REGOLAMENTO (CE) N. 322/96 DELLA COMMISSIONE

del 22 febbraio 1996

relativo alle modalità di applicazione per l'ammasso pubblico di latte scremato in polvere

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CEE) n. 804/68 del Consiglio, del 27 giugno 1968, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari [1], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 2931/95 della Commissione [2], in particolare l'articolo 7, paragrafo 5, e l'articolo 28,

considerando che il regolamento (CEE) n. 1014/68 del Consiglio, del 20 luglio 1968, che stabilisce le norme generali che disciplinano l'ammasso pubblico del latte scremato in polvere [3], modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 3577/90 [4] sarà abrogato, con effetto a decorrere dal 1° marzo 1996, dal regolamento (CE) n. 1538/95 del Consiglio [5]; che occorre pertanto inserire le norme che non sono state incorporate nel regolamento (CEE) n. 804/68 nelle modalità d'applicazione dell'ammasso pubblico del latte scremato in polvere previste dal regolamento (CEE) n. 625/78 della Commissione [6], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1802/95 [7]; che l'entità degli adeguamenti da apportare al regolamento (CEE) n. 625/78 nonché l'alto numero di modificazioni già apportate a detto regolamento rendono opportuna la riformulazione di quest'ultimo per motivi di chiarezza e trasparenza; che di conseguenza occorre abrogare il regolamento (CEE) n. 625/78;

considerando che soltanto il latte scremato in polvere conforme ad un requisito relativo al suo tenore minimo di materia proteica può essere acquistato dagli organismi d'intervento; che inoltre il prezzo d'acquisto può variare a seconda del tenore di materia proteica; che occorre stabilire il metodo analitico da applicare per constatare detto tenore nonché precisare la modalità di calcolo del prezzo d'acquisto;

considerando che, per garantire che non venga effettuato indebitamente alcun pagamento del latte scremato in polvere acquistato, occorre precisare che venga verificato il soddisfacimento di tutte le condizioni richieste e che venga constatato, prima del pagamento, il tenore di materia proteica;

considerando che è stato approntato un metodo di riferimento per la rivelazione di latticello; che, per garantire un'applicazione uniforme delle misure di controllo, occorre ricorrere al suddetto metodo analitico per il controllo del latte scremato in polvere acquistato dagli organismi d'intervento;

considerando che la direttiva 92/46/CEE del Consiglio, del 16 giugno 1992, che stabilisce le norme sanitarie per la produzione e la commercializzazione di latte crudo, di latte trattato termicamente e di prodotti a base di latte [8], modificata da ultimo dalla direttiva 94/71/CE [9], prevede che non possa essere destinato al consumo umano il latte il cui tenore di sostanze antimicrobiche sia superiore al livello autorizzato dal regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio [10], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 282/96 [11]; che è opportuno controllare il latte scremato in polvere acquistato dagli organismi d'intervento riguardo la presenza delle sostanze antimicrobiche usualmente utilizzate; che occorre prevedere un metodo di controllo al riguardo;

considerando che d'altro canto le disposizioni relative all'ammasso pubblico di latte scremato in polvere hanno dato prova della loro validità e, con alcuni adeguamenti di carattere tecnico, possono pertanto essere mantenute;

considerando che i fatti generatori del tasso di conversione agricolo applicabile al regime dell'ammasso pubblico sono stabiliti dal regolamento (CEE) n. 1756/93 della Commissione [12], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 693/95 [13];

considerando che le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per il latte e i prodotti lattiero-caseari,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

1. Gli organismi d'intervento acquistano latte scremato in polvere soltanto se rispondente alla definizione di cui all'articolo 7, paragrafo 1 del regolamento (CEE) n. 804/68 e ai requisiti di qualità di cui all'allegato I nonché soddisfacente alle seguenti condizioni:

a) il controllo di qualità è stato effettuato secondo i metodi d'analisi di cui agli allegati I, V, VI e VII ed in base a campioni prelevati secondo le modalità di cui all'allegato IV;

[1] GU n. L 148 del 28. 6. 1968, pag. 13.
[2] GU n. L 307 del 20. 12. 1995, pag. 10.
[3] GU n. L 173 del 22. 7. 1968, pag. 4.
[4] GU n. L 353 del 17. 12. 1990, pag. 23.
[5] GU n. L 148 del 30. 6. 1995, pag. 17.
[6] GU n. L 84 del 31. 3. 1978, pag. 19.
[7] GU n. L 174 del 26. 7. 1995, pag. 27.
[8] GU n. L 268 del 14. 1. 1992, pag. 1.
[9] GU n. L 368 del 31. 12. 1994, pag. 33.
[10] GU n. L 224 del 18. 8. 1990, pag. 1.
[11] GU n. L 37 del 15. 2. 1996, pag. 9.
[12] GU n. L 161 del 2. 7. 1993, pag. 48.
[13] GU n. L 71 del 31. 3. 1995, pag. 52.

