama y convertidor-amplificador

3.8.4. un integrador-registrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.8.3)

3.9. Columna capilar de sílice fundida recubierta enteramente de BP1 o equivalente (u otra columna de resolución como mínimo equivalente) con un espesor uniforme de 0,25 μm; la columna debe ser capaz de separar los trimetil-silil-derivados del lanosterol y del sitosterol; es adecuada una columna de 12 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interior

3.10. Microjeringa de 1 μl para cromatografía de gases, con aguja endurecida

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza de grado analítico. El agua que se emplee será destilada, o de pureza al menos equivalente.

4.1. Etanol de una pureza mínima del 95 %

4.2. Solución de hidróxido de potasio al 60 %: se disuelven 600 g de hidróxido de potasio (del 85 % como mínimo) en agua y se completa hasta un litro con agua

▼B

4.3. Betulina de una pureza mínima del 99 %

4.3.1. Soluciones de betulina en éter dietílico (4.4)

4.3.1.1. La concentración de la solución de betulina usada para la determinación del contenido de sitosterol debe ser de 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. La concentración de la solución de betulina usada para la determinación del contenido de estigmasterol debe ser de 0,4 mg/ml.

4.4. Éter dietílico de pureza de grado analítico (sin peróxidos ni residuos)

4.5. Sulfato sódico anhidro granular, desecado previamente a 102 °C durante dos horas

4.6. Reactivo de sililación, por ejemplo TRI-SIL (distribuido por Pierce Chemical Co, número de catálogo 49001) o equivalente. (Nota importante: el TRI-SIL es inflamable, tóxico, corrosivo y posiblemente cancerígeno; el personal de laboratorio debe conocer bien los datos sobre seguridad relativos al TRI-SIL y adoptar las debidas precauciones)

4.7. Lanosterol

4.8. Sitosterol de una pureza conocida del 90 % como mínimo (P)

Nota 1: La pureza de los materiales patrón utilizados para la calibración deberá determinarse usando el método de normalización. Ha de considerarse que todos los esteroles presentes en la muestra están representados en el cromatograma, que el área total bajo los picos representa el 100 % de los componentes esterólicos y que los esteroles dan la misma respuesta en el detector. La linealidad del sistema debe estar validada en la zona de concentraciones de interés.

4.8.1. Solución patrón de sitosterol: se prepara una solución que contenga unos 0,5 mg/ml (W_1) de sitosterol (4.8) en éter dietílico (4.4), con una precisión de 0,001 mg/ml

4.9. Estigmasterol, de una pureza conocida del 90 % como mínimo (P)

4.9.1. Solución patrón de estigmasterol: se prepara una solución que contenga unos 0,2 mg/ml (W_1) de estigmasterol (4.9) en éter dietílico (4.4), con una precisión de 0,001 mg/ml

4.10. Mezcla para la prueba de la resolución: se prepara una solución que contenga 0,05 mg/ml de lanosterol (4.7) y 0,5 mg/ml de sitosterol en éter dietílico (4.4)

5. MÉTODO

5.1. **Preparación de las soluciones patrón para cromatografía**

La solución de patrón interno (4.3.1) debe añadirse a la solución patrón de esterol correspondiente a la vez que se añade a la muestra saponificada (véase 5.2.2).

5.1.1. Solución cromatográfica patrón de sitosterol: se pasa 1 ml de solución patrón de sitosterol (4.8.1) a dos viales de reacción (3.7) y se elimina el éter dietílico con una corriente de nitrógeno. Se añade 1 ml de solución de patrón interno (4.3.1.1) y se elimina el éter dietílico con una corriente de nitrógeno.

5.1.2. Solución cromatográfica patrón de estigmasterol: se pasa 1 ml de solución patrón de estigmasterol (4.9.1) a dos viales de reacción (3.7) y se elimina el éter dietílico con una corriente de nitrógeno. Se añade 1 ml de solución de patrón interno (4.3.1.2) y se elimina el éter dietílico con una corriente de nitrógeno.

5.2. **Preparación del insaponificable**

5.2.1. Se funde la muestra de mantequilla a una temperatura no superior a 35 °C y se homogeneiza totalmente agitando.

Se pesa en un matraz de 150 ml (3.1), con precisión de 1 mg, alrededor de 1 g de mantequilla (W_2) o mantequilla concentrada (W_2). Se añaden 50 ml de etanol (4.1) y 10 ml de solución de hidróxido de potasio (4.2). Se coloca el refrigerante de reflujo y se calienta a unos 75 °C durante 30 minutos. Se desmonta el refrigerante y se enfría el matraz hasta una temperatura próxima a la del ambiente.

▼B

5.2.2. Se añade 1,0 ml de solución de patrón interno (4.3.1.1) al matraz si se va a determinar el sitosterol, o bien (4.3.1.2) si se va a determinar el estigmasterol. Se homogeneiza. Se pasa cuantitativamente el contenido del matraz a una ampolla de decantación de 500 ml (3.2) y se lava el matraz, primero con 50 ml de agua y después con 250 ml de éter dietílico (4.4). Se agita enérgicamente la ampolla de decantación durante 2 minutos y se deja que se separen las fases. Se elimina la capa acuosa inferior y se lava la capa etérea agitándola sucesivamente con cuatro porciones de 100 ml de agua.

Nota 2: Para evitar que se forme una emulsión, es fundamental que los dos primeros lavados con agua se realicen suavemente (10 inversiones). El tercer lavado puede hacerse agitando enérgicamente durante 30 segundos. Si se forma una emulsión, puede deshacerse añadiendo de 5 a 10 ml de etanol. Si se añade etanol, es necesario realizar otros dos lavados enérgicos con agua.

5.2.3. Se pasa la capa etérea clara y exenta de jabones a través de una columna de vidrio (3.5) que contenga 30 g de sulfato sódico anhidro (4.5). Se recoge el éter en un matraz de 250 ml (3.3). Se añade una perla para regular la ebullición y se evapora casi hasta sequedad con baño María u otro sistema termostatizado, recogiendo los disolventes utilizados.

Nota 3: Si los extractos de la muestra se llevan a sequedad completa a una temperatura demasiado elevada, puede haber pérdida de esteroles.

5.3. **Preparación de los trimetil-silil-éteres**

5.3.1. Se pasa la solución etérea que queda en el matraz a un vial de reacción de 2 ml (3.7) con 2 ml de éter dietílico y se elimina el éter con una corriente de nitrógeno. Se lava el matraz a continuación dos veces con sendas porciones de 2 ml de éter dietílico, pasando el líquido al vial y eliminando el éter con nitrógeno cada vez.

5.3.2. Se silila la muestra añadiendo 1 ml de TRI-SIL (4.6). Cerrar el vial y agitar enérgicamente para disolver el contenido. Si la disolución es incompleta, se calienta a 65-70 °C. Se deja en reposo durante al menos cinco minutos antes de inyectar en el cromatógrafo de gases. Los patrones se sililan de la misma forma que las muestras. La mezcla para la prueba de la resolución (4.10) se silila de la misma forma que las muestras.

Nota 4: La sililación debe realizarse en ausencia de agua. Si la betulina se silila de forma incompleta, aparece un segundo pico próximo al de la betulina.

La presencia de etanol en la fase de sililación interfiere con este proceso. Esta situación puede darse si el lavado en la fase de extracción no es el adecuado. Si el problema persiste, puede introducirse un quinto lavado en la fase de extracción, con agitación enérgica durante 30 segundos.

5.4. **Análisis por cromatografía de gases**

5.4.1. *Condiciones de funcionamiento:*

El cromatógrafo de gases se ajusta con arreglo a las instrucciones del fabricante.

Las condiciones de funcionamiento recomendadas son las siguientes:

— temperatura de la columna: 265 °C

— temperatura del inyector: 265 °C

— temperatura del detector: 300 °C

— caudal del gas indicador: 0,6 ml/min

— presión del hidrógeno: 84 kPa

— presión del aire: 155 kPa

▼B

— fraccionamiento de la muestra: de 10:1 a 50:1; la tasa de fraccionamiento debe optimizarse con arreglo a las instrucciones del fabricante y la linealidad de la respuesta del detector, y después debe validarse a lo largo de la banda de concentraciones de interés

Nota 5: Es fundamental limpiar regularmente la camisa del inyector.

— cantidad de muestra inyectada: 1 µl de solución de TMSE

Hay que dejar que el sistema se equilibre hasta obtener una respuesta de estabilidad satisfactoria antes de comenzar el análisis.

Estas condiciones pueden modificarse según las características de la columna y del cromatógrafo de gases con el fin de obtener cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

— el pico de sitosterol debe estar suficientemente separado del de lanosterol. La figura 1 muestra un cromatograma típico como el que debe obtenerse con una mezcla sililada para la prueba de la resolución (4.10).

— los tiempos relativos de retención de los siguientes esteroles deben aproximarse a los valores indicados a continuación:

colesterol: 1,0

estigmasterol: 1,3

sitosterol: 1,5

betulina: 2,5

— el tiempo de retención de la betulina debe ser de 24 minutos aproximadamente.

5.4.2. *Procedimiento analítico*

Se inyecta 1 µl de solución patrón sililada (estigmasterol o sitosterol) y se ajustan los parámetros de calibración del integrador.

Se inyecta otra vez 1 µl de solución patrón sililada para determinar los factores de respuesta en relación con la betulina.

Se inyecta 1 µl de solución de muestra sililada y se miden las áreas bajo los picos. Cada tanda cromatográfica debe ir precedida y seguida por una inyección de patrones.

Como orientación, pueden incluirse seis inyecciones de muestra en cada tanda así controlada.

Nota 6: La integración del pico de estigmasterol debe incluir las eventuales colas definidas por los puntos 1, 2 y 3 de la figura 2b.

La integración del pico del sitosterol debe incluir el área bajo el pico del 22-dihidro-β-sitosterol (estigmastanol) que eluye inmediatamente después del sitosterol (véase la figura 3b), cuando se evalúe el sitosterol total.

6. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

6.1. Se determina el área bajo los picos de los esteroles y de la betulina en los dos patrones que preceden y siguen a una tanda y se calcula R_1:

R_1 = (área media del pico de esterol en el patrón)/(área media del pico de betulina en el patrón)

Se determina el área bajo el pico de esterol (estigmasterol y sitosterol) y bajo el de betulina en la muestra y se calcula R_2:

R_2 = (área media bajo el pico de esterol en la muestra)/(área media bajo el pico de betulina en la muestra)

W_1 = contenido de esterol del patrón (mg) en 1 ml de solución patrón (4.8.1 o 4.9.1)

W_2 = peso de muestra (g) (5.2.1)

P = pureza del esterol patrón (4.8 o 4.9)

▼B

Contenido de esterol de la muestra (mg/kg) = $((R_2) / (R_1)) \times ((W_1) / (W_2)) \times P \times 10$.

7. PRECISIÓN DEL MÉTODO

7.1. **Mantequilla**

7.1.1. *Repetibilidad*

7.1.1.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas con el menor intervalo posible de tiempo por el mismo operario, utilizando el mismo equipo y el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterol

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas con el menor intervalo posible de tiempo por el mismo operario, utilizando el mismo equipo y el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Reproducibilidad*

7.1.2.1. Estigmasterol

La diferencia ente los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas por operarios de distintos laboratorios, utilizando equipos diferentes pero el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por operarios de diferentes laboratorios, utilizando equipos diferentes y con el mismo material problema, no debe exceder del 8,7 % respecto a la media de las determinaciones.

7.1.3. *Fuentes de los datos de precisión*

Los datos sobre la precisión proceden de un experimento realizado en 1992 en el que participaron ocho laboratorios y seis muestras (tres duplicados ciegos) para el estigmasterol y seis muestras (tres duplicados ciegos) para el sitosterol.

7.2. **Mantequilla concentrada**

7.2.1. *Repetibilidad*

7.2.1.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas con el menor intervalo posible de tiempo por el mismo operario, utilizando el mismo equipo y el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas en el período de tiempo más breve posible, por un mismo operario, utilizando el mismo equipo y con el mismo material problema, no debe ser superior al 3,6 % respecto a la media de las determinaciones.

7.2.2. *Reproducibilidad*

7.2.2.1. Estigmasterol

La diferencia ente los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas por operarios de distintos laboratorios, utilizando equipos diferentes pero el mismo material de ensayo, no debe ser superior a 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por operarios de diferentes laboratorios, utilizando equipos diferentes y con el mismo material de ensayo, no debe exceder del 8,9 % respecto a la media de las determinaciones.

▼B

7.2.3. *Fuentes de los datos de precisión*

Los datos sobre la precisión proceden de un experimento realizado en 1991 en el que participaron ocho laboratorios y seis muestras (tres duplicados ciegos) para el estigmasterol y seis muestras (tres duplicados ciegos) para el sitosterol.

8. LÍMITES DE TOLERANCIA

8.1. Deben tomarse tres muestras del producto marcado para comprobar la corrección del marcado del producto.

8.2. **Mantequilla**

8.2.1. *Estigmasterol*

8.2.1.1. La tasa de incorporación del estigmasterol es de 150 g de estigmasterol de una pureza mínima del 95 % por tonelada de mantequilla, es decir, 142,5 mg/kg, o 170 g de estigmasterol de una pureza mínima del 85 % por tonelada de mantequilla, es decir 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 115,8 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 85 %).

La concentración de marcador en la muestra que proporcione el resultado más bajo se utiliza en conjunción con la interpolación entre 115,8 mg/kg y 80,1 mg/kg, o 117,7 mg/kg y 81,5 mg/kg, respectivamente.

8.2.2. *Sitosterol*

8.2.2.1. La proporción de incorporación del sitosterol es de 600 g de sitosterol de una pureza mínima del 90 % por tonelada de mantequilla, es decir, 540 mg/kg.

8.2.2.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 482,6 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación de sitosterol de una pureza del 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación de sitosterol de una pureza del 90 %).

La concentración del marcador en la muestra que dé el resultado más bajo se utilizará junto con la interpolación entre 482,6 mg/kg y 347,6 mg/kg.

8.3. **Mantequilla concentrada**

8.3.1. *Estigmasterol*

8.3.1.1. La proporción de incorporación del estigmasterol es de 150 g de estigmasterol de una pureza mínima del 95 % por tonelada de mantequilla concentrada, es decir, 142,5 mg/kg o bien 170 g de estigmasterol de una pureza mínima del 85 % por tonelada de mantequilla concentrada, es decir, 144,5 mg/kg.

▼B

8.3.1.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 118,5 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación de estigmasterol de una pureza del 85 %).

La concentración de marcador en la muestra que proporcione el resultado más bajo se utiliza en conjunción con la interpolación entre 118,5 mg/kg y 82,9 mg/kg, o 120,4 mg/kg y 84,3 mg/kg, respectivamente.

8.3.2. *Sitosterol*

8.3.2.1. La proporción de incorporación del sitosterol es de 600 g de sitosterol de una pureza mínima del 90 % por tonelada de mantequilla concentrada, es decir, 540 mg/kg.

8.3.2.2. Los resultados obtenidos del análisis de tres muestras del producto se utilizan para comprobar la tasa y la homogeneidad de la incorporación del marcador, y el más bajo de estos resultados se compara con los límites siguientes:

— 480,9 mg/kg (95 % de la tasa mínima de incorporación de sitosterol de una pureza del 90 %),

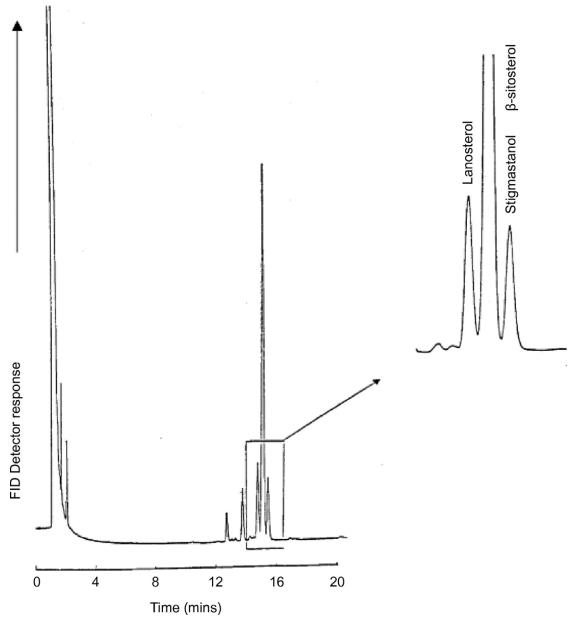
— 345,9 mg/kg (70 % de la tasa mínima de incorporación de sitosterol de una pureza del 90 %).

La concentración del marcador en la muestra que arroje el resultado más bajo se utiliza en conjunción con la interpolación entre 480,9 mg/kg y 345,9 mg/kg.

Figure 1

Chromatogram of resolution test mixture

Complete resolution is preferable, i.e. the peak trace for lanosterol should return to baseline before leaving for the sitosterol peak although incomplete resolution is tolerable.



▼B

Figure 2a
Stigmasterol standard

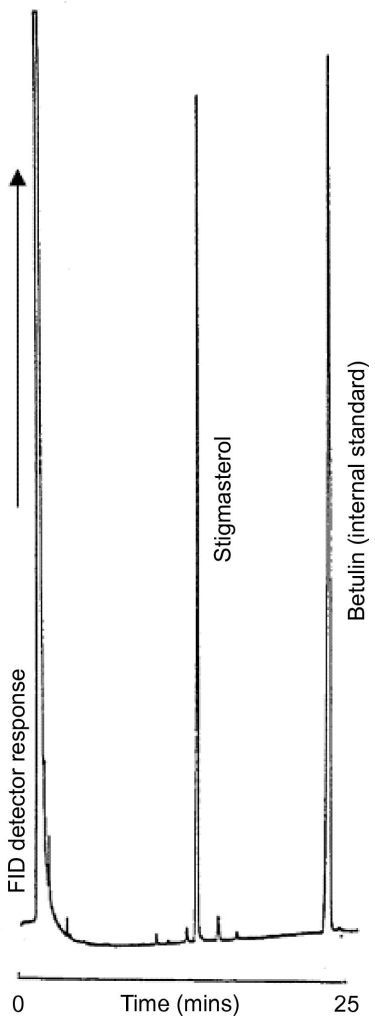
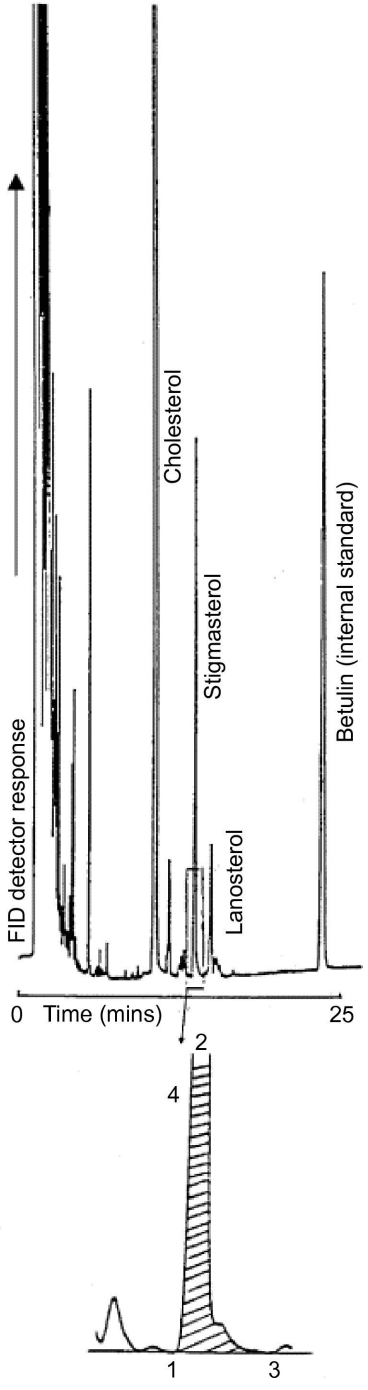


Figure 2b
Butter sample denatured with stigmasterol



Nota: Integration of the stigmasterol peak should include any tailing as defined by points 1, 2 and 3.

▼B

Figure 3a
Sitosterol standard

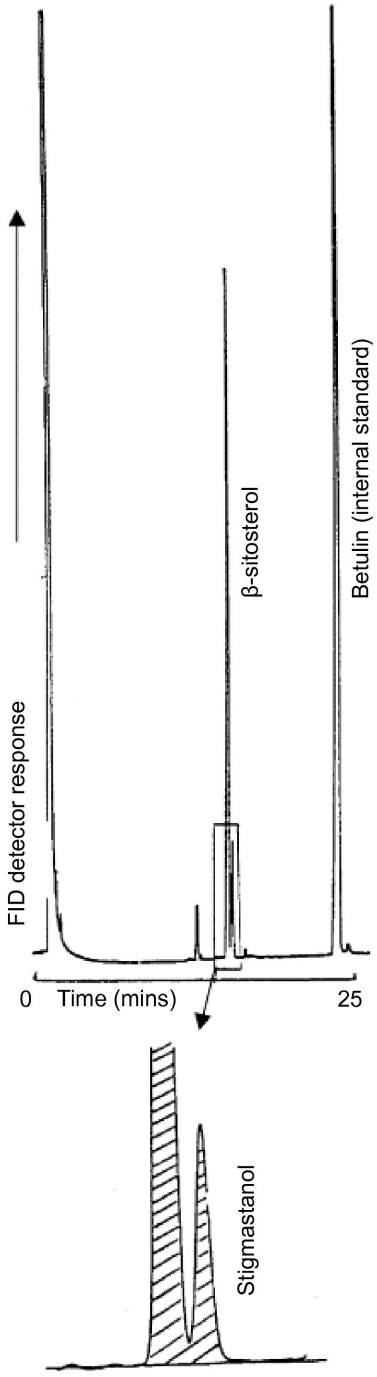
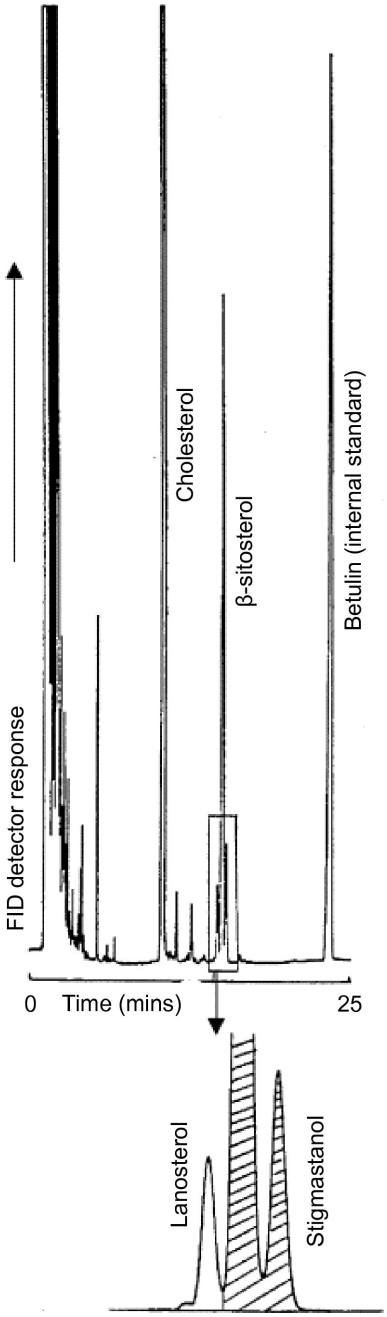


Figure 3b
Butter sample denatured with β-Sitosterol



Nota: β-sitosterol often contains an impurity (identified as stigmastanol) which elutes immediately after β-sitosterol. The areas of these two peaks should be summed when evaluating the total β-sitosterol present.

