Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

►**B** **REGOLAMENTO (CE) N. 273/2008 DELLA COMMISSIONE**

del 5 marzo 2008

che stabilisce modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari

(GU L 88 del 29.3.2008, pag. 1)

Modificato da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►**M1**	Regolamento di esecuzione (UE) n. 565/2013 della Commissione del 18 giugno 2013	L 167	26	19.6.2013

▼B

REGOLAMENTO (CE) N. 273/2008 DELLA COMMISSIONE

del 5 marzo 2008

che stabilisce modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio, del 17 maggio 1999, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari ([1]), in particolare gli articoli 10 e 15, l'articolo 26, paragrafo 3, l'articolo 29, paragrafo 1, e l'articolo 31, paragrafo 4,

considerando quanto segue:

(1) Il regolamento (CE) n. 213/2001 della Commissione ([2]) stabilisce le modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari. Gli sviluppi tecnici realizzati nel campo dei metodi di analisi rendono necessarie alcune modifiche sostanziali a tali modalità. Per motivi di chiarezza e di efficienza e visto il numero considerevole e la tecnicità di tali modifiche appare opportuno abrogare il regolamento (CE) n. 213/2001 e sostituirlo con un nuovo regolamento.

(2) È necessario verificare la composizione e le caratteristiche qualitative del latte e dei prodotti lattiero-caseari stabilite nel quadro dei regimi previsti dal regolamento (CE) n. 1255/1999 allo scopo di garantirne la piena conformità con i requisiti fissati.

(3) Spesso i metodi di riferimento previsti per tali verifiche sono metodi pubblicati da organismi internazionali quali il Comitato europeo di normalizzazione (CEN), la Federazione internazionale dell'industria del latte (FIL-IDF), l'Organizzazione internazionale per la standardizzazione (ISO) e l'AOAC International (Association of Official Analytical Chemists) e regolarmente aggiornati da tali organismi. In alcuni casi esiste un metodo di riferimento comunitario, mentre in altri casi la normativa comunitaria non precisa alcun metodo di riferimento. Per garantire un'applicazione uniforme dei metodi di riferimento è opportuno compilare un elenco di tali metodi di riferimento e dare alla Commissione la facoltà di modificarlo, se necessario.

(4) Non si deve tuttavia escludere la possibilità di applicare metodi di routine, per il cui uso occorre specificare requisiti minimi.

(5) Per stabilire una prassi uniforme per la valutazione dei risultati delle analisi, è inoltre opportuno fissare procedure comuni; lo stesso vale per la valutazione organolettica dei prodotti considerati e per il riesame dei risultati in caso di contestazione.

([1]) GU L 160 del 26.6.1999, pag. 48. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1152/2007 (GU L 258 del 4.10.2007, pag. 3). Il regolamento (CE) n. 1255/1999 sarà sostituito dal regolamento (CE) n. 1234/2007 (GU L 299 del 16.11.2007, pag. 1) a partire dal 1º luglio 2008.

([2]) GU L 37 del 7.2.2001, pag. 1.

▼B

(6) Per determinate analisi non esistono attualmente metodi di riferimento convalidati internazionalmente riconosciuti. Non sono quindi disponibili informazioni sulle variazioni dei risultati analitici da laboratorio a laboratorio. È pertanto opportuno stabilire metodi a livello comunitario, convalidati secondo le norme stabilite a livello internazionale, da applicare come metodi di riferimento.

(7) Il regolamento (CE) n. 1898/2005 della Commissione ([1]) reca modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio in ordine allo smercio sul mercato comunitario di crema di latte, burro e burro concentrato e prevede l'aggiunta di rivelatori al burro concentrato, al burro o alla crema, in determinate circostanze, per garantirne la corretta utilizzazione finale. La marcatura è importante per il corretto funzionamento del regime. Per assicurare la parità di trattamento degli operatori partecipanti è opportuno stabilire metodi comuni per l'individuazione di determinati rivelatori.

(8) A norma dell'articolo 9 del regolamento (CE) n. 1255/1999 è possibile concedere un aiuto all'ammasso privato di formaggi prodotti a base di latte di pecora. Per questi stessi prodotti può essere concessa una speciale restituzione a norma dell'articolo 31 del suddetto regolamento. È possibile importare nella Comunità da determinati paesi terzi, a condizioni preferenziali, formaggi prodotti con latte di pecora, di capra o di bufala oppure con miscele di latte di questi animali. Per questo motivo è necessario verificare con controlli adeguati che nei formaggi di cui trattasi non sia stato incorporato latte vaccino. È quindi opportuno definire un metodo di riferimento comunitario atto a rivelare la presenza di latte vaccino, fatto salvo il ricorso a metodi di routine conformi a determinati criteri.

(9) A norma del regolamento (CEE) n. 2921/90 della Commissione, del 10 ottobre 1990, relativo alla concessione di aiuti per il latte scremato destinato alla fabbricazione di caseina e di caseinati ([2]), occorre accertare l'assenza di coliformi. Il metodo di riferimento riconosciuto a livello internazionale per la ricerca di coliformi nel latte e nei prodotti lattiero-caseari è la norma ISO 4831. È stato stabilito un metodo di riferimento comunitario per la ricerca di coliformi basato sulla succitata norma.

(10) Il regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio, del 23 luglio 1987, relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica e alla tariffa doganale comune ([3]), differenzia le aliquote dei dazi doganali degli alimenti composti per animali appartenenti alla voce tariffaria 2309 in funzione del loro tenore in prodotti lattiero-caseari. Ai fini di un'applicazione uniforme delle disposizioni in oggetto, occorre adottare un metodo d'analisi del tenore in lattosio generalmente riconosciuto e obbligatorio per tutti gli Stati membri.

([1]) GU L 308 del 25.11.2005, pag. 1. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1546/2007 (GU L 337 del 21.12.2007, pag. 68).

([2]) GU L 279 dell'11.10.1990, pag. 22. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1487/2006 (GU L 278 del 10.10.2006, pag. 8).

([3]) GU L 256 del 7.9.1987, pag. 1. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1352/2007 della Commissione (GU L 303 del 21.11.2007, pag. 3).

▼B

(11) A norma del regolamento (CE) n. 1255/1999 il burro e il latte scremato in polvere destinati all'intervento, nonché il latte scremato in polvere destinato all'alimentazione degli animali devono soddisfare determinati requisiti di qualità. È quindi opportuno stabilire metodi di riferimento per accertare il rispetto dei suddetti requisiti.

(12) Il presente regolamento introduce determinati metodi per la prima volta. È necessario prevedere un periodo sufficiente a decorrere dall'entrata in vigore del presente regolamento per permettere ai laboratori di introdurre e utilizzare correttamente tali metodi nuovi. In caso di revisione e pubblicazione di uno dei metodi di riferimento elencati nell'allegato I da parte dell'organismo di normalizzazione che l'ha elaborato, è opportuno concedere ai laboratori un periodo di sei mesi per aggiornare i procedimenti analitici in modo da conformarsi alla nuova norma.

(13) Le misure di cui dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per il latte e i prodotti lattiero-caseari,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

CAPO I

DISPOSIZIONI GENERALI

Articolo 1

Oggetto e campo di applicazione

1. Il presente regolamento stabilisce determinati metodi di riferimento per le analisi chimiche, fisiche e microbiologiche e per la valutazione organolettica del latte e dei prodotti lattiero-caseari, da utilizzare nell'ambito dei regimi previsti dall'organizzazione comune dei mercati nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari istituita dal regolamento (CE) n. 1255/1999, e le modalità di applicazione di tali metodi.

2. L'elenco dei metodi di riferimento applicabili alle analisi di cui all'articolo 1 è riportato nell'allegato I del presente regolamento.

3. La Commissione aggiorna l'elenco secondo la procedura di cui all'articolo 42 del regolamento (CE) n. 1255/1999.

Articolo 2

Metodi di routine

Per l'esecuzione delle analisi previste dalla normativa comunitaria possono essere applicati metodi di routine, purché siano adeguatamente tarati e periodicamente verificati rispetto al metodo di riferimento. I risultati sono comparati tenendo conto della distorsione costante, della ripetibilità e della riproducibilità.

In caso di controversia, prevalgono i risultati ottenuti con il metodo di riferimento.

Gli Stati membri informano la Commissione dell'uso dei metodi di routine nelle analisi di cui all'articolo 1.

▼B

CAPO II

METODI DI ANALISI

Articolo 3

Valutazione del rispetto dei limiti regolamentari di una data partita

L'allegato II del presente regolamento si applica per stabilire il rispetto dei requisiti di composizione previsti dalla normativa, tranne che nel caso delle analisi dei rivelatori.

Articolo 4

Valutazione organolettica

1. Per il latte e i prodotti lattiero-caseari diversi dal burro destinato all'ammasso pubblico, gli Stati membri utilizzano, quale metodo di riferimento per la valutazione organolettica, la norma FIL-IDF 99C/1997 o altri metodi equivalenti debitamente comunicati alla Commissione.

Per verificare il livello delle prestazioni degli assaggiatori e l'attendibilità dei risultati della valutazione organolettica si applicano le procedure indicate nell'allegato III.

2. Per il burro destinato all'ammasso pubblico, per verificare il livello delle prestazioni degli assaggiatori e l'attendibilità dei risultati della valutazione organolettica si applicano le procedure indicate nell'allegato III.

La procedura descritta nell'allegato IV si applica come metodo di riferimento per la valutazione organolettica.

Articolo 5

Determinazione dei rivelatori

1. Il metodo di analisi descritto nell'allegato V si applica come metodo di riferimento per la determinazione del tenore di trigliceridi dell'acido enantico nel burro, nel butteroil e nella crema.

2. Il metodo di analisi descritto nell'allegato VI si applica come metodo di riferimento per la determinazione della vanillina nel burro concentrato, nel burro o nella crema.

3. Il metodo d'analisi descritto nell'allegato VII si applica come metodo di riferimento per la determinazione del tenore di estere etilico dell'acido beta-apo-8'-carotenico nel burro concentrato e nel burro.

4. Il metodo d'analisi descritto nell'allegato VIII si applica come metodo di riferimento per la determinazione del tenore di stigmasterolo o di β-sitosterolo nel burro e nel burro concentrato.

5. L'aggiunta di rivelatori al burro concentrato, al burro o alla crema si considera effettuata nel rispetto della pertinente normativa comunitaria se i risultati ottenuti sono conformi alle specifiche dei punti 10 e 11 dell'allegato V e del punto 8 degli allegati VI, VII e VIII.

Articolo 6

Ricerca di caseina di latte vaccino

1. Per verificare che i formaggi che devono essere prodotti esclusivamente con latte di pecora, con latte di capra o con latte di bufala oppure con miscele di latte di pecora, capra o bufala non contengano caseina di latte vaccino si applica il metodo d'analisi di riferimento descritto nell'allegato IX.

▼B

La caseina di latte vaccino si considera presente se il contenuto di caseina di latte vaccino nel campione analizzato è pari o superiore a quello del campione di riferimento contenente l'1 % di latte vaccino descritto nell'allegato IX.

2. I metodi di routine per individuare la presenza di caseina di latte vaccino nei formaggi di cui al paragrafo 1 possono essere applicati alle seguenti condizioni:

a) il limite di individuazione non deve essere superiore allo 0,5 %;

b) non si devono ottenere risultati falsamente positivi; e

c) la caseina di latte vaccino è individuabile con la sensibilità richiesta anche dopo i lunghi periodi di maturazione consueti in commercio.

In caso di mancato rispetto di una delle condizioni sopra elencate si ricorre al metodo di riferimento descritto nell'allegato IX.

Articolo 7

Ricerca di coliformi

Per la ricerca di coliformi nel burro, nel latte scremato in polvere, nella caseina e nei caseinati si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato X.

Articolo 8

Determinazione del tenore di lattosio

Il tenore di lattosio nei prodotti che rientrano nel codice NC 2309 è determinato in base al metodo di riferimento descritto nell'allegato XI.

Articolo 9

Ricerca di siero di latte presamico

1. Per la ricerca di siero di latte presamico nel latte scremato in polvere destinato all'ammasso pubblico si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XII.

2. Per la ricerca di siero di latte presamico nel latte scremato in polvere e nelle miscele destinati all'alimentazione animale si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XII. Se si riscontra la presenza di siero di latte presamico si applica l'allegato XIII.

Articolo 10

Ricerca di latticello

Per la ricerca di latticello nel latte scremato in polvere si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XIV.

Articolo 11

Ricerca di residui di antibiotici

Per la ricerca di residui di antibiotici nel latte scremato in polvere si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XV.

▼B

Articolo 12

Determinazione del contenuto di latte scremato in polvere

Per la determinazione del contenuto di latte in polvere negli alimenti composti per animali si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XVI.

Articolo 13

Ricerca di amido

Per la ricerca di amido nel latte scremato in polvere, nel latte in polvere denaturato e negli alimenti composti per animali si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XVII.

Articolo 14

Determinazione del tenore di umidità nella crema in polvere

Per la determinazione del tenore di umidità nella crema in polvere si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XVIII.

Articolo 15

Determinazione del tenore di umidità del latticello acido in polvere

Per la determinazione del tenore di umidità del latticello acido in polvere destinato agli alimenti composti per animali si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XIX.

Articolo 16

Determinazione della purezza del grasso di latte

Per la determinazione della purezza del grasso di latte si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XX.

CAPO III

DISPOSIZIONI GENERALI E FINALI

Articolo 17

Assicurazione qualità

Le analisi sono eseguite in laboratori che dispongono di un sistema di assicurazione della qualità analitica che comprende procedure di controllo interno della qualità. I laboratori non accreditati partecipano a programmi di verifica dell'idoneità almeno una volta all'anno e i loro risultati non deviano di oltre $2\sigma_R$ (deviazione standard di riproducibilità del metodo di riferimento) rispetto al valore comune. Il laboratorio tiene a disposizione, per consultazione, una descrizione particolareggiata dei sistemi utilizzati.

I laboratori accreditati in conformità delle norme di cui all'articolo 12 del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la

▼B

conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali ([1]), sono esentati dall'obbligo di sottoporsi alle verifiche di idoneità.

Articolo 18

Campionamento e contestazione dei risultati analitici

1. Si procede al campionamento in conformità alla normativa pertinente per il prodotto trattato. In assenza di disposizioni in materia di campionamento si applicano le disposizioni della norma ISO 707 FIL 50: Latte e prodotti lattiero-caseari — Metodi di campionamento.

2. Nella relazione di laboratorio sui risultati dell'analisi figurano gli elementi atti a consentire una valutazione dei risultati conformemente all'allegato II e all'allegato XXI.

3. Per l'esecuzione delle analisi previste dalla normativa comunitaria si procede al prelievo di campioni in doppio.

4. Se l'operatore contesta i risultati di un'analisi, si applica la procedura indicata nell'allegato XXI.

5. Se entro cinque giorni lavorativi dal campionamento il fabbricante dimostra che la procedura di campionamento non è stata correttamente eseguita, occorre, se possibile, ripetere il campionamento. Se non è possibile procedere a un nuovo campionamento, la partita è accettata.

▼M1

———

Articolo 19 bis

Notifiche

Le notifiche di cui all'articolo 2, all'articolo 4, paragrafo 1, e all'allegato III C sono effettuate in conformità al regolamento (CE) n. 792/2009 della Commissione ([2]).

▼B

Articolo 20

Abrogazioni

Il regolamento (CE) n. 213/2001 è abrogato.

I riferimenti al regolamento abrogato si intendono fatti al presente regolamento e vanno letti secondo la tavola di concordanza di cui all'allegato XXII.

Articolo 21

Entrata in vigore

Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Esso si applica a decorrere dal 31 marzo 2008.

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

([1]) GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1.
([2]) GU L 228 dell'1.9.2009, pag. 3.

▼B

ALLEGATO I

(Articolo 1)

ELENCO DEI METODI DI RIFERIMENTO

Legenda Min. = minimo, Max. = massimo, Allegato = allegato del regolamento citato, s.s.n.g.= sostanza secca non grassa, NP = numero di perossidi, A = aspetto, G = gusto, C = consistenza, CBT = carica batterica totale, Term. = tenore in germi termofili, SM = Stato membro, FIL = Federazione internazionale dell'industria del latte, ISO = Organizzazione internazionale per la standardizzazione, IUPAC = Unione internazionale di chimica pura e applicata, ADPI = American Dairy Products Institute, LCD = latte condensato dolcificato, LCE = latte o crema evaporati.

PARTE A

Regolamento della Commissione	Prodotto	Parametro	Limiti (1)	Metodo di riferimento	Nota
Regolamento (CE) n. 2771/1999 — Ammasso pubblico	Burro non salato	Materie grasse	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Acqua	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		s.s.n.g.	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Acidità del grasso	1,2 mmol/100 g di grasso	ISO 1740:2004FIL 6:2004	
		NP (max.)	0,3 meq. ossigeno/ 1 000 g di grasso	ISO 3976:2006FIL 74:2006	Nota 1
		Coliformi	Non rilevabili in 1 g	Allegato X	Nota 3
		Grassi diversi da quelli del latte	Non rilevabili con l'analisi dei trigliceridi	Allegato XX	
		Rivelatori: steroli	Non rilevabili, β-sitosterolo ≤ 40 mg/kg	Allegato VIII	
		Altri rivelatori:			
		— vanillina	Non rilevabili	Allegato VI	
		— estere etilico dell'acido carotenico	≤ 6 mg/kg	Allegato VII	
		— trigliceridi dell'acido enantico	Non rilevabili	Allegato V	
		Caratteristiche organolettiche	Almeno 4 punti su 5 per A, F e C	Allegato IV	
		Dispersione idrica	Almeno 4 punti	ISO 7586:1985FIL 112A:1989	
Regolamento (CE) n. 2771/1999 — Ammasso privato	Burro non salato	Materie grasse	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Acqua	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Parametro	Limiti (1)	Metodo di riferimento	Nota
		s.s.n.g.	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
Regolamento (CE) n. 2771/1999 — Ammasso privato	Burro salato	Materie grasse	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Acqua	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		s.s.n.g. (sale escluso)	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Sale	Max. 2 % m/m	ISO 15648:2004FIL 179:2004	
Regolamento (CE) n. 1898/2005, capitolo II	Burro non salato	Materie grasse	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Grassi diversi da quelli del latte		Allegato XX	
		Acqua	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1 2001FIL 80-1:2001	
		s.s.n.g.	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Rivelatori:			
		— steroli	Cfr. allegato VIII	Allegato VIII	
		— vanillina	Cfr. allegato VI	Allegato VI	
		— estere etilico dell'acido carotenico	Cfr. allegato VII	Allegato VII	
		— trigliceridi dell'acido enantico	Cfr. allegato V	Allegato V	
Regolamento (CE) n. 1898/2005, capitolo II	Burro salato	Materie grasse	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Grassi diversi da quelli del latte		Allegato XX	
		Acqua	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		s.s.n.g. (sale escluso)	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Sale	Max. 2 % m/m	ISO 15648:2004FIL 179:2004	
		Rivelatori:			
		— steroli	Cfr. allegato VIII	Allegato VIII	
		— vanillina	Cfr. allegato VI	Allegato VI	
		— estere etilico dell'acido carotenico	Cfr. allegato VII	Allegato VII	
		— trigliceridi dell'acido enantico	Cfr. allegato V	Allegato V	
Regolamento (CE) n. 1898/2005, capitolo II	Burro concentrato	Materie grasse	Min. 99,8 % m/m	FIL 24:1964	

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Parametro	Limiti (1)	Metodo di riferimento	Nota
		Acqua e s.s.n.g.	Max. 0,2 % m/m	ISO 5536:2002FIL 23:2002 (umidità) FIL 24:1964 (s.s.n.g.)	
		Acidità delle materie grasse	1,2 mmol/100 g di grasso	ISO 1740:2004FIL 6:2004	
		NP (max.)	0,5 meq. ossigeno/ 1 000 g di grasso	ISO 3976:2006FIL 74:2006	Nota 1
		Grassi diversi da quelli del latte	Assente	Allegato XX	
		Gusto	Netto		
		Odore	Assenza di odori estranei		
		Varie	Assenza di neutralizzanti, antiossidanti e conservanti		
		Rivelatori:			
		— steroli	Cfr. allegato VIII	Allegato VIII	
		— vanillina	Cfr. allegato VI	Allegato VI	
		— estere etilico dell'acido carotenico	Cfr. allegato VII	Allegato VII	
		— trigliceridi dell'acido enantico	Cfr. allegato V	Allegato V	
Regolamento (CE) n. 1898/2005, capitolo II	Crema	Materie grasse	Min. 35 % m/m	ISO 2450:1999FIL 16 C: 1987	
		Grassi diversi da quelli del latte		Allegato XX	
		Rivelatori:			
		— steroli	Cfr. allegato VIII		Nota 2
		— vanillina	Cfr. allegato VI	Allegato VI	
		— estere etilico dell'acido carotenico	Cfr. allegato VII		Nota 2
		— trigliceridi dell'acido enantico	Cfr. allegato V	Allegato V	
Regolamento (CE) n. 1898/2005, capitolo III	Burro concentrato	Materie grasse	Min. 96 % m/m		Nota 2
		Grassi diversi da quelli del latte		Allegato XX	
		s.s.n.g.	Max. 2 % m/m		Nota 2

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Parametro	Limiti (1)	Metodo di riferimento	Nota
		Rivelatori:			
		— stigmasterolo (95 % m/m)	15 g/100 kg di burro concentrato	Allegato VIII	
		— stigmasterolo (85 % m/m)	17 g/100 kg di burro concentrato	Allegato VIII	
		— trigliceridi dell'acido enantico	10,34 kg/t di burro concentrato	Allegato V	
		— estere etilico dell'acido butirrico e stigmasterolo		— estere etilico dell'acido butirrico — stigmasterolo: Allegato VIII	Nota 2
		— estere etilico dell'acido butirrico e trigliceridi dell'acido enantico		— estere etilico dell'acido butirrico — trigliceridi dell'acido enantico: Allegato V	Nota 2
		Lecitina (E 322)	Max. 0,5 % m/m		Nota 2
		NaC1	Max. 0,75 % m/m	ISO 15648:2004FIL 179:2004	
		Acidità delle materie grasse	1,2 mmol/100g di grasso	ISO 1740:2004FIL 6:2004	
		NP (max.)	Max. 0,5 meq. ossigeno/ 1 000 g di grasso	ISO 3976:2006FIL 74:2006	Nota 1
		Gusto	Netto		
		Odore	Assenza di odori estranei		
		Varie	Assenza di neutralizzanti, antiossidanti e conservanti		
Regolamento (CE) n. 1898/2005, capitolo IV	Burro non salato	Materie grasse	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Acqua	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		s.s.n.g.	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
Regolamento (CE) n. 1898/2005, capitolo IV	Burro salato	Materie grasse	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Acqua	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
		s.s.n.g. (sale escluso)	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
		Sale	Max. 2 % m/m	ISO 15648:2004FIL 179:2004	

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Parametro	Limiti (1)	Metodo di riferimento	Nota
Articolo 9 e titolo II del regolamento (CE) n. 1255/1999	Formaggi a base di latte di pecora e/o di capra	Latte vaccino	< 1 % m/m	Allegato IX	
Regolamento (CEE) n. 2921/90	Allegato I — Caseina acida	Acqua	Max. 12,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Materie grasse	Max. 1,75 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Acidità libera	Max. 0,30 ml di soluzione 0,1 N NaOH/g	ISO 5547:1978FIL 91:1979	
Regolamento (CEE) n. 2921/90	Allegato I — Caseina presamica	Acqua	Max. 12,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Materie grasse	Max. 1,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Ceneri	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978FIL 90:1979	
Regolamento (CEE) n. 2921/90	Allegato I — Caseinati	Acqua	Max. 6,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Proteine del latte	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978FIL 92:1979	
		Materie grasse e ceneri	Max. 6,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Ceneri fisse		ISO 5544:1978FIL 89:1979	
		Ceneri		ISO 5545:1978FIL 90:1979	
Regolamento (CEE) n. 2921/90	Allegato II — Caseina acida	Acqua	Max. 10,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Materie grasse	Max. 1,50 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Acidità libera	Max. 0,20 ml di soluzione 0,1 N NaOH/g	ISO 5547:1978FIL 91:1979	
		CBT (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformi	Assente in 0,1 g	Allegato X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Note 3 e 4
Regolamento (CEE) n. 2921/90	Allegato II — Caseina presamica	Acqua	Max. 8,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Materie grasse	Max. 1,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Ceneri	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978FIL 90:1979	
		CBT (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformi	Assente in 0,1 g	Allegato X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Note 3 e 4

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Parametro	Limiti (1)	Metodo di riferimento	Nota
Regolamento (CEE) n. 2921/90	Allegato II — Caseinati	Acqua	Max. 6,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Proteine del latte	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978FIL 92:1979	
		Materie grasse e ceneri	Max. 6,00 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004 ISO 5544:1978FIL 89:1979 o ISO 5545:1978FIL 90:1979	
		CBT (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformi	Assente in 0,1 g	Allegato X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Note 3 e 4
Regolamento (CEE) n. 2921/90	Allegato III — Caseinati	Acqua	Max. 6,00 % m/m	ISO 5550:2006FIL 78:2006	
		Proteine del latte	Min. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978FIL 92:1979	
		Materie grasse	Max. 1,50 % m/m	ISO 5543:2004FIL 127:2004	
		Lattosio	Max. 1,00 % m/m	ISO 5548:2004FIL 106:2004	
		Ceneri	Max. 6,50 % m/m	ISO 5544:1978FIL 89:1979 o ISO 5545:1978FIL 90:1979	
		CBT (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformi	Assente in 0,1 g	Allegato X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Note 3 e 4
Regolamento (CE) n. 2799/1999	Alimenti composti per animali e latte scremato in polvere (LSP) per l'alimentazione degli animali	Acqua (latticello acido in polvere)	Max. 5 % m/m	Allegato XIX	
		Proteine	31,4 % m/m (min.) sull'estratto secco non grasso	ISO 8968-123:2001FIL 20-123:2001	
		Acqua (LSP)	Max. 5 % m/m	ISO 5537:2004FIL 26:2004	
		Materie grasse (LSP)	Max. 11 % m/m	ISO 1736:2000FIL 9C:1987	
		Siero di latte presamico (LSP)	Assente	Allegato XIII	Nota 6
		Amido (LSP)	Assente	Allegato XVII	
		Acqua (miscela)	Max. 5 % sull'estratto secco non grasso	ISO 5537:2004FIL 26:2004	

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Parametro	Limiti (1)	Metodo di riferimento	Nota
		Materie grasse (miscela)		Direttiva 84/4/CEE della Commissione (GU L 15 del 18.1.1984, pag. 29)	
		Siero di latte presamico (miscela)	Assente	Allegato XIII	
		Tenore di LSP (del prodotto finale)	Min. 50 % m/m	Allegato XVI	
		Materie grasse (del prodotto finale)	Min. 2,5 % m/m o 5 % m/m	Direttiva 84/4/CEE della Commissione (GU L 15 del 18.1.1984, pag. 29)	Nota 7
		Amido (del prodotto finale)	Min. 2 % m/m	Allegato XVII	Nota 8
		Rame (del prodotto finale)	25 ppm	Direttiva 78/633/CEE della Commissione (GU L 206 del 26.7.1987, pag. 43)	
Regolamento (CE) n. 214/2001	LSP (metodo spray)	Materie grasse	Max. 1,0 % m/m	ISO 1736:2000FIL 9C:1987	
		Proteine	31,4 % (2)m/m (min.) dell'estratto secco non grasso	ISO 8968-1/2:2001FIL 20-1/2:2001	
		Acqua	Max. 3,5 % m/m	ISO 5537:2004FIL 26:2004	
		Acidità	Max. 19,5 ml, 0,1 N NaOH/10 g solidi magri	ISO 6091:1980FIL 86:1981	
		Lattati	Max. 150 mg/100 g di solidi magri	ISO 8069:2005FIL 69:2005	
		Fosfatasi	Negativa	ISO 11816-1:2006FIL 155-1:2006	
		Indice di insolubilità	Max. 0,5 ml a 24 °C	ISO 8156:2005FIL 129:2005	
		Particelle combuste	Disco A o B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		CBT	40 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformi	Negativo/0,1 g	Allegato X	Nota 3
		Latticello	Negativo	Allegato XIV	
		Siero di latte presamico	Negativo	Allegato XII	
		Siero di latte acido	Negativo		Nota 2
		Antibiotici		Allegato XV	

(1) Fatti salvi i requisiti del regolamento specifico
(2) Il tenore minimo di proteine proposto è del 34 % a partire dal 1º settembre 2009.

▼B

PARTE B

I metodi di riferimento elencati nella parte B si applicano all'analisi di prodotti contemplati da qualsivoglia regolamento della prima colonna.

Regolamento della Commissione	Prodotto	Codice NC	Parametro	Limiti	Metodo di riferimento	Nota
Regolamento (CE) n. 2658/87 Regolamento (CE) n. 2535/2001 Regolamento (CE) n. 1282/2006	Latte e crema di latte, non concentrati e senza aggiunta di zuccheri o di altri dolcificanti	0401	Materie grasse (≤ 6 % m/m)	I limiti sono quelli specificati nella descrizione del codice NC del prodotto specifico e, ove del caso, precisati dal regolamento (CEE) n. 3846/87 della Commissione (GU L 366 del 24.12.1987, pag. 1), nella parte 9 della nomencaltura per le restituzioni all'esportazione o dal regolamento (CE) n. 2535/2001 (GU L 341 del 22.12.2001, pag. 29)	ISO 1211:2001FIL 1D:1996	
			Materie grasse (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999FIL 16C:1987	
	Latte e crema di latte, concentrati o con aggiunta di zuccheri o di altri dolcificanti	0402	Materie grasse (forma liquida)		ISO 1737:1999FIL 13C:1987	
			Materie grasse (forma solida)		ISO 1736:2000FIL 9C:1987	
			Proteine		ISO 8968-123:2001FIL 20-123:2001	
			Saccarosio (tenore normale)		ISO 2911:2004 FIL 35:2004	
			Saccarosio (tenore basso)			Nota 2
			Sostanza secca (LCD)		ISO 6734:1989FIL 15B:1991	
			Sostanza secca (LCE)		ISO 6731:1989FIL 21B:1987	
			Acqua (latte in polvere)		ISO 5537:2004FIL 26:2004	
			Acqua (crema in polvere)		Allegato XVIII	

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Codice NC	Parametro	Limiti	Metodo di riferimento	Nota
	Latticello, latte e crema fermentati o acidificati, concentrati o non concentrati, con aggiunta di zuccheri o di altri dolcificanti	0403	Materie grasse		ISO 1211:2001FIL 1D:1996 ISO 1736:2000FIL 9C:1987 ISO 2450:1999FIL 16C:1987 ISO 7208:1999FIL 22B:1987 ISO 8262-3:2005FIL 124-3:2005	
			Proteine		ISO 8968-123:2001FIL 20-123:2001	
			Saccarosio (tenore normale)		ISO 2911:2004FIL 35:2004	
			Saccarosio (tenore basso)			Nota 2
			Acqua (latticello acido in polvere)		Allegato XIX	
			Acqua (latticello dolce in polvere)		ISO 5537:2004FIL26:2004	
			Sostanza secca (altri prodotti)		Metodi approvati dall'autorità competente	
	Siero di latte, anche concentrato o con aggiunta di zuccheri o di altri dolcificanti; prodotti costituiti di componenti naturali del latte	0404	Materie grasse		ISO 1736:2000FIL 9C:1987 ISO 2450:1999FIL 16C:1987 ISO 7208:1999FIL 22B:1987	
			Proteine		ISO 8968-123:2001FIL 20-123:2001	
			Saccarosio (tenore normale)		ISO 2911:2004FIL 35:2004	
			Saccarosio (tenore basso)			Nota 2
		0404 90	Proteine		ISO 8968 1/2 2001FIL 20-1/2:2001	
			Acqua		FIL 21B:1987	
			Sostanza secca		ISO 6734:1989FIL 15B:1991	

▼B

Regolamento della Commissione	Prodotto	Codice NC	Parametro	Limiti	Metodo di riferimento	Nota
			(Prodotti concentrati)		ISO 6731:1989FIL 21B:1987	
	Burro e altre materie grasse del latte; paste da spalmare lattiere	0405	Materie grasse (se ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003FIL 194:2003	
		Burro	Acqua		ISO 3727-1:2001FIL 80-1:2001	
			s.s.n.g.		ISO 3727-2:2001FIL 80-2:2001	
			NaCl		ISO 15648:2004FIL 179:2004	
			Materie grasse (se > 99 % m/m)		FIL 24:1964	
	Butteroil		Acqua (se materie grasse < 99 % m/m)		ISO 5536:2002FIL 23:2002	
	Formaggi e latticini	0406	Materie grasse		ISO 1735:2004FIL 5:2004	
			Sostanza secca		ISO 5534:2004FIL 4:2004	
			Sostanza secca (Ricotta)		ISO 2920:2004FIL 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006FIL 88:2006	
			Lattosio		ISO 5765-1/2:2002FIL 79-1/2:2002	
Regolamento (CEE) n. 2658/87	Mangimi composti	2309	Lattosio		Allegato XI	

Note dell'elenco dei metodi di riferimento dell'Unione europea:

Nota 1: Isolamento delle materie grasse del latte secondo la norma ISO 1740:1991 (protezione dalla luce).

Nota 2: Non è stato stabilito nessun metodo di riferimento. Metodi approvati dall'autorità competente.

Nota 3: La preparazione del campione deve essere eseguita secondo la norma ISO 8261:2001FIL 122:2001.

Nota 4: Incubazione per 48 ore alla temperatura di 55 °C, precauzioni da adottare per evitare il prosciugamento del terreno di coltura.

Nota 5: % m/m s.s.n.g. = % m/m sostanza secca — % m/m materia grassa.

Nota 6: Direttiva 84/4/CEE della Commissione.

Nota 7: Regolamento (CE) n. 2799/1999 della Commissione (GU L 340 del 31.12.1999, pagg. 3-27).

Nota 8: Direttiva 78/633/CEE della Commissione.

▼B

ALLEGATO II

(Articolo 3)

VALUTAZIONE DELLA CONFORMITÀ DI UNA PARTITA CON I LIMITI REGOLAMENTARI

1. PRINCIPIO

Se la normativa pertinente prevede procedure dettagliate di campionamento, si osservano tali procedure. Negli altri casi si utilizza un campione, composto di almeno 3 unità di campione, prelevato casualmente dalla partita presentata al controllo. Si può preparare un campione composito. Il risultato ottenuto si raffronta con i limiti regolamentari calcolando un intervallo di fiducia del 95 % pari al doppio della deviazione standard, dove la deviazione standard dipende da queste due ipotesi: 1) se il metodo è validato nell'ambito della cooperazione internazionale con valori definiti di σ_r e σ_R oppure 2) in caso di validazione interna, se è stato calcolato un valore di riproducibilità interna. L'intervallo di fiducia viene quindi comparato con l'incertezza di misurazione del risultato.