b) il latte scremato in polvere è conforme al disposto di cui agli allegati II e III per quanto riguarda l'imballaggio e l'etichettatura;

c) il latte scremato in polvere non contiene altri prodotti, in particolare latticello o siero di latte;

d) il latte scremato in polvere è fabbricato nel corso del mese precedente il giorno di ricevimento, da parte dell'organismo d'intervento, dell'offerta di vendita oppure, nel caso di cui all'allegato III, lettera e), seconda frase, nel corso delle quattro settimane precedenti la settimana in cui è ricevuta l'offerta;

e) il latte scremato in polvere ha un livello di radioattività non superiore ai livelli massimi ammissibili prescritti dalla normativa comunitaria; i livelli applicabili sono quelli fissati all'articolo 3 del regolamento (CEE) n. 737/90 del Consiglio [1]; il controllo del livello di contaminazione radioattiva del prodotto si effettua solo se la situazione lo esige e per il periodo necessario; qualora necessario, la durata e la portata delle misure di controllo sono stabilite secondo la procedura di cui all'articolo 30 del regolamento (CEE) n. 804/68.

2. Ai fini del presente regolamento si intende per:

a) latticello, il sottoprodotto della fabbricazione del burro, ottenuto dopo zangolatura o burrificazione continua della crema e separazione della fase grassa solida;

b) siero di latte, il sottoprodotto della fabbricazione del formaggio o della caseina, ottenuto dall'azione degli acidi, del caglio e/o dei processi chimico-fisici.

3. La quantità minima dell'offerta è di 20 tonnellate. Gli Stati membri possono aumentare la quantità minima e/o prescrivere che il latte scremato in polvere venga offerto per tonnellata intera.

4. L'organismo d'intervento registra il giorno di ricevimento dell'offerta di vendita, le quantità e le date di fabbricazione corrispondenti ed il luogo in cui il latte scremato in polvere offerto è in deposito.

5. L'offerta è valida solo se corredata da prova di costituzione, da parte dell'offerente, di una cauzione pari a 12 ECU per tonnellata di latte scremato in polvere offerto.

Nel quadro del presente regolamento il mantenimento dell'offerta e la consegna del latte scremato in polvere al deposito designato dall'organismo d'intervento costituiscono le esigenze principali la cui esecuzione è garantita dalla costituzione della suddetta cauzione. Tuttavia, qualora dal controllo di cui al paragrafo 1, lettera a), risultasse che il latte scremato in polvere non è conforme ai requisiti di cui al paragrafo 1, la cauzione sarà comunque svincolata per le quantità non ancora consegnate.

La cauzione è costituita nello Stato membro in cui viene presentata l'offerta.

[1] GU n. L 82 del 29. 3. 1990, pag. 1.

Articolo 2

1. Lo stabilimento di cui all'articolo 7, paragrafo 1 del regolamento (CEE) n. 804/68 può ottenere l'autorizzazione solo se esso:

a) è autorizzato ai sensi dell'articolo 10 della direttiva 92/46/CEE e dispone degli impianti tecnici appropriati;

b) si impegna a tenere permanentemente i registri stabiliti dall'organismo competente di ciascuno Stato membro, dai quali risultino l'origine delle materie prime, le quantità di latte scremato, di latticello e di siero di latte trattate, il tipo di trattamento termico del latte scremato, le quantità di prodotti ottenute, il confezionamento, l'identificazione e la data di uscita di ciascuna partita di latte scremato in polvere, di latticello in polvere e di siero di latte in polvere;

c) accetta di sottoporre ad un controllo ufficiale specifico la propria fabbricazione di latte scremato in polvere che può essere offerta all'intervento;

d) si impegna a comunicare all'organismo competente incaricato del controllo, con un anticipo di almeno due giorni lavorativi, l'intenzione di fabbricare latte scremato in polvere per l'intervento pubblico; lo Stato membro può tuttavia fissare un termine più breve.

2. Per garantire il rispetto delle disposizioni del presente regolamento, gli organismi competenti effettuano controlli in loco, senza preavviso, tenendo conto del programma di produzione di latte scremato in polvere all'intervento degli stabilimenti interessati.

Mediante tale sistema di controlli dev'essere garantita l'esecuzione di:

— un controllo almeno ogni 28 giorni di fabbricazione per l'intervento e almeno una volta ogni sei mesi, teso in particolare ad esaminare gli elementi di cui al paragrafo 1, lettera b);

— un controllo almeno semestrale teso a verificare il rispetto delle condizioni richieste per l'autorizzazione di cui al paragrafo 1.

3. L'autorizzazione viene revocata qualora non siano più soddisfatte le condizioni di cui al paragrafo 1. L'autorizzazione può essere nuovamente concessa su domanda dello stabilimento interessato, dopo un periodo di sei mesi al termine di un controllo approfondito.

Qualora si constati che uno stabilimento sia venuto meno ad uno dei suoi impegni di cui al paragrafo 1, lettere b), c) e d), salvo in caso di forza maggiore, l'autorizzazione viene sospesa per un periodo da 1 a 12 mesi, a seconda della gravità dell'irregolarità.