▼B

ANEXO IX

(Artículo 6)

MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE LECHE Y CASEINATO DE VACA EN QUESOS DE LECHE DE OVEJA, LECHE DE CABRA O LECHE DE BÚFALA, O MEZCLAS DE LECHE DE OVEJA, CABRA Y BÚFALA

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Método de referencia para la detección de leche y caseinato de vaca en quesos de leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o mezclas de leche de oveja, cabra y búfala, mediante isoelectroenfoque de γ-caseínas tras plasminólisis.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es adecuado para la detección sensible y específica de leche y caseinato de vaca, tanto crudos como con tratamiento térmico, en quesos frescos y madurados elaborados con leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o mezclas de leche de oveja, cabra y búfala. No es adecuado para la detección de la adulteración de leche y queso con concentrados de proteínas de suero de leche de bovino tratados térmicamente.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

3.1. Aislamiento de caseínas de queso y patrones de referencia

3.2. Disolución de las caseínas aisladas y ruptura con plasmina (EC.3.4.21.7)

3.3. Isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmina en presencia de urea y tinción de las proteínas

3.4. Evaluación de las manchas teñidas de γ_3- y γ_2-caseína (prueba de la presencia de leche de vaca) comparando las manchas obtenidas de la muestra con las producidas en el mismo gel por los patrones de referencia que contienen 0 % y 1 % de leche de vaca

4. REACTIVOS

A menos que se indique lo contrario, se utilizarán sustancias de grado analítico. Debe utilizarse agua bidestilada o de pureza equivalente.

Nota: Los datos siguientes se refieren a geles de poliacrilamida con urea, preparados en el laboratorio, de unas dimensiones de 265 × 125 × 0,25 mm. Si se utilizan geles de otro tipo o dimensiones, es posible que deban modificarse las condiciones de separación.

Isoelectroenfoque

4.1. **Reactivos para la obtención de los geles de poliacrilamida con urea**

4.1.1. *Solución de gel madre*

Se disuelven:

4,85 g de acrilamida

0,15 g de N, N'-metilen-bis-acrilamida (BIS)

48,05 g de urea

15,00 g de glicerol (87 % p/p),

en agua; se lleva a 100 ml y se guarda en un frasco de vidrio topacio en el frigorífico.

▼B

Nota: Puede utilizarse una solución de acrilamida/BIS premezcladas, presente en el comercio, en vez de los pesos fijos indicados de las acrilamidas neurotóxicas. Si una solución de este tipo contiene un 30 % p/v de acrilamida y un 0,8 % p/v de BIS, debe utilizarse para la formulación un volumen de 16,2 ml, en lugar de los pesos fijos. El plazo de validez de la solución madre es como máximo de 10 días; si su conductividad es superior a 5 μS, debe desionizarse agitando con 2 g de amberlita MB-3 durante 30 minutos, y filtrar después por una membrana de 0,45 μm.

4.1.2. *Solución de gel*

Se prepara una solución de gel mezclando aditivos y anfólitos con la solución de gel madre (véase 4.1.1):

9,0 ml de solución madre

24 mg de β-alanina

500 μl de anfólito pH 3,5-9,5 ([1])

250 μl de anfólito pH 5-7 ([1])

250 μl de anfólito pH 6-8 ([1]).

Se mezcla la solución de gel y se desgasifica durante dos o tres minutos en un baño de ultrasonidos o en vacío.

Nota: La solución de gel se prepara justo antes de verterla (véase 6.2).

4.1.3. *Soluciones catalizadoras*

4.1.3.1. N, N, N' N'-tetrametiletilendiamina (Temed)

4.1.3.2. Persulfato amónico al 40 % p/v (PER):

Se disuelven 800 mg de PER en agua y se completa hasta 2 ml.

Nota: Debe utilizarse siempre una solución de PER recién preparada.

4.2. **Líquido de contacto**

Queroseno o parafina líquida

4.3. **Solución anódica**

Se disuelven 5,77 g de ácido fosfórico (85 % p/p) en agua y se diluye hasta 100 ml.

4.4. **Solución catódica**

Se disuelven 2,00 g de hidróxido sódico en agua y se diluye hasta 100 ml con agua.

Preparación de las muestras

4.5. **Reactivos para el aislamiento de las proteínas**

4.5.1. *Ácido acético diluido (25,0 ml de ácido acético glacial llevados a 100 ml con agua)*

4.5.2. *Diclorometano*

4.5.3. *Acetona*

4.6. **Amortiguador de disolución de proteínas**

Se disuelven:

5,75 g de glicerol (87 % p/p)

24,03 g de urea

250 mg de ditiotreitol

en agua y se completa hasta 50 ml.

([1]) Se ha visto que los productos Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) y Resolyte® pH 5-7 y pH 6-8 (BDH, Merck) son muy adecuados para conseguir la separación necesaria de las γ-caseínas.

▼B

Nota: Se debe conservar en frigorífico, durante un plazo máximo de una semana.

4.7. **Reactivos para la ruptura con plasmina de las caseínas**

4.7.1. *Amortiguador de carbonato amónico*

Se ajusta a pH 8 una solución de hidrogenocarbonato amónico 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml de agua) que contiene 0,05 mol/l de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 1,46 g/100 ml) con unas solución de carbonato amónico 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml de agua) que contiene 0,05 mol/l de EDTA.

4.7.2. *Plasmina bovina (EC. 3.4.21.7), con una actividad mínima de 5 U/ml*

4.7.3. *Solución de ácido ε-aminocaproico para inhibición enzimática*

Se disuelven 2,624 g de ácido ε-aminocaproico (ácido 6-amino-n-hexanoico) en 100 ml de etanol del 40 % (v/v).

4.8. **Patrones**

4.8.1. *En el Instituto de Medidas y Materiales de Referencia de la Comisión, B-2440 Geel, Bélgica, pueden conseguirse patrones de referencia certificados de una mezcla de leche desnatada de oveja y de cabra cuajada, con un 0 % y un 1 % de leche de vaca.*

4.8.2. *Preparación de patrones provisionales de laboratorio de leche de búfala cuajada con un 0 % y un 1 % de leche de vaca.*

Se prepara la leche desnatada mediante centrifugación de leche cruda de vaca o de búfala a granel a 37 °C a 2 500 g durante 20 minutos. Tras enfriar el tubo y su contenido rápidamente a 6-8 °C, se elimina completamente la capa grasa superior. Para la preparación del patrón del 1 %, se añaden 5,00 ml de leche desnatada de vaca a 495 ml de leche desnatada de búfala en un vaso de 1 litro y se ajusta el pH a 6,4 mediante adición de ácido láctico diluido (10 % p/v). Se ajusta la temperatura a 35 °C y se añaden 100 µl de cuajo de ternero (actividad del cuajo 1:10 000, aprox. 3 000 U/ml), se agita durante 1 minuto y se deja el vaso en reposo, cubierto con lámina de aluminio, a 35 °C durante 1 hora, para que se pueda formar la cuajada. Una vez formada esta, se liofiliza toda la leche cuajada, sin que haya previamente homogeneización ni eliminación del suero. Tras la liofilización, se tritura bien para obtener un polvo homogéneo. Para la preparación del patrón del 0 %, se sigue el mismo procedimiento con 500 ml de leche desnatada pura de búfala. Los patrones deben conservarse a – 20 °C.

Nota: Es conveniente comprobar la pureza de la leche de búfala mediante isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmina antes de la preparación de los patrones.

Reactivos de tinción de proteínas

4.9. **Fijador**

Se disuelven 150 g de ácido tricloroacético en agua y se lleva a 1 000 ml.

4.10. **Solución decolorante**

Se diluyen 500 ml de metanol y 200 ml de ácido acético glacial hasta 2 000 ml con agua destilada.

Nota: La solución decolorante debe prepararse cada día. Puede hacerse mezclando volúmenes iguales de soluciones madre de metanol del 50 % (v/v) y de ácido acético glacial del 20 % (v/v).

4.11. **Soluciones colorantes**

4.11.1. *Solución colorante (solución madre 1)*

Se disuelven 3,0 g de azul brillante Coomassie G 250 (C.I. 42655) en 1 000 ml de metanol del 90 % (v/v) utilizando un agitador magnético (durante unos 45 minutos) y se filtra a través de dos filtros de pliegues de velocidad media.

▼B

4.11.2. *Solución colorante (solución madre 2)*

Se disuelven 5,0 g de sulfato de cobre pentahidratado en 1 000 ml de ácido acético del 20 % (v/v).

4.11.3. *Solución colorante (solución de trabajo)*

Se mezclan 125 ml de cada una de las soluciones madre (4.11.1, 4.11.2), justo antes de realizar la tinción.

Nota: La solución colorante solo debe utilizarse el mismo día en que se haya preparado.

5. EQUIPO

5.1. Placas de vidrio (265 × 125 × 4 mm); rodillo de caucho (15 cm de anchura); mesa de nivelación

5.2. Hoja de soporte del gel (265 × 125 mm)

5.3. Hoja de cobertura (280 × 125 mm). Se pega una tira de cinta adhesiva (280 × 6 × 0,25 mm) a cada uno de los bordes largos (véase la figura 1).

5.4. Cámara de electroenfoque con placa de refrigeración (por ejemplo, 265 × 125 mm) con fuente de alimentación adecuada (≥ 2,5 kV) o equipo automático de electroforesis

5.5. Criostato de circulación, termostatizado a 12 ± 0,5 °C

5.6. Centrífuga, ajustable a 3 000 g

5.7. Tiras de electrodos (≥ 265 mm de longitud)

5.8. Frascos de plástico para el goteo de las soluciones anódica y catódica

5.9. Aplicadores de la muestra (10 × 5 mm, papel de filtro de escasa absorción de proteínas o viscosa)

5.10. Escalpelos, pinzas y tijeras de acero inoxidable

5.11. Placas de cristal o acero inoxidable para teñir y decolorar (por ejemplo, bandejas de instrumentos de 280 × 150 mm)

5.12. Homogeneizador de varilla ajustable (10 mm de diámetro del cilindro, velocidad entre 8 000 y 20 000 rpm)

5.13. Agitador magnético

5.14. Baño de ultrasonidos

5.15. Soldador de películas

5.16. Micropipetas de 25 µl

5.17. Concentrador a vacío o liofilizador

5.18. Baño María termostatizado a 35 y 40 ± 1 °C con agitador

5.19. Equipo de densitometría capaz de medir a λ = 634 nm

6. PROCEDIMIENTO

6.1. **Preparación de las muestras**

6.1.1. *Aislamiento de las caseínas*

Se pesa la cantidad equivalente a 5 g de peso seco de queso o de patrón de referencia en un tubo de centrífuga de 100 ml, se añaden 60 ml de agua destilada y se homogeneiza con un homogeneizador de varilla (8 000-10 000 rpm). Se ajusta el pH a 4,6 con ácido acético diluido (4.5.1) y se centrifuga (5 minutos, 3 000 g). Se decantan la grasa y el suero, se homogeneiza el residuo a 20 000 rpm en 40 ml de agua destilada [con el pH ajustado a 4,5 con ácido acético diluido (4.5.1)], se añaden 20 ml de diclorometano (4.5.2), se homogeneiza y se centrifuga (5 minutos, 3 000 g). Con una espátula se extrae la capa de

▼B

caseína que se halla entre las fases acuosa y orgánica (véase la figura 2) y se decantan ambas fases. Se vuelve a homogeneizar la caseína en 40 ml de agua destilada (véase más arriba) y 20 ml de diclorometano (4.5.2), y se centrifuga. Se repite esta operación hasta que las dos fases de extracción sean incoloras (2 o 3 veces). Se homogeneiza el residuo de proteína con 50 ml de acetona (4.5.3) y se pasa a través de un filtro de pliegues de velocidad media. Se lava dos veces el residuo que queda en el filtro con 25 ml de acetona cada vez, y se deja secar al aire o en corriente de nitrógeno; después se pulveriza bien en mortero.

Nota: La caseína aislada seca debe conservarse a – 20 °C.

6.1.2. *Ruptura de las β-caseínas con plasmina para intensificar las γ-caseínas*

Se suspenden 25 mg de caseínas aisladas (6.1.1) en 0,5 ml de solución amortiguadora de carbonato amónico (4.7.1) y se homogeneiza durante 20 minutos, por ejemplo con ultrasonidos. Se calienta a 40 °C y se añaden 10 µl de plasmina (4.7.2), se mezcla y se incuba durante una hora a 40 °C sin dejar de agitar. Para inhibir la enzima se añaden 20 µl de solución de ácido ε-aminocaproico (4.7.3) y se añaden después 200 mg de urea sólida y 2 mg de ditiotreitol.

Nota: Para obtener mayor simetría en las bandas de caseína enfocada, es conveniente liofilizar la solución tras añadir el ácido ε-aminocaproico y disolver después el residuo en 0,5 ml de solución amortiguadora de disolución de proteínas (4.6).

6.2. **Preparación de los geles de poliacrilamida con urea**

Con ayuda de unas cuantas gotas de agua, se extiende la hoja de soporte del gel (5.2) sobre una placa de vidrio (5.1), y se elimina el exceso de agua con toallas o pañuelos de papel. Se extiende la hoja de cobertura (5.3) con espaciadores (0,25 mm) sobre otra placa de vidrio de la misma forma. Se coloca la placa horizontalmente sobre una mesa de nivelación.

Se añaden 10 µl de Temed (4.1.3.1) a la solución de gel preparada y desgasificada (4.1.2), se agita y se añaden 10 µl de solución de PER (4.1.3.2), se mezcla bien y se vierte de inmediato y uniformemente en el centro de la hoja de cobertura. Se coloca un extremo de la placa de soporte del gel (con la cara de la hoja hacia abajo) sobre la placa de la hoja de cobertura y se baja lentamente de manera que se forme una película de gel entre las hojas, extendiéndose de forma regular y sin burbujas (figura 3). Con una fina espátula se hace bajar cuidadosa y completamente la placa de soporte del gel y se colocan otras tres placas de vidrio encima para que actúen de peso. Una vez completada la polimerización (alrededor de 60 minutos), se extrae el gel polimerizado sobre la hoja de soporte del gel junto con la hoja de cobertura, dando golpecitos en las placas de vidrio. Se limpia cuidadosamente el revés de la hoja de soporte para eliminar los residuos de gel y la urea. Se suelda el «emparedado de gel» para formar un tubo de película, y se guarda en frigorífico (durante 6 semanas como máximo).

Nota: La hoja de cobertura con los espaciadores puede volver a utilizarse. El gel de poliacrilamida puede cortarse en trozos más pequeños, lo que es recomendable cuando hay pocas muestras o si se utiliza un equipo automático de electroforesis (dos geles de 4,5 × 5 cm).

6.3. **Isoelectroenfoque**

Se gradúa el termostato de refrigeración a 12 °C. Se frota el revés de la hoja de soporte del gel con queroseno y después se dejan caer unas cuantas gotas de queroseno (4.2) sobre el centro del bloque de refrigeración. Se extiende encima el «emparedado de gel», con la cara del soporte hacia abajo, con cuidado para evitar la formación de burbujas. Se enjuga el exceso de queroseno y se quita la hoja de cobertura. Se empapan las tiras de los electrodos con las soluciones electródicas (4.3 y 4.4), se cortan para ajustarlas a la longitud del gel y se colocan en los lugares previstos (a 9,5 cm de distancia de los electrodos).

▼B

Condiciones del isoelectroenfoque:

6.3.1. *Tamaño del gel: 265 × 125 × 0,25 mm*

Paso	Tiempo (min.)	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)	Voltios-hora (Vh)
1. Pre-enfoque	30	Máximo 2 500	Máximo 15	Constante 4	Unos 300
2. Enfoque de la muestra ([1])	60	Máximo 2 500	Máximo 15	Constante 4	Unos 1 000
3. Enfoque final	60	Máximo 2 500	Máximo 5	Máximo 20	Unos 3 000
	40	Máximo 2 500	Máximo 6	Máximo 20	Unos 3 000
	30	Máximo 2 500	Máximo 7	Máximo 25	Unos 3 000

([1]) Aplicación de la muestra: Tras el pre-enfoque (paso 1), se pipetean en los aplicadores de muestras (10 × 5 mm) 18 µl de la muesta y de las soluciones patrón, se ponen sobre el gel a intervalos de 1 mm entre sí y a 5 mm longitudinalmente respecto al ánodo, se presiona levemente. Se efectúa el enfoque en las condiciones citadas, retirando con cuidado los aplicadores de muestra tras 60 minutos de enfoque de la muestra.

Nota: Si se modifica el espesor o la anchura de los geles, habrá que ajustar convenientemente los valores de intensidad y potencia (por ejemplo, habrá que duplicar los valores de intensidad eléctrica y de potencia si se utiliza un gel de 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. *Ejemplo de programa de tensión para un equipo automático de electroforesis (2 geles de 5,0 × 4,5 cm), con electrodos cuyas tiras se aplican directamente al gel*

Paso	Tensión	Intensidad	Potencia	Temp.	Voltios-hora
1. Pre-enfoque	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Enfoque de la muestra	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Enfoque	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Enfoque	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

El aplicador de muestra se coloca en el paso 2 a 0 Vh.

El aplicador de muestra se retira en la fase 2 a 30 Vh.

6.4. **Tinción de las proteínas**

6.4.1. *Fijación de las proteínas*

Se retiran las tiras de los electrodos inmediatamente después de cortar la corriente y se pone el gel inmediatamente en un recipiente de tinción/decoloración con 200 ml de fijador (4.9); se deja durante 15 minutos, agitando continuamente.

6.4.2. *Lavado y tinción de la placa de gel*

Se escurre totalmente el fijador y se lava la placa de gel dos veces durante 30 segundos cada vez con 100 ml de solución decolorante (4.10). Se retira la solución decolorante y se llena el recipiente con 250 ml de solución colorante (4.11.3); se tiñe durante 45 minutos con agitación suave.

6.4.3. *Decoloración de la placa de gel*

Se retira la solución colorante, se lava la placa de gel dos veces con 100 ml de solución decolorante (4.10) cada vez; después se agita durante 15 minutos con 200 ml de solución decolorante y se repite la fase de decoloración al menos 2 o 3 veces hasta que el fondo se vea claro e incoloro. A continuación, se enjuaga la placa de gel con agua destilada (2 × 2 minutos) y se deja secar al aire (de 2 a 3 horas) o con un secador de pelo (de 10 a 15 minutos).

▼B

Nota 1: La fijación, el lavado, la tinción y la decoloración se deben realizar a 20 °C. No han de emplearse temperaturas elevadas.

Nota 2: Si se prefiere utilizar una tinción de plata (por ejemplo Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Código nº 17-1150-01), de mayor sensibilidad, las muestras de caseína tratadas con plasmina deben diluirse a 5 mg/ml.

7. EVALUACIÓN

La evaluación se lleva a cabo comparando las manchas, obtenidas en el mismo gel, de proteínas de la muestra problema con los patrones de referencia. La detección de leche de vaca en quesos de leche de oveja, leche de cabra y leche de búfala o sus mezclas se realiza por medio de las γ_3- y γ_2-caseínas, cuyos puntos isoeléctricos se sitúan entre los pH 6,5 y 7,5 (figuras 4a, 4b y 5). El límite de detección es inferior al 0,5 %.

7.1. **Estimación visual**

Para la evaluación visual de la cantidad de leche de vaca es conveniente ajustar las concentraciones de las muestras y patrones para obtener el mismo nivel de intensidad de las γ_2- y γ_3-caseínas de oveja, cabra y búfala (véase «γ_2 E,G,B» y «γ_3 E,G,B», en las figuras 4a y 4b y en la figura 5). A continuación podrá evaluarse directamente la cantidad de leche de vaca (menor, igual o mayor que el 1 %) en la muestra problema comparando la intensidad de las γ_3- y γ_2-caseínas de vaca (véase «γ_3 C» y «γ_2 C» en las figuras 4a y 4b y en la figura 5) con las de los patrones de referencia del 0 % y el 1 % (oveja, cabra) o con los patrones provisionales de laboratorio (búfala).

7.2. **Estimación densitométrica**

Cuando sea posible, se aplica la densitometría (5.19) para determinar la relación de las áreas de los picos de las γ_2- y γ_3-caseínas de vaca con respecto a las de oveja, cabra y búfala (véase la figura 5). Este valor se compara con la relación de las áreas de los picos de las γ_2- y γ_3-caseínas del patrón de referencia del 1 % (oveja, cabra) o del patrón provisional de laboratorio (búfala) analizados en el mismo gel.

Nota: El método funciona satisfactoriamente si se encuentra una señal positiva clara de las dos caseínas de vaca (γ_2 y γ_3) en el patrón de referencia del 1 % pero no en el del 0 %. En caso contrario, deberá optimizarse el procedimiento respetando los detalles del método con precisión.