2. METODO CONVALIDATO NELL'AMBITO DELLA COLLABORAZIONE INTERNAZIONALE

In questo caso sono state stabilite la deviazione standard di ripetibilità σ_r e la deviazione standard di riproducibilità σ_R e il laboratorio è in grado di dimostrare l'osservanza delle caratteristiche di esecuzione del metodo validato.

Calcolare la media aritmetica $\overline{x}$ del numero *n* di misurazioni ripetute.

Calcolare l'incertezza ampliata ($k = 2$) di $\overline{x}$ come segue:

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

Se il risultato finale *x* della misurazione è calcolato utilizzando una formula del tipo $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ o $x = y_1 / y_2$ si devono seguire le procedure di combinazione delle deviazioni standard abituali in tali casi.

Si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare superiore *UL* se

$\overline{x} - U > UL$;

altrimenti si ritiene che la partita rispetti il limite superiore *UL*.

Si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare inferiore *LL* se

$\overline{x} + U < LL$;

altrimenti si ritiene che la partita rispetti il limite inferiore *LL*.

3. VALIDAZIONE INTERNA MEDIANTE IL CALCOLO DELLA DEVIAZIONE STANDARD DI RIPRODUCIBILITÀ INTERNA

Se si utilizzano metodi non previsti dal presente regolamento e se non sono state stabilite le misure della precisione è necessario procedere ad una validazione all'interno del laboratorio. Nella formula di calcolo dell'incertezza ampliata *U*, anziché σ_r e rispettivamente s_{iR}, occorre utilizzare la deviazione standard di ripetibilità interna s_{ir} e la deviazione standard di riproducibilità interna σ_R.

Le regole per l'adozione della decisione corrispondono a quelle indicate al punto 1. Tuttavia, se si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare occorre ripetere le misurazioni utilizzando il metodo specificato nel presente regolamento e la decisione va presa secondo le regole indicate al punto 1.

▼B

ALLEGATO III

(Articolo 4)

VALUTAZIONE DEGLI ASSAGGIATORI E DELL'AFFIDABILITÀ DEI RISULTATI DI ANALISI ORGANOLETTICHE

Le procedure che seguono si applicano se si ricorre a metodi di classificazione mediante punteggio (norma FIL 99C:1997).

A. DETERMINAZIONE DELL «INDICE DI RIPETIBILITÀ»

Un assaggiatore deve analizzare alla cieca almeno 10 campioni in doppio entro un periodo di 12 mesi. Tale operazione si effettua di solito in più sessioni. I risultati delle caratteristiche dei singoli prodotti sono valutati utilizzando la formula seguente:

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

dove:

w_1: indice di ripetibilità

x_{i1}: punteggio per la prima valutazione del campione x_i

x_{i2}: punteggio per la seconda valutazione del campione x_i

n: numero di campioni

I campioni da valutare devono coprire un'ampia gamma di qualità. w_I non deve superare 1,5 (scala a 5 punti).

B. DETERMINAZIONE DELL «INDICE DI DEVIAZIONE»

Tale indice si applica per controllare se un assaggiatore utilizza, per la valutazione qualitativa, la stessa scala di un gruppo sperimentato di assaggiatori. I punteggi attribuiti dall'assaggiatore vengono confrontati con la media dei punteggi del gruppo di assaggiatori.

Per la valutazione dei risultati si utilizza la formula seguente:

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

dove:

x_{i1}; x_{i2}: cfr. lettera A)

$\overline{x}_{i1}$; $\overline{x}_{i2}$: punteggio medio del gruppo di assaggiatori per la prima e, rispettivamente, la seconda valutazione del campione x_i

n: numero di campioni (almeno 10 in 12 mesi).

I campioni da valutare devono coprire un'ampia gamma di qualità. D_I non deve superare 1,5 (scala a 5 punti).

Gli Stati membri comunicano eventuali difficoltà incontrate nell'applicazione di questa procedura.

Se si riscontra che singoli assaggiatori superano il limite di 1,5 per gli indici di deviazione o di ripetibilità, l'esperto o gli esperti dell'autorità ufficiale devono eseguire uno o più controlli di «riesecuzione» su campioni da essi classificati nel corso delle settimane immediatamente successive, oppure devono eseguire uno o più controlli «accompagnati» insieme ai medesimi assaggiatori. È necessaria una sorveglianza rigorosa per decidere se continuare a ricorrere ai loro servizi. È necessario documentare e conservare le risultanze come prova dell'eseguita sorveglianza.

▼B

C. CONFRONTO DEI RISULTATI OTTENUTI IN DIFFERENTI REGIONI DI UNO STATO MEMBRO E IN DIFFERENTI STATI MEMBRI

Ove del caso, almeno una volta all'anno deve essere organizzata una prova che permetta il confronto dei risultati ottenuti da assaggiatori di differenti regioni. Se si rilevano differenze significative, occorre fare in modo di individuarne le ragioni e arrivare a risultati simili.

Gli Stati membri possono organizzare prove che permettano di confrontare i risultati ottenuti dai loro assaggiatori e da assaggiatori di Stati membri confinanti. Se si riscontrano differenze significative occorre procedere a un esame approfondito allo scopo di giungere a risultati simili.

Gli Stati membri comunicano alla Commissione i risultati di tali confronti.

▼B

ALLEGATO IV

(Articolo 4)

VALUTAZIONE ORGANOLETTICA DEL BURRO

1. CAMPO D'APPLICAZIONE

La presente procedura per la valutazione organolettica del burro ha lo scopo di fornire un metodo uniforme applicabile in tutti gli Stati membri.

Per ulteriori dettagli occorre riferirsi alla norma in vigore della FIL (Federazione internazionale dell'industria del latte) per il latte e i prodotti lattiero-caseari, FIL 99 — Parti 1,2,3, sulla valutazione organolettica.

2. DEFINIZIONI

Per «valutazione organolettica» si intende l'esame delle caratteristiche di un prodotto mediante gli organi di senso.

Per «gruppo di esperti» si intende un gruppo di esperti selezionati per la valutazione che, durante le operazioni di valutazione, lavorano senza comunicare fra di loro e senza influenzarsi reciprocamente.

Per «assaggiatore» si intende una persona scelta per la sua capacità di eseguire un esame organolettico. Questo tipo di assaggiatore può avere un'esperienza limitata.

Per «assaggiatore esperto» si intende una persona con un alto grado di sensibilità sensoriale e con esperienza nel campo dei metodi di analisi organolettica, capace di compiere valutazioni organolettiche coerenti e attendibili su vari prodotti. Questo tipo di assaggiatore deve avere una buona memoria sensoriale a lungo termine.

Per «punteggio» si intende il risultato della valutazione organolettica effettuata da un gruppo di esperti ed espresso mediante l'uso di una scala numerica. Si deve usare una nomenclatura dei difetti.

Per «classificazione» si intende una classificazione di qualità eseguita sulla base del punteggio.

Per «documenti di controllo» si intendono i documenti utilizzati per registrare i punteggi singoli assegnati a ciascuna caratteristica e la classificazione finale del prodotto. (Questo documento si può usare anche per registrare la composizione chimica).

3. LOCALE DI PROVA

Per ulteriori dettagli occorre riferirsi alle norme ISO 8589 e ISO/DIS 22935-2 FIL 99-2, paragrafo 7.

Prendere le opportune precauzioni perché gli assaggiatori nella camera di prova non siano influenzati da fattori esterni.

La camera di prova deve essere esente da odori estranei e facile da pulire. Le pareti devono essere di colore chiaro e non riflettenti.

La camera di prova e la sua illuminazione devono essere tali da non influire sulle proprietà del prodotto da valutare.

La camera deve essere equipaggiata di apposito dispositivo di controllo termostatico che permetta di mantenere il burro a temperatura costante. Al momento della classificazione il burro deve avere una temperatura di 12 °C (± 2 °C).

4. SELEZIONE DEGLI ASSAGGIATORI

L'assaggiatore deve avere familiarità con i prodotti a base di burro e avere la competenza necessaria per eseguire una classificazione organolettica. La sua competenza deve essere riesaminata periodicamente (almeno una volta all'anno) da parte dell'autorità competente.

4.1. Consultare le norme ISO/DIS 22935-1 FIL 99-1 paragrafo 4 (assunzione) e paragrafo 5.1 per ulteriori dettagli sui requisiti generali e sulle prove che possono essere utilizzate prima dell'assunzione ufficiale di un nuovo assaggiatore.

È fondamentale che la formazione sia continua ed è opportuno organizzare regolarmente sessioni generali. Per informazioni sulla formazione del gruppo di esperti riferirsi alla norma ISO 8586-1.

▼B

4.2. La formazione iniziale dovrebbe riguardare i seguenti aspetti:

— teoria generale e importanza pratica della valutazione organolettica,

— metodi, punteggi e descrizione delle impressioni sensoriali,

— individuazione e riconoscimento delle caratteristiche organolettiche e conoscenza della terminologia organolettica specifica,

— conoscenze di base sulla fabbricazione del burro,

— riferimenti e campioni convalidati in modo da aiutare l'assaggiatore a riconoscere sapori specifici e una specifica intensità di gusto nel prodotto.

5. REQUISITI DEL GRUPPO DI ASSAGGIATORI

Il gruppo deve essere composto da un numero dispari di assaggiatori, mai inferiore a tre, comprendente una maggioranza di dipendenti dell'autorità competente o di persone autorizzate che non lavorano per l'industria lattiero-casearia.

Il presidente del gruppo è responsabile dell'intera procedura e può essere membro del gruppo di assaggiatori.

Affinché gli assaggiatori possano fornire prestazioni ottimali, prima di procedere alla valutazione occorre tener conto di diversi fattori:

— gli assaggiatori non devono essere affetti da malattie che potrebbero comprometterne le prestazioni: in caso di malattia dell'assaggiatore occorrerà sostituirlo con un altro,

— gli assaggiatori devono presentarsi puntualmente per partecipare alla valutazione e disporre di tempo sufficiente per compierla,

— gli assaggiatori devono evitare l'impiego di prodotti fortemente odorosi quali profumi, lozioni dopobarba, deodoranti e astenersi dal consumo di alimenti molto aromatizzati (speziati), ecc.,

— nella mezzora che precede la valutazione gli assaggiatori non devono fumare, né mangiare o bere tranne acqua.

6. PRESTAZIONI

Per conservare il proprio livello di competenze è necessario che tutti gli assaggiatori prendano parte regolarmente alle riunioni dei gruppi di valutazione organolettica, la cui frequenza dipenderà dal volume di produzione del burro, e che partecipino possibilmente ad una riunione del gruppo di esperti al mese.

Anche gli assaggiatori esperti dovrebbero prendere parte ad un certo numero di riunioni del gruppo di esperti all'anno e possibilmente ad almeno una riunione per trimestre.

7. CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

È fondamentale che l'identità dei campioni sia tenuta celata durante la valutazione per evitare qualsiasi interferenza. È opportuno che i campioni siano contrassegnati da un codice.

Questi aspetti devono essere regolati prima della valutazione. La temperatura del burro durante il trasporto fino al locale di prova deve essere fissata a 6 °C ± 2 °C.

Se la valutazione organolettica è eseguita presso il magazzino frigorifero, il campione di burro è prelevato mediante un campionatore per burro. Se la valutazione organolettica è eseguita in un luogo diverso dal magazzino frigorifero, occorre prelevare un campione di almeno 500 g. Durante la valutazione, il burro deve avere una temperatura di 12 °C (± 2 °C) (cfr. la norma: ISO/DIS 22935-2 FIL 99-2, dove la temperatura di valutazione del burro è di 14 °C ± 2 °C). Evitare assolutamente grandi scostamenti da questo intervallo.

8. VALUTAZIONE DI CIASCUNA CARATTERISTICA

8.1. La valutazione organolettica è eseguita in relazione alle seguenti tre caratteristiche: aspetto, consistenza e gusto/aroma.

«Laspetto» comprende le caratteristiche seguenti: colore, purezza visibile, assenza di contaminazione fisica, assenza di muffe e uniformità di dispersione dell'acqua. La dispersione dell'acqua è valutata conformemente alla norma FIL 112A/1989.

▼B

La «consistenza» comprende le caratteristiche seguenti: corpo, struttura e compattezza. La spalmabilità può essere controllata utilizzando mezzi fisici su richiesta di uno Stato membro che desidera soddisfare le esigenze dei suoi consumatori. La Commissione potrà decidere di armonizzare tale metodologia in futuro.

Il «corpo» si riferisce alla coesione interna del prodotto presentato al consumatore. Di solito è associato alla compattezza e alla spalmabilità e dovrebbe essere uniforme in tutto il prodotto. È una caratteristica strettamente legata alla struttura, che designa la capacità del prodotto di reggersi grazie al proprio peso. È correlato alla resistenza al taglio, che può essere misurata meccanicamente e attraverso la sensazione tattile sotto le dita e in bocca.

Il «gusto» designa le caratteristiche percepite in bocca soprattutto dalle papille gustative della lingua.

«Laroma» designa le caratteristiche percepite dal senso dell'odorato.

Uno scostamento significativo dalla temperatura raccomandata impedisce una valutazione corretta della consistenza e del gusto. La temperatura è quindi della massima importanza.

La classificazione del burro deve essere posticipata se la temperatura non rientra nella fascia raccomandata.

8.2. Ogni caratteristica deve essere oggetto di una valutazione organolettica separata. Il punteggio è assegnato in base alla tabella 1.

8.3. Può essere opportuno che, prima di iniziare la valutazione, gli assaggiatori assegnino insieme un punteggio ad uno o più campioni di riferimento per quanto riguarda aspetto, consistenza e gusto, in modo da raggiungere una maggiore uniformità.

8.4. Il punteggio per l'accettazione è il seguente:

nell'assegnare un punteggio, riferirsi alla parte 7 — Nomenclatura e alla descrizione dei criteri applicabili ai punti.

	Punteggio massimo	Punteggio richiesto
Aspetto	5	4
Consistenza	5	4
Gusto/aroma	5	4

— Se non si raggiunge il punteggio richiesto, occorre fornire una descrizione del difetto.

— Il punteggio assegnato da ogni assaggiatore ad ogni caratteristica deve essere registrato nel documento di controllo.

— Il prodotto è accettato o scartato sulla base di una decisione a maggioranza.

— Non devono verificarsi frequentemente casi in cui le differenze tra i punteggi individuali assegnati a ciascuna caratteristica sono maggiori di un punto (non più di una volta su 20 campioni). In caso contrario il presidente deve riesaminare la competenza del gruppo di assaggiatori.

9. SUPERVISIONE

Il presidente del gruppo, che deve essere un funzionario dell'autorità competente e che può essere membro del gruppo di assaggiatori, avrà la responsabilità generale dell'intera procedura. Il presidente deve registrare nel documento di controllo i punteggi individuali per ciascuna caratteristica e certificare se il prodotto è stato accettato o scartato.

10. NOMENCLATURA

Cfr. l'allegata tabella 2.

11. RIFERIMENTO

FIL-IDF 99C:1997 Valutazione organolettica dei prodotti lattiero caseari con punteggio — Metodo di riferimento

ISO/DIS 22935 FIL 99 Norma internazionale per il latte e i prodotti lattiero-caseari — Analisi organolettica — Parti 1-3

▼B

ISO 8586-1 Analisi organolettica — Orientamenti generali per la selezione, la formazione e la sorveglianza degli assaggiatori — Parte 1

ISO 8589 Analisi organolettica — Orientamenti generali per l'allestimento dei locali di prova

FIL-IDF 112A:1989 Burro — Determinazione del valore di dispersione dell'acqua

Tabella 1

Punteggio del burro

Aspetto			Consistenza			Gusto + aroma		
Punti (classe di qualità)	N. (1)	Osservazioni	Punti (classe di qualità)	N. (1)	Osservazioni	Punti (classe di qualità)	N. (1)	Osservazioni
5		*Molto buono* tipo ideale massima qualità (uniformemente asciutto)	5		*Molto buono* tipo ideale massima qualità (ben spalmabile)	5		*Molto buono* tipo ideale massima qualità (aroma finissimo assolutamente puro)
4		*Buono* (2) nessun difetto evidente	4	 17 18	*Buono* (2) dura morbida	4		*Buono* (2) nessun difetto evidente
3	 1 2 3 4 5 6 7 8	*Discreto (leggeri difetti)* acquoso, goccioline d'acqua non uniforme, due colori striature screziato marezzato chiazzato separazione d'olio colore eccessivo poroso	3	 14 15 16 17 18	*Discreto (leggeri difetti)* corta, fragile, friabile pastosa, grassa appiccicosa dura molle	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Discreto (leggeri difetti)* impuro gusto estraneo acido sapore di cotto, sapore di bruciato sapore di foraggio grossolano, amaro eccessivamente salato
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Scadente (difetti evidenti)* acquoso, goccioline d'acqua striature screziato marezzato chiazzato separazione d'olio materie estranee muffa sale non disciolto	2	 14 15 16 17 18	*Scadente (difetti evidenti)* corta, fragile, friabile pastosa, grassa appiccicosa dura molle	2	 21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Scadente (difetti evidenti)* impuro gusto estraneo stantio acido sapore di ossidato, sapore metallico sapore di foraggio grossolano, amaro eccessivamente salato ammuffito, marcio sapore chimico
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Molto scadente (difetti gravi)* acquoso, goccioline d'acqua striature screziato marezzato chiazzato separazione d'olio colore eccessivo granulare materie estranee muffa sale non disciolto	1	 14 15 16 17 18	*Molto scadente (difetti gravi)* corta, fragile, friabile pastosa, grassa appiccicosa dura molle	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Molto scadente (difetti gravi)* gusto estraneo sapore di formaggio, di formaggio acido acido sapore di lievito sapore di muffa rancido oleoso, di pesce di sego sapore di ossidato, sapore metallico grossolano, amaro eccessivamente salato ammuffito, marcio di malto sapore chimico

(1) Tabella 2.
(2) I difetti citati sotto «Buono» sono solo deviazioni minime dal tipo ideale.

▼B

Tabella 2

Nomenclatura dei difetti del burro

I.	Aspetto
1.	acquoso, goccioline d'acqua evidenti
2.	colore non uniforme, due colori
3.	striato
4.	screziato, marezzato
5.	chiazzato
6.	separazione d'olio
7.	colore eccessivo
8.	poroso
9.	granuloso
10.	materiale estraneo
11.	muffa
12.	sale non disciolto
II.	Consistenza
14.	corta, fragile, friabile
15.	pastosa, grassa
16.	appiccicosa
17.	dura
18.	molle
III.	Gusto e aroma
20.	mancanza d'aroma, insipido
21.	impuro ([1])
22.	gusto estraneo
23.	stantio
24.	sapore di formaggio, di formaggio acido
25.	acido
26.	sapore di lievito
27.	a) sapore di cotto
	b) sapore di bruciato
28.	sapore di muffa
29.	rancido
30.	oleoso, di pesce
31.	sapore di sego
32.	a) sapore di ossidato
	b) sapore metallico
33.	sapore di foraggio
34.	grossolano, amaro
35.	eccessivamente salato
36.	ammuffito, marcio
37.	sapore di malto
38.	sapore di prodotti chimici

([1]) Questa definizione deve venire usata il più raramente possibile e solo quando il difetto non può essere descritto in modo più accurato.

▼B

ALLEGATO V

(Articolo 5)

DETERMINAZIONE DEL TENORE DEL TRIGLICERIDE DELL'ACIDO ENANTICO NEL BURRO, NEL BUTTEROIL E NELLA CREMA MEDIANTE ANALISI GASCROMATOGRAFICA DEI TRIGLICERIDI

1. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo permette la determinazione del tenore di trigliceride dell'acido enantico nel butteroil, nel burro e nella crema.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Tenore di acido enantico: tenore di trigliceride dell'acido enantico determinato col procedimento specificato dal metodo.

Nota: Il tenore di acido enantico è espresso in kg/t di prodotto per il butteroil e il burro e in kg/t di materia grassa del latte per la crema.

3. PRINCIPIO

Le materie grasse del latte sono estratte dai vari prodotti secondo la norma ISO 14156 FIL 172:2001. La determinazione quantitativa del tenore di trigliceride dell'acido enantico nella materia grassa estratta è eseguita mediante gascromatografia con colonna capillare (GC). Il risultato ottenuto per il campione è valutato con riferimento al trigliceride dell'acido caproico come standard interno.

Nota: Si è riscontrato che anche il tributirino costituisce uno standard interno soddisfacente.

4. REAGENTI

Usare esclusivamente reagenti di purezza analitica riconosciuta.

4.1. n-esano

4.2. Trigliceride standard di acido caproico, avente una purezza di almeno il 99 %

4.3. Trigliceride standard di acido enantico, avente una purezza di almeno il 99 %

4.4. Solfato di sodio anidro (Na_2SO_4)

5. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura di laboratorio, in particolare:

5.1. Bilancia analitica con una risoluzione di 1 mg

5.2. Palloni volumetrici della capacità di 10 ml e 20 ml

5.3. Tubi per centrifuga della capacità di 30 ml

5.4. Evaporatore rotante

5.5. Forno regolabile su 50 °C ± 5 °C

5.6. Carta da filtro di porosità media del diametro di circa 15 cm

5.7. Attrezzatura per gascromatografia

5.7.1. Gascromatografo provvisto di un sistema di splittaggio o splitless o di un iniettore in colonna e di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

5.7.2. Colonna GC, con una fase stazionaria di provata efficacia per la separazione del trigliceride (100 % dimetilpolisiloxano o 5 % fenil-95 % metilpolisiloxano). Selezionare la fase stazionaria, la lunghezza della colonna (tra 4 m e 15 m), il diametro interno (tra 0,22 mm e 0,50 mm) e lo spessore della pellicola [(0,12 μm o più] tenendo conto dell'esperienza del laboratorio e del sistema di iniezione applicato. In ogni modo la colonna selezionata produce sia una separazione completa tra il picco dell'eluente e il trigliceride di acido caproico, sia una risoluzione della linea di base tra i picchi di trigliceride dell'acido caproico e dell'acido enantico. Segue un elenco di esempi delle condizioni applicabili.

▼B

5.7.2.1. Esempio di condizioni applicabili utilizzando un iniettore di splittaggio:

— Gas di trasporto (carrier): elio

— Pressione in testa alla colonna: 100 kPa

— Colonna: lunghezza 12 m, diametro interno 0,5 mm, spessore della pellicola 0,1 μm, colonna di silice fusa

— Fase stazionaria: 100 % dimetilpolisiloxano o 5 % fenil-95 % dimetilpolisiloxano (ad esempio HT5)

— Temperatura della colonna: temperatura iniziale 130 °C, mantenuta per 1 min, alzata in ragione di 20 °C/min fino a 260 °C e quindi alzata in ragione di 30 °C/min fino a 360 °C; mantenuta a 360 °C per 10 min

— Temperatura del rivelatore: 370 °C

— Temperatura dell'iniettore: 350 °C

— Rapporto di splittaggio 1:30

— Quantità di campione iniettata: 1 μl.

5.7.2.2. Esempio di condizioni applicabili utilizzando un iniettore in colonna:

— Gas di trasporto (carrier): idrogeno (sistema a flusso costante)

— Pressione in testa alla colonna: 89 kPa

— Colonna: lunghezza 4 m, diametro interno 0,32 mm, spessore della pellicola 0,25 μm, colonna di silice fusa

— Fase stazionaria: 5 % fenil, 95 % dimetilpolisiloxano

— Temperatura della colonna: temperatura iniziale di 60 °C, mantenuta per 2 min, alzata in ragione di 35 °C/min fino a 340 °C, mantenuta a questa temperatura per 5 min

— Temperatura del rivelatore: 350 °C

— Quantità di campione iniettata: 1 μl

5.8. Siringa di iniezione della capacità di 5 μl

6. CAMPIONAMENTO

È importante che il laboratorio riceva un campione veramente rappresentativo, che non ha subito danni o modifiche durante il trasporto o il magazzinaggio.

Il campionamento non rientra nel metodo specificato nella presente norma internazionale. Un metodo di campionamento raccomandato è quello descritto nella norma FIL 50C:1995 o ISO 707-1997 — Latte e prodotti latteo caseari — Metodi di campionamento.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparazione del campione e della porzione da analizzare**

Procedere secondo quanto descritto dalla norma ISO 14156 FIL 172:2001.

7.1.1. *Butteroil e burro*

7.1.1.1. Fondere da 50 a 100 g del campione nel forno (5.5)

7.1.1.2. Porre 0,5 g-1,0 g di solfato di sodio anidro (5.4) in una carta da filtro ripiegata

7.1.1.3. Filtrare il grasso attraverso la carta da filtro contenente il solfato di sodio anidro e raccogliere il filtrato in un becher conservato nel forno (5.5). Nel far decantare il burro sciolto sulla carta da filtro attenzione a non trasferire siero.

7.1.2. *Crema*

7.1.2.1. Portare il campione ad una temperatura di 20 °C±2 °C

7.1.2.2. Mescolare o agitare accuratamente il campione

7.1.2.3. Diluire una quantità di campione adatta per ottenere 100 ml di porzione da analizzare con una frazione in massa di grasso di circa il 4 %

▼B

7.1.2.4. Procedere come per il latte crudo e il latte omogeneizzato (vedi ISO 14156 FIL 172:2001, §8.3) per estrarre il grasso dalla crema

7.1.2.5. Pesare in un pallone volumetrico da 10 ml (5.2), con l'approssimazione di 1 mg, 1 g del grasso estratto Aggiungere 1 ml della soluzione 7.2.2. Portare a 10 ml con n-esano (4.1) e miscelare

7.1.2.6. Introdurre 1 ml della soluzione 7.1.1.2 in un pallone volumetrico da 10 ml (5.2) e diluire a 10 ml con n-esano (5.1)

7.2. **Preparazione delle soluzioni standard di taratura**

7.2.1. Sciogliere 100 mg del trigliceride di acido enantico (4.3) in 10 ml di n-esano (4.1)

7.2.2. Sciogliere 100 mg del trigliceride di acido caproico (4.2) in 10 ml di n-esano (4.1)

7.2.3. Introdurre 1 ml della soluzione 7.2.2. in un pallone volumetrico da 10 ml (5.2). Portare a 10 ml con n-esano (4.1)

7.2.4. Introdurre 1 ml della soluzione 7.2.1. e 1 ml della soluzione 7.2.2 in un pallone volumetrico da 10 ml (5.2). Portare a 10 ml con n-esano (4.1)

7.2.5. Introdurre 1 ml della soluzione 7.2.4 in un pallone volumetrico da 10 ml (5.2) e portare a 10 ml con n-esano (4.1)

7.3. **Determinazione cromatografica**

7.3.1. Iniettare 1 µl della soluzione standard 7.2.5 due volte

7.3.2. Iniettare 1 µl di ogni soluzione campione

Nota: Se si usa un iniettore in colonna occorre applicare una diluizione maggiore sia alle soluzioni standard che alle soluzioni campione.

7.3.3. Ripetere l'operazione 7.3.1 ogni tre campioni in modo che i campioni siano compresi tra le due iniezioni di soluzione standard. I risultati si basano sui fattori medi di risposta ottenuti dai cromatogrammi standard.

8. CALCOLO DEI RISULTATI

Per ogni cromatogramma integrare l'area dei picchi associati ai trigliceridi dell'acido enantico e dell'acido caproico.

Seguire queste istruzioni per ogni sequenza completa, ossia per un gruppo di campioni compresi tra le due iniezioni di standard (la soluzione standard iniettata due volte immediatamente prima dei campioni è la STD_1 e la soluzione standard iniettata due volte immediatamente dopo è la STD_2).

8.1. **Taratura**

8.1.1. Calcolare il fattore di risposta $Rf_1(a)$ e $Rf_1(b)$ per ogni doppio di STD_1

Rf_1 (a) o (b) = (area del picco del trigliceride dell'acido caproico/area del picco del trigliceride dell'acido enantico) × 100.

Calcolare il fattore di risposta medio Rf_1

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

8.1.2. Analogamente calcolare il fattore di risposta medio Rf_2 per STD_2

8.1.3. Calcolare il fattore di risposta medio Rf

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

8.2. **Campioni da analizzare**

Per ogni cromatogramma campione ottenuto tra STD_1 e STD_2 calcolare il tenore di acido enantico C (kg/t) come segue:

C = (area del picco del trigliceride dell'acido enantico × Rf × 100)/(area del picco del trigliceride dell'acido caproico × Wt × 1 000)

dove:

— Wt = peso del grasso prelevato (g)

— 100 = volume di diluizione del campione

— 1 000 = fattore di conversione (da µg/g a kg/t)

▼B

Per i campioni di burro tener conto del tenore di grasso butirrico e calcolare un valore di concentrazione corretto C_{burro} (kg/t di burro)

$$C_{burro} = C_{grasso} \times F$$

dove F è il tenore di grasso del burro.

9. PRECISIONE

Maggiori dettagli di una prova interlaboratorio sul burro secondo le norme ISO 5725-1 e ISO 5725-2 sui metodi di precisione figurano al punto 12.

I valori dei limiti di ripetibilità e riproducibilità sono espressi con un grado di probabilità del 95 % e non possono applicarsi a fasce di concentrazione e a matrici diverse da quelle date.

9.1. **Ripetibilità**

Le differenze assolute tra due singoli risultati analitici, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico nello stesso laboratorio dallo stesso operatore utilizzando la stessa attrezzatura entro un breve intervallo di tempo saranno superiori a 0,35 kg/t in un numero di casi non maggiore del 5 %.

9.2. **Riproducibilità**

Le differenze assolute tra due singoli risultati di prova, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico in laboratori diversi da operatori diversi utilizzando attrezzature diverse saranno superiori a 0,66 kg/t in un numero di casi non maggiore del 5 %.

10. LIMITI DI TOLLERANZA: LIMITI INFERIORI (CASO DI QUANTITÀ INSUFFICIENTI)

10.1. **Per verificare che l'aggiunta di rivelatori sia stata effettuata correttamente, dal prodotto marcato devono essere prelevati tre campioni**

10.2. **Burro e burro concentrato**

10.2.1. Il tasso di incorporazione è di 11 kg di trigliceride di acido enantico puro al 95 % almeno per tonnellata di burro, ovvero 10,45 kg

10.2.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso ottenuto è confrontato con i seguenti limiti:

— 9,51 kg/t (95 % del tasso minimo di incorporazione di trigliceride dell'acido enantico puro al 95 %, singola determinazione)

— 6,89 kg/t (70 % del tasso minimo di incorporazione di trigliceride dell'acido enantico puro al 95 %, singola determinazione)

— la concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione rispettivamente tra 9,51 kg/t e 6,89 kg/t

10.3. **Crema**

10.3.1. Il tasso di incorporazione è di 10 kg di trigliceride di acido enantico puro al 95 % almeno per tonnellata di materia grassa del latte, ovvero 9,50 kg/t di materie grasse del latte contenenti rivelatori.

10.3.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso ottenuto è confrontato con i seguenti limiti:

— 8,60 kg/t (95 % del tasso minimo di incorporazione di trigliceride dell'acido enantico puro al 95 %, singola determinazione)

— 6,23 kg/t (70 % del tasso minimo di incorporazione di trigliceride dell'acido enantico puro al 95 %, singola determinazione)

▼B

— la concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione rispettivamente tra 8,60 kg/t e 6,23 kg/t

11. LIMITI DI TOLLERANZA: LIMITI SUPERIORI (IN CASO DI QUANTITÀ SUPERIORE DI OLTRE IL 20 %)

11.1. **Per verificare che l'aggiunta di rivelatori sia stata effettuata correttamente, dal prodotto marcato devono essere prelevati tre campioni.**

11.2. **Burro e burro concentrato**

11.2.1. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; la media di questi risultati è confrontata con i seguenti limiti:

— il limite superiore è pari a 12,96 kg/t

11.3. **Crema**

11.3.1. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; la media di questi risultati è confrontata con i seguenti limiti:

— il limite superiore è pari a 11,82 kg/t

12. INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI: ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI DELL'ANALISI DEI TRIGLICERIDI PER LA DETERMINAZIONE DI TRIEPTANOATO NEL GRASSO BUTIRRICO

Sono state effettuate quattro prove collaborative per determinare il tenore di trieptanoato nel burro contenente rivelatori.

Al primo test circolare hanno partecipato nove laboratori senza che siano state fornite specifiche dei metodi analitici da utilizzare.

Al secondo test circolare hanno partecipato 10 laboratori e sono stati applicati quattro metodi diversi:

— Quantificazione del metileptanoato utilizzando come standard interno n-nonano o metilnonanoato

— Quantificazione di trieptanoato utilizzando come standard interno il tricaproato

— Quantificazione di metileptanoato usando un campione/una miscela di taratura

— Quantificazione di metileptanoato usando una miscela di taratura.

Inoltre nel caso in cui siano stati analizzati i FAME (esteri metilici degli acidi grassi) sono stati utilizzati due diversi procedimenti di metilazione (De Francesco e Christopherson & Glass).

In base ai risultati ottenuti sono stati selezionati due metodi per eseguire il terzo test circolare:

— Quantificazione del metileptanoato utilizzando come standard interno n-nonano o metilnonanoato

— Quantificazione di trieptanoato utilizzando come standard interno il tricaproato.

I risultati di sette laboratori hanno evidenziato che il metodo FAME ha dato esito ad una maggiore variabilità e di conseguenza si è deciso di utilizzare solo la determinazione dei trigliceridi di trieptanoato seguendo il procedimento della quantificazione q di trieptanoato utilizzando come standard interno il tricaproato. Inoltre, l'analisi del trigliceride deve essere effettuata con la colonna capillare.

Nel quarto test circolare nove laboratori hanno esaminato quattro campioni (A, B, C, D); i risultati sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

▼B

Due laboratori (DE e UE) hanno analizzato i campioni utilizzando il metodo FAME.

Visto lo scarso numero di laboratori il calcolo statistico è stato compiuto sia sulla gamma completa (figure 1 e 2) di dati, includendo i risultati dei FAME, sia sui dati ottenuti dall'analisi dei TG.

Prove per i valori erratici

— Campione A: i test di Dixon, Cochran e Grubbs ai livelli 1 e 5 %, hanno evidenziato un valore erratico di laboratorio.

— Campione B: il test di Grubbs al livello 5 % ha evidenziato un valore erratico di laboratorio.

— Campione C: i test di Dixon e Grubbs ai livelli 1 e 5 %, hanno evidenziato un valore erratico di laboratorio.

— Campione D: i test di Dixon e Grubbs ai livelli 1 e 5 %, hanno evidenziato un valore erratico di laboratorio.

Il valore erratico è stato escluso dal calcolo.