Lo Stato membro può decidere di soprassedere alla sospensione dell'autorizzazione qualora venga accertato che l'irregolarità non è stata commessa deliberatamente o per negligenza grave e che la sua gravità è marginale ai fini dell'efficacia dei controlli previsti al paragrafo 2.

4. I controlli effettuati ai sensi dei paragrafi 2 e 3 devono formare oggetto di una relazione in cui vengano precisate:

— la data del controllo,

— la durata dello stesso,

— le operazioni svolte.

La relazione di controllo deve essere firmata dall'agente responsabile.

5. Gli Stati membri comunicano alla Commissione le misure adottate con riferimento ai controlli di cui ai paragrafi 2 e 3, entro un mese a decorrere dalla loro adozione.

Articolo 3

L'organismo che provvede al controllo dell'osservanza del disposto dell'articolo 1, paragrafo 1, annota, precisando ogni caratteristica del prodotto di cui al paragrafo 1 dell'allegato I, i risultati dell'analisi di ciascuna partita offerta che sono successivamente trascritti in un certificato rilasciato su richiesta, in particolare in caso di scambi tra Stati membri o di esportazione.

Articolo 4

1. Dopo aver verificato gli elementi dell'offerta, l'organismo d'intervento rilascia senza indugio una bolla di consegna datata e numerata su cui sono indicati:

a) la quantità da consegnare,

b) la data limite di consegna del latte scremato in polvere,

c) il magazzino in cui deve aver luogo la consegna.

2. La consegna del latte scremato in polvere deve essere effettuata entro i 28 giorni successivi a quello del ricevimento dell'offerta di vendita di cui all'articolo 1, paragrafo 1, lettera d). La consegna può essere frazionata.

3. Ai fini del presente regolamento, la presa in consegna, da parte dell'organismo d'intervento, del latte scremato in polvere ha luogo il giorno della sua entrata nel magazzino, ma comunque non prima del giorno successivo a quello dell'emissione del buono di consegna di cui al paragrafo 1.

4. Il pagamento del latte scremato in polvere acquistato dall'organismo d'intervento è effettuato tra il centoventesimo e il centoquarantesimo giorno successivi alla presa in consegna dello stesso, sempreché sia stato verificato il soddisfacimento dei requisiti di cui all'articolo 1.

5. Il prezzo d'acquisto del latte scremato in polvere è calcolato come segue:

— se il tenore in materia proteica dell'estratto secco non grasso, constatato con il metodo indicato all'allegato I, è uguale al o maggiore del 35,6 % il prezzo d'acquisto è pari al prezzo d'intervento;

— se il suddetto tenore è almeno uguale al 31,4 % ma minore del 35,6 % il prezzo d'acquisto è pari al prezzo d'intervento diminuito di un importo così calcolato: prezzo d'intervento × [(0,356 − tenore di materia proteica) × 1,75].

6. La presentazione dell'offerta implica che il venditore si impegna, nel caso che dal controllo risulti che il latte scremato in polvere non è conforme ai requisiti di cui all'articolo 1, paragrafo 1:

— a riprendere la merce in oggetto,

— a pagare le spese di magazzinaggio delle quantità in oggetto a partire dal giorno della presa in consegna sino alla data di uscita.

Dette spese di magazzinaggio sono fissate forfettariamente per tonnellata come segue:

a) 21 ECU, per spese fisse,

b) 0,10 ECU/giorno di magazzinaggio, per spese di deposito in magazzino.

I relativi importi sono accreditati al Fondo europeo agricolo di orientamento e garanzia (FEAOG), sezione garanzia.

Articolo 5

1. I depositi di cui all'articolo 7, paragrafo 1, quarto trattino del regolamento (CEE) n. 804/68 devono:

a) essere asciutti, in buono stato di manutenzione, esenti da parassiti,

b) essere privi di odori estranei,

c) essere ben aerati,

d) essere di capacità sufficiente ed essere dotati di attrezzature in rapporto con tale capacità.

I rischi connessi con il magazzinaggio del latte scremato in polvere sono coperti mediante un'assicurazione sotto forma di un obbligo contrattuale degli ammassatori oppure di un'assicurazione globale dell'organismo d'intervento; lo Stato membro può anche essere il proprio assicuratore.

2. Gli organismi d'intervento accertano che l'immagazzinamento e la conservazione del latte scremato in polvere siano eseguiti su pallet in modo da costituire partite facilmente identificabili ed agevolmente accessibili.

3. L'organismo competente incaricato del controllo procede inoltre al controllo della presenza dei prodotti in deposito come previsto all'articolo 4 del regolamento (CEE) n. 618/90 della Commissione (1).

Articolo 6

1. L'organismo d'intervento sceglie il magazzino disponibile più vicino al luogo ove il latte scremato in polvere è in deposito.

(1) GU n. L 67 del 15. 3. 1990, pag. 21.