Una muestra se considerará positiva cuando las dos caseínas de vaca (γ_2 y γ_3) o las relaciones de las áreas de los picos correspondientes sean iguales o superiores al nivel del patrón de referencia del 1 %.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. *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).*

2. *Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. Milchwissenschaft 50, 83-85 (1995).*

3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier 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).*

4. *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).*

▼B

5. *Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 µm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. Electrophoresis 1, 43-56 (1980).*

Figura 1

Esquema de la hoja de cobertura

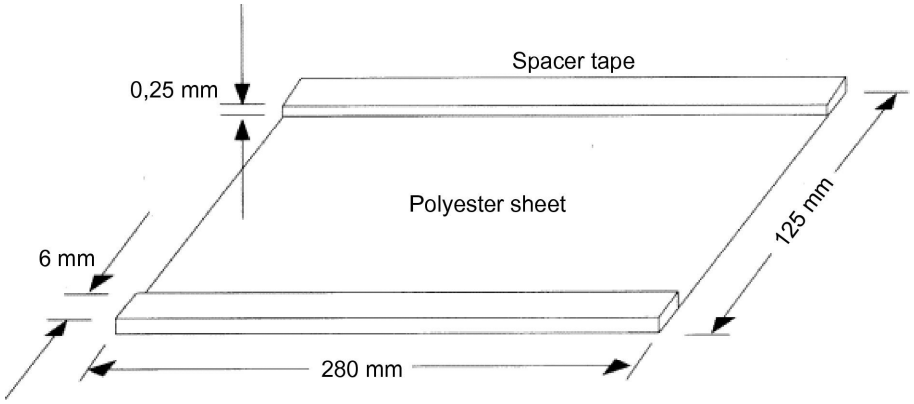


Figura 2

Capa de caseína flotando entre las fases acuosa y orgánica tras la centrifugación

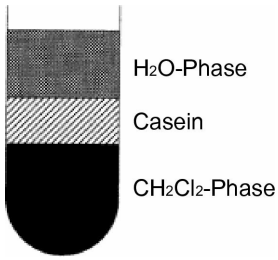
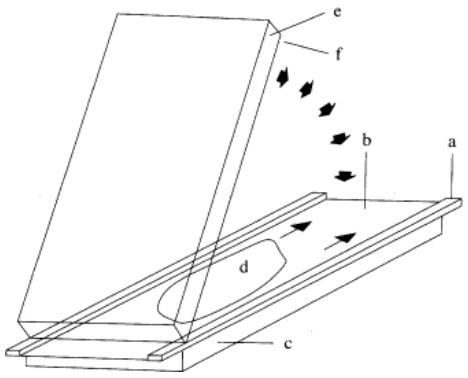


Figura 3

Técnica de inclinación para moldear geles ultrafinos de poliacrilamida

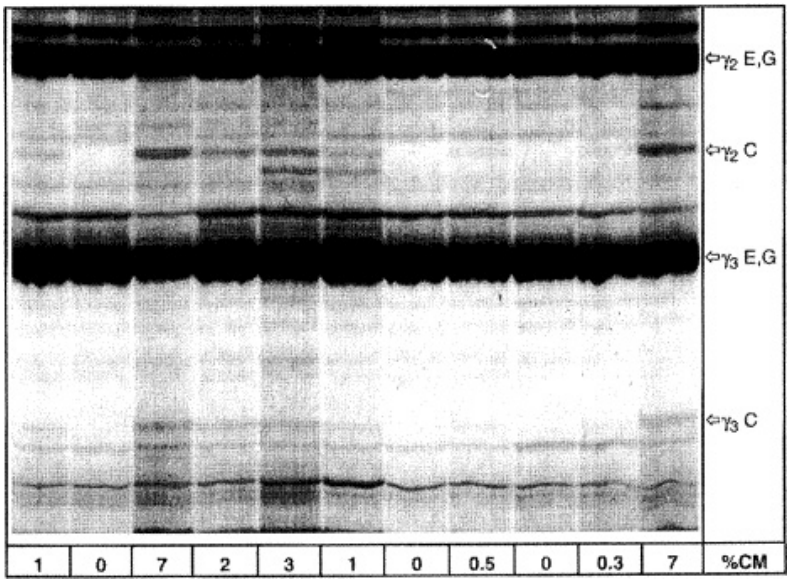


a = cinta espaciadora (0,25 mm); b = hoja de cobertura (5.3); c, e = placas de vidrio (5.1); d = solución de gel (4.1.2); f = hoja de soporte del gel (5.2).

▼B

Figura 4a

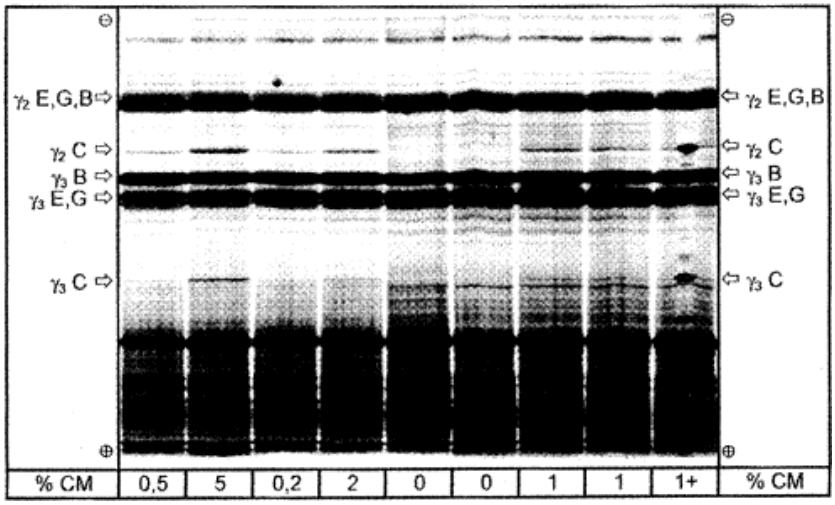
Isoelectroenfoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con leche de oveja y cabra con cantidades diferentes de leche de vaca



% CM = porcentaje de leche de vaca, C = vaca, E = oveja, G = cabra
Se muestra la mitad superior del gel de IEF.

Figura 4b

Isoelectroenfoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con mezclas de leche de oveja, cabra y búfala con cantidades diferentes de leche de vaca



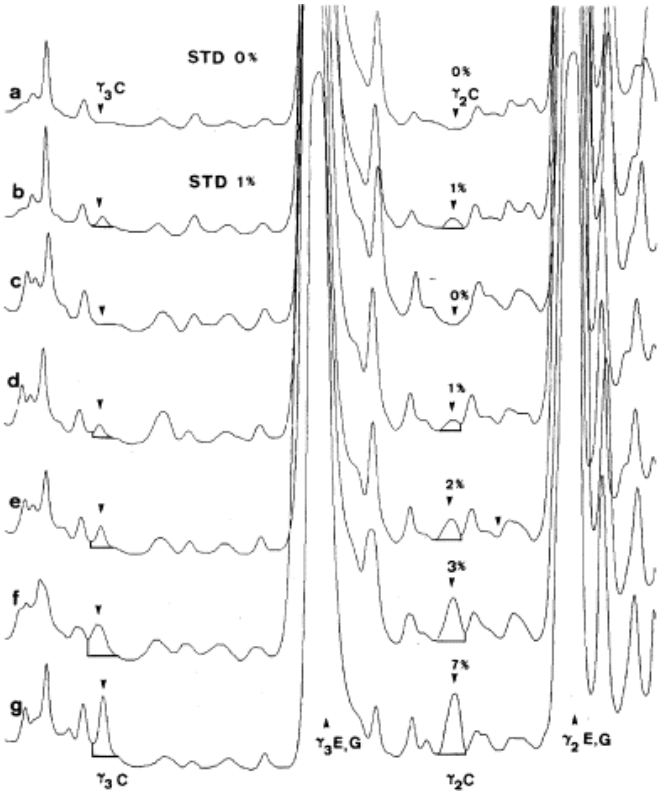
% CM = porcentaje de leche de vaca; 1 + = muestra que contiene un 1 % de leche de vaca en la que se ha inyectado caseína pura de vaca a mitad del recorrido; C = vaca, E = oveja, G = cabra, B = búfala.

Se muestra la distancia de separación total del gel de IEF.

▼B

Figura 5

Superposición de densitogramas de patrones (STD) y muestras de quesos elaborados con una mezcla de leche de oveja y cabra tras el isoelectroenfoque



a, b = patrones con 0 % y 1 % de leche de vaca; c-g = muestras de quesos con 0 %, 1 %, 2 %, 3 % y 7 % de leche de vaca; C = vaca, E = oveja, G = cabra.
La mitad superior del gel de IEF se leyó a λ = 634 nm.

▼B

ANEXO X

(Artículo 7)

MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES EN LA MANTEQUILLA, LA LECHE DESNATADA EN POLVO, LA CASEÍNA Y LOS CASEINATOS

1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

   Norma ISO 8261.

2. PROCEDIMIENTO

   Norma ISO 4831.

   Se inoculan en el medio de cultivo muestras correspondientes a 1g de mantequilla o a 0,1g de leche desnatada en polvo, caseína o caseinatos.

   Se inoculan tres tubos por muestra.

3. RESULTADOS

   Si los tres tubos producen tres resultados negativos, el resultado final es «conforme».

   Si los tres tubos producen dos o tres resultados positivos, el resultado final es «no conforme».

   Si los tres tubos producen dos resultados negativos, el análisis se repite dos veces (con dos tubos)

   — si los dos resultados son negativos, el resultado final es «conforme»,

   — si al menos un resultado es positivo, el resultado final es «no conforme».

▼B

ANEXO XI

(Artículo 8)

DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN PIENSOS COMPUESTOS

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Determinación de lactosa en piensos compuestos.

2. REFEERENCIA

El contenido de lactosa se define como el porcentaje en masa determinado por el procedimiento descrito.

3. DEFINICIÓN

El contenido de lactosa anhidra se expresa en gramos por 100 gramos.

4. PRINCIPIO

El pienso compuesto se reconstituye con agua. Se añade una solución de Biggs a una alícuota pesada y diluida, a fin de precipitar las fracciones proteínicas y lipídicas del pienso compuesto. La muestra se filtra (o centrifuga) y el filtrado (o el sobrenadante) se inyecta en una columna de HPLC de intercambio catiónico en forma de plomo, utilizando agua de grado HPLC como fase móvil. La lactosa eluida se detecta mediante un refractómetro diferencial ([i]).

5. REACTIVOS

5.1. **Consideraciones generales**

Solo deben utilizarse reactivos de grado analítico reconocido, salvo especificación contraria, y agua desgasificada de grado HPLC.

5.2. **Lactosa**

La D-lactosa monohidratada ($(C_{12}H_{22})O_{11}H_2O$) puede tomar humedad adicional. Antes de utilizarla, debe medirse la cantidad real de agua por el método de Karl-Fisher, o eliminarse la humedad adicional poniendo la lactosa en un horno a 105 °C durante 8 horas (la lactosa no pierde su agua de cristalización con este tratamiento).

5.3. **Solución concentrada de Biggs/Szijarto** ([ii])

Se disuelven 9,10 g de acetato de cinc dihidratado ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) y 5,46 g de ácido fosfowolfrámico monohidratado ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) en unos 70 ml de agua de grado HPLC (6.8) en un matraz aforado de 100 ml.

Se añaden 5,81 ml de ácido acético glacial (CH_3COOH). Se enrasa a 100 ml con agua de grado HPLC (65.8) y se mezcla. La solución puede conservarse a temperatura ambiente durante un año.

5.4. **Solución diluida de Biggs/Szijarto**

Se diluyen 25 ml de solución concentrada de Biggs/Szijarto (5.3) con agua hasta 500 ml, en un matraz aforado. La solución puede conservarse a temperatura ambiente durante un mes.

5.5. **Preparación del agua de grado HPLC**

Se filtra agua ultrapura (6.8) utilizando el sistema de filtración en vacío (6.9). Para mejorar el funcionamiento de la bomba y obtener una línea de base estable, ha de desgasificarse diariamente la fase móvil seleccionando una de las técnicas disponibles, como arrastre con helio, baño de ultrasonidos, vacío o sistema de desgasificación en línea.

Nota: Para prolongar la duración de la columna, es fundamental que el contenido de dióxido de carbono del eluyente sea lo más bajo posible y que se impida su captación de nuevo.

▼B

6. EQUIPO

Material habitual de laboratorio y, en particular, el siguiente:

6.1. **Columna de resina de intercambio iónico de HPLC**

Relleno de la columna: copolímero de divinilbenceno-poliestireno con enlaces cruzados al 8 %, activado con grupos de intercambio catiónico en forma de plomo.

Dimensiones de la columna: 300 mm de longitud y unos 8 mm de diámetro interior.

Es posible utilizar otros diámetros si el flujo se ajusta en consecuencia.

6.2. **Precolumna**

La precolumna es la combinación de un intercambiador catiónico aparte (H^+) y un intercambiador aniónico (CO_3-), cada uno introducido en columnas de unos 30 mm × 4,6 mm (L × ID) (por ejemplo, micro-precolumnas en un soporte de microcolumnas) y conectadas en serie en forma de lecho mixto formado por AG 50W-X4, — 400 mallas (H^+) y AG3-X4A, 200-400 mallas (OH-) en la proporción de 35:65 (m/m) introducido manualmente en una columna de unos 20 × 9 mm (L × DI).

6.3. **Horno de columna**

Horno capaz de mantener una temperatura constante de 85 °C ± 1 °C.

6.4. **Bomba de HPLC**

Bomba capaz de proporcionar un flujo constante (fluctuaciones < 0,5 %) a 0,2-1,0 m/min.

6.5. **Equipo de inyección de HPLC**

Automuestreador capaz de inyectar 25 µL y con una repetibilidad < 0,5 %.

También es posible utilizar un equipo manual (con las mismas condiciones que el automuestreador).

6.6. **Detector de HPLC**

Detector de índice de refracción (IR) de elevada sensibilidad con un ruido < $5{,}10^{-9}$ unidades de IR.

6.7. **Integrador**

Programas informáticos o un integrador específico para recoger y tratar los datos, obtener las áreas y las alturas de los picos, que puedan convertirse en concentraciones de lactosa

6.8. **Unidad de depuración del agua**

Sistema capaz de proporcionar agua ultrapura (tipo 1) con una resistividad >14 MΩ.cm.

6.9. **Unidad de filtración del disolvente**

Sistema que permita la filtración del agua utilizando filtros de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.

Nota: Muchas unidades de depuración de agua (6.8) incluyen la filtración por 0,45 o 0,2 µm. Puede no ser necesario volver a filtrar si se utiliza directamente esta agua.

6.10. **Balanza analítica**

Balanza con una lectura de 0,1 mg.

6.11. **Baño María**

Baño María capaz de mantener una temperatura de 40 °C (± 0,5).

6.12. **Centrifugadora**

Debe ser capaz de generar una aceleración de al menos 3 000 g con viales Eppendorf o viales de un tipo equivalente o más grande.

▼B

6.13. **Matraz aforado de 50 mL**

Capacidad de 50 mL, clase A.

Nota: Pueden utilizarse matraces de otra capacidad, teniendo en cuenta el factor de volumen.

6.14. **Matraz aforado de 100 mL**

Capacidad de 100 mL, clase A.

6.15. **Pipeta graduada**

Pipeta graduada de 10 mL.

Nota: También pueden utilizarse pipetas automáticas con una capacidad de 5 mL, añadiendo dos veces un volumen de 5 mL de reactivo (5.3).

7. MUESTREO

Es importante que el laboratorio reciba una muestra tomada de acuerdo con la norma ISO 707/IDF 50 ([iii]), que sea realmente representativa y que no se haya alterado durante su transporte o almacenamiento.

8. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN DE LACTOSA

8.1. **Patrón 1**

Se disuelven unos 50 mg de lactosa monohidratada (5.2), pesados con precisión (lectura de 0,1 mg) en un matraz aforado de 100 mL (6.14) y se enrasa con agua.

8.2. **Patrón 2**

Se disuelven unos 100 mg de lactosa monohidratada (5.2), pesados con precisión (lectura de 0,1 mg) en un matraz aforado de 100 mL (6.14) y se enrasa con agua.

Nota: Las soluciones patrón pueden conservarse un máximo de una semana a unos 5 °C.

9. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PROBLEMA

9.1. **Reconstitución de la muestra**

Se pesan unos 5 g del polvo en un matraz de 50 mL (6.13) y se anota el peso con una precisión de 1 mg (W_1, (11)). Se añaden 50 mL de agua y se apunta el aumento del peso (W_2 (11)) con una precisión de 0,01 g. Se pone en el baño María (6.11) el matraz cerrado durante 30 min y se invierte unas cuantas veces a lo largo de este tiempo. A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente.

9.2. **Tratamiento de la muestra**

Se toma alrededor de 1 g de esta solución y se pone en un matraz aforado de 50 mL (6.13), se anota el peso con una precisión de 1 mg (W_3 (11)), se añaden 20 mL de agua, y después 10 mL de reactivo diluido de Biggs/Szijarto (5.4); se enrasa con agua. Se invierte el matraz suavemente cinco veces durante la primera media hora.

Al cabo de una hora, se toma una alícuota y se centrifuga (6.12) a 3 000 g durante 10 min (puede utilizarse una aceleración g mayor, con un tiempo en consecuencia menor). Se utiliza una alícuota del sobrenadante para el análisis por HPLC.

10. DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC

10.1. **Preparación previa de la HPLC**

10.1.1. *Instalación de la columna y de la precolumna*

Se instala la precolumna (6.2) fuera del horno de columna (6.3) y la columna (6.1) dentro del horno.

Nota: Si el horno no contiene tubos para precalentar el eluyente, es necesario que este pase por unos 15 cm de tubo de acero inoxidable dentro del horno antes de entrar en la columna (para que el pico no se ensanche, es absolutamente necesario que el eluyente se haya calentado antes de entrar en la columna).

▼B

10.1.2. *Detector y flujo inicial*

Para conseguir una línea de base estable, el detector (6.6) debe encenderse al menos 24 h antes del inicio del análisis. La temperatura interna del detector se fija a 35 °C. Se fija el flujo a 0,2 ml/min (6.4) durante al menos 20 min, mientras que el horno de columna (6.3) se fija a temperatura ambiente.

10.1.3. *Horno de columna y flujo final*

Se fija el horno de columna (6.3) a 85 °C. Cuando se ha alcanzado esta temperatura, tras 30 min se va aumentando el flujo desde 0,2 ml/min hasta 0,6 ml/min (6.4). Se deja que el sistema se equilibre con ese flujo, a 85 °C durante 2 h o hasta que se obtenga una línea de base estable.

10.1.4. *Integración*

Deben elegirse cuidadosamente los parámetros de recogida e integración (6.7), como la tasa de los datos, la sensibilidad, la constante de tiempo, la anchura del pico y el umbral.

El tiempo de retención de la lactosa es de unos 11 min.

Nota: Existen muchos programas informáticos de recogida de datos (6.7) que permiten medir fácilmente el número de platos teóricos. Se mide periódicamente el número de platos teóricos del patrón 1 (6.7) y se sustituye la columna (6.1) cuando el número de platos es un 25 % inferior al valor inicial de una columna nueva.

10.1.5. *Prueba de la precolumna*

Ha de comprobarse periódicamente (al menos una vez en cada secuencia) la capacidad de la precolumna (6.2) de eliminar las sales de la muestra inyectando 25 µL de un solución de cloruro sódico al 0,05 %. Cada vez que aparezcan picos hay que sustituir la precolumna.

10.2. **Pase de los patrones**

Se inyectan al principio de cada serie de análisis 25 µL (6.5) de patrón 1 (8.1) y posteriormente de patrón 2 (8.2). Esto se repite cada 10 o 20 muestras, y también se hace al final de la secuencia.

10.3. **Pase de las muestras**

Se inyectan 25 µL del sobrenadante (9.2) de la muestra.

11. CÁLCULO Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

11.1. **Calibración**

Normalmente, para calcular los resultados se utiliza la altura de los picos; sin embargo, si la señal contiene demasiado ruido, puede utilizarse el área del pico (la cuantificación por la altura del pico se ve menos influida por los picos de los componentes presentes en baja concentración y que se separan del pico de lactosa de forma parcial, pero insuficiente).

El programa informático (6.7) debe calcular una curva de calibración lineal que pase por el origen. Ha de comprobarse el posible carácter no lineal de la curva [a falta de linealidad aparente suele deberse a un error en la preparación de los patrones 1 (8.1) o 2 (8.2), a una mala integración o, con menos probabilidad, al mal funcionamiento de un inyector].

Como punto de partida se utilizan las concentraciones de lactosa calculadas como lactosa anhidra en mg/mL de los patrones 1 (8.1) y 2 (8.2).

La pendiente (RF) de la línea de calibración se define por la relación área/concentración en mg/mL.

11.2. **Muestras**

El resultado del análisis se obtiene en g/100 g y se calcula mediante el programa informático (6.7) o mediante la fórmula siguiente:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0,1$$

▼B

siendo

C: concentración de lactosa en g/100 g polvo

H: altura del pico de lactosa de la muestra

RF: factor de respuesta (o pendiente) de la curva de calibración en mV/mg/mL

W_1: peso de la muestra de polvo en g (9.1)

W_2: peso de agua añadida a la muestra de polvo en g (9.1)

W_3: peso de la solución reconstituida de la muestra de polvo en g (9.2)

50: volumen del matraz aforado utilizado en (9.2)

0,1: conversión del resultado en g/100 g

12. PRECISIÓN

Los valores derivados de esta prueba interlaboratorios pueden no ser aplicables a matrices y gamas de concentración distintas de las indicadas aquí. Los valores de repetibilidad y reproducibilidad se deducirán del resultado de un ensayo interlaboratorios efectuado de acuerdo con la norma ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Repetibilidad**

Las diferencias absolutas entre dos resultados particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, con el mismo equipo, dentro de un breve plazo, no superarán en más del 5 % de los casos el valor de xxx (determinado mediante una prueba en colaboración) ([v]).

12.2. **Reproducibilidad**

La diferencia absoluta entre dos resultados particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en distintos laboratorios, por distintos operarios, con distintos equipos, no superará en más del 5 % de los casos el límite de 0,5 g/100 g (determinado mediante una prueba en colaboración).