Va notato che i risultati ottenuti col metodo FAME non sono mai stati considerati come valori erratici nelle prove eseguite.

Parametri di precisione

Nelle tabelle 1 e 2 figurano i risultati di tutti i laboratori e i parametri di precisione calcolati su un numero accettabile (8) di laboratori, ma sfortunatamente non ottenuti con lo stesso metodo analitico.

Le tabelle 3 e 4 indicano i risultati ottenuti esclusivamente con il metodo dei TG e i corrispondenti parametri di precisione. L'accettazione di questi parametri è subordinata all'accettazione del basso numero di laboratori (6).

Le figure 2 e 3 indicano la tendenza di Sr e SR calcolata per i 4 campioni dei 2 gruppi di dati sopra descritti.

La tabella 5 indica i valori di Sr e SR con i corrispondenti valori raggruppati e i parametri generali r e R.

Infine è stata calcolata la differenza critica con la probabilità del 95 %.

Tabella 1

Risultati statistici dei metodi TG + FAME*

Campione A		R_1	R_2	Media	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Valori erratici	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Valore medio	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valore vero	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Ripetibilità r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Ripetibilità relativa r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,23
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	2,04
					Riproducibilità R (95 %)	0,84
					Riproducibilità relativa R %	5,71

▼B

Campione B		R_1	R_2	Media	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Valori erratici	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Valore medio	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valore vero	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Ripetibilità r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Ripetibilità relativa r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,35
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	2,61
					Riproducibilità R (95 %)	0,99
					Riproducibilità relativa R %	7,31

Tabella 2

Risultati statistici dei metodi TG + FAME*

Campione C		R_1	R_2	Media	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Valori erratici	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Valore medio	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valore vero	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Ripetibilità r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Ripetibilità relativa r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,17
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	1,82
					Riproducibilità R (95 %)	0,47
					Riproducibilità relativa R %	5,10
Campione D		R_1	R_2	MEDIA	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Valori erratici	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Valore medio	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valore vero	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Ripetibilità r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Ripetibilità relativa r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,24
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	11,43
					Riproducibilità R (95 %)	0,67
					Riproducibilità relativa R %	32,00

▼B

Tabella 3

Risultati statistici dei metodi TG + FAME*

Campione A		R_1	R_2	Media	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Valori erratici	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valore medio	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Valore vero	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Ripetibilità r (95 %)	0,25
					Ripetibilità relativa r %	2,24
					Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,13
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	1,16
					Riproducibilità R (95 %)	0,36
					Riproducibilità relativa R %	3,25
Campione B		R_1	R_2	Media	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Valori erratici	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valore medio	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Valore vero	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Ripetibilità r (95 %)	0,42
					Ripetibilità relativa r %	3,16
					Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,33
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	2,48
					Riproducibilità R (95 %)	0,93
					Riproducibilità relativa R %	6,94

Tabella 4:

Risultati statistici del metodo TG

Campione C		R_1	R_2	Media	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Valori erratici	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valore medio	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Valore vero	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Ripetibilità r (95 %)	0,42
					Ripetibilità relativa r %	4,51
					Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,19
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	2,04
					Riproducibilità R (95 %)	0,53
					Riproducibilità relativa R %	5,71

▼B

Campione D		R_1	R_2	Media	N. di laboratori selezionati previa esclusione dei valori erratici	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	N. di valori erratici	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Valori erratici	DK
					Valore medio	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valore vero	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Deviazione standard di ripetibilità (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) (%)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Ripetibilità r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Ripetibilità relativa r %	12,01
					Deviazione standard di riproducibilità (SR)	0,25
					Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) (%)	11,90
					Riproducibilità R (95 %)	0,69
					Riproducibilità relativa R %	33,32

Tabella 5

Ripetibilità e riproducibilità (metodo FAME*)

	N. di laboratori	Valori erratici	Ripetibilità Sr (95 %)	Riproducibilità SR (95 %)
Campione A	8	1	0,09	0,23
Campione B	8	1	0,14	0,35
Campione C	8	1	0,14	0,17
Campione D	8	1	0,08	0,24
Valore collettivo			0,116	0,256
			R	**R**
Valore collettivo* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 =0,40
Purezza minima dichiarata del trieptanoato = 95 %
Limite minimo dichiarato del trieptanoato nel grasso butirrico = 11 kg/t
Se si prende in considerazione la differenza critica per una probabilità del 95 %, la media dei due risultati non deve essere inferiore a:

10,05 kg/t nel caso che sia incorporato trieptanoato puro al 95 %.

Ripetibilità e riproducibilità (senza FAME)

	N. di laboratori	Valori erratici	Ripetibilità Sr (95 %)	Riproducibilità SR (95 %)
Campione A	6	1	0,09	0,13
Campione B	6	1	0,15	0,33
Campione C	6	1	0,15	0,19
Campione D	6	1	0,09	0,25
Valore collettivo			0,124	0,237
			r	**R**
Valore collettivo* 2,8			**0,347**	**0,663**

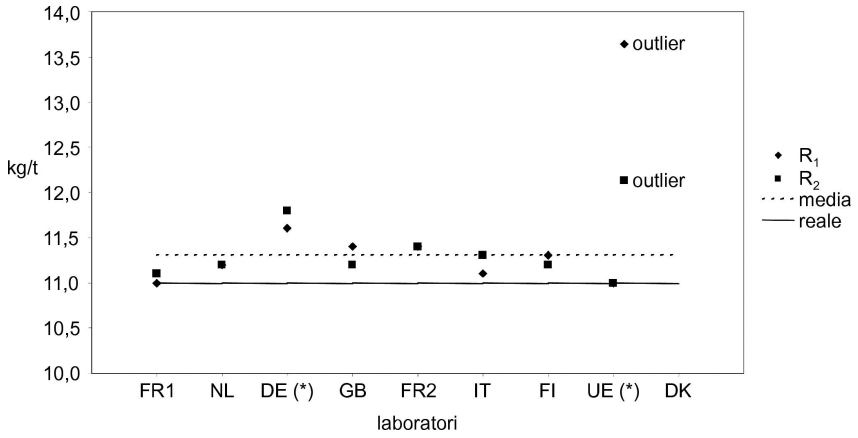
CrD95 = 0,36
Purezza minima dichiarata del trieptanoato = 95 %
Limite minimo dichiarato del trieptanoato nel grasso butirrico = 11 kg/t
Se si prende in considerazione la differenza critica per una probabilità del 95 %, la media dei due risultati non deve essere inferiore a:

10,09 kg/t nel caso che sia incorporato trieptanoato puro al 95 %.

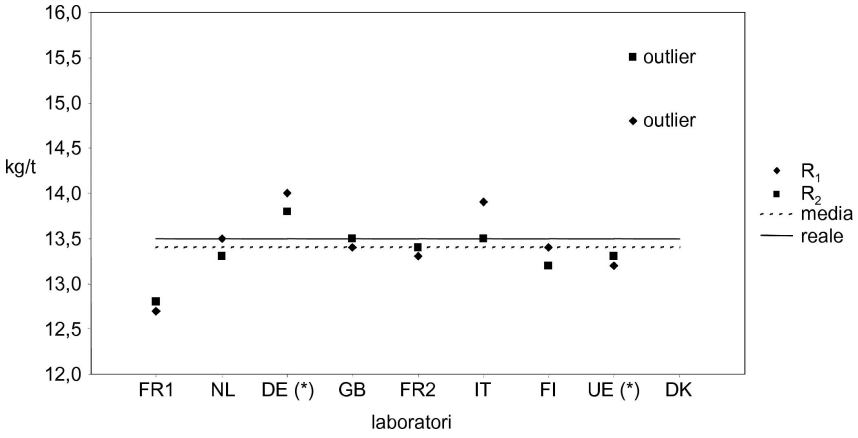
▼B

Figura 1 (*)

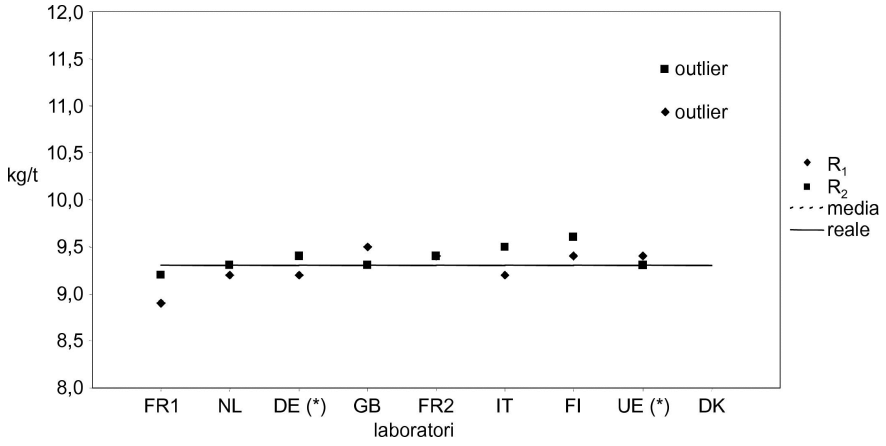
Risultati sperimentali: campione A



Risultati sperimentali: campione B



Risultati sperimentali: campione C



(*) = metodo FAME.

▼B

Risultati sperimentali: campione D

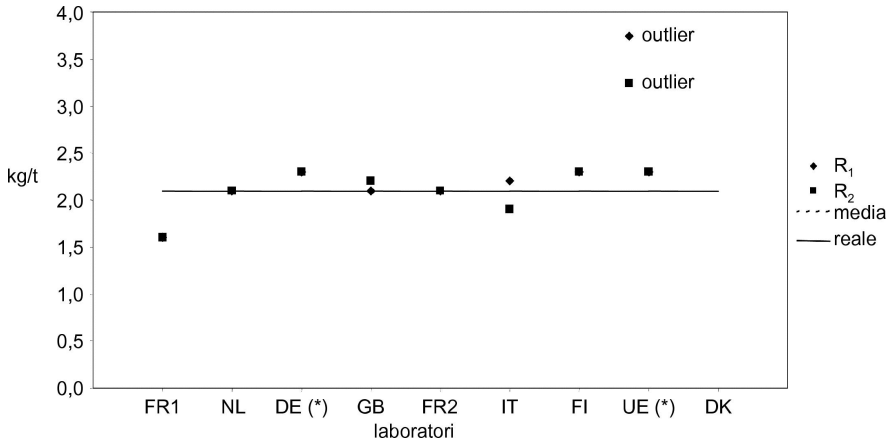


Figura 2

Deviazione standard di ripetibilità e di riproducibilità a diversi livelli (TG + FAME)

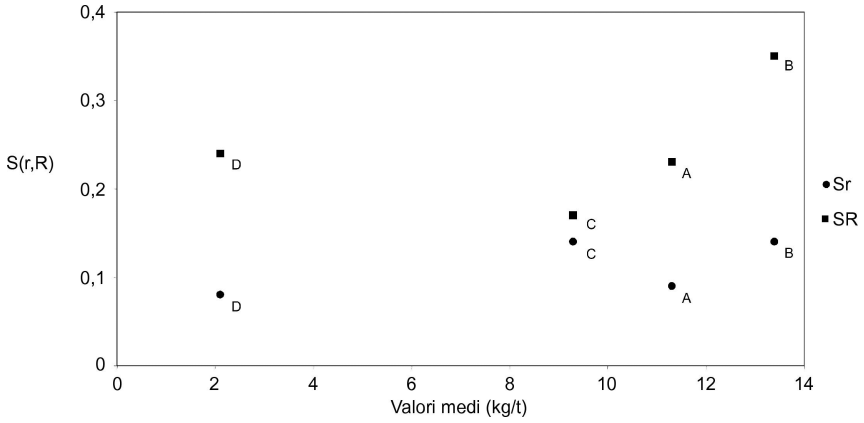
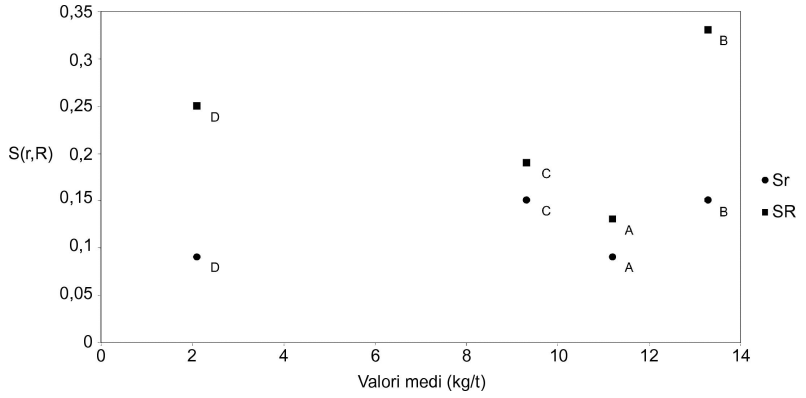


Figura 3

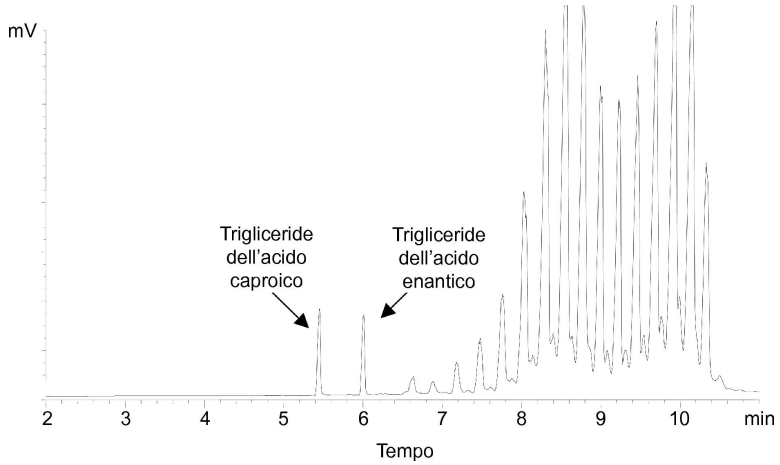
Deviazione standard di ripetibilità e di riproducibilità a diversi livelli (TG)



▼B

Figura 4

Esempio con l'uso di un iniettore in colonna



▼B

ALLEGATO VI

(Articolo 5)

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN VANILLINA NEL BURRO CONCENTRATO, NEL BURRO O NELLA CREMA, PER CROMATOGRAFIA IN FASE LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione quantitativa del contenuto di vanillina nel burro concentrato, nel burro o nella crema.

2. PRINCIPIO

Estrazione di una quantità nota di campione con una miscela di isopropanolo/etanolo/acetonitrile (1:1:2). Precipitazione della maggior parte del grasso per raffreddamento fra – 15 °C e – 20 °C e successiva centrifugazione.

Dopo diluizione con acqua, determinazione del contenuto in vanillina per cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC).

3. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura di laboratorio, in particolare:

3.1. congelatore, campo di temperatura da – 15 °C a – 20 °C

3.2. siringhe a perdere, della capacità di 2 ml

3.3. microfiltri a membrana con pori da 0,45 μm e resistenti a una soluzione contenente il 5 % della soluzione di estrazione (4.4)

3.4. sistema di cromatografia in fase liquida, consistente in una pompa (della portata di 1,0 ml/min), un iniettore (iniezione da 20 μl, automatica o manuale), un rivelatore UV (funzionante a 306 nm, fondo scala a 0,01 Å), un registratore o integratore e un termostato a colonna funzionante a 25 °C

3.5. colonna analitica (250 mm × 4,6 mm d.i.), riempita con LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) o equivalente

3.6. colonna di guardia (ca. 20 mm × 3 mm d.i.), riempita a secco con LiChrospher RP 18 (5-10 μm) od equivalente

3.7. centrifuga a 2 000 rpm

4. REAGENTI

Tutti i reagenti impiegati debbono essere di purezza analitica riconosciuta.

4.1. Isopropanolo

4.2. Etanolo 96 % (v/v)

4.3. Acetonitrile

4.4. Soluzione di estrazione

Mescolare isopropanolo (4.1), etanolo (4.2) ed acetonitrile (4.3) nel rapporto 1:1:2 (v/v).

4.5. Vanillina (4-idrossi-3-metossibenzaldeide) ≥ 98 %

4.5.1. *Soluzione madre di vanillina (= 500 μg/ml)*

In un matraccio tarato da 100 ml, pesare 50 mg circa (CM mg) di vanillina (4.5) con la precisione di 0,1 mg; aggiungere 25 ml di soluzione di estrazione (4.4) e portare a volume con acqua.

4.5.2. *Soluzione standard di vanillina (= 10 μg/ml)*

Pipettare 5 ml di soluzione di riserva di vanillina (4.5.1) in un matraccio tarato da 250 ml e portare a volume con acqua.

4.5.3. *Metanolo per HPLC*

4.5.4. *Acido acetico glaciale*

4.5.5. *Acqua per HPLC*

▼B

4.5.6. *Fase mobile HPLC*

In un matraccio tarato da 1 000 ml, miscelare 300 ml di metanolo (4.5.3) con 500 ml circa d'acqua (4.5.5) e 20 ml di acido acetico (4.5.4); portare a volume con acqua (4.5.5). Filtrare per filtro da 0,45 µm (3.3).

5. PROCEDIMENTO

5.1. **Preparazione delle aliquote da analizzare**

5.1.1. *Burro*

Riscaldare il campione fino a fusione incipiente. Evitare il surriscaldamento locale oltre i 30 °C. In ogni caso il burro non si deve separare in due fasi. Quando il campione diventa sufficientemente plastico, renderlo omogeneo agitando. Rimescolare il burro per 15 secondi prima di prelevarne un'aliquota. In un matraccio tarato da 100 ml, pesare 5 g (SM g) di burro, con l'approssimazione di 1 mg.

5.1.2. *Burro concentrato*

Immediatamente prima di prelevare l'aliquota da analizzare, collocare il contenitore col burro concentrato in una stufa a 40-50 °C fino a fusione completa e rendere omogeneo il campione, agitando in senso rotatorio o rimescolando, senza eccedere in energia per evitare la formazione di bolle d'aria. In un matraccio tarato da 100 ml, pesare 4 g (SM g) di burro concentrato, con l'approssimazione di 1 mg.

5.1.3. *Crema*

Riscaldare il campione in bagnomaria o incubatore termostatato a 35-40 °C. Distribuire il grasso in modo omogeneo agitando in senso rotatorio e, se necessario, rimescolando. Portare rapidamente il campione alla temperatura di 20 ± 2 °C. Il campione deve presentarsi omogeneo; in caso contrario, ripetere l'operazione. In un matraccio tarato da 100 ml, pesare 10 g (SM g) di crema, con l'approssimazione di 1 mg.

5.2. **Preparazione della soluzione da analizzare**

Aggiungere 75 ml circa di soluzione di estrazione (4.4) all'aliquota da analizzare (5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3), agitare o scuotere energicamente per 15 minuti circa e portare a volume con la soluzione di estrazione (4.4). Trasferire 10 ml circa di questo estratto in una provetta fornita di tappo. Collocare la provetta nel congelatore (3.1) e lasciar riposare per 30 minuti circa. Centrifugare l'estratto freddo per 5 minuti a 2 000 rpm circa e decantare immediatamente. Lasciare che la soluzione decantata raggiunga la temperatura ambiente. Pipettare 5 ml della soluzione decantata in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con acqua. Filtrare una porzione del liquido per microfiltro a membrana (3.3) usando una siringa (3.2). Il filtrato è pronto per la determinazione HPLC.

5.3. **Taratura**

In un matraccio tarato da 100 ml, pipettare 5 ml della soluzione standard di vanillina (4.5.2). Aggiungere 5 ml di soluzione di estrazione (4.4) e portare a segno con acqua. Questa soluzione contiene 0,5 µg/ml di vanillina.

5.4. **Determinazione HPLC**

Lasciar stabilizzare il sistema cromatografico per 30 minuti circa. Iniettare la soluzione standard (5.3). Ripetere l'operazione finché la differenza di area o di altezza dei picchi fra due iniezioni successive è inferiore al 2 %. Nelle condizioni descritte, il tempo di ritenzione della vanillina è di circa 9 minuti. Analizzare in doppio la soluzione standard (5.3), iniettando 20 µl. Iniettare 20 µl delle soluzioni (5.2). Determinare l'area o l'altezza del picco ottenuto per la vanillina. Ripetere il duplicato della soluzione standard (5.3) dopo dieci iniezioni delle soluzioni (5.2).

6. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare il valore medio delle aree (o delle altezze), (AC), dei picchi per la vanillina associate all'iniezione in doppio effettuata per inquadrare ciascun gruppo di soluzioni (quattro aree o altezze in totale).

▼B

Calcolare il fattore di risposta (R) con la formula:

$$R = AC/CM$$

dove CM rappresenta la massa della vanillina in mg (4.5.1).

Il contenuto (C) di vanillina nel campione esaminato, espresso in mg/kg, è dato dalla formula

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

dove:

AS = area del picco della vanillina del campione esaminato

SM = massa in g del campione esaminato (5.1.1, 5.1.2, 5.1.3).

Nota: Quando si analizza la crema per individuare la vanillina, la concentrazione del rivelatore va espressa in mg rivelatore/kg grasso di latte. A tal fine si moltiplica C per 100/f, dove f è il tenore di grasso in percentuale della crema (m/m).

20 = fattore che tiene conto delle diluizioni dello standard e del campione esaminato

0,96 = fattore di correzione per il contenuto in grasso nella prima diluizione del campione esaminato

Nota: In luogo delle aree dei picchi, si possono impiegare le rispettive altezze (cfr. 8.3).

7. PRECISIONE DEL METODO

7.1. **Ripetibilità (r)**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile dallo stesso operatore con la stessa apparecchiatura su un materiale da analizzare identico non deve superare 16 mg/kg.

7.2. **Riproducibilità (R)**

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori in laboratori diversi, impiegando apparecchiature diverse su materiali identici, non deve superare 27 mg/kg.

8. LIMITI DI TOLLERANZA

8.1. Dal prodotto a cui sono stati aggiunti rivelatori devono essere prelevati tre campioni per controllarne l'omogeneità.

8.2. Rivelatore ottenuto partendo dalla vaniglia naturale o dalla vanillina sintetica.

8.2.1. La quantità di 4-idrossi-3-metossibenzaldeide da incorporare è di 250 grammi per tonnellata di burro concentrato o di burro. Nel caso della crema, il tasso di incorporazione è di 250 g/t di grasso di latte.

8.2.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 220,8 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione),

— 158,3 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione).

La concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 220,8 mg/kg e 158,3 mg/kg.

8.3. Tracciante ottenuto esclusivamente a partire da baccelli di vaniglia o loro estratti integrali.

8.3.1. La quantità di 4-idrossi-3-metossibenzaldeide da incorporare è di 100 grammi per tonnellata di burro concentrato o di burro. Nel caso della crema, il tasso di incorporazione è di 100 g/t di grasso di latte.

▼B

8.3.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 78,3 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione),

— 53,3 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione).

La concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 78,3 mg/kg e 53,3 mg/kg.

9. NOTE

9.1. Il recupero della vanillina aggiunta al livello di 250 mg/kg di butteroil varia da 97,0 a 103,8. Il contenuto medio ritrovato è risultato essere del 99,9 % con una deviazione standard del 2,7 %.

9.2. La soluzione standard contiene il 5 % di soluzione di estrazione per compensare l'allargamento del picco provocato dalla presenza del 5 % della soluzione di estrazione nelle aliquote analizzate. Ciò consente una quantificazione attraverso l'altezza del picco.

9.3. L'analisi è fondata su una curva di taratura lineare, con intercetta zero.

9.4. La linearità deve essere controllata impiegando appropriate diluizioni della soluzione standard (4.5.2), la prima volta che si effettua l'analisi e successivamente ad intervalli regolari, nonché dopo ogni modifica o riparazione dell'apparecchiatura HPLC. La vanillina può essere degradata in acido vanillico, divanillina e altre componenti grazie all'attività di enzimi intrinseci nella crema non pastorizzata o suoi prodotti.

▼B

ALLEGATO VII

(Articolo 5)

DETERMINAZIONE PER SPETTROMETRIA DELL'ESTERE ETILICO DELL'ACIDO BETA-APO-8'-CAROTENICO NEL BURRO E NEL BURRO CONCENTRATO

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione quantitativa dell'estere etilico dell'acido beta-apo-8'-carotenico (estere apocarotenico) nel burro e nel burro concentrato. L'estere apocarotenico è la somma di tutte le sostanze presenti in un estratto di campioni ottenuto nelle condizioni descritte nel metodo e che assorbe luce di lunghezza d'onda 440 nm.

2. PRINCIPIO

Il grasso di burro viene sciolto in etere di petrolio e l'assorbanza è misurata a 440 nm. Il tenore di estere apocarotenico viene determinato ad uno standard esterno.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Pipette graduate da 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 ml

3.2. Spettrofotometro utilizzabile a 440 nm (e da 447 a 449 nm) e munito di celle con cammino ottico di 1 cm

3.3. Palloni volumetrici, ad esempio da 20 ml e da 100 ml

3.4. Bilancia analitica, con risoluzione di 0,1 mg, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con leggibilità di 0,1 mg

3.5. Forno regolato su 45 °C ± 1 °C

3.6. Filtri circolari senza ceneri

4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta.

4.1. Sospensione di estere apocarotenico (circa 20 %)

4.1.1. Determinare il tenore della sospensione come segue:

Riscaldare la sospensione tra 45 °C e 50 °C e mescolare nel contenitore originale chiuso. In un matraccio (100 ml) pesare con precisione 400 mg, disciogliere in 20 ml di cloroformio (4.4) e portare a volume con cicloesano (4.5). Diluire 5 ml di questa soluzione portandola a 100 ml con cicloesano (soluzione A). Diluire 5 ml della soluzione A portandola a 100 ml con cicloesano. Misurare l'assorbanza a 447-449 nm (misurare il massimo in rapporto al cicloesano come bianco, utilizzando celle con cammino ottico di un 1 cm).

Tenore di estere apocarotenico P (%) = (Abs max × 40 000)/(M_{susp} × 2 550) **o** svolgere: (Abs_{max} / 2 550) × (100/5) × (100/5) × (100/M_{susp})

Abs_{max} = assorbenza della soluzione in esame al massimo

M_{susp} = massa della sospensione (g)

2 550 = valore di riferimento Abs (1 %, 1 cm)

P = purezza (tenore) della sospensione (%)

▼B

Nota La sospensione di estere apocarotenico è sensibile all'aria, al calore e alla luce; può essere conservata per circa 12 mesi nel suo contenitore originale chiuso (sigillato sotto azoto), in luogo fresco; dopo l'apertura, la sospensione deve essere utilizzata entro breve tempo.

4.1.2. Soluzione standard di estere apocarotenico, circa 0,2 mg/ml

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, circa 0,100 g di sospensione di estere apocarotenico (4.1.1) (W), disciogliere in essenza di petrolio (4.2), trasferire quantitativamente in un pallone volumetrico della capacità di 100 ml e portare alla tacca con essenza di petrolio.

Questa soluzione contiene (W × P)/10 mg/ml di estere apocarotenico.

Nota: La soluzione deve essere conservata in luogo fresco e al buio; la soluzione non utilizzata deve essere scartata dopo un mese.

4.2. Essenza di petrolio (40-60 °C)

4.3. Solfato di sodio anidro, granulare, preventivamente essiccato a 102 °C per 2 ore

4.4. Cloroformio

4.5. Cicloesano

5. PROCEDIMENTO

5.1. **Preparazione del campione da analizzare**

5.1.1. *Burro concentrato*

Fondere il campione in un forno a circa 45 °C.

5.1.2. *Burro*

Fondere il campione in un forno a circa 45 °C e filtrarne una parte rappresentativa attraverso un filtro contenente circa 10 g di solfato di sodio anidro (4.3), in ambiente protetto da luce naturale e artificiale forte, alla temperatura di 45 °C. Raccogliere una quantità opportuna di materia grassa butirrica.

5.2. **Determinazione**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, circa 1 g di burro concentrato [o di materia grassa butirrica estratta (5.1.2)], (M). Trasferire quantitativamente in un pallone volumetrico da 20 ml (V) usando essenza di petrolio (4.2); portare alla tacca e miscelare accuratamente.

Trasferirne una parte in una cella da 1 cm e misurare l'assorbanza a 440 nm, in rapporto ad un bianco di essenza di petrolio. Ottenere la concentrazione di estere apocarotenico nella soluzione, per riferimento al diagramma di taratura (C µg/ml).

5.3. **Taratura**

Pipettare 0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 ml di soluzione standard di estere apocarotenico (4.1.2) in cinque palloni volumetrici da 100 ml. Diluire a volume con essenza di petrolio (4.2) ed agitare.

Le concentrazioni approssimative delle soluzioni vanno da 0 a 2 µg/ml e sono calcolate accuratamente per riferimento alla concentrazione della soluzione standard (4.1.2) (W × P)/10 mg/ml. Misurare le assorbanze a 440 nm in rapporto ad un bianco di essenza di petrolio (4.2).

Riportare su un diagramma i valori dell'assorbanza (asse delle y) in funzione della concentrazione di estere apocarotenico (asse delle x). Calcolare l'equazione della curva tipo.

▼B

6. CALCOLO DEI RISULTATI

6.1. Il tenore di estere apocarotenico, espresso in mg/kg di prodotto, è dato da:

Burro concentrato: (C × V)/M

Burro: 0,82 (C × V)M

dove:

C = tenore di estere apocarotenico (μg/ml) letto sul diagramma di taratura (5.3)

V = volume (ml) della soluzione da analizzare (5.2)

M = massa (g) della porzione da analizzare (5.2)

0,82 = fattore di correzione per il tenore di grasso butirrico del burro

7. PRECISIONE DEL METODO

7.1. **Ripetibilità**

7.1.1. *Analisi del burro*

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile dallo stesso operatore con la stessa apparecchiatura su un materiale da analizzare identico non deve superare 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Analisi del burro concentrato*

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile dallo stesso operatore con la stessa apparecchiatura su un materiale da analizzare identico non deve superare 1,6 mg/kg.

7.2. **Riproducibilità**

7.2.1. *Analisi del burro*

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori in laboratori diversi, impiegando apparecchiature diverse su materiali identici, non deve superare 4,7 mg/kg.

7.3. **Analisi del burro concentrato**

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori in laboratori diversi, impiegando apparecchiature diverse su materiali identici, non deve superare 5,3 mg/kg.

7.4. **Fonte dei dati relativi alla precisione**

I dati di precisione sono stati determinati mediante un esperimento eseguito nel 1995, cui hanno partecipato 11 laboratori, su 12 campioni marcati (6 prove in doppio cieco) per il burro e altrettanti 12 campioni marcati (6 prove in doppio cieco) per il burro concentrato.

8. LIMITI DI TOLLERANZA

8.1. Per verificare che l'aggiunta di rivelatori è stata effettuata correttamente, dal prodotto marcato devono essere prelevati tre campioni.

8.2. **Burro**

8.2.1. Il tasso di incorporazione per il burro, tenendo conto dell'assorbanza di fondo, è 22 mg/kg.

8.2.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 17,7 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione),

— 12,2 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione).

▼B

La concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 17,7 mg/kg e 12,2 mg/kg.

8.3. **Burro concentrato**

8.3.1. Il tasso di incorporazione per il burro concentrato, tenendo conto dell'assorbanza di fondo, è 24 mg/kg.

I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 19,2 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione),

— 13,2 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione).

La concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 19,2 mg/kg e 13,2 mg/kg.

▼B

ALLEGATO VIII

(Articolo 5)

DETERMINAZIONE DEL SITOSTEROLO OPPURE DELLO STIGMASTEROLO NEL BURRO CONCENTRATO O NEL BURRO MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione quantitativa del sitosterolo o dello stigmasterolo nel burro concentrato e nel burro. Il sitosterolo viene considerato come la somma del β-sitosterolo e del 22-diidro-β-sitosterolo, in quanto gli altri sitosteroli vengono considerati irrilevanti.

2. PRINCIPIO

Il burro concentrato o il burro viene saponificato con idrossido di potassio in soluzione etanolica e l'insaponificabile viene estratto con etere etilico.

Gli steroli vengono trasformati in eteri trimetil-sililici ed analizzati mediante gascromatografia su colonna capillare facendo riferimento ad uno standard interno a base di betulino.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Pallone di saponificazione da 150 ml provvisto di condensatore a ricadere con giunti in vetro smerigliato

3.2. Imbuti separatori da 500 ml

3.3. Palloni da 250 ml

3.4. Imbuti livellatori di pressione, da 250 ml o simili, per la raccolta dell'etere etilico di scarto

3.5. Colonna di vetro, da 350 mm × 20 mm, provvista di setto in vetro sinterizzato

3.6. Bagnomaria o cuffia riscaldante

3.7. Fiale da 2 ml

3.8. Gascromatografo idoneo ad essere usato con una colonna capillare e provvisto di un sistema di splittaggio costituito da:

3.8.1. Camera termostatica per colonne, capace di mantenere la temperatura desiderata con una precisione di ±1 °C

3.8.2. Un'unità di vaporizzazione termoregolabile

3.8.3. Un rivelatore a ionizzazione di fiamma ed un convertitore-amplificatore

3.8.4. Un integratore-registratore idoneo ad essere usato con il convertitore-amplificatore (3.8.3).

3.9. Una colonna capillare in silice fusa coperta interamente di BP1 o equivalente (o qualsiasi altra colonna di risoluzione almeno equivalente) su uno spessore uniforme di 0,25 μm; la colonna deve essere in grado di separare i derivati trimetilsililici di lanosterolo e sitosterolo. È idonea una colonna della lunghezza di 12 m e un diametro interno di 0,2 mm

3.10. Microsiringa per gascromatografia, da 1 μl, provvista di ago in acciaio temperato.

4. REAGENTI

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

4.1. Etanolo, avente una purezza di almeno il 95 %.

4.2. Idrossido di potassio, soluzione al 60 %: sciogliere 600 g di idrossido di potassio (minimo 85 %) in acqua e portare al volume di 1 l con acqua.

▼B

4.3. Betulino avente una purezza di almeno il 99 %.

4.3.1. Soluzioni di standard interno di betulino in etere etilico (4.4).

4.3.1.1. La concentrazione della soluzione di betulino usata per la determinazione del sitosterolo deve essere pari a 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. La concentrazione della soluzione di betulino usata per la determinazione dello stigmasterolo deve essere pari a 0,4 mg/ml.

4.4. Etere etilico, di purezza analitica (esente da perossidi o da residui).

4.5. Solfato di sodio anidro, granulare, preventivamente essiccato a 102 °C per 2 ore.

4.6. Reagente sililante, ad esempio TRI-SIL (disponibile presso la Pierce Chemical Co., Cat N. 49001) o equivalente (attenzione: il TRI-SIL è infiammabile, tossico, corrosivo e forse cancerogeno. Il personale di laboratorio deve conoscere i dati di sicurezza relativi al prodotto e prendere le relative precauzioni).