Tuttavia e sempreché la scelta di un altro magazzino non comporti spese supplementari di magazzinaggio, l'organismo può:

a) scegliere un altro magazzino di distanza inferiore a quella di cui al paragrafo 2;

b) scegliere un altro magazzino situato ad una distanza maggiore di quella suddetta qualora tale scelta comporti spese minori, tenendo conto delle spese di magazzinaggio e di trasporto; in tal caso l'organismo d'intervento ne dà immediata comunicazione alla Commissione.

2. La distanza massima di cui all'articolo 7, paragrafo 1, terzo comma del regolamento (CEE) n. 804/68 è fissata a 350 chilometri. Al di là di tale distanza, le spese supplementari di trasporto sostenute dall'organismo d'intervento sono fissate a 0,05 ECU per tonnellata e per chilometro.

Tuttavia, qualora l'organismo d'intervento acquirente dipenda da uno Stato membro diverso da quello sul cui territorio il latte scremato in polvere è immagazzinato, non si tiene conto, ai fini del calcolo della distanza massima di cui al primo comma, della distanza tra il deposito di magazzinaggio del venditore e la frontiera dello Stato membro dell'organismo d'intervento acquirente.

Articolo 7

Al momento dell'uscita dal deposito, l'organismo d'intervento, in caso di consegna partenza/deposito, mette a disposizione il latte scremato in polvere:

— caricato in deposito su mezzo di trasporto, fissaggio escluso, se si tratta di un autocarro o di un vagone ferroviario,

— all'uscita del magazzino, se si tratta di altro mezzo di trasporto, in particolare di un container.

Le eventuali spese di fissaggio e di scaricamento dai pallet sono a carico dell'acquirente del latte scremato in polvere. Tali spese sono fissate forfettariamente dallo Stato membro, il quale ne informa ciascun interessato, su richiesta.

Articolo 8

Il regolamento (CEE) n. 625/78 della Commissione è abrogato.

I richiami al regolamento (CEE) n. 625/78 si intendono riferiti al presente regolamento.

Articolo 9

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

Esso è applicabile a decorrere dal 1° marzo 1996.

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

Fatto a Bruxelles, il 22 febbraio 1996.

Per la Commissione

Franz FISCHLER

Membro della Commissione

ALLEGATO I

QUALITÀ DEL LATTE SCREMATO IN POLVERE

1. **Caratteristiche**

a) tenore di materia proteica:	minimo 31,4 % sull'estratto secco non grasso
b) tenore di materie grasse:	massimo 1,00 %
c) tenore di acqua:	massimo 3,5 %
d) acidità titolabile in millilitri di soluzione di idrossido di sodio normaldecimo:	massimo 19,5 ml
e) tenore di lattati:	massimo 150 mg/100 g
f) additivi:	nessuno
g) prova di fosfatasi:	negativa, cioè uguale o minore di 4 microgrammi di fenolo per grammo di latte ricostituito
h) indice di insolubilità:	massimo 0,5 ml (24 °C)
i) tenore di particelle combuste:	massimo 15,0 mg, cioè almeno disco B
j) tenore di microorganismi:	massimo 40 000 per grammo
k) ricerca di coliformi:	negativa in 0,1 g
l) ricerca di latticello:	negativa
m) ricerca di siero di latte:	negativa
n) gusto e odore:	netti
o) aspetto:	colore bianco o leggermente paglierino, assenza di impurità e di particelle colorate
p) antimicrobiotici:	negativa (1)

2. **Metodi di controllo**

a) Fatte salve le disposizioni relative all'armonizzazione dei metodi di analisi, ai fini dell'applicazione del presente regolamento sono obbligatori i seguenti metodi di riferimento:

— dosaggio delle materie proteiche (N × 6,38):	norma internazionale FIL 20B: 1993
— dosaggio delle materie grasse:	norma internazionale FIL 9C: 1987
— dosaggio dell'acqua:	norma internazionale FIL 26A: 1993
— dosaggio dell'acidità:	norma internazionale FIL 86: 1981
— dosaggio dei lattati:	norma internazionale FIL 69B: 1987
— prova di fosfatasi:	norma internazionale ISO 3356: 1975
— indice di insolubilità:	norma internazionale FIL 129A: 1988
— determinazione del tenore di particelle combuste:	ADPI Standard Methods 1990
— conteggio dei microorganismi	norma internazionale FIL 100B: 1991
— ricerca di coliformi:	norma internazionale FIL 73A: 1985

b) Per quanto concerne la ricerca di:

— lattosiero presamico:	dosaggio dei glicomacropeptidi per cromatografia liquida ad alta prestazione con il metodo d'analisi indicato all'allegato V
— siero di latte acido:	prove stabilite dagli Stati membri
— latticello:	l'assenza di latticello può essere determinata mediante un controllo senza preavviso nello stabilimento di produzione ed effettuato almeno una volta alla settimana oppure mediante analisi di laboratorio del prodotto finito (metodo indicato all'allegato VI) da cui risultino al massimo 69,31 mg di PEDP/100 g
— sostanze antimicrobiche:	metodo descritto all'allegato VII

c) Il prelievo dei campioni è effettuato secondo la procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707; gli Stati membri possono tuttavia prevedere un altro metodo di campionamento purché conforme ai principi della norma succitata.