13. BIBLIOGRAFÍA

([i]) J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89-106.

([ii]) D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

([iii]) ISO 707 (FIL 50): Leche y productos lácteos. Guía de muestreo.

([iv]) ISO 5725-1: Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y sus resultados. Parte 1: Principios y procedimientos generales.

([v]) ISO 5725-2: Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y sus resultados. Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normal.

▼B

ANEXO XII

(Artículo 9)

DETECCIÓN DE SUERO DE QUESO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO DESTINADA AL ALMACENAMIENTO PÚBLICO MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LOS CASEINOMACROPÉPTIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite detectar la presencia de suero de queso en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante determinación de los caseinomacropéptidos (CMP).

2. REFERENCIA

Norma Internacional ISO 707: Leche y productos lácteos. Guía de muestreo, conforme a las líneas maestras reflejadas en el anexo I, apartado 2, letra c), último párrafo.

3. DEFINICIÓN

El contenido en sólidos de suero de queso se define como el porcentaje en masa determinado por el contenido en caseinomacropéptido mediante el procedimiento descrito.

4. PRINCIPIO

— Reconstitución de la leche desnatada en polvo, eliminación de las materias grasas y las proteínas con ácido tricloroacético, y centrifugación o filtración.

— Determinación de la cantidad de caseinomacropéptidos (CMP) presentes en el sobrenadante por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

— Evaluación del resultado obtenido con las muestras en relación con muestras patrón constituidas por leche desnatada en polvo con o sin adición de un porcentaje conocido de suero de queso en polvo.

5. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza de grado analítico. El agua utilizada debe ser destilada o de pureza por lo menos equivalente.

5.1. **Solución de ácido tricloroacético**

Se disuelven 240 g de ácido tricloroacético (CCl_3COOH) en agua y se completa hasta 1 000 ml. La solución debe ser clara e incolora.

5.2. **Solución eluyente, pH 6,0**

Se disuelven 1,74 g de fosfato de hidrógeno y dipotasio (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfato de dihidrógeno y potasio (KH_2PO_4) y 21,41 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) en unos 700 ml de agua. Se ajusta, si es necesario, a pH 6,0 con ayuda de una solución de ácido fosfórico o de hidróxido de potasio.

Se lleva a 1 000 ml con agua y se homogeneiza.

Nota: La composición del eluyente se puede modificar para ajustarla al certificado de los patrones o a las recomendaciones del fabricante del material de relleno de la columna.

Antes de utilizarla, se filtra la solución eluyente a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm.

5.3. **Solución de lavado**

Se mezcla un volumen de acetonitrilo (CH_3CN) con nueve volúmenes de agua. Antes de utilizarla, se filtra la mezcla a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm.

▼B

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

5.4. **Muestras patrón**

5.4.1. *Leche desnatada en polvo que responda a las exigencias de esta Resolución, o sea [0].*

5.4.2. *La misma leche en polvo adulterada con 5 % (m/m) de suero de queso (tipo cuajo) en polvo de composición normal, o sea [5].*

6. EQUIPO

6.1. Balanza analítica

6.2. Centrifugadora optativa que pueda alcanzar una aceleración de 2 200 g, provista de tubos para centrifugar con tapón o capucha, de unos 50 ml de capacidad

6.3. Agitador mecánico

6.4. Agitador magnético

6.5. Embudos de vidrio de unos 7 cm de diámetro

6.6. Filtros de papel de filtración media, de unos 12,5 cm de diámetro

6.7. Dispositivo de filtración de vidrio provisto de membrana filtrante de 0,45 µm de diámetro de poro

6.8. Pipetas graduadas que permitan medir 10 ml (ISO 648, clase A, o ISO R/835) o un sistema capaz de introducir 10,0 ml en 2 minutos

6.9. Sistema capaz de introducir 20,0 ml de agua a unos 50 °C

6.10. Baño María termostatizado a 25 ± 0,5 °C

6.11. Equipo de HPLC que comprenda lo siguiente:

6.11.1. Bomba

6.11.2. Inyector, manual o automático, de 15 a 30 µl de capacidad

6.11.3. Dos columnas en serie TSK 2 000-SW (30 cm de longitud, 0,75 cm de diámetro interior) o columnas de eficacia equivalente (por ejemplo, una sola TSK 2 000-SWxl, una sola Agilent Technologies Zorbax GF 250) y una precolumna (3 cm × 0,3 cm) rellena de I 125 o de un material de eficacia equivalente

6.11.4. Horno de columna termostatizado a 35 ± 1 °C

6.11.5. Detector UV de longitud de onda variable, que permita efectuar mediciones a 205 mm con una sensibilidad de 0,008 A

6.11.6. Integrador que pueda integrar de valle a 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 ± 5 °C.

7. MUESTREO

7.1. La toma de muestras se debe efectuar según el procedimiento establecido en la norma internacional ISO 707. No obstante, los Estados miembros podrán utilizar otro método de toma de muestras, siempre que se atenga a los principios de la norma antes citada.

7.2. La muestra se debe conservar en condiciones que eviten cualquier deterioro o modificación de su composición.

8. PROCEDIMIENTO

▼B

8.1. **Preparación de la muestra problema**

Se pasa la leche en polvo a un recipiente de capacidad aproximadamente doble del volumen del polvo, provisto de tapadera hermética al aire. Se cierra el recipiente inmediatamente. Se mezcla bien la leche en polvo invirtiendo varias veces el recipiente.

8.2. **Porción de ensayo**

Se pesan 2,000 ± 0,001 g de la muestra problema y se pasan a un tubo de centrífuga (6.2) o a un matraz apropiado con tapón (50 ml).

8.3. **Eliminación de la grasa y las proteínas**

8.3.1. Se añaden 20,0 ml de agua tibia (50 °C) a la porción de ensayo. Se disuelve la leche en polvo agitando durante 5 minutos con ayuda del agitador mecánico (6.3). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja que se equilibre a 25 °C.

8.3.2. Se añaden, en 2 minutos, 10,0 ml de la solución de ácido tricloroacético (5.1) a unos 25 °C, agitando enérgicamente con el agitador magnético (6.4). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja durante 60 minutos.

8.3.3. Se centrifuga (6.2) durante 10 minutos a 2 200 g, o se pasa a través de un filtro de papel (6.6), desechando los primeros 5 ml del filtrado.

8.4. **Determinación cromatográfica**

8.4.1. Se inyectan de 15 a 30 µl, medidos con precisión, de sobrenadante o de filtrado (8.3.3) en el aparato de HPLC (6.11) regulado a un caudal de 1,0 ml de solución eluyente (5.2) por minuto.

Nota 1: Puede utilizarse otro caudal, en función del diámetro interior de las columnas empleadas o de las instrucciones del fabricante de la columna.

Nota 2: Se mantiene la solución eluyente (5.2) a 85 °C durante todo el análisis cromatográfico con el fin de conservar el eluyente desgasificado y de evitar la proliferación bacteriana. Es aceptable cualquier precaución que tenga un efecto similar.

Nota 3: En cada interrupción, hay que lavar las columnas con agua. Nunca se debe dejar en ellas la solución eluyente (5.2).

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

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

Pico II:	El segundo pico del cromatograma, con un RT de unos 12,5 minutos
Pico III:	El tercer pico del cromatograma, correspondiente a los CMP, con un RT de 15,5 minutos

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

El integrador (6.11.6) calcula automáticamente la superficie A de cada pico:

A_{II}:	superficie del pico II
A_{III}:	superficie del pico III

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

En caso de duda, ha de repetirse el análisis.

▼B

8.5. **Calibración**

8.5.1. Se aplica exactamente a las muestras patrón (5.4) el procedimiento descrito desde el punto 8.2 al punto 8.4.2.

Deben utilizarse soluciones recientemente preparadas pues los CMP se degradan en medio con tricloroacético al 8 %. La pérdida se estima en 0,2 % por hora a 30 °C.

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

8.5.3. Se determinan los factores de respuesta R inyectando el mismo volumen de filtrados (8.5.1) utilizado para las muestras.

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1. **Modo de cálculo y fórmulas**

9.1.1. *Cálculo de los factores de respuesta R*

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

siendo:

R_{II} = los factores de respuesta de los picos II,

A_{II} [0] = las superficies de los picos II de la muestra problema [0] obtenidas en 8.5.3

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

siendo:

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

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

W = la cantidad de suero presente en la muestra patrón [5], o sea 5.

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

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

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

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

siendo:

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

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

R_{II}, R_{III} = los factores de respuesta calculados en 9.1.1.

9.1.3. *Cálculo del tiempo de retención relativo del pico III de la muestra [E]* $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$

siendo:

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 8.4.2,

▼B

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 visto que existe una relación lineal entre el tiempo de retención relativo del pico III, es decir, RRT_{III} [E] y el porcentaje de suero en polvo añadido hasta el 10 %.

— El RRT_{III} [E] es < 1,000 si el contenido de suero es > 5 %.

— El RRT_{III} [E] es ≥ 1,000 si el contenido de suero es ≤ 5 %.

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

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

9.2. Cálculo del porcentaje de suero de queso en polvo presente en la muestra:

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

siendo:

W = el porcentaje (m/m) de suero de queso en la muestra [E],

S_{III} [E] = la superficie relativa del pico III de la muestra problema [E] obtenida en 9.1.2,

1,3 = la superficie media relativa del pico III expresada en gramos de suero de queso por 100 g determinada en leche desnatada en polvo no adulterada, de distintos orígenes. 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 han obtenido en 9.1.1 y 8.5.3, respectivamente,

(S_{III} [0] – 0,9) = la corrección que debe hacerse a la superficie media relativa 1,3 cuando S_{III} [0] no es igual a 0,9. Experimentalmente, la superficie media relativa del pico III de la muestra testigo [0] es 0,9.

9.3. **Precisión del método**

9.3.1. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o en un breve intervalo de tiempo por el mismo analista, empleando los mismos aparatos y la misma muestra, no debe exceder del 0,2 % (m/m).

9.3.2. *Reproducibilidad*

La diferencia entre dos resultados particulares e independientes obtenidos en dos laboratorios diferentes, con la misma muestra, no debe exceder del 0,4 % (m/m).

9.4. **Interpretación**

9.4.1. Se acepta que no existe suero si la superficie relativa del pico III, S_{III} [E], expresada en gramos de suero de queso por 100 g de producto, es ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), siendo

2,0 = el valor máximo permitido para la superficie relativa del pico III teniendo en cuenta la superficie relativa del pico III, es decir, 1,3, la incertidumbre debida a las variaciones en la composición de la leche desnatada en polvo y la reproducibilidad del método (9.3.2),

(S_{III} [0] – 0,9) = la corrección que debe hacerse cuando la superficie S_{III} [0] es distinta de 0,9 (véase el punto 9.2).

9.4.2. Si la superficie relativa del pico III, S_{III} [E], es > 2,0 + (S_{III} [0] – 0,9) y la superficie relativa del pico II, S_{II} [E] ≤ 160, se determina el contenido en suero de queso como se indica en el punto 9.2.

▼B

9.4.3. Si la superficie relativa del pico III, S_{III} [E], es > 2,0 + (S_{III} [0] – 0,9) y la superficie relativa del pico II, S_{II} [E] ≤ 160, se determina el contenido de proteínas totales (P %); después se examinan los gráficos 1 y 2.

9.4.3.1. Los datos obtenidos tras el análisis de muestras de leches desnatadas en polvo no adulteradas, con alto contenido en proteínas totales, se reúnen en los gráficos 1 y 2.

La línea continua representa la regresión lineal, cuyos coeficientes se calculan mediante el método de los mínimos cuadrados.

La recta de trazo discontinuo determina el límite superior de la superficie relativa del pico III, con una probabilidad de que no se sobrepasa en el 90 % de los casos.

Las ecuaciones de las rectas de trazo discontinuo de los gráficos 1 y 2 son:

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

respectivamente, siendo:

S_{III} = la superficie relativa del pico III calculada bien a partir del contenido en proteínas totales, bien a partir de la superficie relativa del pico S_{II} [E],

P % = el contenido en proteínas totales expresado en porcentaje en peso,

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

Estas ecuaciones son equivalentes a la cifra 1,3 mencionada en el punto 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 la fórmula siguiente: $T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)] T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$.

9.4.3.2.

Si T_1 o T_2 son iguales o inferiores a cero, no puede determinarse la presencia de suero de queso.

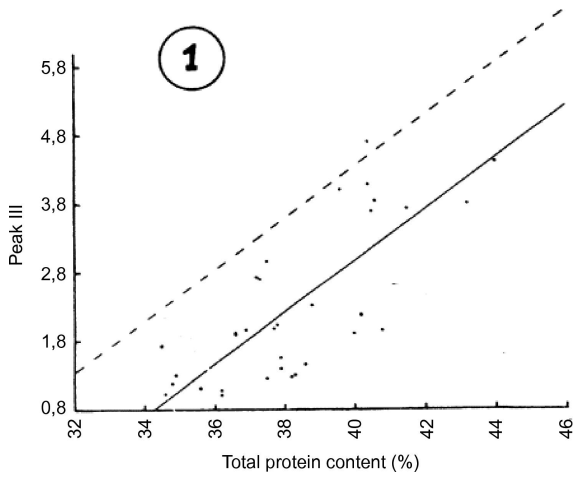
Si T_1 y T_2 son superiores a cero, hay presencia de suero de queso.

El contenido en suero de queso se calcula mediante la fórmula siguiente: $W = T_2 + 0{,}91$

siendo:

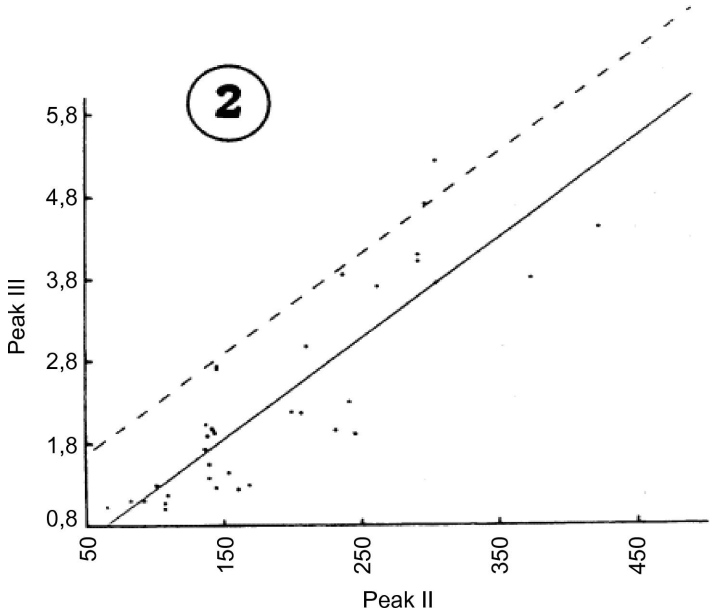
0,91 la distancia sobre el eje vertical entre la recta de trazo continuo y la recta de trazo discontinuo.

Skimmed-Milk Powder



▼B

Skimmed-Milk Powder



▼B

ANEXO XIII

(Artículo 9)

DETERMINACIÓN DE LOS SÓLIDOS DE SUERO DE QUESO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO Y EN LAS MEZCLAS A QUE SE REFIERE EL REGLAMENTO (CE) Nº 2799/1999

1. FINALIDAD: DETECCIÓN DE LA ADICIÓN DE SÓLIDOS DE SUERO DE QUESO A LOS PRODUCTOS SIGUIENTES:

   a) leche desnatada en polvo según la definición del artículo 2 del Reglamento (CE) nº 2799/1999, y

   b) mezclas según la definición del artículo 4 del Reglamento (CE) nº 2799/1999.

2. REFERENCIAS: NORMA INTERNACIONAL ISO 707

3. DEFINICIÓN

   El contenido en sólidos de suero de queso se define como el porcentaje en masa determinado por el contenido en caseinomacropéptido mediante el procedimiento descrito.

4. PRINCIPIO

   El contenido de caseinomacropéptidos se determina conforme al anexo XII. Las muestras que den resultado positivo se analizan para detectar la presencia de caseinomacropéptido A por el procedimiento de cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (procedimiento HPLC). Otra posibilidad es analizar directamente las muestras mediante el procedimiento de HPLC en fase inversa. El resultado se evalúa por comparación con muestras patrón constituidas por leche desnatada en polvo con y sin un porcentaje conocido de suero en polvo. Un resultado superior al 1 % (m/m) indica la presencia de sólidos de suero de queso.

5. REACTIVOS

   Todos los reactivos deben ser de pureza de grado analítico. El agua utilizada debe ser destilada o de pureza por lo menos equivalente. El acetonitrilo debe ser de calidad espectroscópica o adecuada para HPLC.

   Los reactivos necesarios para el procedimiento son los que se indican en el anexo XII del presente Reglamento.

   Reactivos para el procedimiento de HPLC en fase inversa.

5.1. **Solución de ácido tricloroacético**

   Se disuelven 240 g de ácido tricloroacético (CCl_3COOH) en agua y se completa hasta 1 000 ml. La solución debe ser clara e incolora.

5.2. **Eluyentes A y B**

   Eluyente A: se introducen, en un matraz aforado de 1 000 ml, 150 ml de acetonitrilo (CH_3CN), 20 ml de isopropanol ($CH_3CHOHCH_3$) y 1,00 ml de ácido trifluoroacético (TFA, CF_3COOH). Se enrasa con agua.

   Eluyente B: se introducen, en un matraz aforado de 1 000 ml, 550 ml de acetonitrilo, 20 ml de isopropanol y 1,00 ml de TFA. Se enrasa con agua. Antes de utilizarla, se filtra la solución eluyente a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm.

5.3. **Conservación de la columna**

   Tras los análisis, la columna se lava con el eluyente B (mediante un gradiente) y a continuación se enjuaga de acetonitrilo (mediante un gradiente durante 30 minutos). La columna se conserva en acetonitrilo.

5.4. **Muestras patrón**

5.4.1. Leche desnatada en polvo que se ajuste a los requisitos aplicables al almacenamiento público, es decir [0].

▼B

5.4.2. La misma leche en polvo adulterada con 5 % (m/m) de suero de queso (tipo cuajo) en polvo de composición normal, o sea [5].

5.4.3. La misma leche en polvo adulterada con 50 % (m/m) de suero de queso (tipo cuajo) en polvo de composición normal, o sea [50] ([1]).

6. EQUIPO

El equipo necesario para el procedimiento descrito es el que se indica en el anexo XII del presente Reglamento.

6.1. Balanza analítica

6.2. Centrifugadora optativa que pueda alcanzar una aceleración de 2 200 g, provista de tubos para centrifugar con tapón o capucha, de unos 50 ml de capacidad

6.3. Agitador mecánico

6.4. Agitador magnético

6.5. Embudos de vidrio de unos 7 cm de diámetro

6.6. Filtros de papel de filtración media, de unos 12,5 cm de diámetro

6.7. Dispositivo de filtración de vidrio provisto de membrana filtrante de 0,45 µm de diámetro de poro

6.8. Pipetas graduadas que permitan medir 10 ml (ISO 648, clase A, o ISO R/835) o un sistema capaz de introducir 10,0 ml en 2 minutos

6.9. Sistema capaz de introducir 20,0 ml de agua a unos 50 °C

6.10. Baño María termostatizado a 25 ± 0,5 °C

6.11. Equipo de HPLC que comprenda lo siguiente:

6.11.1. Sistema de bombeo de gradiente binario

6.11.2. Inyector, manual o automático, con capacidad de 100 µl

6.11.3. Columna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (25 cm de longitud; 0,46 cm de diámetro interior) o una columna equivalente de fase inversa de poro grueso, a base de sílice

6.11.4. Horno de columna termostatizado a 35 ± 1 °C

6.11.5. Detector de luz ultravioleta de longitud de onda variable, que permita tomar medidas a 210 nm (de ser necesario, puede utilizarse una longitud de onda mayor, hasta 220 nm), con una sensibilidad de 0,02 UA (unidades de absorbancia.

6.11.6. Integrador que pueda efectuar la integración a una línea base común o de valle a valle

Nota: Se puede trabajar con la columna a temperatura ambiente, con tal de que esta no fluctúe en más de 1 °C; si no se cumple esta condición, se produce una variación excesiva del tiempo de retención del CMP_A.

7. MUESTREO

7.1. La toma de muestras se debe efectuar según el procedimiento establecido en la norma internacional ISO 707. No obstante, los Estados miembros podrán utilizar otro método de toma de muestras, siempre que se atenga a los principios de la norma antes citada.

7.2. La muestra se debe conservar en condiciones que eviten cualquier deterioro o modificación de su composición.

8. PROCEDIMIENTO

([1]) El suero de queso en polvo de composición normal, así como la leche en polvo adulterada, pueden obtenerse de NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA Ede. También pueden emplearse otros productos en polvo que den resultados equivalentes al de los productos NIZO.

▼B

8.1. **Preparación de la muestra problema**

Se pasa la leche en polvo a un recipiente de capacidad aproximadamente doble del volumen del polvo, provisto de tapadera hermética al aire. Se cierra el recipiente inmediatamente. Se mezcla bien la leche invirtiendo varias veces el recipiente.

8.2. **Porción de ensayo**

Se pesan 2,00 ± 0,001 g de la muestra problema en un tubo de centrífuga (6.2) o en un matraz apropiado con tapón (50 ml).

Nota: Si se trata de una mezcla, debe pesarse una cantidad de muestra problema tal que la porción de muestra desengrasada corresponda a 2,00 g.

8.3. **Eliminación de la grasa y las proteínas**

8.3.1. Se añaden 20,0 ml de agua tibia (50 °C) a la porción de ensayo. Se disuelve el polvo agitándolo durante 5 minutos, o 30 minutos en caso de mazada ácida, empleando un agitador mecánico (6.3). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja que se equilibre a 25 °C.

8.3.2. Se añaden en 2 minutos, de forma constante, 10,0 ml de solución de ácido tricloroacético a 25 °C (5.1) a la vez que se agita vigorosamente con el agitador magnético (6.4). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja durante 60 minutos.

8.3.3. Se centrifuga (6.2) durante 10 minutos a 2 200 g, o se pasa a través de un filtro de papel (6.6), desechando los primeros 5 ml del filtrado.