4.7. Lanosterolo

4.8. Sitosterolo, di purezza nota non inferiore al 90 % (P).

Nota 1: La purezza dei materiali standard usati per la taratura deve essere determinata con il metodo di normalizzazione. Si suppone che tutti gli steroli presenti nel campione siano rappresentati sul cromatogramma, che l'area totale dei picchi rappresenti il 100 % dei costituenti sterolici e che gli steroli diano la stessa risposta al rivelatore. La linearità del sistema deve essere convalidata alle gamme di concentrazione che interessano.

4.8.1. Soluzione standard di sitosterolo: preparare una soluzione contenente, con l'approssimazione di 0,001 mg/ml, circa 0,5 mg/ml (W_1) di sitosterolo (4.8) in etere etilico (4.4).

4.9. Stigmasterolo, di purezza nota non inferiore al 90 % (P)

4.9.1. Soluzione standard di stigmasterolo: preparare una soluzione contenente, con l'approssimazione di 0,001 mg/ml, circa 0,2 mg/ml (W_1) di stigmasterolo (4.9) in etere etilico (4.4).

4.10. Miscela per la prova di risoluzione: preparare una soluzione contenente 0,05 mg/ml di lanosterolo (4.7) e 0,5 mg/ml di sitosterolo (4.8) in etere etilico (4.4).

5. PROCEDIMENTO

5.1. **Preparazione di soluzioni standard per cromatografia:**

la soluzione di standard interno (4.3.1) dev'essere aggiunta alla appropriata soluzione standard di sterolo, nello stesso momento in cui viene aggiunta al campione saponificato (cfr. 5.2.2).

5.1.1. Soluzione cromatografica standard di sitosterolo: trasferire 1 ml di soluzione standard di sitosterolo (4.8.1) in ciascuna delle due fiale (3.7) ed eliminare l'etere etilico in corrente di azoto. Aggiungere 1 ml di soluzione di standard interno (4.3.1.1) ed eliminare l'etere etilico in corrente di azoto.

5.1.2. Soluzione cromatografica standard di stigmasterolo: trasferire 1 ml di soluzione standard di stigmasterolo (4.9.1) in ciascuna delle due fiale (3.7) ed eliminare l'etere etilico in corrente di azoto. Aggiungere 1 ml di soluzione di standard interno (4.3.1.2) ed eliminare l'etere etilico in corrente di azoto.

5.2. **Preparazione degli insaponificabili**

5.2.1. Fondere il campione di burro ad una temperatura non superiore a 35 °C, agitare vigorosamente.

Pesare con l'approssimazione di 1 mg, circa 1 g di burro (W_2) o di burro concentrato (W_2) in un pallone da 150 ml (3.1). Aggiungere 50 ml di etanolo (4.1) e 10 ml di soluzione di idrossido di potassio (4.2). Applicare il condensatore a ricadere e scaldare a circa 75 °C per 30 minuti. Staccare il condensatore e raffreddare il pallone a una temperatura prossima a quella ambiente.

▼B

5.2.2. Aggiungere 1 ml di soluzione di standard interno (4.3.1.1) al pallone se si deve determinare il sitosterolo, oppure di soluzione (4.3.1.2) se si deve determinare lo stigmasterolo. Agitare accuratamente. Trasferire quantitativamente il contenuto dei palloni in un imbuto separatore da 500 ml (3.2), sciacquando il pallone alternativamente con 50 ml d'acqua e 250 ml di etere etilico (4.4). Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per due minuti e lasciar separare le fasi. Eliminare lo strato acquoso inferiore e lavare lo strato etereo agitando con 4 successive aliquote d'acqua da 100 ml ciascuna.

Nota 2: Per evitare che si formi un'emulsione, è essenziale che i primi due risciacqui con acqua vengano effettuati delicatamente (10 inversioni). Il terzo risciacquo dev'essere effettuato agitando vigorosamente per 30 secondi. Se si forma un'emulsione, essa può essere dissolta aggiungendo 5-10 ml di etanolo. Se si aggiunge etanolo, è essenziale effettuare due ulteriori lavaggi vigorosi con acqua.

5.2.3. Far passare lo strato etereo limpido, esente da sapone, attraverso una colonna di vetro (3.5) contenente 30 g di solfato di sodio anidro (4.5). Raccogliere l'etere in un pallone di 250 ml (3.3). Aggiungere granuli regolatori d'ebollizione ed evaporare quasi completamente su bagnomaria o cuffia riscaldante avendo cura di raccogliere i solventi di scarto.

Nota 3: Se gli estratti di campione sono portati a completo essiccamento a una temperatura troppo elevata, si possono verificare perdite di sterolo.

5.3. **Preparazione di eteri trimetilsililici**

5.3.1. Trasferire la soluzione eterea che resta nel pallone in una fiala da 2 ml (3.7) con 2 ml di etere etilico ed eliminare l'etere in corrente di azoto. Sciacquare il pallone con altri 2 ml di etere etilico, trasferendo nella fiala ed eliminando ogni volta l'etere in corrente di azoto.

5.3.2. Sililare il campione aggiungendo 1 ml di TRI-SIL (4.6). Chiudere la fiala ed agitare vigorosamente fino a scioglimento. Se lo scioglimento è incompleto, scaldare a 65-70 °C. Far riposare per almeno 5 minuti prima di iniettare nel gascromatografo. Sililare gli standard nello stesso modo dei campioni. Sililare la miscela per la prova di risoluzione (4.10) nello stesso modo dei campioni.

Nota 4: La sililazione deve essere effettuata in ambiente anidro. La sililazione incompleta del betulino è indicata da un secondo picco vicino a quello del betulino.

La presenza di etanolo nella fase di sililazione interferisce con la sililazione stessa. Ciò può derivare da un risciacquo insufficiente nella fase di estrazione. Se questo problema persiste, nella fase di estrazione si può risciacquare per la quinta volta, agitando vigorosamente per 30 secondi.

5.4. **Analisi gascromatografica**

5.4.1. *Scelta delle condizioni operative*

Regolare il gascromatografo conformemente alle istruzioni del fabbricante.

Le condizioni operative sono le seguenti:

— temperatura della colonna: 265 °C

— temperatura dell'iniettore: 265 °C

— temperatura del rivelatore: 300 °C

— flusso del gas di trasporto: 0,6 ml/min

— pressione dell'idrogeno: 84 kPa

— pressione dell'aria: 155 kPa

▼B

— rapporto di splittaggio: da 10:1 a 50:1; il rapporto di splittagio deve essere ottimizzato conformemente alle istruzioni del fabbricante e la linearità della risposta del rivelatore deve essere convalidata sulla gamma di concentrazione che interessa.

Nota 5: È importante soprattutto che l'iniettore venga pulito regolarmente.

— Quantitativo di sostanza iniettata: 1 µl di soluzione di TMSE.

Prima di dare inizio a qualsiasi analisi, far sì che il sistema si riequilibri e che si ottenga una risposta sufficientemente stabile.

Queste condizioni possono essere modificate alla luce delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da ottenere cromatogrammi che rispettino i seguenti requisiti:

— il picco del sitosterolo deve essere opportunamente separato da quello del lanosterolo. La figura 1 mostra un tipico cromatogramma che dovrebbe essere ottenuto da una miscela sililata per la prova di risoluzione (4.10),

— i tempi di ritenzione relativi degli steroli sottoindicati devono essere all'incirca i seguenti:

colesterolo: 1,0

stigmasterolo: 1,3

sitosterolo: 1,5

betulino: 2,5

— il tempo di ritenzione del betulino deve essere di circa 24 minuti.

5.4.2. *Procedimento analitico.*

Iniettare 1 µl di soluzione standard sililata (stigmasterolo o sitosterolo) e regolare i parametri della taratura integrati).

Iniettare un altro µl di soluzione standard sililata per determinare i fattori di risposta relativi al betulino.

Iniettare 1 µl di soluzione di campione sililata e misurare le aree dei picchi. Ogni cromatografia effettuata deve essere preceduta da una iniezione di standard.

A titolo indicativo, ogni cromatologia deve comprendere sei iniezioni di campione.

Nota 6: L'integrazione del picco dello stigmasterolo deve comprendere le eventuali «code», come definito ai punti 1, 2 e 3 della figura 2b.

L'integrazione del picco del sitosterolo deve comprendere l'area del picco del 22-diidro-β-sitosterolo (stigmastanolo) che eluisce immediatamente dopo il sitosterolo (vedi figura 3 b) al momento della valutazione del sitosterolo totale.

6. CALCOLO DEI RISULTATI

6.1. Determinare l'area dei picchi degli steroli e del betulino in entrambi gli standard che precedono e che seguono un campione e calcolare R_1:

R_1 = (area media del picco dello sterolo nello standard)/(area media del picco del betulino nello standard)

Determinare l'area del picco dello sterolo (stigmasterolo o sitosterolo) e quello del betulino nel campione e calcolare R_2:

R_2 = (area del picco dello sterolo nel campione)/(area del picco del betulino nel campione)

W_1 = quantità di sterolo dello standard (mg) contenuto in 1 ml di soluzione standard (4.8.1 oppure 4.9.1)

W_2 = peso del campione (g) (5.2.1)

P = purezza dello sterolo standard (4.8 oppure 4.9)

▼B

Tenore di sterolo del campione (mg/kg) = $[(R_2) / (R_1)] \times [(W_1) / (W_2)] \times P \times 10$

7. PRECISIONE DEL METODO

7.1. **Burro**

7.1.1. *Ripetibilità*

7.1.1.1. Stigmasterolo

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile dallo stesso operatore con la stessa apparecchiatura su un materiale da analizzare identico non deve superare 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterolo

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile dallo stesso operatore con la stessa apparecchiatura su un materiale da analizzare identico non deve superare 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Riproducibilità*

7.1.2.1. Stigmasterolo

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori in laboratori diversi, impiegando apparecchiature diverse su materiali identici, non deve superare 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterolo

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori di diversi laboratori, facendo uso di apparecchiature diverse su un identico materiale di prova non deve superare l'8,7 % rispetto alla media delle determinazioni.

7.1.3. *Fonte dei dati relativi alla precisione*

I dati di precisione sono stati determinati con un esperimento eseguito nel 1992 e comprendente 8 laboratori e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per lo stigmasterolo e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per il sitosterolo.

7.2. **Burro concentrato**

7.2.1. *Ripetibilità*

7.2.1.1. Stigmasterolo

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile dallo stesso operatore con la stessa apparecchiatura su un materiale da analizzare identico non deve superare 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterolo

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile, da un solo operatore che usa la stessa apparecchiatura su un materiale di prova identico non deve superare il 3,6 % rispetto alla media delle determinazioni.

7.2.2. *Riproducibilità*

7.2.2.1. Stigmasterolo

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori in laboratori diversi, impiegando apparecchiature diverse su materiali identici, non deve superare 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterolo

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori di diversi laboratori, impiegando apparecchiature diverse su materiali identici, non deve superare l'8,9 % rispetto alla media delle determinazioni.

▼B

7.2.3. *Fonte dei dati relativi alla precisione*

I dati di precisione sono stati determinati con un esperimento eseguito nel 1991 e comprendente 9 laboratori e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per lo stigmasterolo e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per il sitosterolo.

8. LIMITI DI TOLLERANZA

8.1. Per verificare che l'aggiunta di rivelatori è stata effettuata correttamente, dal prodotto marcato devono essere prelevati tre campioni.

8.2. **Burro**

8.2.1. *Stigmasterolo*

8.2.1.1. Il tasso di incorporazione relativo allo stigmasterolo è di 150 g di stigmasterolo puro ad almeno il 95 % per tonnellata di burro, cioè 142,5 mg/kg oppure 170 g di stigmasterolo puro ad almeno l'85 % per tonnellata di burro cioè 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 115,8 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %).

La concentrazione di rivelatore del campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 115,8 mg/kg e 80,1 mg/kg o rispettivamente tra 117,7 mg/kg e 81,5 mg/kg.

8.2.2. *Sitosterolo*

8.2.2.1. Il tasso di incorporazione per il sitosterolo è di 600 g di sitosterolo puro ad almeno il 90 % per tonnellata di burro, ovvero di 540 mg/kg.

8.2.2.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 482,6 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione per sitosterolo puro al 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione per sitosterolo puro al 90 %).

La concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 482,6 mg/kg e 347,6 mg/kg.

8.3. **Burro concentrato**

8.3.1. *Stigmasterolo*

8.3.1.1. Il tasso di incorporazione relativo allo stigmasterolo è di 150 g di stigmasterolo puro ad almeno il 95 % per tonnellata di burro concentrato, cioè 142,5 mg/kg oppure 170 g di stigmasterolo puro ad almeno l'85 % per tonnellata di burro concentrato, cioè 144,5 mg/kg.

▼B

8.3.1.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 118,5 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %).

La concentrazione di rivelatore del campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 118,5 mg/kg e 82,9 mg/kg o rispettivamente tra 120,4 mg/kg e 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitosterolo*

8.3.2.1. Il tasso di incorporazione per il sitosterolo è di 600 g di sitosterolo puro ad almeno il 90 % per tonnellata di burro concentrato, ovvero di 540 mg/kg.

8.3.2.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni ottenuti dall'analisi del prodotto sono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del rivelatore; il risultato più basso è confrontato con i seguenti limiti:

— 480,9 mg/kg (95 % del tasso minimo di incorporazione per sitosterolo puro al 90 %),

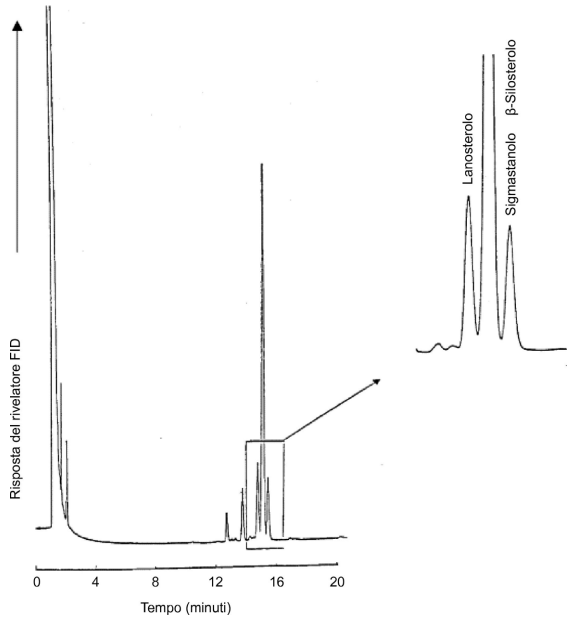
— 345,9 mg/kg (70 % del tasso minimo di incorporazione per sitosterolo puro al 90 %).

La concentrazione di rivelatore nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 480,9 mg/kg e 345,9 mg/kg.

Figura 1

Cromatogramma della miscela per la prova di risoluzione

É preferibile la risoluzione completa, cioè la traccia del picco relativa al lanosterolo deve raggiungere la linea di base prima di quella del picco del sitosterolo, anche se una risoluzione incompleta è ammissibile.



▼B

Figura 2a
Standard di stigmasterolo

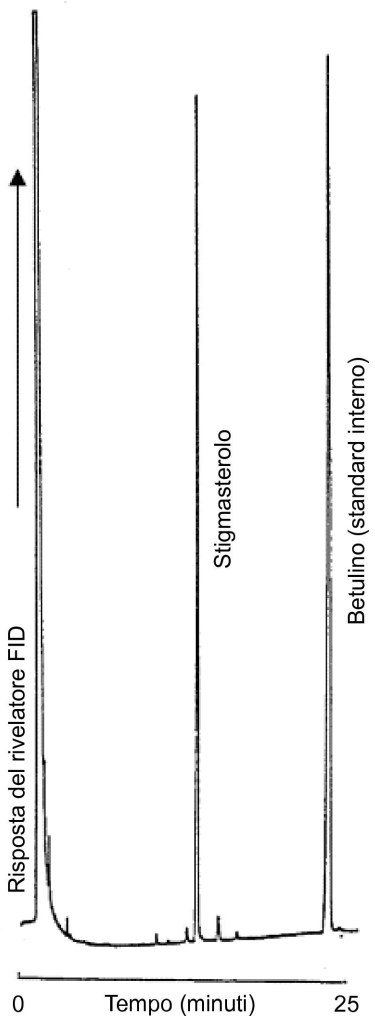
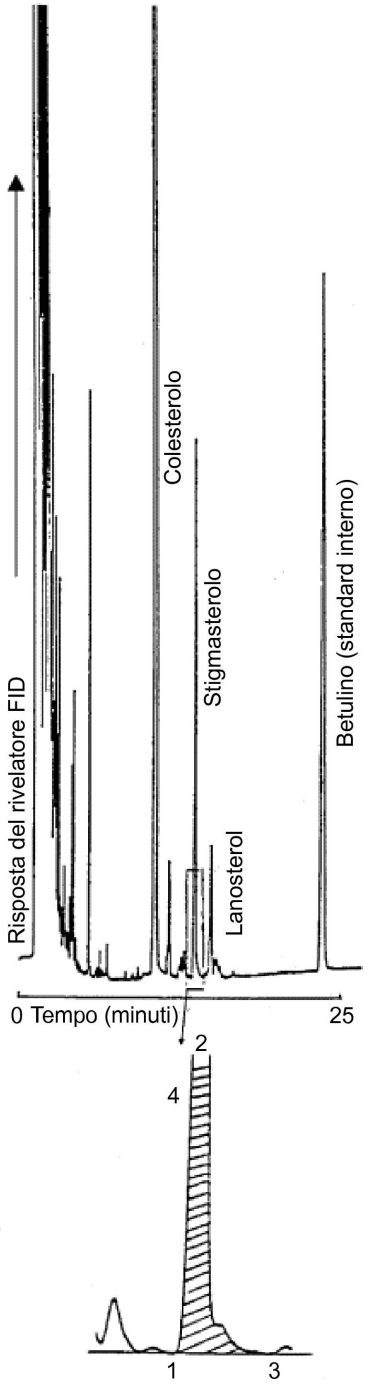


Figura 2b
Campione di burro denaturato con stigmasterolo



Nota: L'integrazione del picco dello stigmasterolo ceve comprendere anche eventuali «code» come definito ai punti 1, 2 e 3.

▼B

Figura 3a
Standard di β-sitosterolo

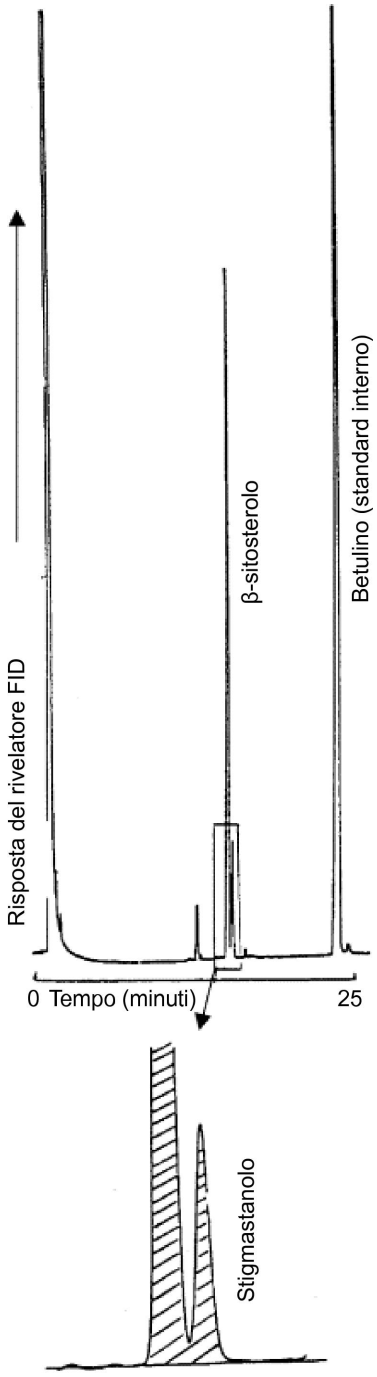
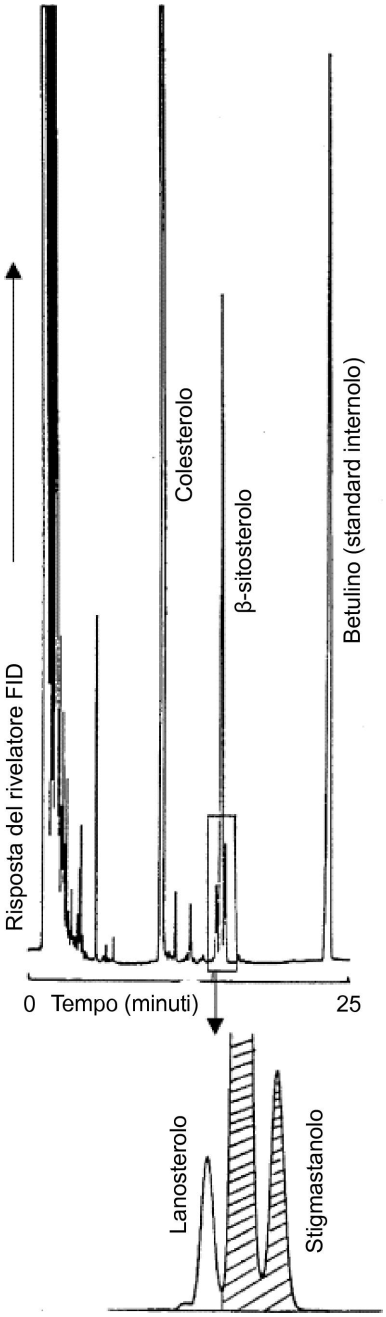


Figura 3b
Campione di burrodenaturato con β-sitosterolo



Nota: Il β-sistosterolo contiene spesso una impurezza (identificata come stigmastanolo) che eluisce immediatamente dopo il β-sitosterolo. Quando si valuta il β-sitosterolo totale presente è necessario sommare le aree di questi due picchi.

▼B

ALLEGATO IX

(Articolo 6)

METODO DI RIFERIMENTO PER LA RIVELAZIONE DI CASEINATO E DI LATTE VACCINI IN FORMAGGI PRODOTTI CON LATTE DI PECORA, DI CAPRA O DI BUFALA O CON MISCELE DI LATTI DI PECORA, DI CAPRA E DI BUFALA

1. OGGETTO

Rivelazione di caseinato e latte vaccini in formaggi di latte di pecora, di capra o di bufala o di miscele di latti di pecora, capra e bufala mediante focalizzazione isoelettrica delle γ-caseine dopo plasminolisi.

2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo è idoneo per una rivelazione sensibile e specifica di latte vaccino crudo o trattato termicamente e di caseinato in formaggi freschi e stagionati di latte di pecora, di capra o di bufala o di miscele di latti di pecora, capra e bufala. Il metodo non è adatto per la rivelazione dell'adulterazione di latte e formaggi mediante concentrati di proteine del siero di latte vaccino trattate termicamente.

3. PRINCIPIO DEL METODO

3.1. Isolamento delle caseine dal formaggio e dagli standard di riferimento.

3.2. Solubilizzazione delle caseine isolate ed azione plasminica sulle stesse (EC.3.4.21.7).

3.3. Focalizzazione isoelettrica delle caseine trattate con plasmina in presenza di urea e colorazione delle proteine.

3.4. Valutazione dei profili di γ_3- e γ_2-caseina (prova della presenza di latte vaccino) per confronto del profilo del campione con quelli ottenuti sullo stesso gel da standard di riferimento contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino.

4. REAGENTI

Salvo dove diversamente indicato, utilizzare solo reagenti chimici per analisi. L'acqua deve essere bidistillata o di purezza equivalente.

Nota: Le indicazioni che seguono valgono per gel di poliacrilammide preparati in laboratorio, contenenti urea, delle dimensioni di 265 × 125 × 0,25 mm. Nel caso vengano utilizzati gel di differenti dimensioni o differente tipo, può rendersi necessario modificare le condizioni di separazione.

Focalizzazione isoelettrica

4.1. **Reagenti per la produzione di gel di poliacrilammide contenenti urea**

4.1.1. *Soluzione madre di gel*

Sciogliere in acqua:

4,85 g di acrilammide

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

48,05 g di urea

15,00 g di glicerolo (87 % p/p),

e portare a 100 ml. Conservare in frigorifero in un flacone di vetro scuro.

▼B

Nota: È preferibile utilizzare una soluzione premiscelata di acrilammide/BIS, disponibile in commercio, invece dei pesi prestabiliti delle acrilammidi neurotossiche. Se una tale soluzione contiene il 30 % p/v di acrilammide e lo 0,8 % p/v di BIS, utilizzare per la formulazione un volume di 16,2 ml invece del peso prestabilito. La soluzione madre può essere conservata per un massimo di 10 giorni; se la sua conducibilità è superiore a 5 μS, deionizzarla agitandola per 30 minuti con 2 g di Amberlite MB-3, poi filtrare attraverso una membrana da 0,45 μm.

4.1.2. *Soluzione di gel*

Preparare una soluzione di gel miscelando additivi e anfoliti con la soluzione madre di gel (4.1.1):

9,0 ml di soluzione madre

24 mg di β-alanina

500 μl di anfolita pH 3,5-9,5 ([1])

250 μl di anfolita pH 5-7 ([1])

250 μl di anfolita pH 6-8 ([1])

Miscelare la soluzione di gel e degassarla per due o tre minuti in un bagno a ultrasuoni o sotto vuoto.

Nota: La soluzione di gel va preparata appena prima dell'uso (cfr. 6.2).

4.1.3. *Soluzioni dei catalizzatori*

4.1.3.1. N, N, N' N' — tetrametiletilendiammina (TEMED)

4.1.3.2. Persolfato d'ammonio (PER) al 40 % p/v:

Sciogliere 800 mg di PER in acqua e portare a 2 ml.

Nota: Usare sempre soluzioni di PER appena preparate.

4.2. **Fluido di contatto**

Cherosene o paraffina liquida

4.3. **Soluzione anodica**

Sciogliere 5,77 g di acido fosforico (85 % p/p) in acqua e portare a 100 ml

4.4. **Soluzione catodica**

Sciogliere 2 g di idrossido di sodio in acqua e portare a 100 ml con acqua.

Preparazione del campione

4.5. **Reagenti per l'isolamento delle proteine**

4.5.1. *Acido acetico diluito (25 ml di acido acetico glaciale portati a 100 ml con acqua).*

4.5.2. *Diclorometano*

4.5.3. *Acetone*

4.6. **Tampone per la solubilizzazione delle proteine**

Sciogliere in acqua:

5,75 g di glicerolo (87 % p/p),

24,03 g di urea

250 mg di ditiotreitolo

e portare al volume di 50 ml.

([1]) Per ottenere la separazione riechiesta delle γ-caseine, si sono dimostrati particolarmente validi i prodotti Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) e Resolyte® pH 5-7 e pH 6-8 (BDH, Merck).

▼B

Nota: Conservare in frigorifero, per una settimana al massimo.

4.7. **Reagenti per la scissione plasmidica delle caseine**

4.7.1. *Tampone di carbonato di ammonio*

Titolare una soluzione di idrogenocarbonato d'ammonio a 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml di acqua) contenente 0,05 mol/l di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, 1,46 g/100 ml), con una soluzione di carbonato d'ammonio a 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml di acqua) contenente 0,05 mol/l EDTA a pH 8.

4.7.2. *Plasmina bovina (EC. 3.4.21.7), attività non minore di 5 U/ml*

4.7.3. *Soluzione di acido ε-amminocapronico per l'inibizione dell'enzima*

Sciogliere 2,624 g di acido ε-amminocapronico (acido 6-ammino-n-esanoico) in 100 ml di etanolo al 40 % (v/v).

4.8. **Standard**

4.8.1. *Standard di riferimento certificati di una miscela di coagulo presamico a partire da latte scremato di pecora e capra contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino possono essere richiesti all'Istituito dei materiali e delle misure di riferimento della Commissione(Institute for Reference Materials and Measurements), B-2440 Geel, Belgio*

4.8.2. *Preparazione di standard di laboratorio provvisori di coagulo presamico di latte di bufala contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino*

Il latte scremato viene preparato mediante centrifugazione di latte crudo di bufala o di vacca, a 37 °C, a 2 500 g per 20 minuti. Dopo aver raffreddato rapidamente a 6-8 °C la provetta e il contenuto, lo strato superiore di grasso viene completamente rimosso. Per la preparazione dello standard all'1 %, aggiungere 5 ml di latte vaccino scremato a 495 ml di latte scremato di bufala in un becher da 1 litro, regolare il pH a 6,4 aggiungendo acido lattico diluito (10 % p/v). Regolare la temperatura su 35 °C e aggiungere 100 µl di caglio di vitello (attività 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), agitare per 1 minuto e poi lasciare a riposo il becher coperto con un foglio di alluminio a 35 °C per 1 ora per permettere la formazione della cagliata. Dopo la formazione della cagliata, liofilizzare l'intero latte coagulato, senza preventiva omogeneizzazione né drenaggio del siero. Dopo la liofilizzazione, macinare finemente fino ad ottenere una polvere omogenea. Per la preparazione dello standard allo 0 %, eseguire la stessa procedura usando latte scremato di bufala puro. Conservare gli standard a – 20 °C.

Nota: È consigliabile controllare la purezza del latte di bufala mediante focalizzazione isoelettrica delle caseine trattate con plasmina prima della preparazione degli standard.

Reagenti per la colorazione delle proteine

4.9. **Fissativo**

Sciogliere 150 g di acido tricloroacetico in acqua e portare a 1 000 ml.

4.10. **Soluzione decolorante**

Portare 500 ml di metanolo e 200 ml di acido acetico glaciale a 2 000 ml con acqua distillata.

Nota: Preparare la soluzione decolorante ogni giorno; per la preparazione si possono utilizzare soluzioni madre di metanolo al 50 % (v/v) e acido acetico glaciale al 20 % (v/v), da miscelare in volumi uguali.

4.11. **Soluzioni coloranti**

4.11.1. *Soluzioni di colorante (soluzione madre 1)*

Sciogliere 3,0 g di blu brillante Coomassie G 250 (C.I. 42655) in 1 000 ml di metanolo al 90 % (v/v) con un agitatore magnetico (circa 45 minuti), filtrare attraverso due filtri a pieghe, a velocità media.

▼B

4.11.2. *Soluzioni di colorante (soluzione madre 2)*

Sciogliere 5 g di solfato di rame pentaidrato in 1 000 ml di acido acetico al 20 % (v/v).

4.11.3. *Soluzioni di colorante (soluzione di lavoro)*

Miscelare 125 ml di ciascuna delle soluzioni madre (4.11.1, 4.11.2) appena prima della colorazione.

Nota: La soluzione colorante deve essere preparata il giorno stesso in cui viene usata.

5. APPARECCHIATURA

5.1. Lastre di vetro (265 × 125 × 4 mm); rullo di gomma (larghezza 15 cm); tavolo con piano regolabile

5.2. Foglio di supporto del gel (265 × 125 mm)

5.3. Foglio di copertura (280 × 125 mm). Applicare una striscia di nastro adesivo (280 × 6 × 0,25 mm) a ciascun bordo lungo (cfr. figura 1).

5.4. Camera di elettrofocalizzazione con piastra di raffreddamento (per esempio 265 × 125 mm) e alimentazione elettrica adatta (≥ 2,5 kV) o dispositivo per elettroforesi automatica

5.5. Criostato a circolazione, con regolazione termostatica su 12 ± 0,5 °C

5.6. Centrifuga regolabile su 3 000 g

5.7. Strisce elettrodiche (lunghezza ≥ 265 mm)

5.8. Flaconi contagocce per le soluzioni anodica e catodica

5.9. Applicatori per campioni (10 × 5 mm, viscosa o carta da filtro a scarso assorbimento di proteine)

5.10. Forbici, bisturi e pinzette in acciaio inossidabile

5.11. Vaschette di colorazione e decolorazione in acciaio inossidabile o vetro (per esempio vassoi portastrumenti da 280 × 150 mm)

5.12. Omogeneizzatore ad asta regolabile (diametro 10 mm), velocità 8 000-20 000 g al minuto

5.13. Agitatore magnetico

5.14. Bagno ad ultrasuoni

5.15. Saldatore per pellicola

5.16. Micropipette da 25 µl

5.17. Concentratore sotto vuoto o liofilizzatore

5.18. Bagnomaria a controllo termostatico regolabile su 35 e 40 ± 1 °C con agitatore

5.19. Densitometro con lettura a λ = 634 nm

6. PROCEDIMENTO

6.1. **Preparazione del campione**

6.1.1. *Isolamento delle caseine*

Pesare una quantità equivalente a 5 g di sostanza secca di formaggio o degli standard di riferimento in una provetta da centrifuga da 100 ml, aggiungere 60 ml di acqua distillata e omogeneizzare con un omogeneizzatore ad asta (8 000- 10 000 rpm). Regolare di pH 4,6 con acido acetico diluito (4.5.1) e centrifugare (5 min, 3 000 g). Decantare il grasso e il siero, omogeneizzare il residuo a 20 000 rpm in 40 ml di acqua distillata portata a pH 4,5 con acido acetico diluito (4.5.1), aggiungere 20 ml di diclorometano (4.5.2), omogeneizzare di nuovo e centrifugare (5 min, 3 000 g). Recuperare con una spatola lo strato di caseina disposto tra la fase acquosa e la fase organica (cfr. figura 2) e separare le due fasi per decantazione. Riomogeneizzare la caseina in

▼B

40 ml di acqua distillata (cfr. sopra) e 20 ml di diclorometano (4.5.2) e centrifugare. Ripetere questo procedimento fino a quando le due fasi di estrazione diventano incolori (2 o 3 volte). Omogeneizzare il residuo proteico con 50 ml di acetone (4.5.3) e filtrare attraverso carta da filtro a pieghe di media velocità. Lavare il residuo sul filtro con due aliquote separate di acetone di 25 ml ciascuna e far essiccare all'aria o in corrente d'azoto, quindi polverizzare finemente nel mortaio.

Nota: Gli isolati di caseina secchi devono essere conservati a – 20 °C.

6.1.2. *Scissione plasminica delle β-caseine per intensificare le bande di γ-caseine*

Disperdere 25 mg di caseine isolate (6.1.1) in 0,5 ml di tampone di carbonato d'ammonio (4.7.1) e omogeneizzare per 20 minuti, ad esempio utilizzando un trattamento ad ultrasuoni. Riscaldare a 40 °C e aggiungere 10 µl di plasmina (4.7.2), miscelare e incubare per 1 ora a 40 °C agitando in continuazione. Per inibire l'enzima, aggiungere 20 µl di soluzione di acido ε-amminocapronico (4.7.3), poi aggiungere 200 mg di urea solida e 2 mg di ditiotreitolo.