---

(1) Il latte crudo utilizzato per la fabbricazione del latte scremato in polvere deve soddisfare ai requisiti previsti all'allegato A, capitolo III, lettera D della direttiva 92/46/CEE.

ALLEGATO II

IMBALLAGGIO

1. **Imballaggi**

Gli imballaggi sono nuovi, asciutti e intatti, di contenuto netto di 25 kg e di confezione rispondente ad una delle seguenti formule:

a) — 4 sacchi di carta «kraft», di resistenza minima 70 g/m²,
— 1 sacco di carta catramata interposto, di resistenza di 140 g/m²,
— 1 sacco interno di polietilene di almeno 0,08 mm di spessore, termosaldato o a doppia legatura;

b) — 1 sacco di carta «kraft», di resistenza minima di 70 g/m²,
— 1 sacco di carta «kraft» con rivestimento in polietilene, di resistenza minima di 80 + 15 g/m²,
— 3 sacchi di carta «kraft», di resistenza minima di 70 g/m²,
— 1 sacco interno di polietilene di almeno 0,08 mm di spessore, termosaldato o a doppia legatura;

c) — 1 sacco esterno di carta «kraft», di resistenza minima di 85 g/m²,
— 1 sacco di carta «kraft» con rivestimento in polietilene, di resistenza minima di 70 + 15 g/m²,
— 2 sacchi di carta «kraft», di resistenza minima di 70 g/m²,
— 1 sacco interno di polietilene di almeno 0,12 mm di spessore, termosaldato o a doppia legatura;

d) — 1 sacco esterno di carta «kraft» semiestensibile, di resistenza minima di 95 g/m²,
— 1 sacco di carta «kraft» semiestensibile, con rivestimento interno in polietilene di resistenza minima di 95 + 15 g/m²,
— 1 sacco di carta «kraft», semiestensibile, di resistenza minima di 85 g/m²,
— 1 sacco interno di polietilene di almeno 0,12 mm di spessore, termosaldato o a doppia legatura.

2. **Riempimento**

All'atto di riempimento, si deve fare in modo che il sacco non presenti delle pieghe e che il contenuto risulti ben compresso.

3. **Prova**

L'imballaggio, conforme a quanto indicato al punto 1 deve poter sopportare una tensione media di 420 joule/m² per almeno tre strati di carta, in base al metodo ISO 1924-2-1985.

ALLEGATO III

ETICHETTATURA

Sull'imballaggio devono essere riportate almeno le indicazioni seguenti, eventualmente in codice:

a) la dicitura «latte scremato in polvere spray», in una delle lingue della Comunità;

b) il peso netto;

c) il numero della partita di fabbricazione;

d) il numero d'approvazione che identifichi lo stabilimento e lo Stato membro di produzione;

e) la data di fabbricazione; se il latte scremato in polvere è immagazzinato in sili, la data di fabbricazione è sostituita dalla settimana di fabbricazione.

ALLEGATO IV

CAMPIONAMENTO ED ANALISI DEL LATTE SCREMATO IN POLVERE

1. Numero di imballaggi da scegliere casualmente per il campionamento:
   — per le offerte che contengono fino a 800 sacchi di 25 kg: almeno 8 imballaggi;
   — per le offerte con oltre 800 sacchi da 25 kg: almeno 8 + 1 imballaggio per ciascuna frazione supplementare di 800 sacchi, o parte di essa.
2. Peso del campione: da ogni imballaggio si prelevano almeno 200 g.
3. Raggruppamento di campioni: in un campione globale possono essere raggruppati al massimo 9 campioni.
4. Analisi dei campioni: ogni campione globale è sottoposto ad analisi allo scopo di verificare tutte le caratteristiche qualitative di cui all'allegato I.
5. Linee guida da seguire quando un campione risulta inadeguato:
   a) se un campione composito risulta fuori norma riguardo un parametro, la quantità rappresentata da quel campione è respinta;
   b) se un campione composito risulta fuori norma riguardo più parametri, la quantità rappresenta da quel campione è respinta ed il resto delle quantità dell'offerta provenienti dallo stesso stabilimento sono sottoposte ad un secondo campionamento determinante per analisi; in tal caso:
      — il numero di campioni previsti al punto 1 è raddoppiato,
      — se un campione composito risulta fuori norma riguardo uno o più parametri, la quantità rappresentata da quel campione è respinta.

ALLEGATO V

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

1. **Finalità e campo di applicazione**

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

2. **Riferimento**

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

3. **Definizione**

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

4. **Principio**

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

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

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

5. **Reattivi**

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

5.1. *Soluzione di acido tricloroacetico*

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

5.2. *Soluzione eluente a pH 6,0*

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

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

Portare a 1 000 ml con acqua e miscelare.