8.4. **Determinación cromatográfica**

8.4.1. Se realiza el análisis por HPLC tal como se indica en el anexo XII. Si el resultado es negativo, se concluye que la muestra analizada no contiene una cantidad detectable de sólidos de suero de queso. En caso de resultado positivo, debe aplicarse el procedimiento de HPLC en fase inversa descrito a continuación. Otra posibilidad es aplicar directamente el método de HPLC en fase inversa. La presencia de mazada ácida en polvo puede dar lugar a falsos resultados positivos si se utiliza el método descrito en el anexo XII. Esta posibilidad queda excluida con el método de HPLC en fase inversa.

8.4.2. Antes de llevar a cabo el análisis por HPLC en fase inversa, deben optimizarse las condiciones de gradiente. Un tiempo de retención de 26 ± 2 minutos para el CMP_A es óptimo para sistemas de gradiente con un volumen muerto de unos 6 ml (volumen desde el punto en que confluyen los disolventes hasta el volumen del circuito de inyección, incluido este último). Para los sistemas de gradiente con un volumen muerto inferior (por ejemplo, 2 ml) debe emplearse un tiempo de retención óptimo de 22 minutos.

Se toman soluciones de las muestras patrón (5.4) con y sin un 50 % de suero de queso.

Se inyectan 100 µl de sobrenadante o filtrado (8.3.3) en el aparato de HPLC, que deberá funcionar en las condiciones de gradiente de exploración que figuran en el cuadro 1.

Cuadro 1

Condiciones de gradiente de exploración para la optimización de la cromatografía

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% A	% B	Curva
Inicial	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	Lineal
32	1,0	10	90	Lineal
37	1,0	10	90	Lineal
42	1,0	90	10	Lineal

La situación del pico del CMP_A se obtendrá por comparación de los dos cromatogramas.

▼B

Mediante la fórmula indicada a continuación puede calcularse la composición inicial del disolvente que ha de utilizarse para el gradiente normal (véase 8.4.3) % B = 10-2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 1,11

siendo:

RT_{cmpA}: el tiempo de retención del CMP_A en el gradiente de exploración

10: el % B inicial del gradiente de exploración

2,5: % B en el punto medio menos % B en el punto inicial del gradiente normal

13,5: el tiempo correspondiente al punto medio del gradiente de exploración

26: el tiempo de retención requerido del CMP_A

6: la proporción de las pendientes del gradiente normal y del de exploración

30: % B en el punto inicial menos % B a los 27 minutos en el gradiente de exploración

27: tiempo de recorrido del gradiente de exploración.

8.4.3. Se toman soluciones de las muestras problema:

Se inyectan 100 µl de sobrenadante o filtrado (8.3.3), medidos con precisión, en el aparato de HPLC que funcionará con un caudal de 1,0 ml de solución de eluyente (5.2) por minuto.

La composición del eluyente al iniciarse el análisis se obtiene de 8.4.2. Normalmente suele estar cerca de A:B = 76:24 (5.2). Inmediatamente después de la inyección se inicia un gradiente lineal que da lugar, al cabo de 27 minutos, a un porcentaje de B superior en un 5 %. A continuación comienza otro gradiente lineal por el cual la composición del eluyente alcanza el 90 % de B en 5 minutos. Esta composición se mantiene durante 5 minutos, transcurridos los cuales la composición se modifica mediante un gradiente lineal para alcanzar en 5 minutos la composición inicial. Dependiendo del volumen interno del sistema de bombeo, la siguiente inyección puede llevarse a cabo 15 minutos después de haberse alcanzado las condiciones iniciales.

Nota 1: El tiempo de retención del CMP_A debe ser de 26 ± 2 minutos. Puede conseguirse variando las condiciones iniciales y finales del primer gradiente. Sin embargo, la diferencia de % B entre las condiciones iniciales y finales del primer gradiente debe mantenerse en 5 % B.

Nota 2: Los eluyentes deben desgasificarse suficientemente y mantenerse desgasificados. Ello es esencial para que el sistema de bombeo por gradiente pueda funcionar correctamente. La desviación típica del tiempo de retención del pico de los CMP_A debe ser inferior a 0,1 minutos (n = 10).

Nota 3: Cada cinco muestras debe inyectarse la muestra de referencia (5) y emplearse para calcular un nuevo factor de respuesta R (9.1.1).

8.4.4. Los resultados del análisis cromatográfico de la muestra problema (E) se obtienen en forma de cromatograma en el que el pico del CMP_A se identifica por su tiempo de retención de unos 26 minutos.

El integrador (6.11.6) calcula automáticamente la altura H del pico del CMP_A. La situación de la línea de base debe comprobarse en cada cromatograma. Hay que repetir el análisis o la integración si la línea de base está situada incorrectamente.

▼B

Nota: Si el pico del CMP_A está separado suficientemente de los otros picos, debe aplicarse la asignación valle a valle; en caso contrario, hay que trazar perpendiculares a una línea de base común, cuyo punto de inicio debe estar próximo al pico del CMP_A (por tanto, ¡no a t = 0 min!). Hay que utilizar el mismo tipo de integración con el patrón y las muestras, y en caso de línea de base ha de comprobarse su coherencia con las muestras y el patrón.

Con el fin de detectar las anomalías eventuales debidas ya sea a un mal funcionamiento del aparato o de la columna, ya sea al origen y naturaleza de la muestra analizada, es fundamental observar el aspecto de cada cromatograma antes de efectuar la interpretación cuantitativa. En caso de duda, ha de repetirse el análisis.

8.5. **Calibración**

8.5.1. Se aplica a las muestras patrón (5.4.1 y 5.4.2) el procedimiento desde el punto 8.2 al 8.4.4, exactamente tal y como se describe. Hay que utilizar soluciones recién preparadas, pues los CMP se degradan en medio tricloroacético al 8 % a temperatura ambiente. A 4 °C, la solución permanece estable durante 24 horas. Cuando se realice una larga serie de análisis, es recomendable emplear una bandeja refrigerada para las muestras en el inyector automático.

Nota: El punto 8.4.2 puede omitirse si el % B en las condiciones iniciales se conoce por análisis previos.

El cromatograma de la muestra de referencia [5] debería ser análogo al representado en la figura 1. Aquí, el pico del CMP_A viene precedido por dos picos pequeños. Es imprescindible obtener una separación similar.

8.5.2. Antes de proceder a la determinación cromatográfica de las muestras, se inyectan 100 µl de la muestra patrón sin suero de queso [0] (5.4.1).

El cromatograma no debe presentar ningún pico al tiempo de retención del CMP_A.

8.5.3. Se determinan los factores de respuesta R inyectando el mismo volumen de filtrado (8.5.1) utilizado para las muestras.

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1. **Modo de cálculo y fórmulas**

9.1.1. *Cálculo del factor de respuesta R:*

Pico CMP_A: $R = W/H$

siendo:

R = el factor de respuesta del pico del CMP_A

H = la altura del pico del CMP_A

W = la cantidad de suero de la muestra patrón [5]

9.2. **Cálculo del porcentaje de suero de queso en polvo presente en la muestra**

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

siendo:

W(E) = el porcentaje (m/m) de suero de queso en la muestra (E)

R = el factor de respuesta del pico del CMP_A (9.1.1)

H(E) = la altura del pico del CMP_A de la muestra (E)

Si W(E) es superior al 1 % y la diferencia entre el tiempo de retención de la muestra y el de la muestra patrón [5] es inferior a 0,2 minutos, se confirma la presencia de sólidos de suero de queso.

9.3. **Precisión del método**

9.3.1. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o en un breve intervalo de tiempo por el mismo analista, empleando los mismos aparatos y la misma muestra, no debe exceder del 0,2 % (m/m).

▼B

9.3.2. *Reproducibilidad*

No determinada.

9.3.3. *Linealidad*

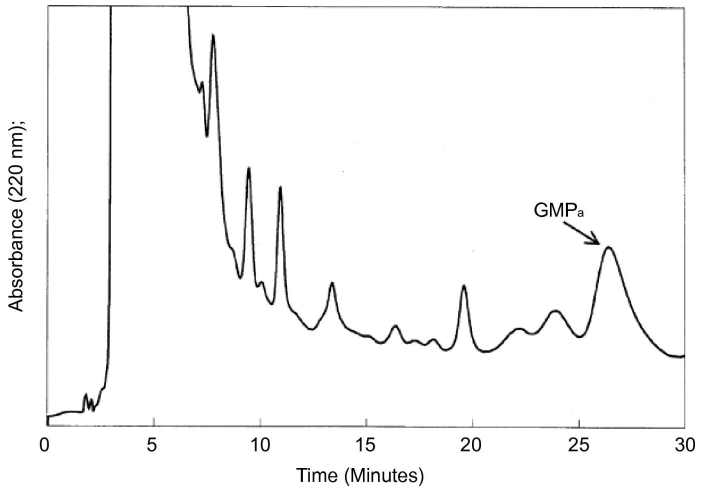
Entre 0 y 16 % de suero de queso, debe obtenerse una relación lineal con un coeficiente de correlación > 0,99.

9.4. **Interpretación**

El límite del 1 % se establece de conformidad con lo dispuesto en los puntos 9.2 y 9.4.1 del anexo XIX del Reglamento (CE) nº 214/2001.

Table 1

Ni –4,6 standard



▼B

ANEXO XIV

(Artículo 10)

LECHE DESNATADA EN POLVO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFATIDILSERINA Y DE FOSFATIDILETANOLAMINA

Método: HPLC en fase inversa.

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método describe un procedimiento de determinación del contenido de fosfatidilserina (FS) y fosfatidiletanolamina (FE) de la leche desnatada en polvo (LDP) y permite detectar en ella la presencia de sólidos de mazada.

2. DEFINICIÓN

El contenido de FS + FE es la fracción de masa de la sustancia determinada mediante la aplicación del presente procedimiento. El resultado se expresa en miligramos de fosfatidiletanolamina-dipalmitoílo (FEDP) por 100 g de polvo.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Extracción de los aminofosfolípidos por medio de metanol a partir de leche en polvo reconstituida. Determinación del contenido de FS y FE en forma de derivados de *o*-ftaldialdehído (OFA) mediante HPLC en fase inversa y detección por fluorescencia. Determinación del contenido de FS y FE en la muestra problema por referencia a una muestra patrón que contiene una cantidad conocida de FEDP.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza de grado analítico. El agua utilizada deberá ser agua destilada o de pureza al menos equivalente, salvo que se indique lo contrario.

4.1. **Material patrón: FEDP con una pureza de un 99 %, como mínimo**

Nota: El material patrón debe almacenarse a – 18 °C.

4.2. **Reactivos para la preparación de la muestra patrón y de la muestra problema**

4.2.1. Metanol de grado HPLC

4.2.2. Cloroformo de grado HPLC

4.2.3. Monoclorhidrato de triptamina

4.3. **Reactivos para la obtención del derivado de o-ftaldialdehído**

4.3.1. Hidróxido de sodio, solución acuosa 12M

4.3.2. Ácido bórico, solución acuosa 0,4 M, ajustada a pH 10,0 por medio de hidróxido de sodio (4.3.1)

4.3.3. 2-mercaptoetanol

4.3.4. o-ftaldialdehído (OFA)

4.4. **Disolventes de elución de HPLC**

4.4.1. Los disolventes de elución deberán prepararse con reactivos de grado HPLC

4.4.2. Agua de grado HPLC

4.4.3. Metanol de pureza fluorimétrica comprobada

4.4.4. Tetrahidrofurano

4.4.5. Fosfato de sodio y dihidrógeno

4.4.6. Acetato de sodio

4.4.7. Ácido acético

5. EQUIPO

5.1. Balanza analítica, capaz de pesar con una precisión de 1 mg y con una legibilidad de 0,1 mg

▼B

5.2. Vasos de precipitados de 25 y 100 ml de capacidad

5.3. Pipetas que permitan medir entre 1 y 10 ml

5.4. Agitador magnético

5.5. Pipetas graduadas que permitan medir 0,2, 0,5 y 5 ml

5.6. Matraces aforados de 10, 50 y 100 ml de capacidad

5.7. Jeringas de 20 y 100 µl de capacidad

5.8. Baño de ultrasonidos

5.9. Centrifugadora que funcione a 27 000 × g

5.10. Frascos de vidrio de unos 5 ml de capacidad

5.11. Probeta de 25 ml de capacidad

5.12. pH-metro, con una precisión de 0,1 unidades de pH

5.13. Equipo HPLC

5.13.1. Sistema de bombeo de gradiente capaz de funcionar a razón de 1,0 ml/min a 200 bar

5.13.2. Muestreador con capacidad para formar derivados

5.13.3. Calentador de columna, capaz de mantenerla a 30 °C ± 1 °C

5.13.4. Detector de fluorescencia capaz de funcionar con una longitud de onda de excitación de 330 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm

5.13.5. Integrador o programa de tratamiento de datos capaz de medir el área de los picos

5.13.6. Columna de Licrosphere — 100 (250 × 4,6 mm) o una columna equivalente rellena de octadecilsilano (C 18) con una granulometría de 5 µm

6. MUESTREO

El muestreo deberá realizarse con arreglo a la norma ISO 707.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. **Preparación de la solución de patrón interno**

7.1.1. Se pesan 30,0 ± 0,1 mg de monoclorhidrato de triptamina (4.2.3) en un matraz aforado de 100 ml (5.6) y se enrasa con metanol (4.2.1).

7.1.2. Se pasa con la pipeta (5.3) 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml (5.6) y se enrasa con metanol (4.2.1) con el fin de obtener una concentración de triptamina de 0,15 mM.

7.2. **Preparación de la solución de muestra problema**

7.2.1. Se pesa 1,000 ± 0,001 g de la muestra problema de LDP en un vaso de precipitados de 25 ml (5.2). Se añaden 10 ml de agua destilada a 40 °C ± 1 °C con una pipeta (5.3) y se agita con el agitador magnético (5.4) durante 30 minutos para disolver los grumos.

7.2.2. Se pasan con la pipeta (5.5) 0,2 ml de leche reconstituida a un matraz aforado de 10 ml (5.6), se añaden 100 µl de solución de triptamina de 0,15 mM (7.1) con una jeringa (5.7) y se enrasa con metanol (4.2.1). Se mezcla cuidadosamente por inversión y se somete a ultrasonidos (5.8) durante 15 minutos.

7.2.3. Se centrifuga (5.9) a 27 000 g durante 10 minutos y se recoge la solución sobrenadante en un frasco de vidrio (5.10).

Nota: La solución de muestra problema debe almacenarse a 4 °C hasta que se proceda al análisis por HPLC.

7.3. **Preparación de la solución del patrón externo**

▼B

7.3.1. Se pesan 55,4 mg de FEDP (4.1) en un matraz aforado de 50 ml (5.6) y se añaden unos 25 ml de cloroformo (4.2.2) con una probeta (5.11). Se calienta el matraz con tapón a 50 °C ± 1 °C y se mezcla a fondo hasta que se disuelva el FEDP. Se enfría el matraz hasta 20 °C, se enrasa con metanol (4.2.1) y se mezcla por inversión.

7.3.2. Se pasa con pipeta (5.3) 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml (5.6) y se enrasa con metanol (4.2.1). Se pasa con pipeta (5.3) 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml (5.6), se añaden 100 µl (5.7) de solución de triptamina 0,15 mM (7.1) y se enrasa con metanol (4.2.1). Se mezcla por inversión.

Nota: La solución de la muestra de referencia debe almacenarse a 4 °C hasta que se proceda al análisis por HPLC.

7.4. **Preparación del reactivo de derivación**

Se pesan 25,0 ± 0,1 mg de OFA (4.3.4) en un matraz aforado de 10 ml (5.6), se añaden 0,5 ml (5.5) de metanol (4.2.1) y se mezcla bien hasta disolver el OFA. Se enrasa con la solución de ácido bórico (4.3.2) y se añaden 20 µl de 2-mercaptoetanol (4.3.3) con una jeringa (5.7).

Nota: El reactivo de derivación debe conservarse a 4 °C en un frasco de vidrio topacio; permanece estable durante una semana.

7.5. **Determinación por HPLC**

7.5.1. *Disolventes de elución (4.4)*

Disolvente A: solución de fosfato de sodio y dihidrógeno 0,3 mM y de acetato de sodio 3 mM (ajustada a un pH de 6,5 con ácido acético): metanol: tetrahidrofurano = 558:440:2 (v/v/v).

Disolvente B: metanol.

7.5.2. *Gradiente de elución preconizado:*

Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)	Flujo (ml/min)
Inicial	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

Nota: El grado de elución podrá requerir una ligera modificación con vistas a la obtención de la resolución indicada en la figura 1.

Temperatura de la columna: 30 °C

7.5.3. *Volumen de inyección: 50 µl de reactivo de derivación y 50 µl de solución de la muestra*

▼B

7.5.4. *Equilibrado de la columna*

El sistema se debe poner en marcha a diario. Se llena la columna con disolvente B al 100 % durante 15 minutos y, a continuación, se regula la proporción a A:B = 40:60 y se equilibra a 1 ml/min durante 15 minutos. Se efectúa un ciclo en blanco inyectando metanol (4.2.1).

Nota: Antes de guardarla durante un tiempo largo, hay que llenar la columna con metanol y cloroformo en la proporción de 80:20 (v/v) durante 30 minutos.

7.5.5. *Determinación del contenido de FS y FE de la muestra problema*

7.5.6. *Se efectúa la secuencia de análisis cromatográficos sin modificar el tiempo entre ciclos con el fin de obtener períodos de retención constantes. Se inyecta la solución de patrón externo (7.3) cada 5-10 soluciones de muestra problema a fin de calcular el factor de respuesta0.*

Nota: La columna debe lavarse llenándola con solución de disolvente B al 100 % (7.5.1) durante al menos 30 minutos cada 20-25 ciclos.

7.6. **Modo de integración**

7.6.1. *Pico del FEDP*

El FEDP se eluye en forma de un solo pico. Se determina el área del pico mediante la integración de valle a valle.

7.6.2. *Pico de la triptamina*

La triptamina se eluye en forma de un solo pico (figura 1). Se determina el área del pico mediante la integración de valle a valle.

7.6.3. *Grupos de picos de FS y FE*

En las condiciones descritas (figura 1), la FS se eluye en forma de dos picos principales parcialmente no resueltos precedidos de un pico menor. La FE se eluye en forma de tres picos parcialmente no resueltos. Hay que determinar la superficie total de cada grupo de picos estableciendo la línea de base tal como se indica en la figura 1.

8. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El contenido de FS y FE de la muestra problema se calculará como sigue: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

siendo:

C = el contenido de FS o FE (mg/100 g de polvo de muestra problema)

A_1 = el área del pico de FEDP de la solución de muestra patrón (7.3)

A_2 = el área del pico de FS o FE de la solución de muestra problema (7.2)

T_1 = el área del pico de triptamina de la solución de muestra patrón (7.3)

T_2 = el área del pico de triptamina de la solución de muestra problema (7.2)

9. PRECISIÓN DEL MÉTODO

Nota: Los valores relativos a la repetibilidad se han calculado de acuerdo con la norma internacional FIL [1]. El límite de reproducibilidad provisional se ha calculado de conformidad con el procedimiento establecido en la parte b) de su anexo III.

[1] Norma internacional FIL 135B/1991. Leche y productos lácteos; características de precisión de los métodos analíticos; esquema relativo a un método de estudio en colaboración.

▼B

9.1. **Repetibilidad**

La desviación típica relativa de la repetibilidad, que expresa la variabilidad de los resultados de análisis independientes obtenidos por un mismo analista utilizando el mismo material en las mismas condiciones y con la misma muestra problema, durante un breve lapso de tiempo, no debe sobrepasar un 2 % en valor relativo. En caso de que se proceda a dos determinaciones en esas condiciones, la diferencia relativa entre ambos resultados no deberá sobrepasar el 6 % de la media aritmética de los resultados.

9.2. **Reproducibilidad**

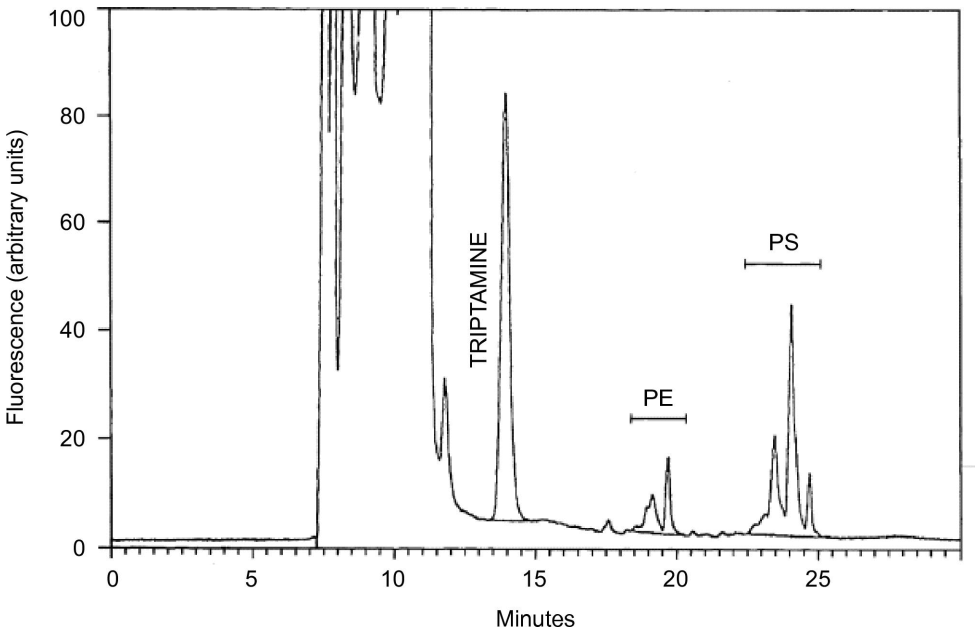
En caso de que se efectúen dos determinaciones por parte de analistas de distintos laboratorios, utilizando materiales distintos y en distintas condiciones para el análisis de la misma muestra problema, la diferencia relativa entre ambos resultados no deberá sobrepasar el 11 % de la media aritmética de los resultados.