Nota: Per ottenere una maggiore simmetria nelle bande di caseina focalizzate, è consigliabile liofilizzare la soluzione dopo aver aggiunto l'acido ε-amminocapronico e disciolto poi i residui in 0,5 ml di tampone di solubilizzazione delle proteine (4.6).

6.2. **Preparazione di gel di poliacrilammide contenenti urea**

Con qualche goccia d'acqua e col rullo stendere il foglio di supporto del gel (5.2) su una lastra di vetro (5.1) rimuovendo l'acqua in eccesso con carta assorbente o con un panno. Con il rullo, stendere il foglio di copertura (5.3) con distanziatori (0,25 mm) su un'altra lastra di vetro nello stesso modo. Posare la lastra orizzontalmente su un piano a livello regolabile.

Aggiungere 10 µl di TEMED (4.1.3.1) alla soluzione di gel preparata e disaerata (4.1.2) agitare e aggiungere 10 µl di soluzione di PER (4.1.3.2), miscelare accuratamente e versare immediatamente in modo regolare sul centro del foglio di copertura. Posizionare un bordo della lastra di supporto del gel (con il lato del foglio in basso) sulla lastra del foglio di copertura e abbassarla lentamente in modo che tra i fogli si formi una pellicola di gel uniforme e senza bolle (figura 3). Abbassare completamente la lastra di supporto del gel con attenzione usando una spatola sottile e porre altre tre lastre di vetro su di essa come pesi. Dopo il completamento della polimerizzazione (circa 60 minuti), rimuovere il gel polimerizzato sul foglio di supporto insieme con il foglio di copertura scostando le lastre di vetro. Pulire accuratamente il rovescio della lastra di supporto per rimuovere residui di gel e urea. Saldare il «sandwich di gel» in una pellicola tubolare e conservare in frigorifero (massimo 6 settimane).

Nota: Il foglio di copertura con i distanziatori può essere riutilizzato. Il gel di poliacrilammide può essere tagliato in porzioni più piccole, cosa raccomandata quando i campioni sono pochi o si utilizza un dispositivo automatico per elettroforesi (2 gel, dimensioni 4,5 × 5 cm).

6.3. **Focalizzazione isoelettrica**

Regolare il termostato di raffreddamento su 12 °C. Detergere il rovescio del foglio di supporto del gel con cherosene, poi far cadere qualche goccia di cherosene (4.2) sul centro del blocco di raffreddamento. Far ruotare su di esso il sandwich di gel con il lato del supporto verso il basso, facendo attenzione che non rimangano bolle. Detergere l'eccesso di cherosene e rimuovere il foglio di copertura. Bagnare le strisce elettrodiche con le soluzioni elettrodiche (4.3, 4.4), tagliarle nel senso della lunghezza del gel e posizionarle nei punti previsti (distanza tra gli elettrodi 9,5 cm).

▼B

Condizioni della focalizzazione isoelettrica

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

Operazione	Tempo (min.)	Tensione (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Volt/ora (Vh)
1. Prefocalizzazione	30	massimo 2 500	massimo 15	cost. 4	c. 300
2. Focalizzazione campione ([1])	60	massimo 2 500	massimo 15	cost. 4	c. 1 000
3. Focalizzazione finale	60	massimo 2 500	massimo 5	massimo 20	c. 3 000
	40	massimo 2 500	massimo 6	massimo 20	c. 3 000
	30	massimo 2 500	massimo 7	massimo 25	c. 3 000

([1]) Applicazione del campione: dopo la prefocalizzazione (fase 1), pipettare 18 µl di soluzioni campione e standard sugli applicatori del campione (10 × 5 mm), posizionarli sul gel a distanze di 1 mm uno dall'altro e a 5 mm di distanza in senso longitudinale dall'anodo e premere leggermente. Eseguire la focalizzazione nelle condizioni suddette rimuovendo con attenzione gli applicatori dei campioni dopo 60 minuti di focalizzazione.

Nota: Se lo spessore o la larghezza del gel vengono modificati, i valori di corrente e potenza devono essere regolati di conseguenza (per esempio raddoppiare i valori della corrente elettrica e della potenza se si utilizza un gel a 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. *Esempio di un programma di tensione per un dispositivo per elettroforesi automatica (2 gel da 5,0 × 4,5 cm), elettrodi senza strisce applicate direttamente al gel*

Operazione	Tensione	Corrente	Potenza	Temp.	Volt/ora
1. Prefocalizzazione	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Focalizzazione campione	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Focalizzazione	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Focalizzazione	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Posizionare l'applicatore del campione nella fase 2 a 0 Vh

Rimuovere l'applicatore del campione nella fase 2 a 30 Vh

6.4. **Colorazione delle proteine**

6.4.1. *Fissaggio delle proteine*

Rimuovere le strisce elettrodiche immediatamente dopo aver interrotto l'alimentazione elettrica e porre il gel immediatamente in una bacinella di colorazione/decolorazione con 200 ml di fissativo (4.9). Lasciare per 15 minuti agitando continuamente.

6.4.2. *Lavaggio e colorazione della lastra di gel*

Eliminare accuratamente il fissativo e lavare la lastra di gel due volte per 30 secondi, ogni volta con 100 ml di soluzione decolorante (4.10). Eliminare la soluzione decolorante e riempire la bacinella con 250 ml di soluzione colorante (4.11.3); lasciar colorare per 45 minuti agitando delicatamente.

6.4.3. *Decolorazione della lastra di gel*

Eliminare la soluzione colorante, lavare due volte la lastra di gel con 100 ml di soluzione decolorante (4.10) ogni volta; agitare con 200 ml di soluzione di decolorazione per 15 minuti e ripetere l'operazione almeno due o tre volte fino a quando il fondo è chiaro e incolore. Risciaquare poi la lastra di gel con acqua distillata (2 × 2 min) e asciugare all'aria per 2 o 3 ore o con un asciugacapelli per 10-15 minuti.

▼B

Nota 1: Eseguire il fissaggio, il lavaggio, la colorazione e la decolorazione a 20 °C. Non usare temperature elevate.

Nota 2: Se si preferisce una colorazione più sensibile con argento (per esempio Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, codice n. 17-1150-01) i campioni di caseina trattata con plasmina devono essere diluiti a 5 mg/ml.

7. VALUTAZIONE

La valutazione è eseguita confrontando i profili proteici del campione sconosciuto con quello dello standard di riferimento sullo stesso gel. La presenza di latte vaccino nei formaggi di latte di pecora, di capra o di bufala e di miscele di latti di pecora, capra e bufala, viene rivelata attraverso le γ_3- e γ_2-caseine, i cui punti isoelettrici sono compresi tra pH 6,5 e pH 7,5 (figure 4a, 4b e 5). Il limite di rivelazione è inferiore allo 0,5 %.

7.1. **Stima visiva**

Per una valutazione visiva della quantità di latte vaccino, è consigliabile regolare le concentrazioni dei campioni e degli standard in modo da ottenere lo stesso livello di intensità delle γ_2- and γ_3-caseine ovine, caprine e/o di bufala (cfr. «γ_2 E,G,B» e «γ_3 E,G,B» nelle figure 4a, 4b e 5). Dopo di ciò, la quantità di latte vaccino (minore, uguale o maggiore dell'1 %) nel campione in esame può venire valutata direttamente confrontando l'intensità delle γ_3- e γ_2-caseine vaccine (cfr. «γ_3 C» e «γ_2 C» nelle figure 4a, 4b e 5) con quella degli standard di riferimento allo 0 % e all'1 % (pecora, capra) o con gli standard provvisori di laboratorio (bufala).

7.2. **Stima densitometrica**

Se disponibile, ricorrere alla densitometria (5.19) per la determinazione del rapporto tra le aree dei picchi delle γ_2- e γ_3-caseine vaccine sulle γ_2- e γ_3-caseine ovine, caprine e/o di bufala (cfr. figura 5). Confrontare questo valore con il rapporto di area dei picchi delle γ_2- e γ_3-caseine dello standard di riferimento all'1 % (pecora, capra) o dello standard provvisorio di laboratorio (bufala) analizzati sullo stesso gel.

Nota: Il metodo è soddisfacente nel caso di un chiaro segnale positivo per le γ_2- e γ_3-caseine vaccine nello standard di riferimento all'1 %, ma non nello standard di riferimento allo 0 %. In caso contrario, ottimizzare la procedura seguendo con estrema precisione i dettagli del metodo.

Un campione è considerato positivo se entrambe le γ_2- e γ_3-caseine vaccine, o i corrispondenti rapporti di area dei picchi, sono uguali o maggiori del livello dello standard di riferimento all'1 %.

8. BIBLIOGRAFIA

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

Disegno schematico del foglio di copertura

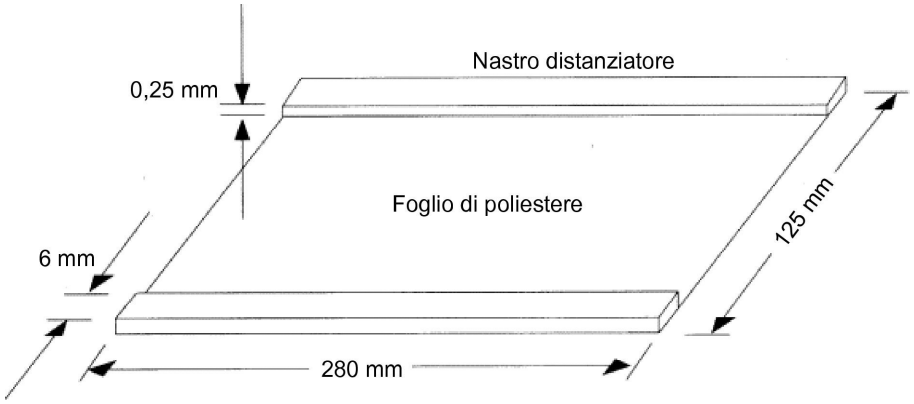


Figura 2

Strato di caseina sospeso tra la fase acquosa e la fase organica dopo centrifugazione

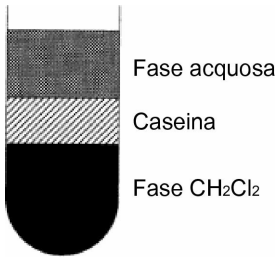
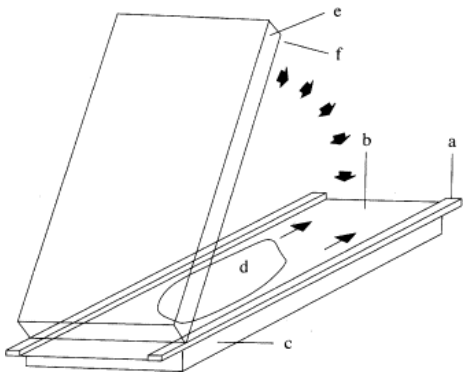


Figura 3

Tecnica per la colata di gel poliacrilammide ultrasottile

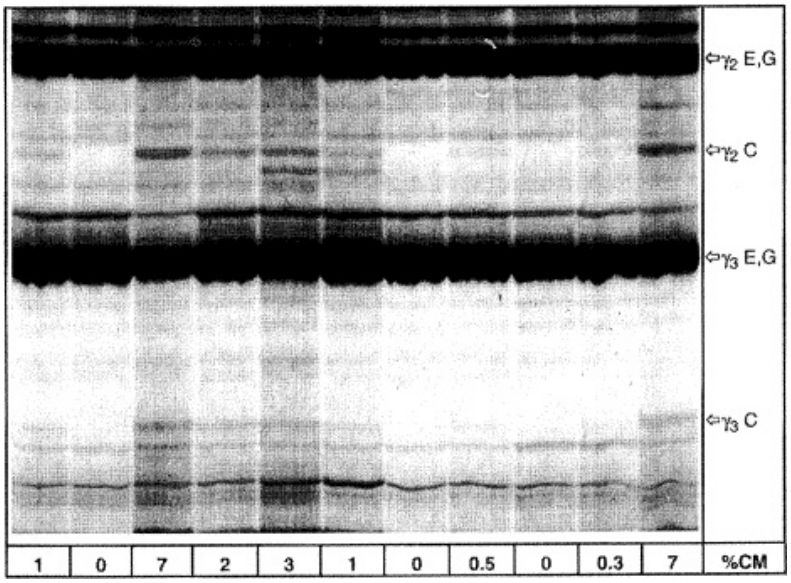


a = nastro distanziatore (0,25 mm); b = foglio di copertura (5.3); c, e = lastre di vetro (5.1); d = soluzione di gel (4.1.2); f = foglio di supporto del gel (5.2)

▼B

Figura 4°

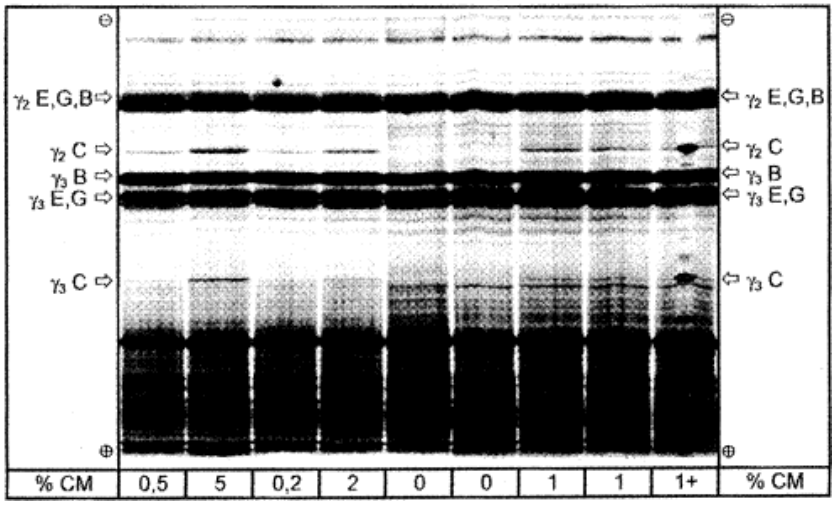
Focalizzazione isoelettrica di caseine di formaggio di latte di pecora e capra contenente varie quantità di latte vaccino trattate con plasmina



% CM = percentuali di latte vaccino, C = vacca, E = pecora, G = capra
È mostrata la metà superiore del gel IEF

Figura 4b

Focalizzazione isoelettrica di caseine, trattate con plasmina, di formaggio di miscele di latte di pecora, capra e bufala contenenti varie quantità di latte vaccino



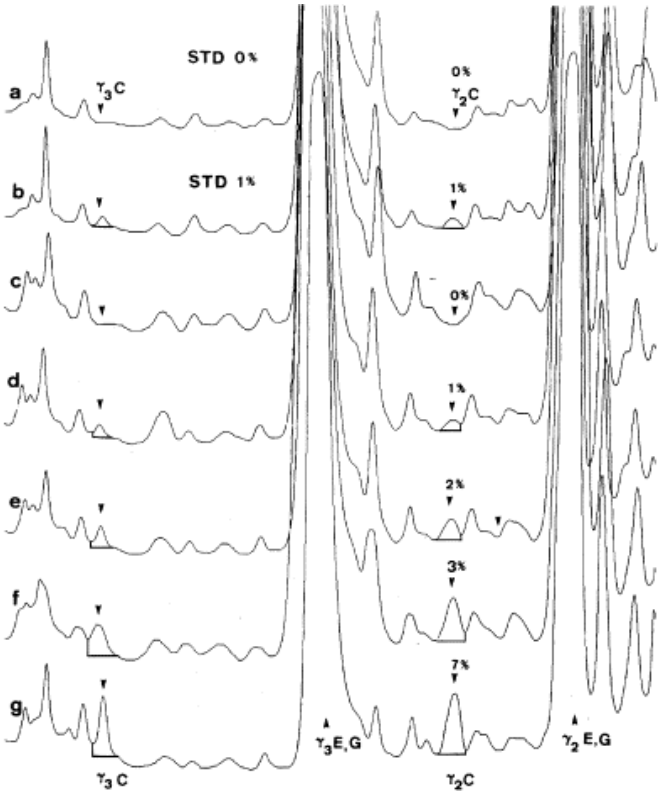
% CM = percentuali di latte vaccino; 1 + = campione contenente l'1 % di latte vaccino con aggiunta di caseina vaccina pura al centro della traccia. C = vacca, E = pecora, G = capra, B = bufala.

È mostrata la distanza totale di separazione del gel IEF.

▼B

Figura 5

Sovrapposizione dei densitogrammi di standard (STD) e di campioni di formaggio prodotto con miscele di latte di pecora e capra dopo focalizzazione isoelettrica



a,b = standard contenenti lo 0 e l'1 % di latte vaccino; c-g = campioni di formaggio contenenti lo 0, 1, 2, 3 e 7 % di latte vaccino. C = vacca, E = pecora, G = capra.
È stata analizzata la metà superiore del gel IEF a λ = 634 nm.

▼B

ALLEGATO X

(Articolo 7)

METODO DI RIFERIMENTO PER LA RICERCA DI COLIFORMI NEL BURRO, NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE, NELLA CASEINA E NEI CASEINATI

1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

   Norma internazionale ISO 8261.

2. PROCEDIMENTO

   Norma internazionale ISO 4831.

   Inoculare campioni di 1 g di burro o di 0,1 g di latte scremato in polvere o di caseina/caseinati nel terreno di coltura.

   Si inoculano tre provette per campione.

3. RISULTATI

   Il risultato è «soddisfacente» se le 3 provette danno 3 risultati negativi.

   Il risultato è «insoddisfacente» se le 3 provette danno 2 o 3 risultati positivi.

   Se le 3 provette danno 2 risultati negativi, occorre rifare due volte l'analisi (con 2 provette)

   — Il risultato è «soddisfacente» se entrambi i risultati sono negativi.

   — Il risultato è «insoddisfacente» se almeno 1 risultato è positivo.

▼B

ALLEGATO XI

(Articolo 8)

DETERMINAZIONE DEL LATTOSIO NEI MANGIMI COMPOSTI

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Determinazione del lattosio nei mangimi composti.

2. RIFERIMENTO

Il tenore di lattosio è espresso in percentuale di massa ed è determinato con il procedimento in appresso descritto.

3. DEFINIZIONE

Il tenore di lattosio anidro è espresso in g/100 g.

4. PRINCIPIO

L'alimento composto è ricostituito con acqua. Aggiungere una soluzione «Biggs» ad un'aliquota pesata e diluita in modo da far precipitare il grasso e le frazioni di componenti proteiche dell'alimento composto. Filtrare (o centrifugare) il campione e iniettare il filtrato (o surnatante) in una colonna HPLC (forma piombo) a scambio cationico usando acqua di qualità per HPLC come fase mobile. Il lattosio eluito è determinato per mezzo di un rifrattometro differenziale ([i]).

5. REAGENTI

5.1. **Osservazioni generali**

Usare solo reagenti di purezza analitica riconosciuta, salvo diversa specificazione, e acqua di qualità per HPLC degassata.

5.2. **Lattosio**

Il D-lattosio monoidrato [$(C_{12}H_{22})O_{11}H_2O$] può assorbire l'umidità in eccesso. Prima dell'uso misurare il tenore reale di acqua col metodo Karl-Fisher o eliminare l'umidità in eccesso ponendo il lattosio in un forno a 105 °C per 8 ore (il lattosio non perde l'acqua di cristallizzazione con questo trattamento).

5.3. **Soluzione Biggs/Szijarto concentrata** ([ii])

In un pallone volumetrico da 100 ml sciogliere 9,10 g di acetato di zinco diidrato [$Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$] e 5,46 g di acido fosfotungstico monoidrato {$H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$} in circa 70 ml di acqua di qualità per HPLC (6.8).

Aggiungere 5,81 ml di acido acetico glaciale (CH_3COOH). Diluire fino alla tacca di 100 ml con acqua di qualità per HPLC (6.8) e mescolare. La soluzione può essere conservata a temperatura ambiente per un anno.

5.4. **Soluzione Biggs/Szijarto diluita**

In un pallone diluire 25 ml di soluzione Biggs/Szijarto concentrata (5.3) con acqua fino a 500 ml. La soluzione può essere conservata a temperatura ambiente per un mese.

5.5. **Preparazione acqua di qualità per HPLC**

Filtrare l'acqua ultrapura (6.8) usando un sistema di filtrazione sotto vuoto (6.9). Per migliorare il rendimento della pompa e ottenere una linea di base stabile, degassare la fase mobile ogni giorno con una delle tecniche disponibili come gorgogliamento di elio, sonicazione, o degassatore a vuoto o in linea.

Nota: Per prolungare la vita della colonna è essenziale che il tenore di anidride carbonica dell'eluente sia il più basso possibile e che sia impossibile riutilizzarlo.

▼B

6. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura di laboratorio, in particolare:

6.1. **Colonna HPLC con resina a scambio di ioni.**

Confezione della colonna: copolimero (polistirene-divinilbenzene) reticolato a 8 %, funzionalizzato con gruppi a scambio di cationi in forma piombo.

Dimensioni della colonna: lunghezza 300 mm, diametro interno ca. 8 mm.

L'uso di altri diametri è possibile purché si adatti il flusso in proporzione.

6.2. **Colonna di guardia**

La colonna di guardia è una combinazione di uno scambiatore di cationi (H^+) e uno scambiatore di anioni (CO_3-) separati, impaccati ciascuno in colonne di ca. 30 mm × 4,6 mm (lunghezza × diametro interno) (ossia microcolonne di guardia in un supporto per microcolonne) e collegati in serie o a strati misti composti da AG 50W-X4, — 400 mesh (H^+) e AG3-X4A, 200-400 mesh (OH-) nel rapporto di 35:65 (m/m) impaccati a mano in una colonna di ca. 20 × 9 mm (lunghezza × diametro interno).

6.3. **Forno a colonna**

Forno capace di mantenere una temperatura compresa fra 85 °C ± 1 °C.

6.4. **Pompa HPLC**

Pompa capace di generare un flusso costante (fluttuazioni < 0,5 %) a 0,2-1,0 m/min.

6.5. **Iniettore HPLC**

Iniettore automatico capace di iniettare 25 µl e avente una ripetibilità < 0,5 %.

In alternativa si può usare un dispositivo manuale (rispondente alle stesse caratteristiche di quello automatico).

6.6. **Rivelatore HPLC**

Rivelatore con un indice di rifrazione altamente sensibile con disturbo $< 5.10^{-9}$ unità RI.

6.7. **Integratore**

Software o un integratore appositamente destinato ad acquisire i dati, a trasformare e generare le aree e le altezze dei picchi che possono essere convertite in concentrazioni di lattosio.

6.8. **Dispositivo di purificazione dell'acqua**

Dispositivo capace di fornire acqua ultrapura (tipo 1) con una resistività >14 MΩ.cm.

6.9. **Dispositivo di filtrazione**

Dispositivo che permette la filtrazione dell'acqua con una membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm.

Nota: Molti apparecchi di purificazione dell'acqua (6.8) hanno un filtro incorporato di 0,45 o 0,2 µm. Se si usa direttamente quest'acqua si può tralasciare ogni ulteriore filtrazione.

6.10. **Bilancia analitica**

Bilancia con una risoluzione di 0,1 mg.

6.11. **Bagnomaria**

Bagnomaria in grado di mantenere la temperatura a 40 °C (± 0,5).

6.12. **Centrifuga**

Capace di generare almeno 3 000 g per provette Eppendorf o tipi di fiale equivalenti o più grandi.

▼B

6.13. **Pallone volumetrico da 50 ml**

Capacità 50 ml, classe A.

Nota: Si possono usare palloni di capacità diversa tenendo conto del fattore volume.

6.14. **Pallone volumetrico da 100 ml**

Capacità 100 ml, classe A.

6.15. **Pipette graduate**

Pipette graduate da 10 ml.

Nota: In alternativa si può usare un pipettatore manuale da 5 ml aggiungendo due volte un volume di 5 ml di reagente (5.3).

7. CAMPIONAMENTO

È importante che il laboratorio riceva un campione veramente rappresentativo secondo la norma ISO 707/FIL 50 ([iii]), che non ha subito danni durante il trasporto o il magazzinaggio.

8. PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE STANDARD DI LATTOSIO

8.1. **Standard 1**

Sciogliere un'aliquota pesata esattamente (lettura di 0,1 mg) di ca. 50 mg di lattosio monoidrato (5.2) in un pallone volumetrico da 100 ml (6.14) e portare a segno con acqua.

8.2. **Standard 2**

Sciogliere un'aliquota pesata esattamente (lettura di 0,1 mg) di ca. 100 mg di lattosio monoidrato (5.2) in un pallone volumetrico da 100 ml (6.14) e portare a segno con acqua.

Nota: Le soluzioni standard si possono conservare per una settimana al massimo a ca. 5 °C.

9. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DA ANALIZZARE

9.1. **Ricostituzione del campione**

Pesare ca. 5 g della polvere in un pallone da 50 ml (6.13) e annotare il peso con la precisione di 1 mg [W_1, (11)]. Aggiungere 50 ml di acqua e annotare l'aumento di peso [W_2 (11)] con la precisione di 0,01 g. Porre il pallone chiuso a bagnomaria (6.11) per 30 min e capovolgerlo qualche volta nell'attesa. Lasciarlo poi raffreddare a temperatura ambiente.

9.2. **Trattamento del campione**

Prelevare ca. 1 g di questa soluzione e trasferirla in un pallone volumetrico da 50 ml (6.13), annotare il peso con la precisione di 1 mg [W_3 (11)], aggiungere 20 ml di acqua e quindi 10 ml di reagente Biggs/Szijarto diluito (5.4), e portare a segno con acqua. Capovolgere con cautela il pallone 5 volte nei primi 30 min.

Dopo un'ora prelevare un'aliquota e centrifugare (6.12) a 3 000 g per 10 min (si può usare un valore di g più elevato per un tempo proporzionalmente inferiore). Usare un'aliquota del surnatante per l'analisi HPLC.

10. DETERMINAZIONE HPLC

10.1. **Preparazione preliminare della HPLC**

10.1.1. *Installazione della colonna e della precolonna*

Installare la precolonna (6.2) fuori del forno a colonna (6.3) e la colonna (6.1) nel forno.

Nota: Se il forno non contiene tubi per preriscaldare l'eluente, è necessario far passare l'eluente per un tubo di acciaio inossidabile di ca. 15 cm nel forno prima di essere posto nella colonna (è assolutamente necessario che l'eluente sia stato scaldato prima di essere posto nella colonna, altrimenti si determina un allargamento dei picchi).

▼B

10.1.2. *Rivelatore e flusso iniziale*

Per ottenere una linea di base stabile accendere il rivelatore (6.6) almeno 24 ore prima di cominciare l'analisi. Regolare la temperatura del rivelatore a 35 °C. Fissare la velocità di flusso a 0,2 ml/min (6.4) per almeno 20 min mentre il forno a colonna (6.3) è regolato a temperatura ambiente.

10.1.3. *Forno a colonna e velocità di flusso finale*

Regolare la temperatura del forno a colonna (6.3) a 85 °C. Al raggiungimento della temperatura aumentare gradualmente dopo 30 min la velocità di flusso da 0,2 ml/min a 0,6 ml/min (6.4). Far sì che il sistema si riequilibri con questo flusso e a 85 °C per 2 ore o fino a ottenere una linea di base stabile.

10.1.4. *Integrazione*

Scegliere con cura l'acquisizione e l'integrazione dei parametri (6.7) quali la velocità dei dati, la sensibilità, la costanza nel tempo, l'ampiezza dei picchi e i valori soglia.

Il tempo di ritenzione del lattosio è ca. 11 min.

Nota: Molti software di acquisizione dati (6.7) permettono una facile misurazione del numero di piatti teorici. Misurare regolarmente il numero di piatti teorici dello standard 1 (8.1) e sostituire la colonna (6.1) quando il numero è inferiore del 25 % al valore iniziale di una colonna nuova.

10.1.5. *Prova della colonna di guardia*

Controllare regolarmente (almeno una volta per ogni sequenza) la capacità della colonna di guardia (6.2) di eliminare i sali dal campione iniettando 25 µl di una soluzione di cloruro di sodio a 0,05 %. Occorre sostituire la colonna ogni volta che compaiono picchi.

10.2. **Iniezione degli standard**

Iniettare all'inizio di ogni serie di analisi 25 µl (6.5) dello standard 1 (8.1) e poi dello standard 2 (8.2). Ripetere l'operazione ogni 10-20 campioni e anche alla fine della sequenza.

10.3. **Iniezione dei campioni**

Iniettare 25 µl del surnatante (9.2) del campione.

11. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

11.1. **Taratura**

Di solito per calcolare i risultati si usano le altezze dei picchi, ma se il segnale è troppo disturbato si può usare l'area dei picchi (la quantificazione per altezza dei picchi è influenzata meno dai picchi delle componenti presenti a bassa concentrazione e che sono separate parzialmente, ma in misura insufficiente, dal picco del lattosio).

Il software (6.7) dovrebbe calcolare una curva di taratura lineare forzata attraverso l'origine. Controllare l'eventuale non linearità della curva (è molto probabile che la non linearità apparente si produca per un errore nella preparazione degli standard 1 (8.1) o 2 (8.2), per una integrazione sbagliata e, con meno probabilità, a causa del cattivo funzionamento dell'iniettore).

Usare come dati di partenza le concentrazioni di lattosio calcolate in mg/ml degli standard 1 (8.1) e 2 (8.2) come lattosio anidro.

La pendenza (RF) della linea di taratura è definita dal rapporto tra la superficie e la concentrazione in mg/ml.

11.2. **Campioni**

Il risultato dell'analisi si ottiene in g/100 g e si calcola usando il software (6.7) o la formula:

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

▼B

dove:

C: concentrazione di lattosio in g/100 g di polvere

H: altezza del picco di lattosio del campione

RF: fattore di risposta (o pendenza) del diagramma di taratura in mV/mg/ml

W_1: peso del campione di polvere in g (8.1)

W_2: peso dell'acqua aggiunta in g al campione di polvere (9.1)

W_3: peso del campione della soluzione ricostituita di polvere in g (9.2)

50: volume del pallone volumetric usato in (9.2)

0,1: conversione del risultato in g/100 g

12. PRECISIONE

I valori derivati da questa prova interlaboratorio non si possono applicare a gamme di concentrazioni e a matrici diverse da quelle date. I valori di ripetibilità e riproducibilità saranno derivati dal risultato di una prova interlaboratorio eseguita secondo la norma ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Ripetibilità**

La differenza assoluta tra due singoli risultati di prova, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico nello stesso laboratorio dallo stesso operatore utilizzando la stessa attrezzatura entro un breve intervallo di tempo saranno superiori a xxx (da determinare in sede di prove collaborative) ([v]) in un numero di casi non maggiore del 5 %.

12.2. **Riproducibilità**

Le differenze assolute tra due singoli risultati di prova, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico in laboratori diversi da operatori diversi che utilizzano attrezzature diverse saranno superiori a 0,5 g/100 g (da determinare in sede di prove collaborative) in un numero di casi non maggiore del 5 %.

13. BIBLIOGRAFIA

([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), latte e prodotti lattiero-caseari — Metodi di campionamento.

([iv]) ISO 5725-1, Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione. Parte 1: Principi generali e definizioni.

([v]) ISO 5725-2, Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione. Parte 2: Metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato

▼B

ALLEGATO XII

(Articolo 9)

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

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

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

2. RIFERIMENTO

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

3. DEFINIZIONE

Il contenuto di siero di latte presamico in polvere è espresso come percentuale di massa, determinato mediante il contenuto di caseinomacropeptidi secondo il metodo in appresso descritto.

4. PRINCIPIO

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

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

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

5. REAGENTI

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

5.1. **Soluzione di acido tricloracetico**

Sciogliere in acqua 240 g di acido tricloroacetico (CCl_3COOH) e portare a 1 000 ml. La soluzione deve essere chiara e incolore.

5.2. **Soluzione eluente a pH 6,0**

Sciogliere 1,74 g di fosfato dipotassico (K_2HPO_4), 12,37 g di fosfato monopotassico (KH_2PO_4) e 21,41 g di solfato di sodio (Na_2SO_4) in 700 ml d'acqua circa. Se necessario, regolare a pH 6,0 mediante una soluzione di acido fosforico o di idrossido di potassio.

Portare a 1 000 ml con acqua e miscelare.

Nota: La composizione dell'eluente può essere aggiornata per rispettare il certificato delle norme o le raccomandazioni del fabbricante del materiale di confezione della colonna.

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

5.3. **Soluzione di lavaggio**

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

▼B

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

5.4. **Campioni di riferimento**

5.4.1. *Latte scremato in polvere rispondente alle esigenze della presente risoluzione, indicato in seguito con [0].*

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

6. APPARECCHIATURA

6.1. Bilancia analitica

6.2. Centrifuga capace di raggiungere 2 200 g e fornita di provette a tappo della capacità di 50 ml circa

6.3. Agitatore meccanico

6.4. Agitatore magnetico

6.5. Imbuti in vetro del diametro di 7 cm circa

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

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

6.8. Pipette graduate capaci di erogare 10 ml (norma ISO 648, classe A o ISO/R 835) oppure un sistema capace di erogare 10,0 ml in due minuti

6.9. Sistema erogatore capace di erogare 20,0 ml di acqua a ca. 50 °C

6.10. Bagnomaria, termostatato a 25 ± 0,5 °C

6.11. Apparecchiatura HPLC comprendente:

6.11.1. pompa;

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

6.11.3. due colonne in serie TSK 2 000-SW (lunghezza 30 cm, diametro interno 0,75 cm) o colonne di pari efficacia (es. colonna singola TSK 2 000-SWxl, colonna singola Agilent Technologies Zorbax GF 250) ed una precolonna a monte (3 cm × 0,3 cm), caricata con I 125 o con un materiale di pari efficacia;

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

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

6.11.6. integratore capace di misurare l'altezza dei picchi da valle a valle.

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

7. CAMPIONAMENTO

7.1. Il prelievo dei campioni si effettua in base alla procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707. Gli Stati membri possono tuttavia impiegare un altro metodo di campionamento purché conforme a principi della succitata norma.

7.2. Conservare il campione in condizioni tali da non consentire alcun deterioramento o modifica di composizione.

8. PROCEDIMENTO

▼B

8.1. **Preparazione del campione da analizzare**

Travasare la polvere in un recipiente di capacità all'incirca doppia del volume della polvere, provvisto di un coperchio impermeabile all'aria. Chiudere immediatamente il recipiente. Mescolare bene il latte in polvere capovolgendo più volte il recipiente.

8.2. **Aliquota da analizzare**

In una provetta da centrifuga (6.2) o in una bottiglia chiusa idonea (50 ml) pesare 2,000 g del campione con l'approssimazione di 0,001 g.

8.3. **Eliminazione dei grassi e delle proteine**

8.3.1. Aggiungere all'aliquota da analizzare 20,0 ml di acqua calda (50 °C). Sciogliere la polvere agitando per 5 minuti con l'agitatore (6.3). Mettere la provetta a bagnomaria (6.10) fino a raggiungere i 25 °C.