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

5.3. *Soluzione di lavaggio e conservazione delle colonne*

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

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

5.4. *Campioni di riferimento*

5.4.1. Latte scremato in polvere rispondente alle esigenze del presente regolamento, indicato in seguito con [0].

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

6. **Apparecchiatura**

6.1. Bilancia analitica.

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

6.3. Agitatore meccanico.

6.4. Agitatore magnetico.

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

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

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

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

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

6.10. Apparecchiatura HPLC comprendente:

6.10.1. pompa;

6.10.2. iniettore, manuale od automatico, da 125 a 30 µl di capacità;

6.10.3. due colonne in serie TSK 2 000 SW (lunghezza 30 cm, diametro interno 0,75 cm) o colonne di pari efficacia ed una precolonna a monte (3 cm × 0,3 cm), caricata con I 125 o con un materiale di pari efficacia;

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

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

6.10.6. integratore capace di integrare da valle a valle.

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

7. **Campionamento**

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

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

8. **Modo di operare**

8.1. *Preparazione del campione per la prova*

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

Chiudere immediatamente il recipiente.

Mescolare bene il latte capovolgendo più volte il recipiente.

8.2. *Aliquota da analizzare*

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

8.3. *Eliminazione dei grassi e delle proteine*

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

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

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

8.4. *Determinazione cromatografica*

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

Nota:

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

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

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

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

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

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

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

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

A_{II}: superficie del picco II,

A_{III}: superficie del picco III,

A_{IV}: superficie del picco IV.

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

In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

8.5. *Taratura*

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

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

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

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

9. Espressione dei risultati

9.1. *Metodo di calcolo e formule*

9.1.1. Calcolo dei coefficienti di risposta R:

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

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

in cui:

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

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

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

in cui:

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

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

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

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

S_{II} [E] = R_{II} × A_{II} [E]
S_{III} [E] = R_{III} × A_{III} [E]
S_{IV} [E] = R_{IV} × A_{IV} [E]

di cui:

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

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

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

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

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

in cui:

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

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

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

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

— per un contenuto > 5 %, è RRT_{III} [E] < 1,000;
— per un contenuto ≤ 5 %, è RRT_{III} [E] ≥ 1,000.

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

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

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

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

dove:

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

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

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

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

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

9.3. *Precisione del metodo*

9.3.1. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o a breve distanza di tempo dallo stesso analista, impiegando la stessa apparecchiatura e sulla stessa aliquota di campione, non deve superare 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 ≤ a 2,0 + (S_{III} [0] − 0,9),

in cui:

2,0 è il valore massimo ammesso per la superficie relativa del picco III, che tiene conto della superficie relativa del picco III, 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) è la correzione da apportare quando il valore S_{III} [0] è diverso da 0,9 (vedi punto 9.2).

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

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

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

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

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

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

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

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

in cui:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

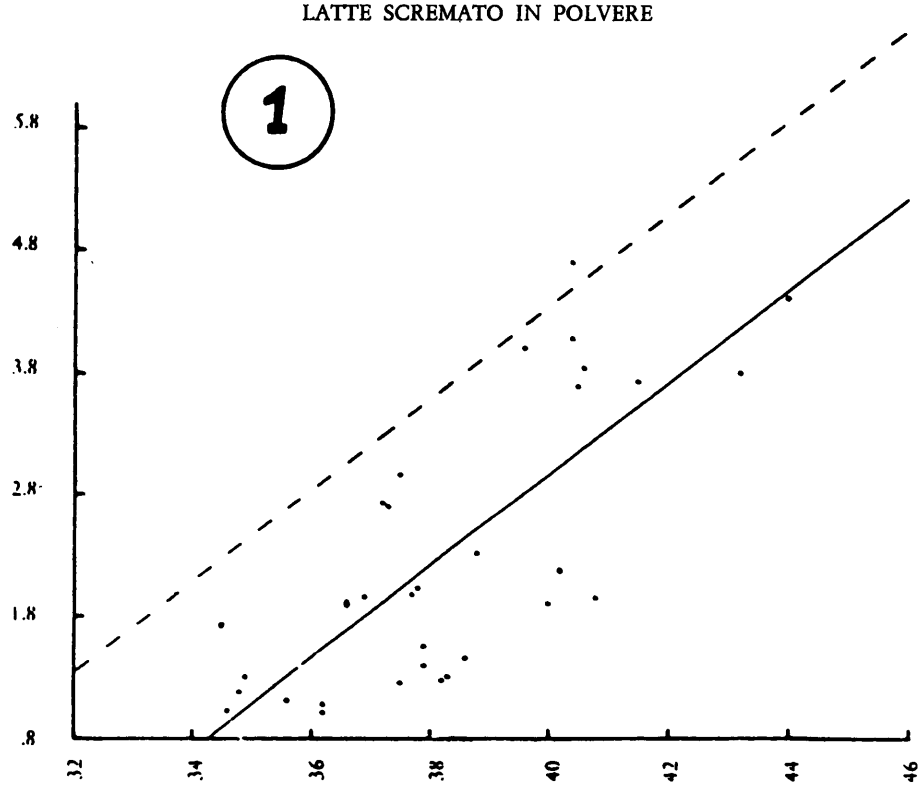
Il tenore di lattosiero presente è calcolato utilizzando la formula seguente:

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

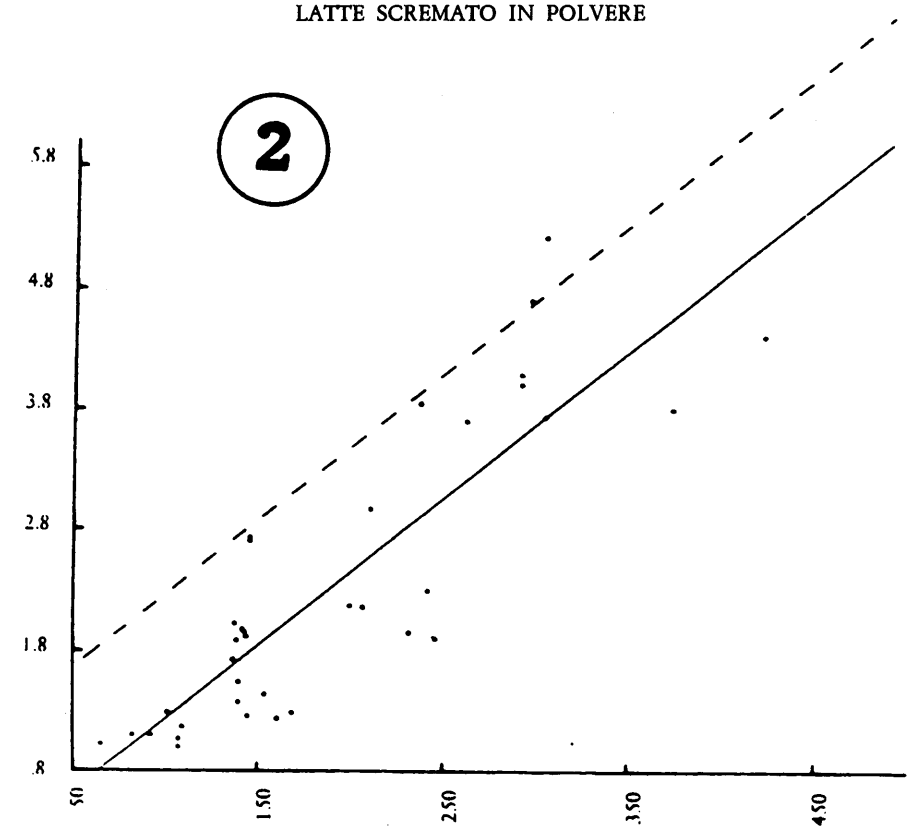
in cui:

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

LATTE SCREMATO IN POLVERE



LATTE SCREMATO IN POLVERE



ALLEGATO VI

LATTE SCREMATO IN POLVERE DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI FOSFATIDILSERINA E FOSFATIDILETANOLAMINA

METODO HPLC A FASE INVERSA

1. Ambito e campo di 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

Estrazione degli amminofosfolipidi mediante metanolo da latte in polvere ricostituito. Determinazione di PS e PE come derivati della dialdeide o-ftalica (OPA) mediante HPLC a 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 qualità analitica garantita. 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*

I solventi di eluizione devono essere preparati utilizzando reagenti per HPLC.

4.4.1. Acqua per HPLC.

4.4.2. Metanolo di purezza fluorimetrica controllata.

4.4.3. Tetraidrofurano.

4.4.4. Diidrogenofosfato di sodio.

4.4.5. Acetato di sodio.

4.4.6. Acido acetico.

5. Apparecchiature

5.1. *Bilancia analitica.*

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 a 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.*

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 colonna regolato su 30 °C.

5.13.4. Rivelatore a fluorescenza regolato alla lunghezza d'onda di eccitazione di 300 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 (C18), granulometria 5 µm.

6. Campionamento

Il campionamento deve essere eseguito secondo la norma IDF 50B-1985.

7. Procedura

7.1. *Preparazione della soluzione dello standard interno*

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). 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*

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 mediante una pipetta (5.3) e agitare con l'agitatore magnetico (5.4) per 30 minuti per sciogliere eventuali grumi. 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. Centrifugare (5.9) a 27 000 × g per 10 minuti e raccogliere il surnatante in un flacone di vetro (5.10).

Nota:

La soluzione del campione d'analisi deve essere conservata a 4 °C fino al momento dell'esecuzione dell'analisi HPLC.

7.3. *Preparazione della soluzione dello standard esterno*

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 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. 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 campione standard deve essere conservata a 4 °C fino al momento 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) mediante 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 con acido acetico): metanolo: tetraidrofurano = 558: 440: 2 (v/v/v).

Solvente B: metanolo.

7.5.2. Gradiente di eluizione consigliato:

Tempo (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.

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

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 fattore di risposta.