10. BIBLIOGRAFÍA

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

Figura 1

Perfil de HPLC de los derivados OPA de la fosfatidilserina (FS) y de la fosfatidiletanolamina (FE) contenidos en el extracto de metanol de la leche desnatada en polvo reconstituida. Se indica el modo de integración de los picos de FS, FE y triptamina (patrón interno)



▼B

ANEXO XV

(Artículo 11)

DETECCIÓN DE RESIDUOS DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO

Se utiliza un ensayo de cribado de inhibidores microbianos con *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (cepa idéntica a la C953) como microorganismo de ensayo, que tenga una sensibilidad suficiente para detectar 4 μg de bencilpenicilina por kg de leche y 100 μg de sulfadimidina por kg de leche. Existen equipos comerciales para ensayos que pueden utilizarse siempre que tengan la sensibilidad requerida para la bencilpenicilina y la sulfadimidina.

Para realizar el ensayo se utiliza leche desnatada en polvo reconstituida (1 g de polvo + 9 ml agua destilada). El ensayo se lleva a cabo según se describe en la norma ISO/TS 26844:2006: Leche y productos lácteos. Determinación de residuos de sustancias antimicrobianas. Prueba de difusión en tubo de la FIL, boletín nº 258/1991, sección 1, capítulo 2, o conforme a las instrucciones del fabricante del equipo para ensayos ([1]).

Los resultados positivos deben interpretarse como sigue:

1. La presencia de β-lactamas puede confirmarse si se repite el ensayo añadiendo penicilinasa al sistema de ensayo ([2]):

   Resultado negativo: la sustancia inhibidora es un antibiótico β-lactámico.

   El resultado positivo permanece: la sustancia inhibidora no puede identificarse con este procedimiento; se ha de pasar a la etapa 2.

2. La presencia de sulfonamidas puede confirmarse si se repite el ensayo añadiendo ácido *p*-aminobenzoico al sistema de ensayo:

   Resultado negativo: la sustancia inhibidora es una sulfonamida.

   El resultado positivo permanece: la sustancia inhibidora no puede identificarse con este procedimiento; se ha de pasar a la etapa 3.

3. La presencia de una combinación de una β-lactama y una sulfonamida puede confirmarse si se repite el ensayo añadiendo penicilinasa y ácido *p*-aminobenzoico al sistema de ensayo:

   Resultado negativo: las sustancias inhibidoras son un antibiótico β-lactámico y una sulfonamida.

   Resultado positivo: la sustancia inhibidora no puede identificarse con este procedimiento.

([1]) Nota importante: Pueden darse resultados positivos falsos cuando se analiza leche desnatada en polvo. Por tanto, es importante verificar que el sistema de ensayo aplicado no proporciona resultados positivos falsos.

([2]) Algunas β-lactamas son menos sensibles a la β-lactamasa. En tales casos, se recomienda efectuar un pretratamiento adicional de la muestra (1 ml de la muestra problema se pone con 0,3 ml de concentrado de penasa a 37 °C durante 2 h).

▼B

ANEXO XVI

(Artículo 12)

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA LECHE DESNATADA EN POLVO PRESENTE EN UN PIENSO COMPUESTO POR COAGULACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PARACASEÍNA

1. OBJETO

Determinación cuantitativa de la leche desnatada en polvo presente en un pienso compuesto por coagulación enzimática de la paracaseína.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método se aplica a los piensos compuestos que contengan al menos un 10 % de leche desnatada en polvo; la presencia de cantidades importantes de mazada o de determinadas proteínas no lácteas puede provocar interferencias.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

3.1. Disolución de la caseína contenida en el pienso compuesto por extracción con una solución de citrato de sodio.

3.2. Ajuste de la concentración en iones calcio al nivel necesario para la precipitación de la paracaseína mediante la adición de cuajo.

3.3. Determinación del contenido en nitrógeno de la paracaseína precipitada por el método de Kjeldahl, contemplado en la norma ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001; cálculo de la cantidad de leche desnatada en polvo presente tomando como base un contenido mínimo en caseína del 27,5 % (véase el punto 8.1).

4. REACTIVOS

Los reactivos utilizados deben ser de pureza de grado analítico. El agua utilizada ha de ser destilada o de pureza equivalente. Con excepción del cuajo (4.5), todos los reactivos y soluciones deben estar libres de sustancias nitrogenadas.

4.1. Citrato trisódico dihidratado (solución al 1 % p/v)

4.2. Cloruro de calcio (solución aproximadamente 5 M)

Se disuelven 75 g of $CaCl_2.2\ H_2O$ en 100 ml de agua destilada mediante agitación (atención a la reacción exotérmica). Se deja hasta el día siguiente y después se filtra la solución. La solución se guarda en refrigerador.

4.3. Hidróxido de sodio 0,1 N

4.4. Ácido clorhídrico 0,1 N

4.5. Cuajo de ternera líquido [potencia de unas 100 IMCU (unidades internacionales de coagulación de leche)/ml según la norma ISO 11815/IDF 157]. Se conserva en frigorífico a 4-6 °C.

4.6. Reactivos para la determinación cuantitativa del nitrógeno según el método de Kjeldahl contemplado en la norma ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001.

5. EQUIPO

Material habitual de laboratorio y, en particular:

5.1. Mortero o molino homogeneizador

5.2. Balanza analítica, capaz de pesar con una precisión de 1 mg y con una legibilidad de 0,1 mg

5.3. Centrifugadora de mesa (de 500 g o 2 000 a 3 000 rpm) con tubos de centrífuga de 50 ml y 2 000 g

5.4. Agitador magnético con varillas de 10-15 mm

5.5. Vasos de precipitados de 150 a 200 ml

5.6. Matraces de 250 y 500 ml

▼B

5.7. Embudos de vidrio de 60-80 mm de diámetro

5.8. Filtros sin cenizas, de filtración rápida, con un diámetro de 150 mm (Whatman nº 41 o equivalente)

5.9. Pipetas de diferentes tamaños

5.10. Baño María termostatizado a 37 °C ± 1° C

5.11. pH-metro, con una precisión de 0,1 unidades de pH

5.12. Termómetros con una precisión de 1 °C

6. PROCEDIMIENTO

6.1. **Preparación de la muestra**

Se trituran 10-20 g de la muestra en un mortero o se homogeneizan en el molino con el fin de obtener una mezcla homogénea.

6.2. **Disolución de la leche en polvo y separación del residuo insoluble**

6.2.1. Se pesan 1,000 g ± 0,002 g de pienso compuesto bien homogeneizado (6.1) directamente en un tubo de centrífuga de 50 ml. Se añaden 30 ml de solución de citrato trisódico (4.1) previamente calentada a 45 °C ± 2 °C. Se mezcla por agitación magnética durante 5 minutos como mínimo, o mediante sacudidas manuales enérgicas.

6.2.2. Se centrifuga a 500 g (de 2 000 a 3 000 rpm) durante 10 minutos y se decanta el sobrenadante acuoso claro en un vaso de precipitados de 150-200 ml, teniendo cuidado para no verter nada del material suelto del fondo.

6.2.3. Se realizan otras dos extracciones del residuo, siguiendo el mismo procedimiento, y se añaden los extractos al primero.

6.2.4. Si se forma una capa de aceite en la superficie, se debe enfriar en frigorífico hasta solidificación de la fase grasa, y a continuación se retira con una espátula esa fase sólida.

6.3. **Coagulación de la caseína por las enzimas del cuajo**

6.3.1. Al extracto acuoso total (alrededor de 100 ml) se añaden gota a gota, con agitación continua, 2 ml de cloruro de calcio (4.2). Se ajusta el pH a 6,4-6,5 con soluciones de NaOH (4.3) o HCl (4.4). Se pone la solución en un baño termostatizado a 37 °C ± 1 °C durante 15 o 20 min para que se establezca el equilibrio salino, que se manifestará por la aparición de una ligera turbidez.

6.3.2. Se pasa el líquido a un tubo de centrífuga y se centrifuga a 2 000 g durante 10 min para eliminar el material precipitado. Se pasa el sobrenadante, sin lavar el sedimento, a otro tubo de centrífuga.

6.3.3. Se lleva la temperatura del sobrenadante de nuevo a 37 °C ± 1 °C. Se añaden al extracto, gota a gota y agitando a la vez, 0,5 ml de cuajo líquido (4.5). La coagulación se produce en 2 minutos.

6.3.4. Se pone de nuevo la muestra en el baño María y se deja a la temperatura de 37 °C ± 1 °C durante 15 min. Se saca la muestra del baño y se rompe el coágulo por agitación. Se centrifuga a 2 000 g durante 10 min. Se filtra el sobrenadante con un filtro de papel adecuado (5.8) y se conserva este filtro. Se lava el precipitado del tubo de centrífuga con 50 ml de agua a unos 35 °C, agitando el precipitado.

Se centrifuga de nuevo a 2 000 g durante 10 minutos. Se filtra el sobrenadante empleando el mismo filtro de papel anterior.

6.4. **Determinación del nitrógeno caseínico**

6.4.1. Después del lavado, se transfiere cuantitativamente el precipitado al mismo filtro de papel conservado (6.3.4) utilizando agua destilada. Se introduce el filtro de papel secado en el matraz Kjeldahl. Se determina el nitrógeno siguiendo el método Kjedahl descrito en la norma ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001.

▼B

7. ENSAYO EN BLANCO

7.1. Debe efectuarse periódicamente un ensayo en blanco sometiendo a mineralización por el método de Kjeldahl contemplado en la norma ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001 un filtro de papel sin cenizas (5.8) humedecido con una mezcla compuesta de 90 ml de solución de citrato de sodio (4.1), 2 ml de solución de cloruro de calcio (4.2) y 0,5 ml de cuajo líquido (4.5), y lavado 3 veces con 15 ml de agua destilada.

7.2. El volumen de ácido utilizado en el ensayo en blanco debe restarse del volumen de ácido (4.4) utilizado para la valoración de la muestra.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. El porcentaje de leche desnatada en polvo en el pienso compuesto se calculará mediante la fórmula siguiente

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

donde:

N representa el porcentaje en nitrógeno de la paracaseína;

27,5 es el factor de conversión de la caseína determinada en porcentaje de leche desnatada en polvo;

2,81 y 0,908 son factores de corrección obtenidos por análisis de regresión.

9. PRECISIÓN DEL MÉTODO

9.1. **Repetibilidad**

Al menos en el 95 % de los casos estudiados, la diferencia entre dos resultados individuales, obtenidos con una misma muestra, en el mismo laboratorio y por el mismo operador, no deberá superar los 2,3 g de leche desnatada en polvo por 100 g de pienso compuesto examinado.

9.2. **Reproducibilidad**

Al menos en el 95 % de los casos estudiados, la diferencia entre los resultados obtenidos por dos laboratorios con una misma muestra no deberá superar los 6,5 g de leche desnatada en polvo por 100 g de pienso compuesto examinado.

10. OBSERVACIONES

10.1. La adición de un porcentaje importante de determinadas proteínas no lácteas, y especialmente las de soja, cuando se hayan calentado con la leche desnatada en polvo, puede producir resultados demasiado elevados debido a un fenómeno de coprecipitación con la paracaseína de la leche.

10.2. La adición de mazada puede originar cifras algo bajas, pues la determinación no se refiere más que al extracto magro. La adición de determinadas mazadas ácidas puede dar lugar a cifras claramente bajas, ya que su disolución en la solución de citrato no es completa.

10.3. La adición de, al menos, 0,5 % de lecitina puede dar lugar asimismo a resultados bajos.

10.4. La incorporación de leche en polvo calentada a alta temperatura (high-heat) puede producir valores demasiado elevados, debido a la coprecipitación de determinadas proteínas del suero con la paracaseína de la leche.

▼B

ANEXO XVII

(Artículo 13)

DETECCIÓN DEL ALMIDÓN EN LECHE DESNATADA EN POLVO, LECHE EN POLVO DESNATURALIZADA Y PIENSOS COMPUESTOS

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método sirve para la detección del almidón que se utiliza como marcador en la leche en polvo desnaturalizada.

El límite de detección del método es de aproximadamente 0,05 g de almidón por 100 g de muestra.

2. PRINCIPIO

La reacción se basa en la utilizada en yodometría:

— fijación por parte de los coloides del yodo libre en solución acuosa,

— absorción por parte de las micelas de almidón y formación de color.

3. REACTIVOS

3.1. Solución de yodo:

— yodo: 1,0 g,

— yoduro de potasio: 2,0 g,

— agua destilada: 100 ml,

— se disuelven 1,0 g de yodo y 2,0 g de yoduro de potasio en agua en un matraz aforado de 100 ml. Se enrasa con agua y se mezcla.

4. EQUIPO

4.1. Balanza analítica

4.2. Baño María hirviendo

4.3. Tubos de ensayo de 25 mm × 200 mm

5. PROCEDIMIENTO

Se pesa 1,0 g de la muestra con una precisión de 0,1 g y se pasa al tubo de ensayo (4.3).

Se añaden 20 ml de agua destilada y se agita para dispersar la muestra.

Se introduce en el baño María hirviendo (4.2) y se deja durante 5 min.

Se saca después del baño y se enfría a temperatura ambiente.

Se añaden 0,5 ml de solución de yodo (3.1), se agita y se observa el color resultante.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La presencia de almidón nativo en la muestra se refleja mediante una coloración azul.

Si la muestra contiene almidón modificado, es posible que el color no sea azul.

7. OBSERVACIONES

El color, su intensidad y el aspecto microscópico del almidón variarán dependiendo del origen del almidón nativo (por ejemplo, maíz o patata) y del tipo de almidón modificado presente en la muestra.

En presencia de almidones modificados, el color se vuelve violeta, rojo o marrón, dependiendo del grado de modificación de la estructura cristalina del almidón nativo.

▼B

ANEXO XVIII

(Artículo 14)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN HUMEDAD DE LA NATA EN POLVO

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente anexo recoge un método para la determinación del contenido en humedad de la nata en polvo.

2. DEFINICIONES

A los efectos del presente anexo, se entenderá por:

Humedad: la pérdida de masa determinada por el procedimiento especificado en el presente anexo.

Se expresa en porcentaje en masa.

3. PRINCIPIO

Se seca una porción de muestra a 102 ± 2 °C hasta llegar a una masa constante y se pesa para determinar la pérdida de masa.

4. EQUIPO

Material habitual de laboratorio y, en particular, el siguiente:

4.1. Balanza analítica, capaz de pesar con una precisión de 1 mg y con una legibilidad de 0,1 mg.

4.2. Estufa de secado, bien ventilada, capaz de mantenerse termostatizada a 102 ± 2 °C en todo el espacio de trabajo.

4.3. Desecador provisto de gel de sílice recién deshidratado con indicador higrométrico u otro deshidratante eficaz.

4.4. Placas de fondo plano, de una profundidad de unos 25 mm, un diámetro de unos 50 mm, y hechas de un material adecuado (por ejemplo, vidrio, acero inoxidable, níquel o aluminio), provistas de tapas que ajusten bien y puedan quitarse fácilmente.

4.5. Frascos con tapones que cierren bien, para mezclar las muestras de laboratorio

5. MUESTREO

Es importante que el laboratorio reciba una muestra problema realmente representativa y que no se haya alterado ni cambiado durante su transporte o almacenamiento.

El muestreo no forma parte del método especificado en esta norma internacional. En la norma ISO 707FIL 50 se presenta un método recomendado de muestreo.

La muestra debe conservarse de forma que se evite su deterioro o modificación.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PROBLEMA

La muestra problema se homogeneiza bien agitando e invirtiendo repetidamente el recipiente (en caso necesario, después de haber pasado todas las muestras problema a un recipiente estanco de capacidad suficiente para que pueda efectuarse esta operación).

Si no se consigue alcanzar la homogeneidad completa con este procedimiento, las porciones de muestra (para dos determinaciones simples) se toman de la muestra problema preparada de dos puntos lo más distantes posible.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. **Preparación de la placa**

7.1.1. Se calientan una placa abierta y su tapa (4.4) en la estufa (4.2), regulada a 102 ± 2 °C, durante al menos 1 h.

7.1.2. Se pone la tapa en la placa, se pasa la placa cubierta al desecador (4.3), se deja que se enfríe hasta la temperatura de la sala de balanzas y se pesa con precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg.

▼B

7.2. **Porción de muestra**

Se pasan a la placa entre 1 y 3 g de la muestra problema preparada (6), se cubre con la tapa y se pesa con precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg.

7.3. **Determinación**

7.3.1. Se destapa la placa y se coloca su tapa en la estufa (4.2), regulada a 102 ± 2 °C, durante 2 h.

7.3.2. Se vuelve a poner la tapa en la placa, se pasa la placa cubierta al desecador, se deja que se enfríe hasta la temperatura de la sala de balanzas y se pesa con precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg.

7.3.3. Se destapa la placa y se vuelve a calentar otra vez, junto con su tapa, en la estufa durante 1 h. Después se repite la operación 7.3.2.

7.3.4. Se repite el proceso de calentamiento y de pesada hasta que entre dos pesadas sucesivas el descenso de la masa sea igual o inferior a 1 mg, o hasta que haya aumento.

Para el cálculo se tiene en cuenta la masa mínima registrada.

8. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. **Cálculo**

El contenido en humedad, expresado en g/100 g, es igual a:

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

siendo:

m_0 la masa, en gramos, de la placa y su tapa (7.1.2);

m_1 la masa, en gramos, de la placa, su tapa y la porción de muestra antes de secar (7.2);

m_2 la masa, en gramos, de la placa, su tapa y la porción de muestra después de secar (7.3.4).

El resultado se indica con dos cifras decimales.

9. PRECISIÓN

Nota: Los valores de repetibilidad y reproducibilidad se deducen de los resultados de un ensayo interlaboratorios (véase Steiger, G. *Bulletin of IDF* nº 285/1993, p. 21-28) efectuado de acuerdo con la norma FIL 135B:1991: Leche y productos lácteos; características de precisión de los métodos analíticos; esquema relativo a un método de estudio en colaboración.

9.1. **Repetibilidad**

La diferencia absoluta entre dos resultados independientes y particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, con el mismo equipo, dentro de un breve plazo, no superará en más del 5 % de los casos el valor de 0,20 g de humedad por 100 g de producto.

9.2. **Reproducibilidad**

La diferencia absoluta entre dos resultados independientes y particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en distintos laboratorios, por distintos operarios, con distintos equipos, no superará en más del 5 % de los casos el valor de 0,40 g de humedad por 100 g de producto.

10. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá mencionar:

— toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra,

— el método de muestreo utilizado, si se conoce,

— el método de ensayo utilizado con referencia a su norma internacional,

▼B

— todos los datos del procedimiento que no se especifiquen en esta norma internacional o se consideren optativos, junto con los datos de cualquier incidente que pueda haber influido en los resultados,

los resultados obtenidos del ensayo y, si se ha comprobado la repetibilidad, el resultado final con su margen de error.

▼B

ANEXO XIX

(Artículo 15)

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN LA MAZADA ÁCIDA EN POLVO

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Determinar el contenido de humedad de la mazada ácida en polvo destinada en principio a la alimentación animal.

2. PRINCIPIO

La muestra se seca al vacío. La pérdida de masa se determina pesando la muestra.

3. EQUIPO

3.1. Balanza analítica, capaz de pesar con una precisión de 1 mg y con una legibilidad de 0,1 mg.

3.2. Placas de metal inoxidable o de cristal, provistas de tapadera que garantice un cierre hermético; superficie útil que permita extender la muestra a una densidad de unos 0,3 g/cm^2.

3.3. Estufa de vacío de calentamiento eléctrico regulable, provista de una bomba de aceite y de un dispositivo para la introducción de aire caliente deshidratado a través de una torre que contenga, por ejemplo, óxido de calcio o sulfato de calcio (con un indicador de humedad).

3.4. Desecador que contenga un deshidratante eficaz.

3.5. Estufa de secado ventilada, termostatizada a 102 ± 2 °C.

4. PROCEDIMIENTO

Se calienta una placa (3.2), junto con su tapadera, en la estufa de secado (3.5) durante 1 h como mínimo. Se coloca la tapa sobre el recipiente, se pasa inmediatamente al desecador (3.4), se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa con precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg.

Se destapa la placa, se pasan a ella unos 5 g de muestra y se pesa con precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg. Se pone la placa con su tapa en la estufa de vacío (3.3) precalentada a 83 °C. Para evitar que la temperatura de la estufa baje indebidamente, ha de introducirse la placa lo más deprisa posible.

Se lleva la presión hasta 100 Torr (13,3 kPa) y se deja secando hasta peso constante (unas 4 h) a esta presión en corriente de aire caliente seco.

Se cuenta el tiempo de secado a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo la temperatura de 83 °C. Con precaución, se restablece la presión atmosférica en la estufa. Se abre la estufa, se cubre inmediatamente la placa con la tapa, se retira la placa de la estufa, se deja enfriar durante 30 o 45 minutos en el desecador (3.4) y se pesa con precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg. Se procede a una desecación complementaria durante 30 min en la estufa de vacío (3.3) a 83 °C y se vuelve a pesar. Se repite el proceso de calentamiento y de pesada hasta que entre dos pesadas sucesivas el descenso de la masa sea igual o inferior a 1 mg, o hasta que haya aumento. Para el cálculo se tiene en cuenta la masa mínima registrada.

5. CÁLCULO

$\%\ \text{humedad} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100\ \%$

siendo:

m_0 la masa de la placa y su tapa;

m_1 la masa de la placa, su tapa y la porción de muestra antes de secar;

m_2 la masa de la placa, su tapa y la porción de muestra después de secar.

El resultado se registra con la precisión de 0,1 g / 100 g.

▼B

6. PRECISIÓN

6.1. **Límite de repetibilidad**

La diferencia absoluta entre dos resultados independientes y particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, con el mismo equipo, dentro de un breve plazo, no superará en más del 5 % de los casos el valor de 0,4 g de agua / 100 g de mazada en polvo.

6.2. **Límite de reproducibilidad**

La diferencia absoluta entre dos resultados independientes y particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en distintos laboratorios, por distintos operarios, con distintos equipos, no superará en más del 5 % de los casos el valor de 0,6 g de agua/100 g de mazada ácida en polvo.