8.3.2. Lavorando sotto agitazione magnetica (6.4), aggiungere 10,0 ml della soluzione di acido tricloroacetico (5.1) a ca. 25 °C in 2 minuti. Collocare la provetta nel bagnomaria (6.10) e mantenervela per 60 minuti.

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

8.4. **Determinazione cromatografica**

8.4.1. Iniettare nell'apparecchio HPLC (6.11) da 15 a 30 µl del surnatante o del filtrato (8.3.3), misurati esattamente, mantenendo la velocità di flusso della soluzione eluente (5.2) sul valore di 1,0 ml/minuto.

Note 1: Si può usare un'altra velocità di flusso in funzione del diametro interno delle colonne usate o delle istruzioni del fabbricante della colonna.

Note 2: Mantenere la soluzione eluente (5.2) alla temperatura di 85 °C durante tutta l'analisi cromatografica, per mantenere l'eluente esente da gas e prevenire ogni proliferazione batterica. Qualunque precauzione dotata di effetto analogo è accettabile.

Note 3: Al momento di ogni interruzione, risciacquare le colonne con acqua. Non lasciarle mai sotto la soluzione eluente (5.2).

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

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

Picco II:	secondo picco del cromatogramma, con RT uguale a 12,5 minuti circa.
Picco III:	terzo picco del cromatogramma, corrispondente ai CMP, con RT uguale a 15,5 minuti.

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

L'integratore (6.11.6) calcola automaticamente la superficie A di ogni picco:

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

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

In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

▼B

8.5. **Taratura**

8.5.1. Applicare esattamente ai campioni di riferimento (5.4) il modo di operare descritto dal punto 8.2 al punto 8.4.2.

Utilizzare soluzioni preparate di recente, in quanto, in presenza di tricloroacetico all'8 %, i CMP si degradano (alla temperatura di 30 °C, difatti, la loro concentrazione diminuisce dello 0,2 % circa ogni ora).

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

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

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

9.1. **Metodo di calcolo e formule**

9.1.1. *Calcolo dei coefficienti di risposta R:*

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

dove:

R_{II} = coefficiente di risposta del picco II,

A_{II} [0] = le superfici dei picchi II del campione di riferimento [0] ottenute in 8.5.3.

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

dove:

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

A_{III} [0] e A_{III} [5] = le superfici del picco III nei campioni di riferimento [0] e [5] rispettivamente ottenute in 8.5.3,

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

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

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

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

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

dove:

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

A_{II} [E], A_{III} [E] = superfici rispettivamente dei picchi II e III nel campione [E], ottenute in 8.4.2,

R_{II}, R_{III} = coefficienti di risposta calcolati in 9.1.1.

9.1.3. *Calcolo del tempo di ritenzione relativo del picco III del campione [E]: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

dove:

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

RT_{III} [E] = tempo di ritenzione del picco III del campione [E] ottenuto in 8.4.2,

▼B

RT_{III} [5] = tempo di ritenzione del picco III del campione di controllo [5] ottenuto in 8.5.3.

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

— RRT_{III} [E] è < 1,000 se il contenuto di lattosiero è > 5 %,

— RRT_{III} [E] è ≥ 1,000 se il contenuto di lattosiero è ≤ 5 %.

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

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

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

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

dove:

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

S_{III} [E] = superficie relativa del picco III del campione da analizzare [E] ottenuto in 9.1.2,

1,3 = superficie relativa media del picco III, espressa in grammi di lattosiero presamico per 100 g determinato in latte scremato in polvere non sofisticato di diversa origine. Questa cifra è stata ottenuta sperimentalmente,

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

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

9.3. **Precisione del metodo**

9.3.1. *Ripetibilità*

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

9.3.2. *Riproducibilità*

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

9.4. **Interpretazione**

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

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

(S_{III} [0] – 0,9) = correzione da apportare quando il valore S_{III} [0] è diverso da 0,9 (cfr. punto 9.2).

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

▼B

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

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

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

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

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

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

dove:

S_{III} = superficie relativa del picco III, calcolata in base al tenore di proteine totali o in base alla superficie relativa del picco S_{III} [E],

P % = tenore di proteine totali espresso in percentuale in peso,

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

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

Lo scarto (T_1 e T_2) tra la superficie relativa S_{III} [E] osservata e la superficie relativa S_{III} si ricava dalle seguenti relazioni: $T_1 = S_{III}[E] - \{(0{,}376\ P\ \% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)\}$ $T_2 = S_{III}[E] - \{(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)\}$.

9.4.3.2.

Se T_1 e/o T_2 sono inferiori o uguali a zero, non si può concludere che è presente lattosiero presamico.

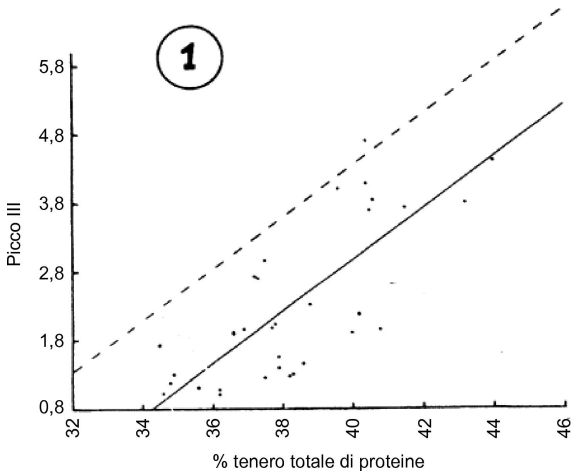
Se T_1 e T_2 sono superiori a zero, si può concludere che è presente lattosiero presamico.

Il tenore di lattosiero presente è calcolato utilizzando la formula seguente: $W = T_2 + 0{,}91$

dove:

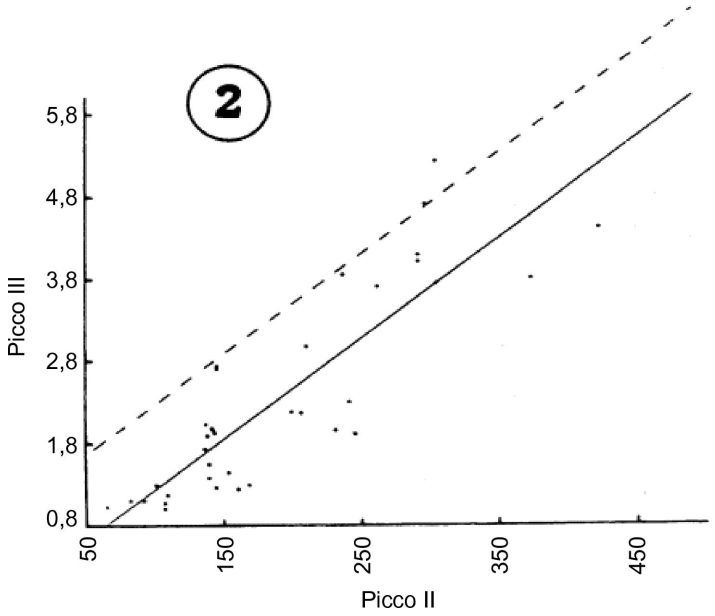
0,91 rappresenta lo scarto sull'asse verticale tra la retta continua e la retta tratteggiata.

Latte scremato in polvere



▼B

Latte scremato in polvere



▼B

ALLEGATO XIII

(Articolo 9)

DETERMINAZIONE DEL LATTOSIERO PRESAMICO IN POLVERE NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE E NELLE MISCELE DI CUI AL REGOLAMENTO (CE) N. 2799/1999

1. OGGETTO: RICERCA DELL'AGGIUNTA DI SIERO DI LATTE PRESAMICO IN POLVERE:

   a) al latte scremato in polvere come definito nell'articolo 2 del regolamento (CE) n. 2799/1999; e

   b) alle miscele di cui all'articolo 4 del regolamento (CE) n. 2799/1999.

2. RIFERIMENTI: NORMA INTERNAZIONALE ISO 707

3. DEFINIZIONE

   Il contenuto di siero di latte presamico in polvere è espresso come percentuale di massa, determinato mediante il contenuto di caseinomacropeptidi secondo il metodo in appresso descritto.

4. PRINCIPIO

   Determinazione del contenuto di caseinomacropeptidi conformemente all'allegato XII. I campioni che danno risultati positivi sono analizzati ai fini della ricerca del caseinomacropeptide A mediante il metodo per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) in fase inversa. In alternativa i campioni sono analizzati direttamente con il metodo della HPLC in fase inversa. Valutazione del risultato ottenuto in confronto con campioni di riferimento costituiti da latte scremato in polvere esente o addizionato di una percentuale nota di siero di latte in polvere. I risultati superiori all'1 % (m/m) mostrano la presenza di polvere di siero di latte presamico.

5. REAGENTI

   Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua da impiegare deve essere acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente. L'acetonitrile deve essere di qualità spettroscopica o HPLC.

   I reagenti necessari per il metodo sono descritti nell'allegato XII del presente regolamento.

   Reagenti per HPLC in fase inversa.

5.1. **Soluzione di acido tricloracetico**

   Sciogliere in acqua 240 g di acido tricloroacetico (CCl_3COOH) e portare a 1 000 ml. La soluzione deve essere chiara e incolore.

5.2. **Eluenti A e B**

   Eluente A: in un pallone da 1 000 ml porre 150 ml di acetonitrile (CH_3CN), 20 ml di isopropanolo ($CH_3CHOHCH_3$) e 1,00 ml di acido trifluoroacetico (TFA, CF_3COOH) e portare al volume di 1 000 ml con acqua.

   Eluente B: in un pallone da 1 000 ml porre 550 ml di acetonitrile, 20 ml di isopropanolo e 1,00 ml di TFA e portare al volume di 1 000 ml con acqua. Prima dell'impiego, filtrare la soluzione eluente su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 μm.

5.3. **Conservazione della colonna**

   Dopo le analisi la colonna viene lavata con l'eluente B (con gradiente) e successivamente con acetonitrile (con gradiente per 30 minuti). La colonna è conservata in acetonitrile.

5.4. **Campioni di riferimento**

5.4.1. Latte scremato in polvere rispondente ai requisiti previsti per l'ammasso pubblico, indicato in appresso con [0].

▼B

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

5.4.3. Lo stesso latte, sofisticato al 50 % (m/m) con lattosiero in polvere di tipo presamico di composizione media, indicato in seguito con [50] ([1]).

6. APPARECCHIATURA

L'apparecchiatura necessaria per il metodo descritto è specificata nell'allegato XII del presente regolamento.

6.1. Bilancia analitica

6.2. Centrifuga capace di raggiungere 2 200 g e fornita di provette a tappo della capacità di 50 ml circa

6.3. Agitatore meccanico

6.4. Agitatore magnetico

6.5. Imbuti in vetro del diametro di 7 cm circa

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

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

6.8. Pipette graduate capaci di erogare 10 ml (norma ISO 648, classe A o ISO/R 835) oppure un sistema capace di erogare 10,0 ml in due minuti

6.9. Sistema erogatore capace di erogare 20,0 ml di acqua a ca. 50 °C

6.10. Bagnomaria, termostatato a 25 ± 0,5 °C

6.11. Apparecchiatura HPLC comprendente:

6.11.1. sistema di pompaggio a gradiente binario;

6.11.2. iniettore manuale o automatico da 100 µl di capacità;

6.11.3. colonna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (lunghezza 25 cm × diametro interno 0,46 cm) o una colonna equivalente per fase inversa a base di silice a pori larghi;

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

6.11.5. rilevatore UV a lunghezza d'onda variabile, capace di effettuare misure fino a 210 nm (se necessario si può utilizzare una lunghezza d'onda superiore, fino a 220 nm), con la sensibilità di 0,02 Å;

6.11.6. integratore capace di impostare l'integrazione o sulla linea di base o da valle a valle.

Nota: È possibile far funzionare la colonna a temperatura ambiente purché tale temperatura non abbia fluttuazioni superiori ad 1 °C, altrimenti il tempo di ritenzione del CMP_A sarebbe soggetto a variazioni troppo grandi.

7. CAMPIONAMENTO

7.1. Il prelievo dei campioni si effettua in base alla procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707. Gli Stati membri possono tuttavia impiegare un altro metodo di campionamento purché conforme ai principi della succitata norma.

7.2. Conservare il campione in condizioni tali da non consentire alcun deterioramento o modifica di composizione.

8. PROCEDIMENTO

([1]) Il lattosiero presamico in polvere di composizione standard e il latte scremato in polvere adulterato possono essere ottenuti presso NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA Ede. Possono tuttavia essere ugualmente utilizzate polveri che diano risultati equivalenti a quelli delle polveri NIZO.

▼B

8.1. **Preparazione delle aliquote da analizzare**

Travasare la polvere in un recipiente di capacità all'incirca doppia del volume della polvere, provvisto di un coperchio impermeabile all'aria. Chiudere immediatamente il recipiente. Mescolare bene il latte in polvere capovolgendo più volte il recipiente.

8.2. **Aliquota da analizzare**

In una provetta da centrifuga (6.2) o in una bottiglia chiusa idonea (50 ml) pesare 2,00 g del campione con l'approssimazione di 0,001 g.

Nota: Nel caso delle miscele, pesare una porzione dell'aliquota da analizzare in modo che la porzione sgrassata del campione corrisponda a 2,00 g.

8.3. **Eliminazione dei grassi e delle proteine**

8.3.1. Aggiungere all'aliquota da analizzare 20,0 ml di acqua calda (50 °C). Sciogliere la polvere agitando per 5 minuti, o per 30 minuti nel caso di latticello acido, con l'agitatore meccanico (6.3). Mettere la provetta a bagnomaria (6.10) fino a raggiungere i 25 °C.

8.3.2. Aggiungere 10,0 ml di soluzione di acido tricloroacetico a ca. 25 °C (5.1) senza interruzione per 2 minuti, agitando vigorosamente con l'agitatore magnetico (6.4). Collocare la provetta nel bagnomaria (6.10) e mantenervela per 60 minuti.

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

8.4. **Determinazione cromatografica**

8.4.1. Eseguire l'analisi HPLC come descritto nell'allegato XII. Se si ottiene un risultato negativo il campione analizzato non contiene polvere di siero di latte presamico in quantità rilevabili. In caso di risultato positivo si deve applicare il metodo HPLC in fase inversa descritto in appresso. In alternativa si può applicare direttamente il metodo della HPLC in fase inversa. La presenza di polvere di latticello acido può dare origine a risultati falsamente positivi usando il metodo descritto nell'allegato XII. Il metodo HPLC in fase inversa esclude questa possibilità.

8.4.2. Prima di eseguire l'analisi HPLC in fase inversa andranno ottimizzate le condizioni del gradiente. Un tempo di ritenzione di 26 minuti ± 2 minuti per il CMP_A è ottimale per i sistemi a gradiente con un volume morto di circa 6 ml (volume dal punto in cui i solventi confluiscono sino al volume del circuito dell'iniettore compreso). Per i sistemi a gradiente con un volume morto inferiore (ad esempio 2 ml) si deve utilizzare come tempo ottimale di ritenzione un tempo di 22 minuti.

Prendere soluzioni dei campioni di riferimento (5.4) con e senza lattosiero presamico al 50 %.

Iniettare 100 µl del surnatante o del filtrato (8.3.3) nell'apparecchiatura HPLC operante alle condizioni di gradiente di esplorazione date nella tabella 1.

Tabella 1

Condizioni del gradiente di esplorazione per l'ottimizzazione della cromatografia

Tempo (min)	Flusso (ml/min)	% A	% B	Curva
Iniziale	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

Confrontando i due cromatogrammi si dovrebbe individuare il picco del CMP_A.

▼B

Utilizzando la formula che segue si può calcolare la composizione del solvente iniziale da utilizzare per il gradiente normale (secondo 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

dove:

RT_{cmpA}: tempo di ritenzione del CMP_A nel gradiente di esplorazione

10: la % B iniziale del gradiente di esplorazione

2,5: la % B al punto intermedio meno la % B al punto iniziale nel gradiente normale

13,5: tempo del punto intermedio del gradiente di esplorazione

26: tempo di ritenzione necessario del CMP_A

6: rapporto dei coefficienti di direzione del gradiente di esplorazione e del gradiente normale

30: la % B al punto iniziale meno la % B a 27 minuti nel gradiente di esplorazione

27: tempo di operazione del gradiente di esplorazione

8.4.3. Prendere soluzioni dei campioni da analizzare

Iniettare nell'apparecchio HPLC 100 µl del surnatante o del filtrato (8.3.3) misurati esattamente, mantenendo la velocità di flusso della soluzione eluente (5.2) sul valore di 1,0 ml/minuto.

La composizione dell'eluente all'inizio dell'analisi si ottiene da 8.4.2. Normalmente essa è prossima ad A: B = 76:24 (5.2). Subito dopo l'iniezione viene avviato un gradiente lineare che dopo 27 minuti porta ad una percentuale di B maggiore del 5 %. Successivamente viene avviato un gradiente lineare che in 5 minuti, porta la composizione dell'eluente a 90 % B. Questa composizione viene mantenuta per 5 minuti, dopo di che con un gradiente lineare la composizione cambia e torna in 5 minuti a quella iniziale. Sulla base del volume interno del sistema di pompaggio l'iniezione successiva può essere effettuata 15 minuti dopo aver raggiunto le condizioni iniziali.

Nota 1: Il tempo di ritenzione del CMP_A deve essere di 26 minuti 26 ± 2 minuti. Esso può essere ottenuto variando le condizioni iniziali e finali del primo gradiente. Tuttavia la differenza nella % B per quanto riguarda le condizioni iniziali e finali del primo gradiente deve rimanere del 5 % B.

Nota 2: Gli eluenti devono essere adeguatamente degassati e restare tali. Ciò è essenziale per il corretto funzionamento del sistema di pompaggio del gradiente. La deviazione standard per il tempo di ritenzione del picco CMP_A deve essere inferiore a 0,1 minuto (n = 10).

Nota 3: Ogni 5 campioni è necessario iniettare il campione di riferimento [5] da utilizzare per calcolare un nuovo coefficiente di risposta R (9.1.1).

8.4.4. I risultati dell'analisi cromatografica del campione da analizzare [E] sono ottenuti sotto forma di un cromatogramma in cui il picco CMP_A è identificato dal suo tempo di ritenzione che è di circa 26 minuti.

L'integratore (6.11.6) calcola automaticamente l'altezza di picco H del picco CMP_A. In ogni cromatogramma si deve controllare la posizione della linea di base. Se la linea di base non è correttamente localizzata occorre ripetere l'analisi o l'integrazione.

▼B

Nota: Se il picco CMP_A è separato sufficientemente dagli altri picchi occorre usare il metodo dell'integrazione attraverso l'assegnazione della linea di base da valle a valle; altrimenti tracciare linee perpendicolari ad una linea di base comune, il cui punto di partenza deve essere vicino al picco CMP_A (ma non a t = 0 min!). Usare lo stesso tipo di integratore per lo standard di riferimento e i campioni e, nel caso di una linea di base comune, verificarne la coerenza per i campioni e lo standard di riferimento.

Prima di procedere all'interpretazione quantitativa è necessario esaminare l'aspetto di ciascun cromatogramma al fine di individuare anomalie dovute al cattivo funzionamento dell'apparecchio o della colonna, oppure all'origine e alla natura del campione analizzato. In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

8.5. **Taratura**

8.5.1. Applicare esattamente ai campioni di riferimento (5.4.1-5.4.2) il modo di operare descritto dal punto 8.2 al punto 8.4.4. Utilizzare soluzioni preparate di recente, in quanto a temperatura ambiente il CMP si degrada in ambiente tricloroacetico all'8 %. A 4 °C la soluzione rimane stabile per 24 ore. Nel caso si debba procedere a lunghe serie di analisi è opportuno l'impiego, nell'iniettore automatico, di una vaschetta raffreddata per il campione.

Nota: 8.4.2. può essere omesso se la % B alle condizioni iniziali è nota da analisi precedenti.

Il cromatogramma del campione di riferimento [5] dovrebbe essere analogo alla figura 1. In questa figura il picco CMP_A è preceduto da due piccoli picchi. È essenziale ottenere una separazione analoga.

8.5.2. Prima di procedere alla determinazione cromatografica dei campioni iniettare 100 µl del campione di riferimento senza lattosiero presamico [0] (5.4.1).

Nel cromatogramma non si deve vedere un picco al tempo di ritenzione del picco CMP_A.

8.5.3. Determinare i coefficienti di risposta R iniettando un volume di filtrato (8.5.1) pari a quello utilizzato per i campioni.

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

9.1. **Metodo di calcolo e formule**

9.1.1. *Calcolo del coefficiente di risposta R:*

Picco CMP_A: R = W/H

dove:

R = coefficiente di risposta del picco CMP_A

H = altezza del picco CMP_A

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

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

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

dove:

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

R = coefficiente di risposta del picco CMP_A (9.1.1)

H(E) = altezza del picco CMP_A del campione [E]

Se W[E] è maggiore dell'1 % e la differenza fra il tempo di ritenzione e quello del campione di riferimento [5] è inferiore a 0,2 minuti, è presente lattosiero presamico in polvere.

9.3. **Precisione del metodo**

9.3.1. *Ripetibilità*

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

▼B

9.3.2. *Riproducibilità*

Non determinata.

9.3.3. *Linearità*

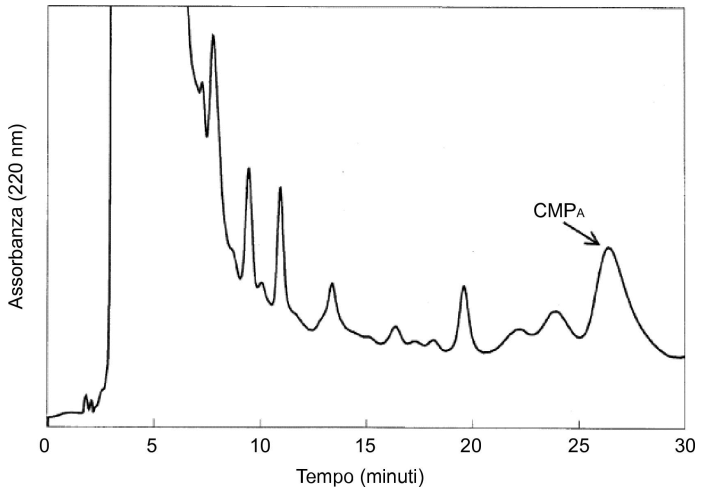
Dallo 0 al 16 % di lattosiero presamico si deve ottenere una relazione lineare con un coefficiente di correlazione > 0,99.

9.4. **Interpretazione**

Il limite dell'1 % è fissato conformemente alle disposizioni del regolamento (CE) n. 214/2001, allegato XIX, punti 9.2 e 9.4.1 e tiene conto dell'incertezza dovuta alla riproducibilità.

Figura 1

Ni –4,6 standard



▼B

ALLEGATO XIV

(Articolo 10)

LATTE SCREMATO IN POLVERE: DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ DI FOSFATIDILSERINA E FOSFATIDILETANOLAMINA

Metodo HPLC in fase inversa

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo descrive una procedura per la determinazione quantitativa della fosfatidilserina (PS) e della fosfatidiletanolamina (PE) nel latte scremato in polvere (LSP) ed è adatto per rivelare particelle solide di latticello nel LSP.

2. DEFINIZIONE

Contenuto di PS + PE: la frazione in massa di sostanza determinata utilizzando la procedura qui specificata. Il risultato è espresso in milligrammi di dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PEDP) per 100 g di polvere.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Estrazione degli amminofosfolipidi mediante metanolo da latte in polvere ricostituito. Determinazione di PS e PE come derivati della dialdeide o-ftalica (OPA) mediante HPLC in fase inversa (RP) e rivelazione per fluorescenza. Quantificazione del contenuto di PS e PE nel campione d'analisi per riferimento ad un campione standard contenente una quantità nota di PEDP.

4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua deve essere distillata o di purezza almeno equivalente, salvo diversamente specificato.

4.1. **Materiale standard: PEDP, purezza 99 % minimo**

Nota: Il materiale standard deve essere conservato a – 18 °C.

4.2. **Reagenti per le preparazioni del campione standard e del campione d'analisi**

4.2.1. Metanolo per HPLC

4.2.2. Cloroformio per HPLC

4.2.3. Triptamina monocloridrato

4.3. **Reagenti per la derivatizzazione con dialdeide o-ftalica**

4.3.1. Idrossido di sodio, soluzione acquosa 12M

4.3.2. Acido borico, soluzione acquosa 0,4M regolata a pH 10,0 con idrossido di sodio (4.3.1)

4.3.3. 2-mercaptoetanolo

4.3.4. Dialdeide o-ftalica (OPA)

4.4. **Solventi per l'eluizione HPLC**

4.4.1. I solventi di eluizione devono essere preparati utilizzando reagenti per HPLC

4.4.2. Acqua per HPLC

4.4.3. Metanolo di purezza fluorimetrica controllata

4.4.4. Tetraidrofurano

4.4.5. Diidrogenofosfato di sodio

4.4.6. Acetato di sodio

4.4.7. Acido acetico

5. APPARECCHIATURA

5.1. Bilancia analitica, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con risoluzione di 0,1 mg

▼B

5.2. Becher da 25 e 100 ml

5.3. Pipette da 1 e 10 ml

5.4. Agitatore magnetico

5.5. Pipette graduate da 0,2, 0,5 e 5 ml

5.6. Matracci tarati da 10, 50 e 100 ml

5.7. Siringhe da 20 e 100 µl

5.8. Bagno ad ultrasuoni

5.9. Centrifuga a 27 000 × g

5.10. Flaconi di vetro della capacità di circa 5 ml

5.11. Cilindro graduato da 25 ml

5.12. pH-metro, con l'approssimazione di 0,1 unità di pH

5.13. Apparecchiatura HPLC

5.13.1. Sistema di pompaggio a gradiente in grado di funzionare a 1,0 ml/min a 200 bar

5.13.2. Autocampionatore con possibilità di derivatizzazione

5.13.3. Riscaldatore di colonna termostatato a 30 °C ± 1 °C

5.13.4. Rivelatore a fluorescenza regolato alla lunghezza d'onda di eccitazione di 330 nm e alla lunghezza d'onda di emissione di 440 nm

5.13.5. Integratore o software di elaborazione dati in grado di misurare l'area dei picchi

5.13.6. Una colonna lichrosphere — 100 (250 × 4,6 mm) o una colonna equivalente riempita con ottadecilsilano (C 18), granulometria 5 µm.

6. CAMPIONAMENTO

Il campionamento deve essere eseguito secondo la norma ISO 707.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparazione della soluzione dello standard interno**

7.1.1. Pesare 30,0 ± 0,1 mg di triptamina monocloridrato (4.2.3) in un matraccio tarato da 100 ml (5.6) e portare alla tacca con metanolo (4.2.1).

7.1.2. Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 10 ml (5.6) e integrare alla tacca con metanolo (4.2.1) in modo da ottenere una concentrazione di triptamina pari a 0,15 mM.

7.2. **Preparazione della soluzione campione d'analisi**

7.2.1. Pesare 1,000 ± 0,001 g del campione di LSP in un becher da 25 ml (5.2). Aggiungere 10 ml di acqua distillata a 40 °C ± 1 °C mediante una pipetta (5.3) e agitare con l'agitatore magnetico (5.4) per 30 minuti per sciogliere eventuali grumi.

7.2.2. Pipettare 0,2 ml (5.5) del latte ricostituito in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 100 µl della soluzione di triptamina 0,15 mM (7.1) con una siringa (5.7) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Miscelare accuratamente capovolgendo il matraccio e sottoponendolo a bagno ultrasonico (5.8) per 15 minuti.

7.2.3. Centrifugare (5.9) a 27 000 g per 10 minuti e raccogliere il surnatante in un flacone di vetro (5.10).

Nota: La soluzione campione deve essere conservata a 4 °C fino al momento dell'esecuzione dell'analisi HPLC.

7.3. **Preparazione della soluzione dello standard esterno**

▼B

7.3.1. Pesare 55,4 mg di PEDP (4.1) in un matraccio tarato da 50 ml (5.6) e aggiungere circa 25 ml di cloroformio (4.2.2) mediante un cilindro graduato (5.11). Riscaldare il matraccio tappato a 50 °C ± 1 °C e miscelare accuratamente fino a quando il PEDP si scioglie. Raffreddare il matraccio a 20 °C, portare a volume con metanolo (4.2.1) e miscelare capovolgendolo.

7.3.2. Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 100 ml (5.6) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 100 µl (5.7) di soluzione di triptamina 0,15 mM (7.1) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Miscelare mediante capovolgimento.

Nota: La soluzione del campione deve essere conservata a 4 °C fino al momento dell'esecuzione dell'analisi HPLC.

7.4. **Preparazione del reagente di derivatizzazione**

Pesare 25,0 ± 0,1 mg di OPA (4.3.4) in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 0,5 ml (5.5) di metanolo (4.2.1) e miscelare accuratamente per sciogliere l'OPA. Portare alla tacca con soluzione di acido borico (4.3.2) e aggiungere 20 µl di 2-mercaptoetanolo (4.3.3) con una siringa (5.7).

Nota: Il reagente di derivatizzazione deve essere conservato a 4 °C in un flacone scuro; in tal modo rimane stabile per una settimana.

7.5. **Determinazione HPLC**

7.5.1. *Solventi di eluizione (4.4)*

Solvente A: soluzione di diidrogenofosfato di sodio 0,3 mM e di acetato di sodio 3 mM (regolata a pH 6,5 ± 0,1 con acido acetico): metanolo: tetraidrofurano = 558:440:2 (v/v/v)

Solvente B: metanolo.

7.5.2. *Gradiente di eluizione consigliato:*

Durata (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Portata (ml/min)
Iniziale	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: Il gradiente di eluizione può richiedere leggere modifiche per ottenere la risoluzione mostrata in figura 1.

Temperatura della colonna: 30 °C.

7.5.3. *Volume di iniezione: 50 µl di reagente di derivatizzazione e 50 µl di soluzione campione.*

▼B

7.5.4. *Equilibratura della colonna*

Tutti i giorni, all'avviamento del sistema flussare la colonna con solvente B al 100 % per 15 minuti, regolarla poi su A:B = 40:60 ed equilibrarla a 1 ml/min per 15 minuti. Eseguire una prova in bianco iniettando metanolo (4.2.1).

Nota: Se si prevede di non usare la colonna per un tempo prolungato, flussarla con metanolo:cloroformio = 80:20 (v/v) per 30 minuti.

7.5.5. *Determinazione del contenuto di PS + PE nel campione d'analisi*

7.5.6. *Eseguire la sequenza delle analisi cromatografiche mantenendo costante il tempo da una prova all'altra allo scopo di ottenere tempi di ritenzione costanti. Iniettare la soluzione dello standard esterno (7.3) ogni 5-10 soluzioni del campione d'analisi per valutare il coefficiente di risposta0.*

Nota: La colonna deve essere pulita mediante flussaggio con solvente B al 100 % (7.5.1) per almeno 30 minuti ogni 20-25 prove.

7.6. **Modalità di integrazione**

7.6.1. *Picco PEDP*

Il PEDP viene eluito come picco singolo. Determinare l'area del picco mediante integrazione da valle a valle.

7.6.2. *Picco della triptamina*

La triptamina viene eluita come picco singolo (figura 1). Determinare l'area del picco mediante integrazione da valle a valle.

7.6.3. *Gruppo dei picchi PS e PE*

Nelle condizioni descritte (figura 1), la PS eluisce nella forma di due picchi principali parzialmente non risolti preceduti da un picco minore; la PE eluisce nella forma di tre picchi principali parzialmente non risolti. Determinare l'area totale di ciascun gruppo di picchi fissando la linea di base come indicato nella figura 1.

8. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Calcolare il contenuto di PS e PE nel campione d'analisi con la formula seguente: $C = 55{,}36 \times [(A_2)/(A_1)] \times [(T_1)/(T_2)]$

dove:

C = contenuto di PS o PE (mg/100 g di polvere) nel campione d'analisi;

A_1 = area del picco della PEDP della soluzione campione standard (7.3);

A_2 = area del picco PS o PE della soluzione campione d'analisi (7.2);

T_1 = area del picco della triptamina della soluzione campione standard (7.3);

T_2 = area del picco della triptamina della soluzione campione d'analisi (7.2).

9. PRECISIONE DEL METODO

Nota: I valori della ripetibilità sono stati calcolati secondo la norma internazionale FIL ([1]). Il limite provvisorio di riproducibilità è stato calcolato in base alla procedura di cui all'allegato III, lettera b).

([1]) Norma internazionale FIL 135B/1991. Latte e prodotti lattiero-caseari. Caratteristiche di precisione dei metodi di analisi. Descrizione di un metodo di studio in collaborazione.

▼B

9.1. **Ripetibilità**

La deviazione standard relativa della ripetibilità (che esprime la variabilità di risultati analitici indipendenti ottenuti dallo stesso operatore utilizzando la stessa apparecchiatura nelle stesse condizioni sullo stesso campione d'analisi e a breve distanza di tempo) non deve superare il 2 % in valore relativo. La differenza relativa tra i risultati di due determinazioni ottenute in queste condizioni non deve essere superiore al 6 % della media aritmetica dei risultati.

9.2. **Riproducibilità**

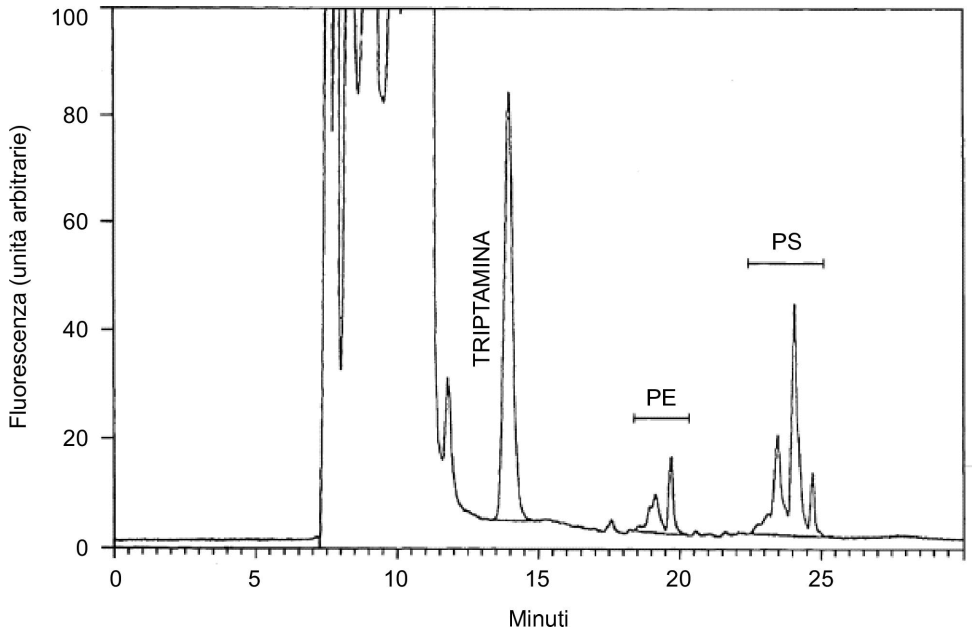
La differenza relativa tra i risultati di due determinazioni ottenute da operatori di differenti laboratori utilizzando apparecchiature differenti in differenti condizioni per l'analisi dello stesso campione non deve essere maggiore dell'11 % della media aritmetica dei risultati.