6.3. **Fuente de los datos de precisión**

Los datos de precisión fueron determinados en un experimento realizado en 1995 en el que participaron ocho laboratorios y doce muestras (seis duplicados ciegos).

▼B

ANEXO XX

(Artículo 16)

MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA GRASA LÁCTEA MEDIANTE ANÁLISIS DE TRIGLICÉRIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES — REVISIÓN 2

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Esta norma especifica un método de referencia para la determinación de la pureza de la grasa láctea mediante análisis de triglicéridos por cromatografía de gases. Pueden detectarse grasas vegetales y animales, tales como sebo de vacuno y manteca de cerdo.

La integridad de la grasa láctea se determina utilizando fórmulas definidas de triglicéridos. Básicamente, el método se aplica a la leche de vaca a granel y a sus productos, independientemente de las condiciones de alimentación, cría o lactancia. Solo una alimentación con un excepcionalmente elevado contenido en aceites vegetales puros, como aceite de colza, puede provocar un resultado positivo falso. También pueden dar resultado positivo falso los productos lácteos obtenidos de vacas determinadas.

En particular, el método es aplicable a la grasa extraída de productos lácteos que supuestamente contienen grasa láctea pura con una composición no modificada, como mantequilla, nata, leche y leche en polvo. El tratamiento tecnológico de la grasa láctea, como la extracción del colesterol o su fraccionamiento, pueden dar lugar a un resultado positivo falso. También puede suceder así con la grasa láctea obtenida de leche desnatada o de mazada. El método no puede aplicarse siempre a la grasa extraída del queso, debido a que el proceso de maduración puede afectar a la composición de la grasa tanto que llegue a dar un resultado positivo falso.

Nota 1: El ácido butírico (n-butanoico) (C_4) está presente solo en la grasa láctea y permite efectuar una estimación cuantitativa de la presencia de cantidades pequeñas o moderadas de grasa láctea en grasas vegetales y animales. Sin embargo, debido a la gran variación de C_4 (con una gama de fracciones másicas porcentuales aproximadas entre el 3,1 % y el 3,8 %), es difícil dar información cuali y cuantitativa con fracciones másicas de grasa extraña respecto a la grasa láctea pura de hasta el 20 %[1].

Nota 2: En la práctica, no pueden obtenerse resultados cuantitativos a partir del contenido en esterol de las grasas vegetales, ya que dependen de las condiciones de producción y transformación. Además, la determinación cualitativa de la grasa extraña utilizando los esteroles es ambigua.

2. DEFINICIÓN

Pureza de la grasa láctea: ausencia de grasas vegetales y animales determinada mediante el proceso especificado en la presente norma.

Nota: La pureza se determina utilizando valores *S*, que se calculan a partir de la composición de triglicéridos. Las fracciones másicas de triglicéridos se expresan en porcentaje.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La grasa extraída de la leche o los productos lácteos se analiza mediante cromatografía de gases utilizando una columna capilar corta o rellena para determinar los triglicéridos (TG), separados por su número total de carbonos. Los valores *S* se calculan introduciendo en las fórmulas adecuadas de TG la fracción másica, expresada en porcentaje, de las moléculas grasas de diferentes tamaños (C_{24} a C_{54}, utilizando solo números pares de átomos de C). Si los valores *S* superan los límites establecidos con la grasa láctea, se detecta la presencia de grasa extraña.

▼B

Nota 1: Se ha demostrado previamente la adecuación y equivalencia de las columnas tanto rellenas como capilares[2-4].

Nota 2: El valor *S* es una suma de fracciones másicas de TG multiplicadas por unos factores correspondientes definidos.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza de grado analítico reconocido.

4.1. Gas portador: nitrógeno, o bien helio o hidrógeno, todos con una pureza mínima del 99,995 %.

4.2. Patrones de grasa, para calibrar un patrón de grasa láctea según el punto 7.3.3.

4.2.1. Patrones de triglicéridos, saturados; se encuentran en el comercio productos adecuados.

4.2.2. Patrón de colesterol.

4.3. Metanol (CH_3OH) anhidro.

4.4. n-hexano ($CH_3(CH_2)4CH_3$)

4.5. n-heptano ($CH_3(CH_2)5CH_3$)

4.6. Otros gases: hidrógeno, con una pureza mínima del 99,995 %, exento de impurezas orgánicas (C_nH_m < 1 µl/l); aire sintético, exento de impurezas orgánicas (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4).

5. EQUIPO

Material habitual de laboratorio y, en particular, el siguiente:

5.1. **Cromatógrafo de gases de temperatura elevada**

El cromatógrafo de gases de temperatura elevada debe ser adecuado para temperaturas de al menos 400 °C, y estar equipado con un detector de ionización de llama. Los diafragmas utilizados en el inyector deben soportar temperaturas elevadas y presentar un grado muy bajo de fugas. Para la cromatografía de gases capilar, se utiliza un inyector en columna. Deben utilizarse siempre juntas de grafito para conectar la columna y el inyector, así como los eventuales insertos del detector.

5.2. **Columna de cromatografía**

5.2.1. *Columna rellena*

Se utiliza una columna de vidrio de 2 mm de diámetro interior y 500 mm de longitud, rellena con una fase estacionaria de OV-1 al 3 % sobre Gas ChromQ de 125 µm a 150 µm (100 a 120 mallas) ([1]). Las operaciones de preparación, silanización, relleno y acondicionamiento de la columna rellena se describen en el anexo A.

Otra posibilidad es utilizar una columna capilar (5.2.2).

5.2.2. *Columna capilar*

Se utiliza una columna capilar, por ejemplo de una longitud de 5 m, con una fase estacionaria apolar que pueda soportar temperaturas de 400 °C o más ([2]). La columna se acondiciona efectuando 20 análisis de una solución de grasa láctea (7.2) en 2 o 3 días en las condiciones indicadas en 7.3.4.2. Tras esto, los factores de respuesta (7.3.3) deben estar cerca de 1 y ser inferiores a 1,20.

Nota: Pueden utilizarse columnas con diferentes dimensiones y otra fase apolar resistente a las temperaturas elevadas, siempre que su comportamiento sea compatible con la presente norma. Véase también el punto 7.3.4.2.

([1]) Se trata de un ejemplo de producto adecuado disponible en el comercio. Esta información se da para ayudar a los usuarios de la norma internacional, pero no constituye una garantía del producto.

([2]) Como ejemplo de producto adecuado disponible en el comercio puede citarse CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm). Esta información se da para ayudar a los usuarios de la norma internacional, pero no constituye una garantía del producto.

▼B

5.3. Columna Extrelut, con una capacidad de 1 ml a 3 ml, rellena de gel de sílice, necesaria para la extracción de grasa láctea solo según 7.1.3.

5.4. Juntas de grafito, capaces de resistir temperaturas de 400 °C como mínimo, para utilizarlas en las conexiones de la columna de CG y con los insertos del inyector y del detector.

5.5. Baño María, capaz de mantener una temperatura de 50 °C ± 2 °C.

5.6. Estufa, capaz de funcionar a 50 °C ± 2 °C y 100 °C ± 2 °C.

5.7. Micropipeta.

5.8. Pipeta graduada de 5 ml de capacidad.

5.9. Matraz redondo de 50 ml de capacidad

5.10. Matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad nominal.

5.11. Embudo.

5.12. Filtro de papel de poro fino.

5.13. Rotavapor.

5.14. Ampollas de 1 ml de capacidad nominal, con tapón de rosca o tapón con cápsula de aluminio recubierto de politetrafluoroetileno.

5.15. Jeringa de inyección, cuyo émbolo no llegue a la boquilla de la aguja (columna de CG rellena).

Nota: Con estas jeringas se obtiene la mejor repetibilidad de los resultados.

5.16. Balanza analítica, capaz de pesar con una precisión de 1 mg y con una legibilidad de 0,1 mg.

6. MUESTREO

Debe enviarse al laboratorio una muestra representativa, que no se deteriore ni cambie durante el transporte o el almacenamiento.

El muestreo no forma parte del método especificado en esta norma internacional. En la norma ISO 707FIL 50[5] se presenta un método recomendado de muestreo.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. **Preparación de las muestras problema**

Para la preparación de la muestra problema se utiliza uno de los tres métodos siguientes de extracción de la grasa láctea.

7.1.1. *Aislamiento de mantequilla o butteroil*

Se funden entre 50 y 100 g de muestra problema a 50 °C en un baño María (5.5) o una estufa (5.6). Se colocan entre 0,5 y 1,0 g de sulfato sódico (4.7) en un papel de filtro plegado (5.12). Se precalientan en la estufa (5.6) a 50 °C un matraz Erlenmeyer de 250 ml (5.10) y un embudo (5.11) en el que se ha insertado un filtro de papel. Se filtra la capa grasa de la muestra fundida, manteniendo en la estufa el matraz, el embudo y el filtro precalentados. Ha de procurarse que no pase nada de suero.

En caso de que se disponga solo de una cantidad limitada de muestra problema, es posible utilizar una muestra problema más pequeña, adaptando el procedimiento en consecuencia. Sin embargo, la utilización de una porción de muestra más pequeña implica un riesgo mayor de obtener una muestra no representativa.

Nota 1: La mantequilla puede obtenerse de la nata batiendo esta y lavando a fondo los glóbulos resultantes de mantequilla.

Nota 2: La grasa láctea obtenida siguiendo el procedimiento del punto 7.1.1 estará casi exenta de fosfolípidos.

▼B

7.1.2. *Extracción según el método gravimétrico de Röse-Gottlieb*

Se extrae de la muestra problema la fracción grasa siguiendo el método gravimétrico descrito en una de las normas ISO 1211 FIL 001D, ISO 2450 FIL 016C o ISO 7328 FIL 116A.

Nota: Si hay presencia de fosfolípidos en la grasa láctea obtenida, aparecerá un pico de colesterol aumentado en alrededor de un 0,1 %. La composición de triglicéridos normalizada al 100 %, incluido el colesterol, se ve así influida solo en una proporción despreciable.

7.1.3. *Extracción de la leche con columnas de gel de sílice*

Utilizando una micropipeta (5.7), se añaden 0,7 ml de muestra problema atemperada a 20 °C a una columna Extrelut de 1 ml a 3 ml (5.3). Se dejan unos 5 min para que conseguir la distribución uniforme sobre el gel de sílice.

Para desnaturalizar los complejos proteína-lípido, con la pipeta graduada (5.8) se añaden a la columna Extrelut 1,5 ml de metanol (4.3). A continuación se extrae la fracción grasa de la muestra problema con 20 ml de *n*-hexano (4.4). El *n*-hexano se añade lentamente, en pequeñas cantidades. El disolvente que vaya saliendo se recoge en un matraz redondo de 50 ml (5.9), secado previamente hasta masa constante, medida con precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg.

Se deja que la columna vaya drenándose hasta vaciarse tras la extracción. Se eliminan los disolventes del eluido mediante destilación en un rotavapor (5.13), con su baño María regulado a una temperatura de entre 40 y 50 °C. Una vez destilados los disolventes, se seca y se pesa el matraz redondo con su contenido, con una precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg. Se determina la masa de la grasa restando de la masa obtenida la masa del matraz vacío y seco.

Nota: Las extracciones de grasa según los métodos de Gerber, Weibull-Berntrop o Schmid-Bondzynski-Ratzlaff o el aislamiento de grasa láctea con detergentes (método BDI) no son adecuados para el análisis de triglicéridos, ya que así se permite que pasen a la fase grasa cantidades importantes de fosfolípidos o glicéridos parciales. Por tanto, la aplicación de esta norma internacional es limitada en relación con determinados productos, especialmente el queso.

7.2. **Preparación de la solución de la muestra**

En caso de cromatografía de gases con columna rellena, se prepara una solución al 5 % (fracción de volumen) de la grasa (obtenida según el punto 7.1) en *n*-hexano (4.4) o *n*-heptano (4.5). En función de las dimensiones de la columna, ha de utilizarse una concentración del 1 % (0,53 mm de diámetro interior) o menos para la inyección en columna con una columna capilar.

Basándose en la columna utilizada y en la masa de grasa obtenida en 7.1.3, se determina la cantidad de disolvente (4.4 o 4.5) que debe añadirse al material de la muestra problema del matraz, pesando con una precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg. Se disuelve el resto completamente.

Se pasa a una ampolla (5.14) aproximadamente 1 ml de la solución de muestra.

7.3. **Determinación de los triglicéridos por cromatografía**

7.3.1. *Deriva de la línea de base*

Para minimizar la elevación de la línea de base, la columna debe acondicionarse como se indica en 5.2.2 (columna capilar) o en el anexo A.4 (columna rellena).

Nota: Debido a lo elevado de la temperatura de la columna, el análisis de TG es especialmente sensible a una elevación de la línea de base en la gama alta de números de carbono.

7.3.2. *Técnica de la inyección*

▼B

7.3.2.1. Columna rellena

Para evitar efectos de discriminación, se aplica la técnica de la aguja caliente a fin de mejorar la cuantificación de los componentes de los TG de elevado punto de ebullición. Se llena la aguja de aire aspirando la solución de grasa a la jeringa. Se inserta la aguja en el inyector. Se calienta la aguja antes de la inyección durante unos 3 s y a continuación se inyecta rápidamente el contenido de la jeringa.

7.3.2.2. Columna capilar

Si se utiliza la inyección fría en columna (7.3.4.2), se inserta la aguja de la jeringa y se inyecta inmediatamente. El tiempo de permanencia de la aguja en el puerto de inyección debe ser tal que se evite la formación de colas amplias del pico del disolvente.

Nota: El tiempo de permanencia óptimo es normalmente de unos 3 s.

7.3.3. *Calibración*

7.3.3.1. Consideraciones generales

Para la calibración de las muestras problema, se efectúan dos o tres análisis de grasa láctea normalizada al inicio de cada día. Se utiliza el último análisis de la grasa láctea normalizada para determinar los factores de respuesta, RF_{si} (fracción de masa / fracción de área) de los TG y del colesterol y se aplican estos a las muestras problema posteriores (véase 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

siendo:

w_{si} la fracción de masa, expresada en porcentaje, de cada TG o colesterol de la grasa láctea normalizada;

A_{si} el valor numérico del área del pico de cada TG o colesterol de la grasa láctea normalizada;

se utiliza bien 7.3.3.2 o bien 7.3.3.3 para obtener una grasa láctea normalizada con una composición de TG conocida.

7.3.3.2. Patrón de grasa láctea comercial

La mejor forma de determinar el factor de respuesta de cada componente de la muestra problema es utilizar una grasa láctea normalizada con una composición de TG certificada.

Nota: Un patrón adecuado es el CRM 519 (grasa láctea anhidra), que puede obtenerse del Instituto de Medidas y Materiales de Referencia (IRMM), Geel, Bélgica [1].

7.3.3.3. Patrón de grasa láctea de laboratorio

Se prepara alrededor de 1 g de una mezcla de los patrones de grasa (véase 4.2, con al menos los TG saturados C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} y C_{54}, así como colesterol; además de, preferentemente, C_{50} y C_{52}) pesando con una precisión de 1 mg y con un error de pesada de 0,1 mg, para obtener una composición relativa de TG similar a la grasa láctea.

Se analiza repetidamente una solución de la mezcla de patrones de grasa en *n*-hexano (4.4) o *n*-heptano (4.5), según 7.3.4. En la misma secuencia, se analiza repetidamente una grasa láctea de composición media.

Se determinan los factores de respuesta de los TG a partir de la mezcla de patrones de grasa. Los factores de respuesta intermedios de TG no presentes en la mezcla pueden calcularse mediante interpolación matemática. Se aplican a la grasa láctea los factores de respuesta obtenidos,

[1] Se trata de un ejemplo de producto adecuado disponible en el comercio. Esta información se da para ayudar a los usuarios de la norma internacional, pero no constituye una garantía del producto.

▼B

a fin de obtener una composición normalizada. La grasa láctea normalizada así obtenida puede conservarse durante varios años si se mantiene en nitrógeno a la temperatura máxima de –18 °C.

7.3.4. *Condiciones cromatográficas*

Nota: El uso de columnas tanto rellenas como capilares suele dar una resolución similar a la figura 1. No se observa normalmente fraccionamiento de los TG de número par, y debe evitarse.

7.3.4.1. Columna rellena

a) Programa de temperatura: Se fija la temperatura inicial de la estufa a 210 °C y se mantiene durante 1 min. Después se va aumentando la temperatura a la velocidad de 6 °C/min, hasta llegar a 350 °C. Esta temperatura (final) se mantiene durante 5 min.

b) Temperatura del detector y del inyector: se fija a 370 °C.

c) Gas portador: se utiliza nitrógeno con un caudal constante de unos 40 ml/min, que se ajusta exactamente para que C_{54} eluya a 341 °C.

d) Duración del análisis: 29,3 min.

e) Volumen de inyección: se inyectan 0,5 µl de una solución de muestra al 5 % (en volumen).

Si no se efectúan análisis de TG, se mantiene la temperatura inicial de la estufa como se indica en a), la del detector y del inyector como en b), y el caudal del gas portador como en c), de forma constante, también durante la noche, fines de semana y vacaciones. Así se consigue el mejor funcionamiento de la columna.

7.3.4.2. Columna capilar

a) Programa de temperatura: Se fija la temperatura inicial de la estufa a 80 °C y se mantiene durante 0,5 min. Después se va aumentando la temperatura a la velocidad de 50 °C/min, hasta llegar a 190 °C, y después a 6 °C/min hasta llegar a 350 °C. Esta temperatura (final) se mantiene durante 5 min.

b) Temperatura del detector: se fija a 370 °C.

c) Gas portador: se utiliza nitrógeno con un caudal constante de unos 3 ml/min.

d) Duración del análisis: 34,4 min.

e) Volumen de inyección: se inyectan 0,5 µl de una solución de muestra al 1 % (en volumen).

Estas condiciones se mantienen en las fases de espera para conseguir el mejor funcionamiento (véase 7.3.4.1).

Las condiciones analíticas dadas en 7.3.4.2 son adecuadas para una columna ancha (0,53 mm de diámetro interior), como se indica en 5.2.2. Pueden aplicarse otras condiciones si se utilizan fases o dimensiones de columna diferentes.

8. INTEGRACIÓN, EVALUACIÓN Y CONTROL DE LAS CONDICIONES ANALÍTICAS

Los picos del cromatograma se evalúan con un sistema de integración capaz de trazar la línea de base y de reintegrar. La figura 1 muestra un cromatograma integrado correctamente, mientras que la figura 2 demuestra un error esporádico en el extremo de la línea de base tras C_{54}, que influye en el porcentaje de todos los TG. Sin embargo, se excluyen de la evaluación los picos que eluyen tras el C_{54}.

Los triglicéridos con un número impar de C acílico ($2n + 1$) se combinan con el triglicérido precedente de número par ($2n$). No se tiene en cuenta el bajo contenido en C_{56}. Se multiplican los porcentajes de los TG restantes, incluido el colesterol, por los correspondientes factores de respuesta de la grasa láctea normalizada (última calibración) y se normaliza el conjunto al 100 % según 9.1.

▼B

Figura 1

Ejemplo de cromatograma de triglicéridos de grasa láctea con la línea de base fijada correctamente

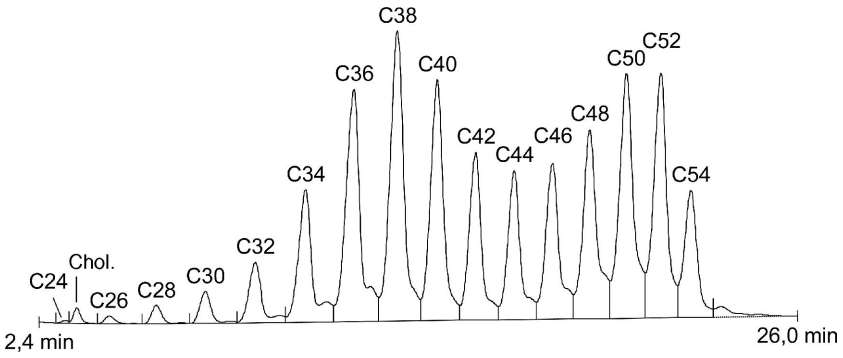
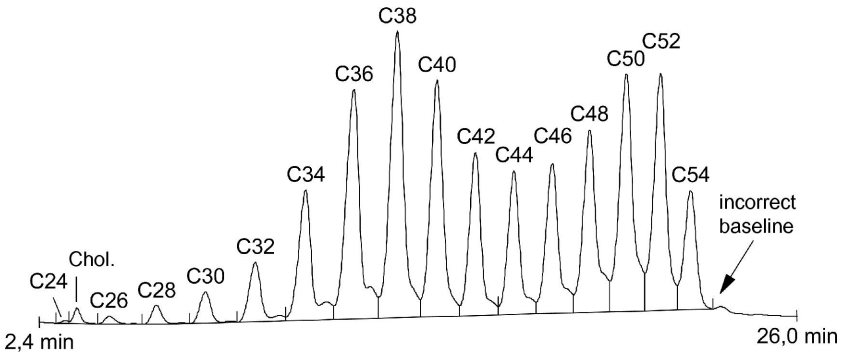


Figura 2

Ejemplo de cromatograma de triglicéridos de grasa láctea con la línea de base fijada incorrectamente



Para controlar las condiciones de la medición se compara con los coeficientes de variación (CV), expresados en porcentaje, de los diversos TG indicados en el cuadro 1, basados en los 19 análisis consecutivos de la misma muestra de grasa láctea.

Si los CV son considerablemente más elevados que los valores dados en el cuadro 1, las condiciones cromatográficas no son adecuadas.

Nota: Los valores recogidos en el cuadro 1 no son obligatorios, sino simplemente orientativos a efectos de control de calidad.

Sin embargo, en caso de admitirse valores más elevados de CV, es preciso cumplir pese a todo los límites de repetibilidad y reproducibilidad señalados en el punto 10.

Cuadro 1

Coeficientes de variación del contenido de triglicéridos (19 análisis consecutivos)

Triglicérido	CV %
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42

▼B

Triglicérido	CV %
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. Cálculo y expresión de los resultados

9.1. **Composición de triglicéridos**

9.1.1. *Cálculo*

Se calcula la fracción de masa de cada TG (para $i = C_{24}$, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52}, y C_{54}) más el colesterol, w_i, expresadas en porcentaje del contenido total de TG de la muestra problema utilizando la siguiente fórmula:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

siendo:

A_i el valor numérico del área del pico de cada TG de la muestra problema;

RF_{si} el factor de respuesta de cada TG determinado en la calibración (7.3.3).