10. BIBLIOGRAFIA

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

Diagramma HPLC di derivati OPA della fosfatidilserina (PS) e della fosfatidiletanolammina (PE) in estratto metanolico di latte scremato in polvere ricostituito. È riportato il modo di integrazione dei picchi di PS, PE e triptamina (standard interno)



▼B

ALLEGATO XV

(Articolo 11)

RICERCA DI RESIDUI DI ANTIBIOTICI NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE

Effettuare un test di ricerca degli inibitori microbici che impieghi, come microorganismo di prova, *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (identico al ceppo C953) e che sia sufficientemente sensibile per rivelare 4 µg di benzilpenicillina per kg di latte e 100 µg di sulfadimidina per kg di latte. In commercio esistono kit completi di analisi che possono essere utilizzati purché abbiano la sensibilità richiesta per la benzilpenicillina e la sulfadimidina.

Per l'analisi usare latte in polvere scremato ricostituito (1 g di polvere + 9 ml di acqua distillata). Procedere come descritto in ISO/TS 26844:2006, Latte e prodotti lattiero-caseari — Determinazione di residui di antimicrobici — Test di disseminazione in tubo, bollettino FIL n. 258/1991, sezione 1, capitolo 2, o secondo le istruzioni del fabbricante del kit d'analisi ([1]).

I risultati positivi devono essere interpretati come segue:

1. La presenza di β-lattami può essere confermata ripetendo il test con l'aggiunta di penicillinasi al sistema di analisi ([2]):

   Risultato negativo: la sostanza inibitrice è un antibiotico β-lattamico.

   Se rimane un risultato positivo: la sostanza inibitrice non può essere identificata mediante questa procedura; continuare come descritto in 2.

2. La presenza di sulfonammidi può essere confermata ripetendo il test con l'aggiunta di acido p-amminobenzoico al sistema d'analisi:

   Risultato negativo: la sostanza inibitrice è una solfonammide.

   Se rimane un risultato positivo: la sostanza inibitrice non può essere identificata mediante questa procedura; continuare come descritto in 3.

3. La presenza di una combinazione di β-lattami e sulfonammidi può essere confermata ripetendo il test con l'aggiunta di penicillinasi e acido p-amminobenzoico al sistema d'analisi:

   Risultato negativo: le sostanze inibitrici sono un antibiotico β-lattamico e una solfonammide.

   Risultato positivo: la sostanza inibitrice non può essere identificata mediante questa procedura.

([1]) Nota importante: Nell'analisi di latte in polvere scremato si possono ottenere risultati falsi-positivi. È pertanto importante verificare che il sistema di analisi non dia risultati falsi-positivi.

([2]) Alcuni β-lattami sono meno sensibili alla β-lattamasi. In questi casi si raccomanda un pretrattamento supplementare del campione (1 ml del campione d'analisi con 0,3 ml di penicillasi concentrato a 37 °C per due ore).

▼B

ALLEGATO XVI

(Articolo 12)

DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ DI LATTE SCREMATO IN POLVERE PRESENTE IN UN ALIMENTO COMPOSTO PER ANIMALI, PER COAGULAZIONE ENZIMATICA DELLA PARACASEINA

1. OGGETTO

Determinazione della quantità di latte scremato in polvere presente in un alimento composto per animali, per coagulazione enzimatica della paracaseina.

2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il presente metodo si applica agli alimenti composti per animali contenenti almeno il 10 % di latte scremato in polvere; la presenza di quantità notevoli di latticello e/o di talune proteine non lattee può provocare interferenze.

3. PRINCIPIO DEL METODO

3.1. Solubilizzazione della caseina contenuta nell'alimento composto per animali, per estrazione con una soluzione di citrato di sodio.

3.2. Ripristino della concentrazione di ioni calcio necessaria per la precipitazione della paracaseina mediante aggiunta di caglio.

3.3. Determinazione dell'azoto della paracaseina dopo mineralizzazione secondo il metodo Kjeldahl, come descritto nella norma ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001; calcolo delle quantità di latte scremato in polvere presente, sulla base di un contenuto minimo di caseina del 27,5 % (cfr. 8.1).

4. REAGENTI

I reagenti impiegati sono di purezza analitica. L'acqua deve essere distillata o avere purezza equivalente. Ad eccezione del caglio (4.5) tutti i reagenti e tutte le soluzioni impiegate devono essere esenti da sostanze azotate.

4.1. Citrato trisodico con 2 molecole d'acqua di idratazione (soluzione all'1 % p/v).

4.2. Cloruro di calcio (soluzione 5 M ca).

Sciogliere 75 g di $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ in 100 ml di acqua distillata mescolando vigorosamente (attenzione alla reazione esotermica). Lasciare riposare una notte e filtrare la soluzione. Conservare la soluzione in frigorifero.

4.3. Idrossido di sodio 0,1 N.

4.4. Acido cloridrico 0,1 N.

4.5. Soluzione di caglio di vitello con titolo 100 IMCU/ml ca. secondo la norma ISO 11815/FIL 157. Conservare in frigorifero a 4-6 °C.

4.6. Reagenti per il dosaggio dell'azoto secondo il metodo Kjeldahl, come descritto nell'ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001.

5. APPARECCHIATURA

Materiale corrente di laboratorio, ed in particolare:

5.1. Mortaio o mulino omogeneizzatore

5.2. Bilancia analitica, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con risoluzione di 0,1 mg

5.3. Centrifuga da tavolo (500 g o 2 000-3 000 rpm) e relative provette da 50 ml e 2 000 g

5.4. Agitatore magnetico con sbarrette da 10-15 mm.

5.5. Becher da 150-200 ml

5.6. Matracci da 250 ml e 500 ml

▼B

5.7. Imbuti in vetro, del diametro di 60-80 mm

5.8. Filtri circolari senza ceneri, per filtrazione rapida, del diametro di 150 mm (Whatman N.41 o equivalenti)

5.9. Pipette di varie misure

5.10. Bagnomaria termostatato a 37 °C ± 1 °C

5.11. pH-metro, con l'approssimazione di 0,1 unità di pH

5.12. Termometri, con l'approssimazione di 1 °C

6. PROCEDIMENTO

6.1. **Preparazione del campione**

10-20 g del campione sono triturati in mortaio o miscelati nell'omogeneizzatore-miscelatore in modo da ottenere una miscela omogenea.

6.2. **Solubilizzazione della polvere di latte e separazione del residuo insolubile.**

6.2.1. Pesare 1,000 ± 0,002 g di alimento composto per gli animali ben omogeneizzato (6.1) direttamente in una provetta da centrifuga da 50 ml. Aggiungere 30 ml di soluzione di citrato trisodico (4.1) preventivamente riscaldata a 45 °C ± 2 °C. Disperdere la polvere sottoponendo ad agitazione magnetica per almeno 5 minuti o scuotendo vigorosamente a mano.

6.2.2. Centrifugare a 500 g (2 000-3 000 rpm) per 10 minuti e raccogliere il surnatante acquoso in un becher da 150-200 ml. Evitare la perdita di particelle insolubili durante il trasferimento del surnatante.

6.2.3. Procedere a due altre estrazioni sul residuo, operando allo stesso modo e mescolando i tre estratti acquosi.

6.2.4. Qualora dovesse verificarsi una separazione della sostanza grassa, raffreddare fino a solidificazione della fase grassa, che verrà poi asportata con una spatola.

6.3. **Coagulazione della caseina con gli enzimi del caglio**

6.3.1. All'estratto acquoso totale (circa 100 ml) aggiungere, goccia a goccia e sotto agitazione, 2 ml di una soluzione satura di cloruro di calcio (4.2). Regolare il pH su 6,4-6,5 con soluzioni diluite di NaOH (4.3) o HCl (4.4). Porre la soluzione in bagno termostatato a 37 °C ± 1 °C per 15-20 minuti, per consentire la creazione dell'equilibrio salino. Questo si manifesta con la comparsa di un aspetto lattescente.

6.3.2. Trasferire il liquido in una o due provette da centrifuga e centrifugare a 2 000 g per 10 minuti per eliminare il precipitato. Trasferire il surnatante, senza lavare il sedimento, in una o due provette da centrifuga.

6.3.3. Riportate la temperatura del surnatante a 37 °C ± 1 °C. Aggiungere goccia a goccia all'estratto agitando 0,5 ml di caglio liquido (4.5). La coagulazione si verifica entro 2 minuti.

6.3.4. Riportare il campione nel bagnomaria e lasciarlo alla temperatura di 37 °C ± 1 °C per 15 minuti. Togliere il campione dal bagnomaria e rompere il coagulo agitando. Centrifugare a 2 000 g per 10 minuti. Filtrare il surnatante con una carta da filtro adatta (5.8) e conservare la carta da filtro. Lavare il precipitato nella provetta da centrifuga con 50 ml di acqua a circa 35 °C mescolando il precipitato.

Centrifugare nuovamente a 2 000 g per 10 minuti. Filtrare il surnatante attraverso la carta da filtro conservata in precedenza.

6.4. **Determinazione dell'azoto caseinico**

6.4.1. Dopo il lavaggio, trasferire quantitativamente il precipitato sulla carta da filtro utilizzata per il procedimento di cui al punto 6.3.4 usando acqua distillata. Trasferire la carta da filtro asciugata nel pallone Kjeldahl e procedere al dosaggio dell'azoto secondo il metodo Kjeldahl come descritto nella norma ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001.

▼B

7. PROVA IN BIANCO

7.1. Effettuare regolarmente una prova in bianco mediante mineralizzazione, secondo il metodo Kjeldahl descritto nella norma ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001. Utilizzare un filtro senza ceneri (5.8) umettato con una miscela contenente 90 ml di soluzione di citrato di sodio (4.1), 2 ml di una soluzione satura di cloruro di calcio (4.2), 0,5 ml di caglio liquido (4.5) e lavato con 3 × 15 ml d'acqua distillata.

7.2. Detrarre dal volume di acido (4.4) impiegato per la titolazione del campione esaminato il volume necessario per la prova in bianco.

8. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

8.1. La percentuale di latte scremato in polvere nell'alimento composto per gli animali è calcolata con la formula seguente:

$$\% \text{ LSP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100\right) - 2,81}{0,908}$$

dove:

N rappresenta la percentuale di azoto della para-caseina,

27,5 è il coefficiente per convertire la caseina determinata nella percentuale di latte scremato in polvere,

2,81 e 0,908 sono i coefficienti di correzione ottenuti dall'analisi di regressione.

9. PRECISIONE DEL METODO

9.1. **Ripetibilità**

Nel 95 % almeno dei casi studiati la differenza fra due risultati singoli, ottenuti sullo stesso campione, nel medesimo laboratorio dallo stesso operatore, non deve superare 2,3 g di latte scremato in polvere su 100 g dell'alimento composto per gli animali esaminato.

9.2. **Riproducibilità**

Nel 95 % almeno dei casi studiati, la differenza fra i risultati ottenuti da due laboratori sullo stesso campione, non deve superare 6,5 g di latte scremato in polvere su 100 g dell'alimento composto per gli animali esaminato.

10. OSSERVAZIONI

10.1. L'aggiunta di una percentuale rilevante di talune proteine non lattee, e in particolare di quelle di soia che siano state riscaldate insieme al latte scremato in polvere, comporta risultati troppo elevati, dovuti alla coprecipitazione delle proteine stesse insieme alla paracaseina del latte.

10.2. L'aggiunta di latticello può comportare valori troppo bassi, poiché la determinazione si riferisce soltanto all'estratto sgrassato. L'aggiunta di taluni tipi di latticello di crema acida può dare valori nettamente più bassi, poiché la dissoluzione di tali prodotti nel citrato è incompleta.

10.3. L'aggiunta di lecitina in quantità non inferiore allo 0,5 % può parimenti comportare risultati troppo bassi.

10.4. L'incorporazione di latte in polvere riscaldato ad alta temperatura può condurre a valori troppo elevati, dovuti alla coprecipitazione di talune proteine del lattosiero insieme alla paracaseina del latte.

▼B

ALLEGATO XVII

(Articolo 13)

RICERCA DELL'AMIDO NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE, NEL LATTE IN POLVERE DENATURATO E NEGLI ALIMENTI COMPOSTI PER ANIMALI

1. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il presente metodo serve ad individuare l'amido utilizzato come tracciante nel latte in polvere denaturato.

Il suo valore minimo di rivelazione è di circa 0,05 g di amido per 100 g di campione.

2. PRINCIPIO

La reazione è basata su quella utilizzata nella iodometria:

— fissazione da parte dei colloidi dello iodio libero in soluzione acquosa,

— assorbimento da parte delle micelle di amido e conseguente colorazione.

3. REAGENTI

3.1. Soluzione di iodio:

— iodio: 1,0 g

— ioduro di potassio: 2,0 g

— acqua distillata: 100 ml

— sciogliere 1,0 g di iodio e 2 g di ioduro di potassio in acqua in un matraccio tarato da 100 ml. Diluire con acqua fino alla tacca di 100 ml e mescolare.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Bilancia analitica

4.2. Bagnomaria bollente

4.3. Provette, 25 mm × 200 mm.

5. PROCEDIMENTO

Pesare 1,0 g del campione con l'approssimazione di 0,1 g e collocarlo nella provetta (4.3).

Aggiungere 20 ml di acqua distillata e agitare per disperdere il campione.

Mettere la provetta nel bagnomaria bollente (4.2) e mantenervela per 5 minuti.

Togliere la provetta dal bagnomaria e lasciare raffreddare a temperatura ambiente.

Aggiungere 0,5 ml della soluzione di iodio (3.1), agitare e osservare il colore risultante.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La colorazione blu indica la presenza di amido nativo nel campione.

Se il campione contiene amido modificato il colore non può essere blu.

7. OSSERVAZIONI

Il colore, la sua intensità e l'aspetto dell'amido al microscopio variano a seconda dell'origine dell'amido nativo (ad esempio: mais o patate) e del tipo di amido modificato presente nel campione.

Nel caso di amidi modificati, il colore risultante vira al violetto, al rosso o al marrone, secondo il grado di modificazione della struttura cristallina dell'amido nativo.

▼B

ALLEGATO XVIII

(Articolo 14)

DETERMINAZIONE DEL TENORE DI UMIDITÀ NELLA CREMA IN POLVERE

1. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il presente allegato specifica un metodo per la determinazione del contenuto di acqua nella crema in polvere.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Ai fini del presente allegato valgono le seguenti definizioni:

tenore di umidità, la perdita di massa determinata con il procedimento descritto nella presente norma internazionale,

espressa in percentuale della massa.

3. PRINCIPIO

Essiccare un'aliquota da analizzare a 102 ± 2 °C fino ad ottenere una massa costante e pesare per determinare la perdita di massa.

4. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura di laboratorio, in particolare:

4.1. Bilancia analitica, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con una risoluzione di 0,1 mg.

4.2. Forno da essiccazione, ventilato, sotto controllo termostatico, funzionante a 102 ± 2 °C su tutto lo spazio di lavoro.

4.3. Essiccatore fornito di gel di silice recentemente essiccato, con indicatore igroscopico, o di un altro efficace agente essiccante.

4.4. Piattini piani, profondi 25 mm ca., del diametro di ca. 50 mm, di materiale idoneo (ad esempio vetro, acciaio inossidabile, nickel o alluminio), con coperchi a misura facilmente amovibili.

4.5. Bottiglie con tappo a tenuta, adatte per miscelare i campioni di laboratorio.

5. CAMPIONAMENTO

È importante che il laboratorio riceva un campione da analizzare veramente rappresentativo, che non ha subito danni o modifiche durante il trasporto o il magazzinaggio.

Il campionamento non rientra nel metodo specificato nella presente norma internazionale. Un metodo di campionamento raccomandato è descritto nella norma ISO 707FIL 50.

Conservare il campione in modo da impedirne il deterioramento e le modifiche di composizione.

6. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DA ANALIZZARE

Mescolare bene il campione d'analisi agitando ripetutamente e capovolgendo il contenitore (se necessario dopo aver trasferito tutti i campioni in un recipiente a tenuta stagna di capacità sufficiente per permettere l'esecuzione di quest'operazione).

Se questo procedimento non permette di ottenere un'omogeneità completa, prendere le aliquote da analizzare (per due determinazioni singole) dal campione d'analisi preparato prelevandole da due punti il più possibile lontani tra loro.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparazione del piattino**

7.1.1. Riscaldare un piattino scoperto e il suo coperchio (4.4) nel forno (4.2) termostatato a 102 ± 2 °C, per almeno un'ora.

7.1.2. Porre il coperchio sul piattino e trasferire il piattino coperto nell'essiccatore (4.3); lasciare raffreddare fino alla temperatura della sala bilance e pesare con l'approssimazione di 1 mg annotando il peso in base ad una risoluzione di 0,1 mg.

▼B

7.2. **Aliquota da analizzare**

Trasferire da 1 a 3 g del campione d'analisi preparato (6) nel piattino, coprire col coperchio e pesare con l'approssimazione di 1 mg, annotando il peso in base ad una risoluzione di 0,1 mg.

7.3. **Determinazione**

7.3.1. Scoperchiare il piattino e riscaldare piattino e coperchio nel forno (4.2) termostatato a 102 ± 2 °C, per due ore.

7.3.2. Rimettere il coperchio sul piatto e trasferirlo nell'essiccatore; lasciare raffreddare fino alla temperatura della sala bilance e pesare con l'approssimazione di 1 mg, annotando il peso in base ad una risoluzione di 0,1 mg.

7.3.3. Scoperchiare il piattino e riscaldare di nuovo piattino e coperchio nel forno per un'ora. Poi ripetere l'operazione descritta in 7.3.2.

7.3.4. Ripetere la procedura di riscaldamento e la pesatura finché la massa diminuisce di 1 mg o meno, o aumenta di peso tra due pesate successive.

Per il calcolo usare la massa più piccola registrata.

8. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

8.1. **Calcolo**

Il tenore di umidità, espresso in g/100 g, è pari a:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

dove:

m_0 è la massa, in grammi, del piattino e del coperchio (7.1.2);

m_1 è la massa, in grammi, del piattino, del coperchio e dell'aliquota da analizzare prima dell'essiccazione (7.2);

m_2 è la massa, in grammi, del piattino, del coperchio e dell'aliquota da analizzare dopo l'essiccazione (7.3.4).

Indicare il risultato con due decimali.

9. PRECISIONE

Nota: I valori di ripetibilità e riproducibilità sono stato ottenuti da un test interlaboratorio (cfr. Steiger, Bollettino FIL-IDF n. 285/1993, pagg. 21-28) eseguito in conformità alla norma FIL-IDF 135B:1991. Latte e prodotti lattiero-caseari — Caratteristiche di precisione dei metodi di analisi — Descrizione di un metodo di studio in collaborazione.

9.1. **Ripetibilità**

La differenza assoluta tra due singoli risultati analitici, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico nello stesso laboratorio dallo stesso operatore utilizzando la stessa attrezzatura entro un breve intervallo di tempo sarà superiore a 0,20 g di umidità per 100 g di prodotto in un numero di casi non maggiore del 5 %.

9.2. **Riproducibilità**

Le differenze assolute tra due singoli risultati analitici, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico in laboratori diversi da operatori diversi che utilizzano attrezzature diverse saranno superiori a 0,40 g di umidità per 100 g di prodotto in un numero di casi non maggiore del 5 %.

10. RELAZIONE

La relazione dovrà precisare:

— tutte le informazioni necessarie per l'identificazione completa del campione,

— il metodo di campionamento usato, se noto,

— il metodo di prova usato con riferimento alla presente norma internazionale,

▼B

— tutti i particolari operativi non specificati nella presente norma internazionale o considerati come facoltativi, nonché gli eventuali incidenti che potrebbero avere influenzato i risultati.

I risultati ottenuti e, se è stata verificata la ripetibilità, il risultato finale ottenuto.

▼B

ALLEGATO XIX

(Articolo 15)

DETERMINAZIONE DEL TENORE DI UMIDITÀ DEL LATTICELLO ACIDO IN POLVERE

1. CAMPO D'APPLICAZIONE

Determinazione del tenore d'umidità nel latticello acido in polvere, originariamente destinato ad alimenti per animali.

2. PRINCIPIO

Il campione è essiccato sotto vuoto. La massa persa è determinata mediante pesatura.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Bilancia analitica, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con risoluzione di 0,1 mg

3.2. Piattini di vetro o di metallo non intaccabile da sostanze corrosive con coperchi a chiusura ermetica; superficie utile su cui possa essere distribuito il campione in esame a circa 0,3 g/cm^2.

3.3. Stufa a vuoto a riscaldamento elettrico regolabile munita di pompa ad olio e di un dispositivo per introdurre aria secca calda attraverso una torre contenente, ad esempio, ossido di calcio o solfato di calcio (con un indicatore di umidità).

3.4. Essiccatore con un efficace agente essiccante.

3.5. Forno di essiccazione ventilato, a termoregolazione (termostato), a 102 ± 2 °C.

4. PROCEDIMENTO

Riscaldare un piattino (3.2) e il suo coperchio nel forno (3.5) per almeno un'ora. Porre il coperchio sul recipiente e trasferire immediatamente nell'essiccatore (3.4); lasciare raffreddare a temperatura ambiente e pesare con l'approssimazione di 1 mg, annotando la massa in base ad una risoluzione di 0,1 mg.

Scoperchiare il piattino e trasferirvi ca. 5 g di campione e pesare con l'approssimazione di 1 mg, annotando la massa in base ad una risoluzione di 0,1 mg. Porre il piattino col coperchio nella stufa a vuoto (3.3) preriscaldata ad 83 °C. Per evitare che la temperatura della stufa si abbassi eccessivamente, introdurvi il piattino il più rapidamente possibile.

Portare la pressione a 100 Torr (13,3 kPa) e lasciare essiccare fino a ottenimento di un peso costante (per quattro ore circa) a questa pressione in una corrente di aria secca calda.

Iniziare il conteggio del tempo di essiccazione dal momento in cui la temperatura della stufa ritorna ad 83 °C. Riportare con cautela la stufa alla pressione atmosferica. Aprire la stufa, porre immediatamente il coperchio sul piattino, toglierlo dalla stufa, lasciare raffreddare per 30-45 min nell'essiccatore (3.4) e pesare con l'approssimazione di 1 mg, annotando la massa in base ad una risoluzione di 0,1 mg. Fare essiccare per altri 30 min nella stufa a vuoto (3.3) ad 83 °C e pesare nuovamente. Ripetere la procedura di riscaldamento e di pesatura finché la massa del piattino col coperchio diminuisce di 1 mg o meno, o aumenta di peso tra due pesate successive. Per il calcolo usare la massa più piccola registrata.

5. CALCOLO

$\%\ \text{umidità} = (m_1-m_2) / (m_1-m_0) \times 100\ \%$

dove:

m_0 è la massa del piattino e del coperchio,

m_1 è la massa del piattino, del coperchio e dell'aliquota da analizzare prima dell'essiccazione,

m_2 è la massa del piattino, del coperchio e dell'aliquota da analizzare dopo l'essiccazione.

Registrare il risultato con l'approssimazione di 0,1 g/100 g.

▼B

6. PRECISIONE

6.1. **Ripetibilità**

La differenza assoluta tra due singoli risultati analitici indipendenti, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico nello stesso laboratorio dallo stesso operatore utilizzando la stessa attrezzatura entro un breve intervallo di tempo sarà superiore a 0,4 g di acqua per 100 g di latticello in polvere in un numero di casi non maggiore del 5 %.

6.2. **Riproducibilità**

Le differenze assolute tra due singoli risultati analitici indipendenti, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico in laboratori diversi da operatori diversi che utilizzano attrezzature diverse saranno superiori a 0,6 g di acqua per 100 g di latticello acido in polvere in un numero di casi non maggiore del 5 %.

6.3. **Fonte dei dati relativi alla precisione**

I dati relativi alla precisione sono stati stabiliti in base ad un esperimento svolto nel 1995 in otto laboratori e su dodici campioni (sei in doppio cieco).

▼B

ALLEGATO XX

(Articolo 16)

METODO DI RIFERIMENTO PER LA DETERMINAZIONE DELLA PUREZZA DEL GRASSO DEL LATTE MEDIANTE ANALISI GASCROMATOGRAFICA DEI TRIGLICERIDI — REVISIONE 2

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

La presente norma stabilisce un metodo di riferimento per la determinazione della purezza del grasso del latte mediante analisi gascromatografica dei trigliceridi. Possono essere rilevati i grassi sia vegetali che animali, come il sego e il lardo.

Mediante l'uso di formule trigliceridiche definite si determina l'integrità del grasso del latte. Di massima il metodo si applica al latte vaccino crudo, o ai prodotti da esso ottenuti, indipendentemente dalle condizioni di alimentazione, allevamento o lattazione. Solo un'alimentazione eccezionalmente ricca di oli vegetali puri, come l'olio di ravizzone, può dare risultati falsi positivi. Anche i prodotti ottenuti dal latte di singole vacche possono dare risultati falsi positivi.

Il metodo si applica in particolare al grasso estratto da prodotti lattiero-caseari che si suppone debbano contenere grasso del latte puro di composizione inalterata, come il burro, la crema di latte, il latte e il latte in polvere. I trattamenti tecnologici sul grasso del latte, come ad esempio la rimozione del colesterolo o il frazionamento, possono dare risultati falsi positivi. Ciò vale anche per il grasso del latte ottenuto da latte scremato o latticello. Questo metodo non si può sempre applicare al grasso estratto dal formaggio perché il processo di maturazione può influire sulla composizione del grasso in misura così notevole da causare risultati falsi positivi.

Nota 1: L'acido butirrico (n-butanoico) (C_4) che è presente esclusivamente nel grasso del latte permette stime quantitative di quantità da piccole a medie di grasso di latte in grassi vegetali e animali. Tuttavia è difficile ottenere informazioni qualitative e quantitative sui grassi estranei al grasso del latte per aggiunte di frazioni in massa fino al 20 % [1], a causa delle ampie variazioni, nel C_4, della percentuale approssimativa della frazione in massa che va da 3,1 % a 3,8 %.

Nota 2: In pratica non si possono ottenere risultati quantitativi in base al contenuto di steroli dei grassi vegetali, in quanto tali risultati variano in funzione delle condizioni di produzione e di trattamento. Anzi, la determinazione qualitativa dei grassi estranei in base agli steroli è ambigua.

2. DEFINIZIONE

Purezza del grasso di latte: assenza di grassi vegetali e animali determinata con il procedimento descritto nella presente norma.

Nota: La purezza è determinata utilizzando valori di *S* calcolati in base alla composizione del trigliceride. Le frazioni in massa del trigliceride sono espresse in percentuale.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il grasso estratto dal latte o dai prodotti lattiero-caseari è analizzato mediante gascromatografia per mezzo di una colonna impaccata o una colonna capillare corta per determinare i trigliceridi (TGs), separati secondo il numero di atomi di carbonio. Inserendo la frazione di massa, espressa in percentuale, delle molecole di grasso di differenti dimensioni (da C_{24} a C_{54}, usando solo i numeri pari) nelle formule dei trigliceridi adeguate si calcolano i valori di *S*. Se i valori di *S* superano i limiti stabiliti con il grasso di latte puro, è accertata la presenza di grassi estranei.

▼B

Nota 1: L'idoneità e l'equivalenza delle colonne impaccate e delle colonne capillari è già stata dimostrata in precedenza [2-4].

Nota 2: Il valore di *S* è la somma delle frazioni di massa del trigliceride moltiplicate rispettivamente per fattori determinati.

4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di qualità analitica garantita.

4.1. Gas di trasporto (carrier): azoto o, in alternativa, elio o idrogeno, tutti di purezza minima del 99,995 %.

4.2. Campioni di grasso standard per la standardizzazione di un grasso di latte standard secondo la sezione 7.3.3.

4.2.1. Trigliceridi standard saturi; in commercio esistono prodotti adatti.

4.2.2. Colesterolo standard.

4.3. Metanolo anidro (CH_3OH).

4.4. n-esano [$CH_3(CH_2)4CH_3$].

4.5. n-eptano [$CH_3(CH_2)5CH_3$].

4.6. Altri gas: idrogeno, purezza di almeno 99,995 %, esente da impurezze organiche (C_nH_m < 1 µl/l); aria sintetica, esente da impurezze organiche (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Solfato di sodio anidro (Na_2SO_4).

5. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura di laboratorio, in particolare la seguente.

5.1. **Gascromatografo ad alta temperatura**

Il gascromatografo ad alta temperatura deve essere adatto per temperature di almeno 400 °C e equipaggiato con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). I setti del sistema iniettore devono essere resistenti ad alte temperature e presentare in generale un livello di cessione bassissimo. Per le colonne capillari usare un iniettore di colonna. Usare sempre guarnizioni di grafite per collegare la colonna e gli inserti dell'iniettore e/o del rivelatore (se del caso).

5.2. **Colonna cromatografica**

5.2.1. *Colonna impaccata*

Utilizzare una colonna di vetro del diametro interno di 2 mm e della lunghezza di 500 mm, impaccata con una fase stazionaria di OV-1 al 3 % su Gas ChromQ da 125/150 µm (100/120 mesh) ([1]). La preparazione, la silanizzazione, l'impaccamento e la confezione della colonna impaccata sono descritti nell'allegato A.

In alternativa si può usare una colonna capillare (5.2.2).

5.2.2. *Colonna capillare*

Usare una colonna capillare corta, ad esempio di 5 m di lunghezza con una fase stazionaria non polare, resistente a temperature di almeno 400 °C ([2]). Confezionare la colonna eseguendo 20 analisi di una soluzione di grasso di latte (7.2) in due o tre giorni utilizzando i parametri forniti nella sezione 7.3.4.2. Al termine delle analisi i coefficienti di risposta (7.3.3) devono essere prossimi a 1 e inferiori a 1,20.

Nota: Si possono usare colonne di dimensioni diverse e con una fase non polare diversa resistente ad alte temperature, purché la loro efficacia risponda alla presente norma. Cfr. anche 7.3.4.2.

([1]) Esempio di un prodotto disponibile in commercio. Quest'informazione è fornita per coloro che utilizzano questa norma internazionale, ma non deve essere intesa come una raccomandazione del prodotto.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) è un esempio di prodotto idoneo disponibile in commercio. Quest'informazione è fornita per coloro che utilizzano questa norma internazionale, ma non deve essere intesa come una raccomandazione del prodotto.

▼B

5.3. Colonna Extrelut, da 1 ml a 3 ml, riempita con gel di silice, necessaria per l'estrazione del grasso di latte esclusivamente in base al metodo di cui alla sezione 7.1.3.

5.4. Guarnizioni di grafite resistenti a temperature di almeno 400 °C, da usare per collegare la colonna GC e gli inserti dell'iniettore e/o del rivelatore.

5.5. Bagnomaria in grado di mantenere una temperatura di 50 °C ± 2 °C.

5.6. Stufa regolabile su 50 °C ± 2 °C e 100 °C ± 2 °C.

5.7. Pipetta con graduazione in microlitri.

5.8. Pipetta graduata della capacità di 5 ml.

5.9. Pallone a fondo rotondo della capacità di 50 ml.

5.10. Beuta, volume nominale 250 ml.

5.11. Imbuto.

5.12. Carta da filtro a pori fini.

5.13. Evaporatore rotante.

5.14. Fiale, volume nominale 1 ml, provviste di tappo d'alluminio a corona o a vite foderato di politetrafluoroetilene.

5.15. Siringa di iniezione, con stantuffo che non raggiunge la punta dell'ago (colonna GC impaccata).

Nota: Queste siringhe permettono di ottenere una migliore ripetibilità dei risultati.

5.16. Bilancia analitica, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con risoluzione di 0,1 mg

6. CAMPIONAMENTO

Al laboratorio deve essere stato spedito un campione rappresentativo che non ha subito danni o modifiche nel corso del trasporto o del magazzinaggio.

Il campionamento non rientra nel metodo specificato nella presente norma internazionale. Un metodo di campionamento raccomandato è descritto nella norma ISO 707FIL 50 [5].

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparazione dei campioni da analizzare**

Per la preparazione dei campioni da analizzare si può utilizzare uno dei seguenti tre metodi di estrazione del grasso di latte.

7.1.1. *Isolamento a partire da burro o butteroil*

Fondere 50-100 g del campione d'analisi a 50 °C nel bagnomaria (5.5) o nella stufa (5.6). Porre 0,5-1,0 g di solfato di sodio (4.7) in una carta da filtro ripiegata (5.12). Preriscaldare una beuta da 250 ml (5.10) e un imbuto (5.11), con inserita carta da filtro, nella stufa (5.6) regolata su 50 °C. Filtrare lo strato di grasso del campione fuso mantenendo il dispositivo preriscaldato nella stufa (beuta, imbuto e filtro). Attenzione a non trasferire siero.

Solo se è disponibile una quantità limitata dell'aliquota da analizzare si può utilizzare un campione più piccolo adattando il procedimento di conseguenza. Tuttavia la manipolazione di un'aliquota d'analisi più piccola comporta un rischio maggiore di ottenere un campione non rappresentativo.

Nota 1: Il burro può essere ottenuto dalla crema mediante zangolatura e accurato lavaggio del burro che ne deriva.

Nota 2: Il grasso di latte ottenuto mediante il procedimento descritto in 7.1.1 sarà pressoché esente da fosfolipidi.

▼B

7.1.2. *Estrazione della frazione grassa con il metodo gravimetrico Röse-Gottlieb*

Estrarre la frazione grassa dal campione da analizzare con il metodo gravimetrico descritto in una delle norme ISO 1211 FIL 001D, ISO 2450FIL 016C o ISO 7328FIL 116A.

Nota: Se nel grasso di latte ottenuto sono presenti fosfolipidi si otterrà un picco di colesterolo aumentato dello 0,1 % circa. La composizione del trigliceride standardizzato al 100 % col colesterolo ne risulta influenzata solo in misura trascurabile.

7.1.3. *Estrazione dal latte con l'utilizzo di colonne a gel di silice*

Con una micropipetta (5.7) applicare un campione da 0,7 ml termostatato a 20 °C ad una colonna Extrelut da 1 a 3 ml (5.3) e lasciare distribuire in maniera uniforme sul gel di silice per circa 5 minuti.