9.1.2. *Expresión de los resultados*

Los resultados se indican con dos cifras decimales.

9.2. **Valores S**

9.2.1. *Cálculo*

9.2.1.1. Se calculan los valores *S*, expresados en porcentaje, introduciendo el valor calculado w_i (9.1.1) de los porcentajes de los TG correspondientes en las fórmulas (3) a (7). Se utilizan todas las fórmulas, independientemente del tipo de grasa extraña cuya presencia se sospeche.

9.2.1.2. Aceite de soja, de girasol, de oliva, de colza, de linaza, de germen de trigo, de germen de maíz, de algodón y de pescado.

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Grasa de coco y de palmiste

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Aceite de palma y sebo de vacuno

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Tocino

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6. Total

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Expresión de los resultados*

Los resultados se indican con dos cifras decimales.

9.3. **Detección de grasas extrañas**

Se comparan los cinco valores *S* obtenidos en 9.2.1 con los correspondientes límites *S* indicados en el cuadro 2.

La muestra se considera como grasa láctea pura cuando los cinco valores *S* están dentro de los límites mencionados en el cuadro 2. Ahora bien, si algún valor *S* cae fuera de los límites correspondientes, se considera que la muestra contiene una grasa extraña.

Aunque las fórmulas (3) a (6) son más sensibles respecto a determinadas grasas extrañas que la fórmula total (7) (véase el cuadro B.1), un resultado positivo obtenido con solo una de las fórmulas (3) a (6) no permite extraer conclusiones sobre el tipo de grasa extraña.

El anexo B describe un procedimiento para el cálculo del contenido de grasa vegetal o animal en la grasa láctea adulterada. Este procedimiento no está validado y solo tiene valor informativo.

Cuadro 2

Límites S para las grasas lácteas puras

Grasa extraña	Fórmula	*Límites S* ()
Aceite de soja, de girasol, de oliva, de colza, de linaza, de germen de trigo, de germen de maíz, de algodón, de pescado	(3)	98,05 a 101,95
Grasa de coco y de palmiste	(4)	99,42 a 100,58
Aceite de palma y sebo de vacuno	(5)	95,90 a 104,10
Tocino	(6)	97,96 a 102,04
Total	(7)	95,68 a 104,32

([a]) Calculados con un nivel de confianza del 99 %, de forma que la adición de grasa extraña se indique solo si se superan los límites de detección de la fórmula correspondiente (véase el cuadro B.1).

10. PRECISIÓN

10.1. **Prueba interlaboratorios**

Los valores de repetibilidad y reproducibilidad se han determinado a partir de las fórmulas (3) y (7) utilizando grasa láctea pura y pueden no ser aplicables a matrices diferentes de las indicadas.

10.2. **Repetibilidad**

Las diferencias absolutas entre dos resultados particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, con el mismo equipo, dentro de un breve plazo, no superarán en más del 5 % de los casos los límites establecidos en el cuadro 3.

▼B

Cuadro 3

Límites de repetibilidad, r, para las fórmulas (3) a (7)

Grasa extraña	Fórmula	R %
Aceite de soja, de girasol, de oliva, de colza, de linaza, de germen de trigo, de germen de maíz, de algodón, de pescado	(3)	0,67
Grasa de coco y de palmiste	(4)	0,12
Aceite de palma y sebo de vacuno	(5)	1,20
Tocino	(6)	0,58
Total	(7)	1,49

10.3. **Reproducibilidad**

Las diferencias absolutas entre dos resultados particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material problema, en distintos laboratorios, por distintos operarios, con distintos equipos, no superarán en más del 5 % de los casos los límites establecidos en el cuadro 4.

Cuadro 4

Límites de reproducibilidad, R, para las fórmulas (3) a (7)

Grasa extraña	Fórmula	R %
Aceite de soja, de girasol, de oliva, de colza, de linaza, de germen de trigo, de germen de maíz, de algodón, de pescado	(3)	1,08
Grasa de coco y de palmiste	(4)	0,40
Aceite de palma y sebo de vacuno	(5)	1,81
Tocino	(6)	0,60
Total	(7)	2,07

11. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

Con los valores de repetibilidad, *r*, y reproducibilidad, *R*, puede calcularse la incertidumbre ampliada correspondiente a un valor *S*.

La inclusión de la incertidumbre expandida (basada en análisis duplicados) en los límites *S* del cuadro 2 lleva a los límites *S* extendidos que se recogen en el cuadro 5.

Cuadro 5

Límites S extendidos para las grasas lácteas puras con inclusión de la incertidumbre expandida

Grasa extraña	Fórmula	Límites *S* extendidos
Aceite de soja, de girasol, de oliva, de colza, de linaza, de germen de trigo, de germen de maíz, de algodón, de pescado	(3)	97,36 a 102,64
Grasa de coco y de palmiste	(4)	99,14 a 100,86
Aceite de palma y sebo de vacuno	(5)	94,77 a 105,23
Tocino	(6)	97,65 a 102,35
Total	(7)	94,42 a 105,58

▼B

12. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá mencionar:

— toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra,

— el método de muestreo utilizado, si se conoce,

— el método de ensayo utilizado con referencia a esta norma internacional,

— todos los datos del procedimiento que no se especifiquen en esta norma internacional o se consideren optativos, junto con los datos de cualquier incidente que pueda haber influido en los resultados,

— los resultados obtenidos del ensayo y, si se ha comprobado la repetibilidad, el resultado final con su margen de error.

▼B

ANEXO A

(normativo)

PREPARACIÓN DE LA COLUMNA RELLENA

A.1. REACTIVOS Y MATERIAL

A.1.1. **Tolueno** ($C_6H_5CH_3$)

A.1.2. Solución de **dimetildiclorosilano** [$Si(CH_3)_2Cl_2$]

Se disuelven 50 ml de dimetildiclorosilano en 283 ml de tolueno (A.1.1).

A.1.3. Solución de **manteca de cacao**, con una fracción de masa del 5 % de manteca de cacao en *n*-hexano (4.4) o *n*-heptano (4.5).

A.1.4. **Fase estacionaria**, OV-1 al 3 % sobre Gas ChromQ de 125 μm a 150 μm (100 a 120 mallas) ([1]).

Nota: La indicación del tamaño de partícula se ha convertido en micrómetros de acuerdo con la norma BS 410 (todas las partes)[6].

A.1.5. **Columna de vidrio**, de 2 mm de diámetro interior y 500 mm de longitud, en forma de U.

A.1.6. **Dispositivo** para rellenar la columna de relleno.

A.1.6.1. *Columna para el rellenado* con tapones de rosca en los extremos, provista de un enrase hasta el que puede ponerse la cantidad necesaria de fase estacionaria.

A.1.6.2. *Tamiz fino* (tamaño de malla de unos 100 μm) con tapón de rosca, adecuado para cerrar la columna de vidrio según la figura A.3.

A.1.6.3. *Lana de vidrio silanizada*, desactivada.

A.1.6.4. *Vibrador* para distribuir uniformemente la fase estacionaria durante la operación de rellenado.

A.1.6.5. *Dispositivos de silanización*, para silanizar la superficie de vidrio de la columna.

A.1.6.6. *Frasco de Woulff.*

A.1.6.7. *Bomba de succión de agua.*

A.2 SILANIZACIÓN (DESACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE DE VIDRIO)

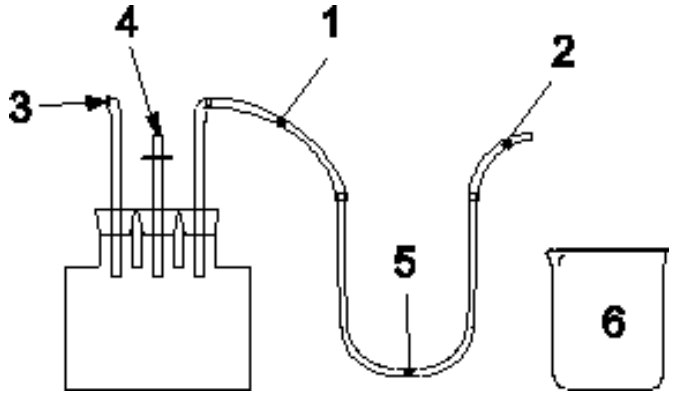
Tras conectar el frasco de Woulff (A.1.6.6) a la bomba de succión de agua (A.1.6.7), se sumerge el tubo 2 (véase la figura A.1) en la solución de dimetilclorosilano (A.1.2). Se llena la columna (A.1.5) con esa solución cerrando la llave. Se abre de nuevo la llave y después se retiran los dos tubos. Se fija la columna a un soporte y se llena completamente utilizando una pipeta con solución de dimetilclorosilano (A.1.2).

([1]) Se trata de un ejemplo de producto adecuado disponible en el comercio. Esta información se da para ayudar a los usuarios de la norma internacional, pero no constituye una garantía del producto por la ISO o la FIL.

▼B

Figura A.

Dispositivo de silanización



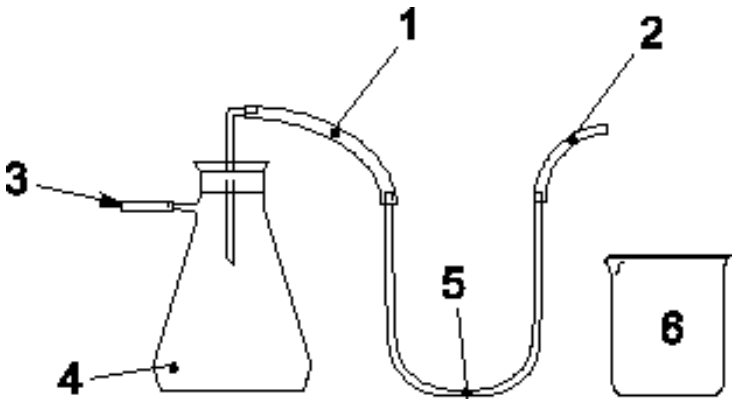
Leyenda

1) tubo 1
2) tubo 2
3) bomba de succión de agua
4) llave
5) columna de vidrio
6) dimetilclorosilano y tolueno

Se deja la columna en posición vertical durante 20 o 30 min; después se sustituye el frasco de Woulff por un frasco de vacío. Se vacía la columna conectándola a la bomba de succión de agua (A.1.6.7) (véase la figura A.2). Se lava la columna vaciada sucesivamente con 75 ml de tolueno (A.1.1) y 50 ml de metanol (4.3) sumergiendo el tubo 2 en el disolvente. La columna lavada se seca en la estufa (5.6) a unos 100 °C durante 30 min.

Figura A.

Dispositivo de lavado



Leyenda

1) tubo 1
2) tubo 2
3) bomba de succión de agua
4) frasco de vacío
5) columna de vidrio
6) agente de lavado

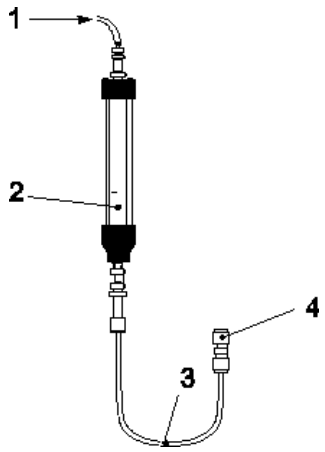
▼B

A.3 RELLENADO

Se rellena la columna utilizando el dispositivo representado en la figura A.3. Se introduce la fase estacionaria (A.1.4) en la columna para el rellenado (A.1.6.1) hasta el enrase. Se cierra el extremo inferior de la columna de vidrio de relleno con un tapón de alrededor de 1 cm de longitud de lana de vidrio (A.1.6.3) comprimida y silanizada. Se cierra el extremo de la columna con el tamiz fino (A.1.6.2).

Figura A.

Rellenado de la columna de vidrio



Leyenda

1) entrada de nitrógeno

2) columna para el rellenado, que se llena hasta el enrase con OV-1

3) columna de vidrio que ha de rellenarse

4) tapón de rosca con filtro, contra el que se comprimen la fibra de vidrio y la fase estacionaria

Se rellena la columna con la fase estacionaria bajo presión (300 kPa y corriente de nitrógeno). Para obtener un empaquetamiento uniforme, continuo y firme, se va desplazando un vibrador arriba y abajo de la columna de vidrio durante la operación de rellenado. Una vez terminada esta, se comprime en el otro extremo de la columna rellena un tapón sólido de lana de vidrio silanizada (A.1.6.3). Se cortan los extremos que sobresalgan. Se aprieta con una espátula para que el tapón se introduzca en la columna unos cuantos milímetros.

A.4 ACONDICIONAMIENTO

Durante las fases a) a c) no se debe conectar el extremo posterior de la columna al detector para evitar la contaminación. La columna rellenada (A.3) se acondiciona de la manera siguiente:

a) se llena la columna con nitrógeno durante 15 min, con el flujo regulado a 40 ml/min y la estufa de cromatografía de gases estabilizada a 50 °C;

b) se calienta la columna a la velocidad de 1 °C/min hasta 355 °C, con el flujo de nitrógeno regulado a 10 ml/min;

c) se mantiene la columna a 355 °C durante 12 h a 15 h;

d) se inyecta dos veces 1 µl de solución de manteca de cacao (A.1.3) utilizando el programa de temperatura de la columna rellena que se da en 7.3.4.1;

Nota: La manteca de cacao consiste casi exclusivamente en triglicéridos de elevado punto de ebullición de C_{50} a C_{54}, por lo que reduce el esfuerzo de acondicionamiento de la columna en relación con los correspondientes factores de respuesta.

▼B

e) se inyectan 20 veces 0,5 µl de una solución de grasa láctea según 7.2 en el plazo de 2 o 3 días utilizando las condiciones de la columna rellena que se dan en 7.3.4.1.

— Deben utilizarse solo columnas cuyos factores de respuesta estén próximos a la unidad para los análisis de las muestras problema. Los factores de respuesta no deben ser superiores a 1,20.

▼B

ANEXO B

(informativo)

CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA EXTRAÑA

B.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El cuadro B.1 indica los límites de detección de diversas grasas extrañas calculados con un nivel de confianza del 99 %. La columna central indica los límites de detección de la mejor fórmula de (3) a (6).

Los límites de detección de la fórmula total (7), recogidos en la columna de la derecha, son algo más elevados. En principio, la fórmula (7) solo es necesaria para cuantificar la grasa extraña.

Con todas las fórmulas pueden detectarse también combinaciones de distintas grasas extrañas. La variación de la composición de triglicéridos entre distintas muestras de un solo tipo de grasa extraña no influye de forma significativa en los límites de detección.

Cuando se utilizan tanto las fórmulas individuales como la fórmula total, se aplican los límites de detección de las ecuaciones individuales. Sin embargo, en ciertos casos se necesita el valor *S* de la ecuación total para cuantificar (B.2).

Cuadro B.1

Límites de detección (99 %) de grasa extraña añadida a la grasa láctea, expresados en porcentaje

Grasa extraña	Fórmula individual %	Fórmula total %
Aceite de soja	2,1	4,4
Aceite de girasol	2,3	4,8
Aceite de oliva	2,4	4,7
Aceite de coco	3,5	4,3
Aceite de palma	4,4	4,7
Grasa de palmiste	4,6	5,9
Aceite de colza	2,0	4,4
Aceite de linaza	2,0	4,0
Aceite de germen de trigo	2,7	6,4
Aceite de germen de maíz	2,2	4,5
Aceite de algodón	3,3	4,4
Tocino	2,7	4,7
Sebo de vacuno	5,2	5,4
Aceite de pescado hidrogenado	5,4	6,1

B.2. CÁLCULO

La determinación del contenido de grasa extraña solo se efectúa si se ha sobrepasado al menos uno de los límites *S* (cuadro 2 o cuadro 5). Para obtener información cuantitativa, se calcula la fracción de masa de la grasa extraña o de la mezcla de grasas extrañas en la muestra problema, w_f, expresada en porcentaje, utilizando la fórmula siguiente:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(B. 1)}$$

▼B

siendo:

S el resultado obtenido de introducir los datos de los TG de grasa láctea a la que se ha añadido una grasa extraña o una mezcla de grasas extrañas en una de las ecuaciones (3) a (7);

S_f una constante que depende del tipo de grasa extraña añadida.

Si no se conoce el tipo de grasa extraña añadida a la grasa láctea, se utiliza un valor de S_f general de 7,46 (cuadro B.2). Se utiliza siempre el valor de S obtenido de la fórmula (7), incluso aunque no se superen sus límites S sino los de otra fórmula.

Cuando se trate de grasas extrañas conocidas, se introducen en la fórmula (B.1) sus valores S_f individuales (cuadro B.2). Para calcular S se selecciona de las ecuaciones (3) to (6) la ecuación de la grasa extraña correspondiente.

Cuadro B.2

Valores Sf de distintas grasas extrañas

Grasa extraña	S_f
Desconocida	7,46
Aceite de soja	8,18
Aceite de girasol	9,43
Aceite de oliva	12,75
Aceite de coco	118,13
Aceite de palma	7,55
Aceite de palmiste	112,32
Aceite de colza	3,30
Aceite de linaza	4,44
Aceite de germen de trigo	27,45
Aceite de germen de maíz	9,29
Aceite de algodón	41,18
Tocino	177,55
Sebo de vacuno	17,56
Aceite de pescado	64,12

B.3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se indican con dos cifras decimales.

Bibliografía

1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft, 52, 1987, pp. 82-85*.

2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16-17.

3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265-270.

4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791-797.

5) ISO 707FIL 50: Leche y productos lácteos. Guía de muestreo.

▼B

6) BS 410:1988: Tamices de ensayo. Requisitos técnicos y ensayo.

7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber*, 43, 1991, pp. 219-242.

8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol*., 93, 1991, pp. 538-544.

9) DIN 10336:1994: *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detección y determinación de grasas extrañas en la grasa láctea por análisis de triglicéridos mediante cromatografía de gases].

10) Comisión de las Comunidades Europeas: Consideración de los resultados de los ensayos CEE en colaboración primero, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto: Determinación de triglicéridos en la grasa láctea; Doc. nº VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92 y VI/4604/93.

11) Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, pp. 505-510.

▼B

ANEXO XXI

(Artículo 18)

PROCEDIMIENTO APLICABLE EN CASO DE IMPUGNACIÓN DE LOS RESULTADOS DE UN ANÁLISIS (ANÁLISIS QUÍMICO)

1. A solicitud del fabricante, se efectúa otro análisis en otro laboratorio aprobado por la autoridad competente siguiendo el método correspondiente, siempre que se disponga de duplicados sellados de las muestras del producto que hayan sido conservados de forma adecuada por la autoridad competente. La solicitud debe presentarse en el plazo de 7 días laborables a partir de la notificación de los resultados del primer análisis. El análisis debe efectuarse en el plazo de 21 días laborables a partir de la recepción de la solicitud. La autoridad competente enviará dichas muestras a un segundo laboratorio, a petición del fabricante y por cuenta de este. Dicho laboratorio deberá estar aprobado para llevar a cabo análisis oficiales y su cualificación en los análisis cuestionados correspondientes estará demostrada.

2. Las incertidumbres expandidas ($k = 2$) de la media $\overline{y}_1$ de las n_1 mediciones repetidas del laboratorio 1 y de la media $\overline{y}_2$ de las n_2 mediciones repetidas del laboratorio 2 son

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1-\frac{1}{n_1}\right)}$ y $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1-\frac{1}{n_2}\right)}$

respectivamente, siendo σ_r la desviación típica de la repetibilidad y σ_R la desviación típica de la reproducibilidad del método correspondiente. Si el resultado final *y* de la medición en los laboratorios se calcula utilizando una fórmula del tipo $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ o $y = x_1/x_2$, deben seguirse los métodos normales para combinar desviaciones típicas en tales casos, a fin de obtener la incertidumbre.

4. A fin de comprobar si los resultados de los dos laboratorios se ajustan a la desviación típica de la reproducibilidad σ_R del método, se calcula la incertidumbre expandida de la diferencia $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Si el valor absoluto de la diferencia de las medias de laboratorio, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, no es mayor que su incertidumbre $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

los resultados de los dos laboratorios se ajustan a la desviación típica de la reproducibilidad σ_r y se indica como resultado final la media aritmética de las dos medias de laboratorio,

$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2}$,

Su incertidumbre expandida es:

$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2-\frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$.

Se considera que el envío no se ajusta al límite legal superior *UL* si

$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL$;

en caso contrario, se considera que sí cumple el *UL*.

Se considera que el envío no se ajusta al límite legal inferior *LL* si

$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL$;

en caso contrario, se considera que sí cumple el *LL*.

Si el valor absoluto de la diferencia de las medias de laboratorio, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, es mayor que su incertidumbre $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

▼B

los resultados de los dos laboratorios no se ajustan a la desviación típica de la reproducibilidad.

En este caso, el envío se rechaza como no conforme si el segundo análisis confirma al primero. En caso contrario, el envío se acepta como conforme.

El fabricante debe notificar a la autoridad competente el resultado final tan pronto como sea posible. El fabricante debe sufragar los gastos del segundo análisis en caso de que el envío sea rechazado.

▼B

ANEXO XXII

TABLA DE CORRESPONDENCIAS

Reglamento (CE) nº 213/2001	El presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 1
Artículo 2	Artículo 1
Artículo 3	Artículo 2
—	Artículo 3
Artículo 4	—
Artículo 5	—
Artículo 6	Artículo 4
Artículo 7	Artículo 18
Artículo 8	—
Artículo 9	Artículo 5
Artículo 10	Artículo 6
Artículo 11	Artículo 7
Artículo 12	Artículo 8
Artículo 13	Artículo 9
Artículo 14	Artículo 10
Artículo 15	Artículo 11
Artículo 16	Artículo 12
Artículo 17	Artículo 13
—	Artículo 14
Artículo 18	Artículo 15
Artículo 19	Artículo 16
	Artículo 17
	Artículo 19
Artículo 20	—
Artículo 21	—
Artículo 22	Artículo 20
Artículo 23	Artículo 21