Per denaturare i complessi proteolipidici, aggiungere con la pipetta graduata (5.8) 1,5 ml di metanolo (4.3) alla colonna Extrelut. Successivamente estrarre la frazione grassa dal campione con 20 ml di *n*-esano (4.4). L'*n*-esano viene aggiunto lentamente in piccole quantità e il solvente drenato viene raccolto in un pallone a fondo rotondo da 50 ml (5.9) preventivamente essiccato a peso costante noto, pesato con l'approssimazione di 1 mg, registrando la massa in base ad una risoluzione di 0,1 mg.

Dopo l'estrazione drenare la colonna fino a quando è vuota. Allontanare dall'eluato i solventi per distillazione su un evaporatore rotante (5.13) ad una temperatura del bagnomaria da 40 a 50 °C. Dopo la rimozione dei solventi essiccare il pallone e quindi pesarlo insieme al suo contenuto con l'approssimazione di 1 mg, registrando la massa in base ad una risoluzione di 0,1 mg. Determinare la resa di grasso sottraendo la massa del pallone vuoto asciutto dalla massa ottenuta.

Nota: I metodi di estrazione dei grassi secondo Gerber, Weibull-Berntrop o Schmid-Bondzynski-Ratzlaff o l'isolamento del grasso di latte con l'utilizzo di detergenti (metodo BDI) non sono adatti per l'analisi dei trigliceridi perché con questi metodi possono passare nella fase grassa quantità notevoli di gliceridi parziali o fosfolipidi. Di conseguenza la presente norma internazionale è di applicazione limitata nel caso di certi prodotti, in particolare il formaggio.

7.2. **Preparazione della soluzione campione**

Per la gascromatografia usando una colonna impaccata, preparare una soluzione al 5 % (frazione di volume) del grasso (ottenuto secondo la sezione 7.1) in *n*-esano (4.4) o *n*-eptano (4.5). In funzione delle dimensioni della colonna usare una concentrazione all'1 % (0,53 mm di diametro interno, colonna wide-bore) o inferiore in caso di iniezione diretta in colonna in una colonna capillare.

In funzione della colonna usata e della massa di grasso ottenuta in 7.1.3, determinare la quantità di solvente (4.4 o 4.5) da aggiungere al campione nel pallone pesando con l'approssimazione di 1 mg e registrando la massa in base alla risoluzione di 0,1 mg. Sciogliere completamente la parte rimanente.

Trasferire circa 1 ml della soluzione campione in una fiala (5.14).

7.3. **Determinazione cromatografica dei trigliceridi**

7.3.1. *Deriva della linea di base*

Per minimizzare l'allontanamento della linea di base dalla linea orizzontale la colonna deve essere confezionata come specificato nella sezione 5.2.2. (colonna capillare) oppure nell'allegato A (punto A.4, colonna impaccata).

Nota: A causa dell'elevata temperatura nella colonna, l'analisi dei trigliceridi è particolarmente esposta ad un innalzamento della linea di base nella fascia con un numero elevato di atomi di carbonio.

7.3.2. *Tecnica di iniezione*

▼B

7.3.2.1. Colonna impaccata

Per evitare effetti di discriminazione si applica la tecnica di iniezione a caldo per ottenere risultati quantitativi migliori con i componenti trigliceridici alto-bollenti. Riempire l'ago di aria nell'aspirare la soluzione di grasso nella siringa. Inserire l'ago nell'iniettore. Riscaldare l'ago prima dell'iniezione per circa 3 s e iniettare quindi rapidamente il contenuto della siringa.

7.3.2.2. Colonna capillare

Se si usa un'iniezione in colonna a freddo (7.3.4.2), inserire l'ago della siringa e iniettare immediatamente. Il tempo di permanenza dell'ago nel punto di iniezione deve essere tale da evitare code ampie del picco dell'eluente.

Nota: Il tempo di permanenza ottimale è di solito di circa 3 s.

7.3.3. *Taratura*

7.3.3.1. Osservazioni generali

Per la taratura dei campioni di prova eseguire da due a tre analisi del grasso di latte standardizzato all'inizio di ogni giorno. Usare l'ultima analisi del grasso di latte standardizzato per determinare i coefficienti di risposta RF_{si} (frazione di massa/frazione di superficie) dei trigliceridi e del colesterolo e applicarli ai campioni d'analisi successivi (cfr. 9.1).

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

dove:

w_{si} è la frazione di massa, espressa in percentuale, di ogni trigliceride o colesterolo contenuto nel grasso di latte standardizzato;

A_{si} è il valore numerico della superficie del picco di ogni trigliceride o colesterolo contenuto nel grasso di latte standardizzato.

Usare il procedimento descritto in 7.3.3.2 o 7.3.3.3 per ottenere grasso di latte standardizzato con una composizione nota di trigliceridi.

7.3.3.2. Grasso di latte standard disponibile in commercio

Il modo migliore di determinare il coefficiente di risposta di ciascun costituente del campione da analizzare è quello di usare un grasso di latte standardizzato di composizione trigliceridica certificata.

Nota: Uno standard idoneo è il CRM 519 (grasso di latte anidro) che si può ottenere presso l'Istituto dei materiali e delle misure di riferimento (IRMM) Geel, Belgio ([1]).

7.3.3.3. Grasso di latte standard di laboratorio

Preparare circa 1 g di miscela di grassi standardizzati (cfr. 4.2, contenenti almeno i trigliceridi saturi C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} e C_{54}, e il colesterolo; preferibilmente anche con C_{50} e C_{52}) pesando con l'approssimazione di 1 mg e registrando la massa in base ad una risoluzione di 0,1 mg, per ottenere una composizione relativa del trigliceride simile al grasso del latte.

Compiere analisi ripetute di una soluzione della miscela di grassi standard in *n*-esano (4.4) o *n*-eptano (4.5) secondo quanto indicato nella sezione 7.3.4. Nella stessa sequenza analizzare ripetutamente grasso di latte di composizione media.

Determinare i coefficienti di risposta del trigliceride a partire dalla miscela di grassi standard. I coefficienti di risposta intermedi di trigliceridi non presenti nella miscela si possono calcolare per interpolazione

([1]) Esempio di un prodotto disponibile in commercio. Quest'informazione è fornita per coloro che utilizzano questa norma internazionale, ma non deve essere intesa come un raccomandazione del prodotto.

▼B

matematica. Applicare i coefficienti di risposta ottenuti al grasso di latte per ottenere una composizione standardizzata. Il grasso di latte standardizzato così ottenuto ha una conservabilità di parecchi anni se viene immagazzinato sotto azoto alla temperatura massima di – 18 °C.

7.3.4. *Condizioni cromatografiche*

Nota: L'uso di colonne impaccate o capillari in genere dà una risoluzione simile a quella riprodotta nella figura 1. Di solito non si osserva, e va evitato, lo splitting dei trigliceridi a numero pari.

7.3.4.1. Colonna impaccata

a) Programma di temperatura: Regolare la temperatura iniziale della stufa a 210 °C e mantenerla per 1 min, quindi aumentarla in ragione di 6 °C/min fino a 350 °C; mantenere quest'ultima temperatura (definitiva) per 5 min.

b) Temperature del rivelatore e dell'iniettore: entrambe a 370 °C.

c) Gas di trasporto (carrier): usare azoto ad un flusso costante di circa 40 ml/min. Regolare il flusso esatto del gas di trasporto in modo che C_{54} sia eluito a 341 °C.

d) Durata dell'analisi: 29,3 min.

e) Volume di iniezione: 0,5 µl di una soluzione di campione al 5 % (frazione di volume).

Se non si eseguono analisi dei trigliceridi, mantenere costanti la temperatura iniziale del forno indicata in a), le temperature del rivelatore e dell'iniettore indicate in b) e il flusso del gas di trasporto indicato in c), anche di notte e durante i fine settimana e le vacanze. Ciò permette di ottimizzare il funzionamento della colonna.

7.3.4.2. Colonna capillare

a) Programma di temperatura: regolare la temperatura iniziale della stufa a 80 °C e mantenerla per 0,5 min, quindi aumentarla in ragione di 50 °C/min fino a 190 °C e successivamente di 6 °C/min fino a 350 °C; mantenere quest'ultima temperatura per 5 min.

b) temperatura del rivelatore: 370 °C.

c) Gas di trasporto (carrier): usare azoto ad un flusso costante di circa 3 ml/min.

d) Durata dell'analisi: 34,4 min.

e) Volume di iniezione: 0,5 µl di una soluzione di campione all'1 % (frazione di volume).

Mantenere questi parametri nei periodi di attesa per garantire una prestazione ottimale (cfr. 7.3.4.1).

I parametri di analisi indicati in 7.3.4.2 sono idonei per l'uso in una colonna di tipo wide-bore (diametro interno 0,53 mm) come specificato in 5.2.2. Si possono applicare condizioni diverse se si usa una colonna di dimensioni diverse o una diversa fase.

8. INTEGRAZIONE, VALUTAZIONE E CONTROLLO DELLA PRESTAZIONE ANALITICA

Valutare i picchi del cromatogramma con un sistema di integrazione in grado di tracciare e reintegrare la linea di base. La figura 1 presenta un cromatogramma correttamente integrato, mentre la figura 2 presenta un errore sporadico nella linea di base che finisce dopo C_{54}, che influenza le percentuali di tutti i trigliceridi. Escludere comunque dalla valutazione i picchi eluiti dopo C_{54}.

Combinare i trigliceridi con un numero dispari di carboni acilici ($2n + 1$) con il trigliceride a numero pari precedente ($2n$). Non si tiene conto del basso contenuto di C_{56}. Moltiplicare le percentuali dell'area dei trigliceridi rimanenti, incluso il colesterolo, per i corrispondenti coefficienti di risposta del grasso di latte standardizzato (ultima taratura) e normalizzare tutto insieme al 100 % secondo quanto indicato nella sezione 9.1.

▼B

Figura 1

Esempio di cromatogramma di trigliceride del grasso di latte con un tracciato della linea di base corretto

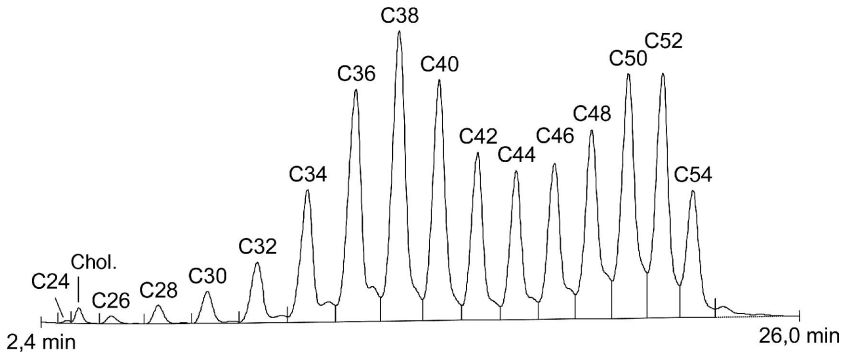
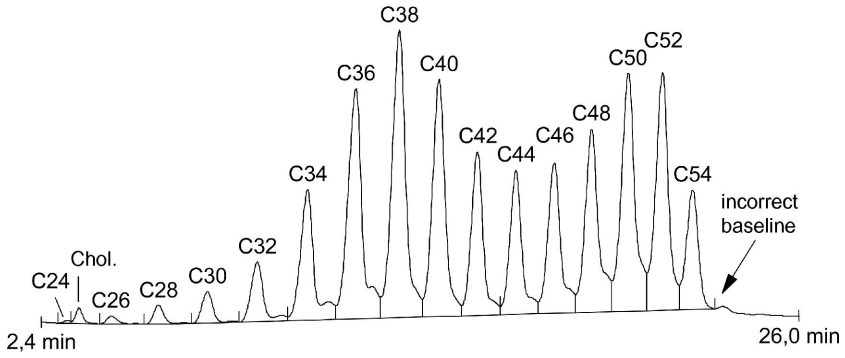


Figura 2

Esempio di cromatogramma di trigliceride del grasso di latte con un tracciato della linea di base non corretto



Per controllare le condizioni di misurazione, comparare con i coefficienti di variazione, CV, espressi in percentuale, dei vari trigliceridi riportati nella tabella 1, calcolati in base a 19 analisi consecutive dello stesso campione di grasso di latte.

Se i CV sono nettamente superiori ai valori indicati nella tabella 1, le condizioni cromatografiche non sono corrette.

Nota: I valori riportati nella tabella 1 non sono vincolanti e si limitano a fornire un'indicazione per il controllo di qualità.

Se si accettano valori di CV più elevati, occorre comunque rispettare i limiti di ripetibilità e di riproducibilità di cui alla sezione 10.

Tabella 1

Coefficienti di variazione del tenore di trigliceridi (19 analisi consecutive)

Trigliceride	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

Trigliceride	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. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

9.1. **Composizione trigliceridica**

9.1.1. *Calcolo*

Calcolare la frazione di massa di ogni trigliceride (per 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} e C_{54}) e del colesterolo, w_i, espressa in percentuale, del tenore totale di trigliceridi contenuti nel campione d'analisi usando la seguente formula:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

dove:

A_i è il valore numerico dell'area del picco di ogni trigliceride presente nel campione analizzato;

RF_{si} è il coefficiente di risposta di ogni trigliceride determinato mediante taratura (7.3.3).

9.1.2. *Espressione dei risultati*

Indicare il risultato con due decimali.

9.2. **Valori di *S***

9.2.1. *Calcolo*

9.2.1.1. Calcolare i valori di *S*, espressi in percentuale, inserendo il valore calcolato di w_i (9.1.1) delle percentuali del relativo trigliceride nelle formule da (3) a (7). Usare tutte le formule indipendentemente dalla natura del grasso estraneo di cui si sospetta la presenza.

9.2.1.2. Oli di soia, girasole, oliva, ravizzone, semi di lino, germe di grano, germe di granturco, semi di cotone e olio di pesce.

$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50}$ (3)

9.2.1.3. Grasso di cocco e di palmisto.

$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54}$ (4)

9.2.1.4. Olio di palma e sego

$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46}$ (5)

9.2.1.5. Lardo.

$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54}$ (6)

▼B

9.2.1.6. Totale

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Espressione dei risultati*

Indicare il risultato con due decimali.

9.3. **Ricerca di grasso estraneo**

Comparare i cinque valori di *S* ottenuti in 9.2.1 con i corrispondenti limiti di *S* indicati nella tabella 2.

Il campione da analizzare si può considerare come grasso di latte puro se tutti e cinque i valori di *S* rientrano nei limiti indicati nella tabella 2. Se però uno dei valori di *S* supera i limiti corrispondenti, si ritiene che il campione contenga un grasso estraneo presente.

Benché le singole formule da (3) a (6) siano più sensibili per certi grassi estranei rispetto alla formula totale (7) (cfr. tabella B.1), un risultato positivo ottenuto solo con una delle formule da (3) a (6) non permette di trarre conclusioni sul tipo di grasso estraneo.

L'allegato B descrive un procedimento di calcolo del tenore di grassi animali o vegetali nel grasso di latte adulterato. Il procedimento non è stato validato ed è indicato solo in via informativa.

Tabella 2

Limiti di *S* per i grassi di latte puri

Grasso estraneo	Formula	Limiti di *S* [a]
Oli di soia, girasole, oliva, ravizzone, semi di lino, germe di grano, germe di granturco, semi di cotone e olio di pesce	(3)	98,05-101,95
Grasso di cocco e di palmisto	(4)	99,42-100,58
Olio di palma e sego	(5)	95,90-104,10
Lardo	(6)	97,96-102,04
Totale	(7)	95,68-104,32

[a] Calcolato con un livello di fiducia del 99 % in modo che l'aggiunta di grasso estraneo sia indicata solo se sono superati i limiti di rilevamento della pertinente formula (cfr. tabella B.1).

10. PRECISIONE

10.1. **Test interlaboratorio**

I valori di ripetibilità e riproducibilità sono stati determinati in base alle formule da (3) a (7) usando grasso di latte puro e non possono essere applicati a matrici diverse da quelle date.

10.2. **Ripetibilità**

La differenza assoluta tra due singoli risultati analitici, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico nello stesso laboratorio dallo stesso operatore utilizzando la stessa attrezzatura entro un breve intervallo di tempo saranno superiori ai limiti riportati nella tabella 3 in un numero di casi non maggiore del 5 %.

▼B

Tabella 3

Limiti di ripetibilità, r, per le formule da (3) a (7)

Grasso estraneo	Formula	r %
Oli di soia, girasole, oliva, ravizzone, semi di lino, germe di grano, germe di granturco, semi di cotone e olio di pesce	(3)	0,67
Grasso di cocco e di palmisto	(4)	0,12
Olio di palma e sego	(5)	1,20
Lardo	(6)	0,58
Totale	(7)	1,49

10.3. **Riproducibilità**

La differenza assoluta tra due singoli risultati analitici, ottenuti con lo stesso metodo su materiale da analizzare identico in laboratori diversi da operatori diversi utilizzando un'attrezzatura diversa saranno superiori ai limiti riportati nella tabella 4 in un numero di casi non maggiore del 5 %.

Tabella 4

Limiti di riproducibilità, R, per le formule da (3) a (7)

Grasso estraneo	Formula	R %
Oli di soia, girasole, oliva, ravizzone, semi di lino, germe di grano, germe di granturco, semi di cotone e olio di pesce	(3)	1,08
Grasso di cocco e di palmisto	(4)	0,40
Olio di palma e sego	(5)	1,81
Lardo	(6)	0,60
Totale	(7)	2,07

11. INCERTEZZA DELLA MISURA

Si può calcolare l'incertezza ampliata di un valore di *S* con la ripetibilità, *r*, e la riproducibilità *R*.

L'inserimento dell'incertezza ampliata (in base ad analisi in doppio) nei limiti di *S* della tabella 2 dà luogo ad un'estensione dei limiti di *S* come indicato nella tabella 5.

Tabella 5

Limiti di *S* ampliati per i grassi di latte puri mediante inclusione dell'incertezza ampliata

Grasso estraneo	Formula	Limiti di *S* ampliati
Oli di soia, girasole, oliva, ravizzone, semi di lino, germe di grano, germe di granturco, semi di cotone e olio di pesce	(3)	97,36-102,64
Grasso di cocco e di palmisto	(4)	99,14-100,86
Olio di palma e sego	(5)	94,77-105,23
Lardo	(6)	97,65-102,35
Totale	(7)	94,42-105,58

▼B

12. RELAZIONE

La relazione dovrà precisare:

— tutte le informazioni necessarie per l'identificazione completa del campione,

— il metodo di campionamento usato, se noto,

— il metodo di prova usato con riferimento alla presente norma internazionale,

— tutti i particolari operativi non specificati nella presente norma internazionale o considerati come facoltativi, nonché i dettagli relativi agli eventuali incidenti che potrebbero avere influenzato i risultati,

— i risultati ottenuti e, se è stata verificata la ripetibilità, il risultato finale ottenuto.

▼B

ALLEGATO A

(normativo)

PREPARAZIONE DELLA COLONNA IMPACCATA

A.1. REAGENTI E APPARECCHIATURA

A.1.1. **Toluene** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2. **Soluzione di dimetildiclorosilano** [$Si(CH_3)2Cl_2$]

Sciogliere 50 ml di dimetildiclorosilano in 283 ml di toluene (A.1.1).

A.1.3. Soluzione di **burro di cacao** con una frazione in massa di grasso del 5 % di burro di cacao in *n*-esano (4.4) o *n*-eptano (4.5).

A.1.4. **Fase stazionaria**, OV-1 al 3 % su Gas ChromQ da 125-150 μm (100-120 mesh) ([1]).

Nota: La granulometria è stata convertita in micrometri in base a BS 410 (tutte le parti) [6].

A.1.5. **Colonna di vetro** fatta a U, avente un diametro interno di 2 mm e una lunghezza di 500 mm.

A.1.6. **Apparecchiatura** per riempire la colonna impaccata.

A.1.6.1. **Colonna da riempimento** con tappi terminali a vite, provvista di una tacca indicante il livello di riempimento per la quantità richiesta di fase stazionaria.

A.1.6.2. **Setaccio** (maglia da circa 100 μm) con tappo a vite adatto per la chiusura della colonna di vetro secondo la figura A.3.

A.1.6.3. **Lana di vetro silanizzata** disattivata.

A.1.6.4. **Vibratore** per distribuire in modo uniforme la fase stazionaria durante il riempimento.

A.1.6.5. **Dispositivi per la silanizzazione** della superficie di vetro della colonna.

A.1.6.6. *Bottiglia di Woulff.*

A.1.6.7. *Pompa di aspirazione ad acqua.*

A.2. SILANIZZAZIONE (DISATTIVAZIONE DELLA SUPERFICIE DI VETRO)

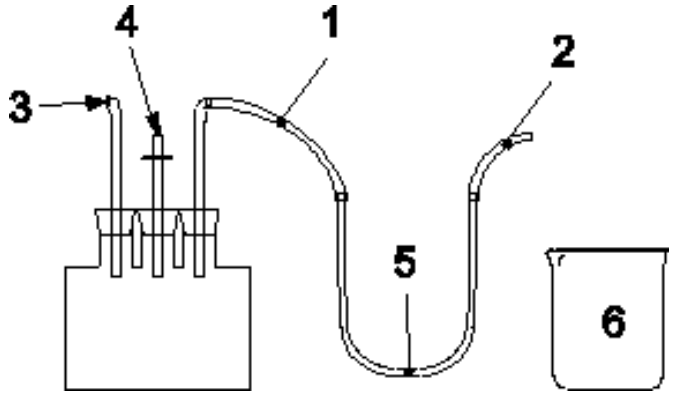
Dopo avere collegato la bottiglia di Woulff (A.1.6.6) con la pompa di aspirazione ad acqua (A.1.6.7), immergere il tubo 2 (cfr. figura A.1) nella soluzione di dimetildiclorosilano (A.1.2). Riempire la colonna (A.1.5) con la soluzione chiudendo il rubinetto. Riaprire il rubinetto e poi togliere i due tubi. Fissare la colonna su uno stativo e riempirla completamente di soluzione di dimetildiclorosilano (A.1.2) con una pipetta.

([1]) Esempio di un prodotto disponibile in commercio. Quest'informazione è fornita per coloro che utilizzano questa norma internazionale, ma non deve essere intesa come una raccomandazione del prodotto da parte dell'ISO o della FID.

▼B

Figura A.1

Apparecchiatura per la silanizzazione



Legenda

1 tubo 1

2 tubo 2

3 pompa di aspirazione ad acqua

4 rubinetto

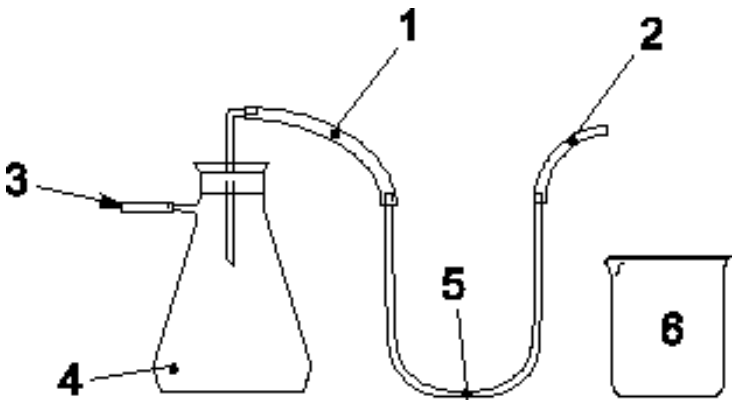
5 colonna di vetro

6 dimetildiclorosilano e toluene

Dopo 20-30 minuti, sostituire la bottiglia Woulff con una beuta per filtrazione. Svuotare la colonna collegandola alla pompa di aspirazione ad acqua (A.1.6.7) (cfr. figura A.2). Risciacquare la colonna vuota usando in successione 75 ml di toluene (A.1.1) e 50 ml di metanolo (4.3) immergendo il tubo 2 nel solvente. Essiccare la colonna risciacquata nella stufa (5.6) regolata a 100 °C per circa 30 minuti.

Figura A.2

Apparecchiatura per il risciacquo



Legenda

1 tubo 1

2 tubo 2

3 pompa di aspirazione ad acqua

4 beuta per filtrazione

5 colonna di vetro

6 agente di risciacquo

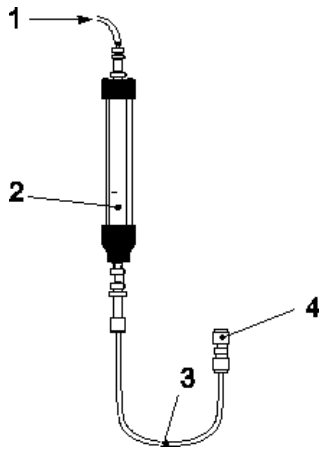
▼B

A.3. RIEMPIMENTO

Riempire la colonna usando l'apparecchiatura rappresentata nella figura A.3. Riempire la colonna (A.1.6.1) di fase stazionaria (A.1.4) fino alla tacca. Chiudere l'estremità inferiore della colonna di vetro da riempire con un tappo della lunghezza di circa 1 cm di lana di vetro silanizzata e compressa (A.1.6.3). Chiudere l'estremità della colonna con il setaccio descritto in A.1.6.2.

Figura A.3

Riempimento della colonna di vetro



Legenda

1 ingresso di azoto

2 colonna da riempire fino alla tacca con OV-1

3 colonna di vetro da riempire

4 tappo a vite con filtro contro cui sono premute la fibra di vetro e la fase stazionaria

Riempire la colonna sotto pressione (300 kPa e un getto di N_2) con la fase stazionaria. Per ottenere un riempimento uniforme, continuo e compatto, durante il riempimento muovere un vibratore su e giù lungo la colonna di vetro. Dopo il riempimento premere un tappo compatto di lana di vetro silanizzata (A.1.6.3) nell'altra estremità della colonna riempita. Ritagliare le estremità sporgenti e spingere il tappo nella colonna per qualche millimetro con una spatola.

A.4. CONFEZIONE

Nelle tappe da a) a c) non collegare l'estremità della colonna al rivelatore per evitare contaminazioni. Confezionare la colonna (A.3) come segue:

a) flussare la colonna con azoto per 15 min, regolare la velocità di flusso a 40 ml/min e la stufa a 50 °C;

b) riscaldare la colonna alzando la temperatura di 1 °C/min fino a 355 °C, con un flusso di azoto regolato a 10 ml/min;

c) mantenere la temperatura della colonna a 355 °C per 12-15 ore;

d) iniettare due volte 1 µl di soluzione di burro di cacao (A.1.3) applicando il programma di temperatura descritto in 7.3.4.1 per la colonna impaccata;

Nota: Il burro di cacao è costituito pressoché esclusivamente da trigliceridi alto-bollenti C_{50}-C_{54} e riduce perciò lo sforzo di confezionamento della colonna per i rispettivi coefficienti di risposta.

▼B

e) fare 20 iniezioni di 0,5 µl di soluzione di grasso di latte (7.2) per 2-3 giorni, utilizzando i parametri per la colonna impaccata forniti nella sezione 7.3.4.1.

— Per l'analisi dei campioni usare solo colonne con coefficienti di risposta prossimi a 1. I coefficienti di risposta non devono essere superiori a 1,20.

▼B

ALLEGATO B

(informativo)

QUANTIFICAZIONE DEL TENORE DI GRASSO ESTRANEO

B.1. OSSERVAZIONI GENERALI

La tabella B.1 indica i limiti di rilevazione di vari grassi estranei calcolati con un livello di fiducia del 99 %. La colonna centrale indica i limiti di rilevazione delle migliori formule singole da (3) a (6).

I limiti di rilevazione della formula totale (7), indicati nella colonna di destra, sono leggermente più elevati. In teoria la formula (7) serve solo per la quantificazione del grasso estraneo.

Con tutte le formule si possono rilevare anche combinazioni di differenti grassi estranei. La variazione della composizione trigliceridica tra singoli campioni dello stesso tipo di grasso estraneo non incide in misura significativa sui limiti di rilevazione.

Se si usano sia le formule singole che la formula totale si applicano i limiti di rilevazione delle formule singole. Tuttavia il valore di S della formula totale è necessario per la quantificazione in certi casi (B.2).

Tabella B.1

Limiti di rilevazione al 99 % per l'aggiunta di grasso estraneo al latte (in %)

Grasso estraneo	Formula singola %	Formula totale %
Olio di soia	2,1	4,4
Olio di semi di girasole	2,3	4,8
Olio di oliva	2,4	4,7
Olio di cocco	3,5	4,3
Olio di palma	4,4	4,7
Grasso di palmisto	4,6	5,9
Olio di semi di ravizzone	2,0	4,4
Olio di lino	2,0	4,0
Olio di germe di grano	2,7	6,4
Olio di germe di granturco	2,2	4,5
Olio di semi di cotone	3,3	4,4
Lardo	2,7	4,7
Sego	5,2	5,4
Olio di pesce idrogenato	5,4	6,1

B.2. CALCOLO

Procedere alla determinazione quantitativa del grasso estraneo solo se è superato almeno uno dei limiti di S (tabella 2 o tabella 5). Per ottenere informazioni quantitative, calcolare la frazione di massa di grasso estraneo o di miscela di grassi estranei, w_f, in percentuale, nel campione da analizzare con formula seguente:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(B. 1)}$$

▼B

dove:

S è il risultato che si ottiene inserendo in una delle formule da (3) a (7) i dati sui trigliceridi del grasso di latte a cui è stato aggiunto grasso estraneo o una miscela di grassi estranei;

S_f è una costante, in funzione del tipo di grasso estraneo aggiunto.

Se non si conosce il tipo di grasso estraneo aggiunto al grasso di latte, usare il valore generale S_f di 7,46 (tabella B.2). Usare sempre il valore di S ottenuto con la formula (7), anche se non sono superati i suoi limiti di S, mentre lo sono quelli di un'altra formula.

Conoscendo il tipo di grasso estraneo, inserire i rispettivi valori singoli di S_f (tabella B.2) nella formula (B.1). Scegliere la rispettiva formula del grasso estraneo dalle formule da (3) a (6) per calcolare S.

Tabella B.2

Valori di S_f di vari grassi estranei

Grasso estraneo	S_f
Sconosciuto	7,46
Olio di soia	8,18
Olio di semi di girasole	9,43
Olio di oliva	12,75
Olio di cocco	118,13
Olio di palma	7,55
Oli di palmisto	112,32
Olio di semi di ravizzone	3,30
Olio di lino	4,44
Olio di germe di grano	27,45
Olio di germe di granturco	9,29
Olio di semi di cotone	41,18
Lardo	177,55
Sego	17,56
Olio di pesce	64,12

B.3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Indicare il risultato con due decimali.

Bibliografia

1. Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pagg. 82-85.

2. Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pagg. 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, pagg. 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, pagg. 791-797.

5. ISO 707IDF 50, Milk and milk products — Guidance on sampling.

▼B

6. BS 410:1988, Test sieves — Technical requirements and testing.

7. Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, pagg. 219-242

8. Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol.*, 93, 1991, pagg. 538-544.

9. DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis].

10. Commission of the European Communities: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, 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, pagg. 505-510.

▼B

ALLEGATO XXI

(Articolo 18)

PROCEDURA DA SEGUIRE IN CASO DI CONTROVERSIA SUI RISULTATI DI UN'ANALISI (ANALISI CHIMICA)

1. A richiesta del fabbricante presentata entro 7 giorni lavorativi dalla comunicazione dei risultati della prima analisi, si effettua un'altra analisi in un altro laboratorio riconosciuto dall'autorità competente usando il metodo pertinente, a condizione che siano disponibili campioni del prodotto prelevati in doppio, sigillati e conservati in modo appropriato presso organismi competenti. L'analisi è realizzata entro 21 giorni lavorativi dal ricevimento della richiesta. Su richiesta del fabbricante e a spese del medesimo, l'organismo competente invia tali campioni ad un secondo laboratorio. Questo laboratorio deve essere autorizzato ad eseguire analisi ufficiali e deve possedere una dimostrata competenza per le analisi in questione.

2. Le incertezze ampliate ($k = 2$) della media $\overline{y}_1$ delle n_1 misurazioni ripetute nel laboratorio 1 e della media $\overline{y}_2$ delle n_2 misurazioni ripetute nel laboratorio 2 sono

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ e $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ risp., dove σ_r è la deviazione standard di ripetibilità e σ_R è la deviazione standard di riproducibilità del relativo metodo. Se il risultato finale y della misurazione nei laboratori è calcolato utilizzando una formula del tipo $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ o $y = x_1/x_2$ si devono seguire le procedure abituali di combinazione delle deviazioni standard in tali casi per ottenere l'incertezza.

4. Per verificare se i risultati dei due laboratori sono conformi alla deviazione standard di riproducibilità σ_R del metodo, si calcola l'incertezza ampliata della differenza $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$ come segue:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Se il valore assoluto della differenza delle medie di laboratorio, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, non è superiore alla sua incertezza $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

i risultati dei due laboratori sono conformi alla deviazione standard di riproducibilità σ_r e viene indicata come risultato finale la media aritmetica delle medie dei due laboratori,

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2}.$$

La sua incertezza ampliata è:

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

La partita è respinta in quanto si ritiene che non rispetti il limite regolamentare superiore *UL* se

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL;$$

altrimenti la partita è accettata in quanto conforme al limite *UL*.

La partita è respinta in quanto si ritiene che non rispetti il limite regolamentare inferiore *LL* se

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL;$$

altrimenti la partita è accettata in quanto conforme al limite *LL*.

Se il valore assoluto della differenza delle medie di laboratorio, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, è superiore alla sua incertezza $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

i risultati dei due laboratori non sono conformi alla deviazione standard di riproducibilità.

In questo caso la partita è respinta come non conforme se la seconda analisi conferma la prima. Altrimenti la partita si ritiene conforme ed è accettata.

L'autorità competente comunica quanto prima al fabbricante il risultato finale. Se la partita è respinta i costi della seconda analisi sono a carico del fabbricante.

▼B

ALLEGATO XXII

TAVOLA DI CONCORDANZA

Regolamento (CE) n. 213/2001	Presente regolamento
Articolo 1	Articolo 1
Articolo 2	Articolo 1
Articolo 3	Articolo 2
—	Articolo 3
Articolo 4	—
Articolo 5	—
Articolo 6	Articolo 4
Articolo 7	Articolo 18
Articolo 8	—
Articolo 9	Articolo 5
Articolo 10	Articolo 6
Articolo 11	Articolo 7
Articolo 12	Articolo 8
Articolo 13	Articolo 9
Articolo 14	Articolo 10
Articolo 15	Articolo 11
Articolo 16	Articolo 12
Articolo 17	Articolo 13
—	Articolo 14
Articolo 18	Articolo 15
Articolo 19	Articolo 16
	Articolo 17
	Articolo 19
Articolo 20	—
Articolo 21	—
Articolo 22	Articolo 20
Articolo 23	Articolo 21