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

$$C = 55{,}36 \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{T_1}{T_2}$$

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**

Nota: I valori della ripetibilità sono stati calcolati secondo la norma internazionale IDF (1). Il limite provvisorio di riproducibilità è stato calcolato in base alle linee direttive per l'interpretazione dei risultati analitici e la valutazione organolettica del latte e dei prodotti lattiero-caseari soggetti all'organizzazione comune dei mercati (documento della Commissione VI/2721/95).

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 %. 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).

(1) International IDF Standard 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure.

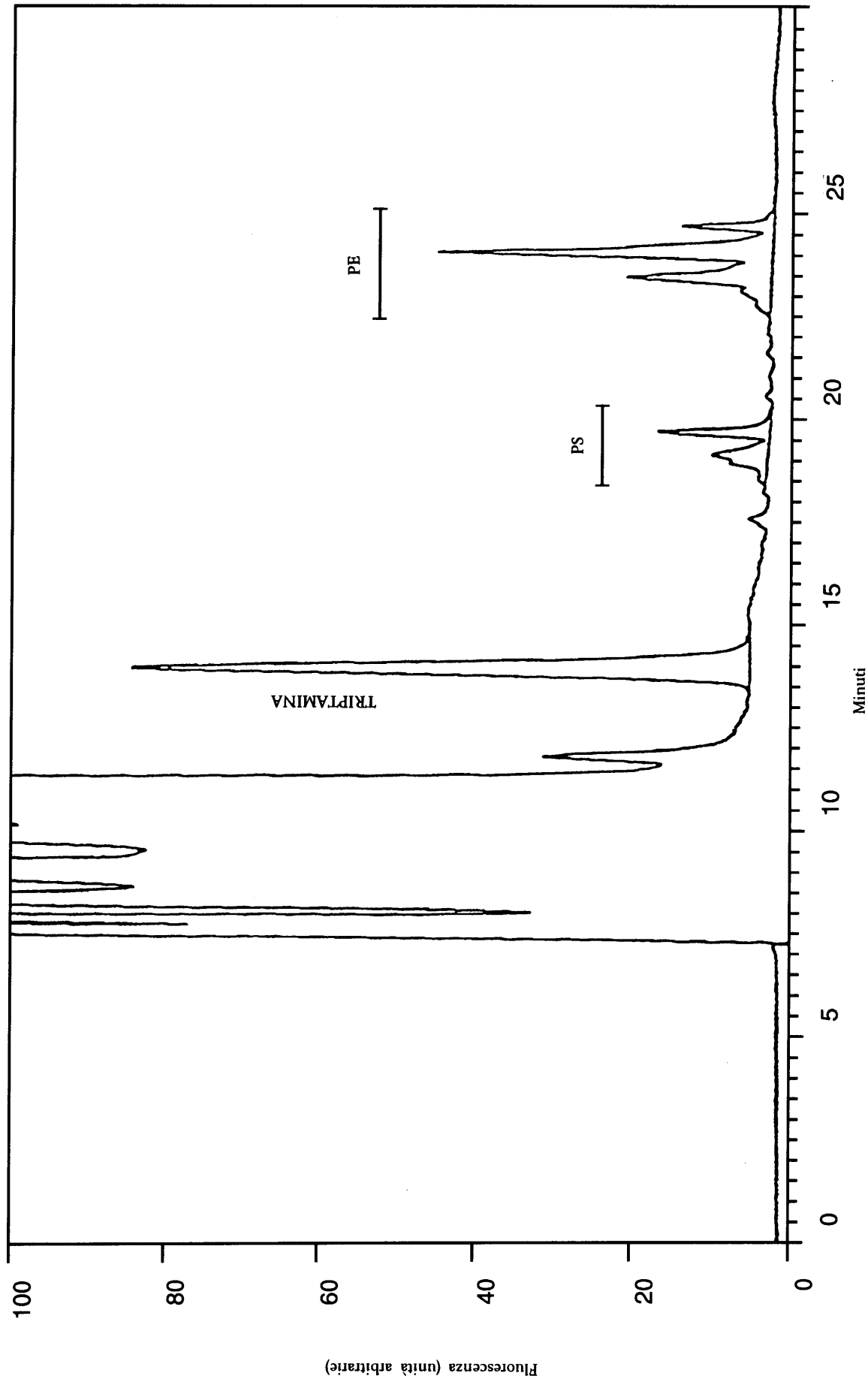


Figura 1: Diagramma HPLC di derivati OPA della fosfatidilserina (PS) e della fosfatidiletanolammina (PE) in estratto metanolico di latte scremato in polvere ricostituito. È riportato il modo di integrazione dei picchi di PS, PE e triptamina (standard interno).

ALLEGATO VII

RIVELAZIONE DI RESIDUI DI ANTIBIOTICO E SOLFONAMMIDE/DAPSON NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE

Effettuare un test di ricerca degli inibitori microbici impiegante, come microorganismo di prova, il Bacillus stearothermophilus var. calidolactis C953 e sufficientemente sensibile per rivelare 4 µg di benzilpenicillina per litro di latte e 100 µg di sulfadimidina per litro di latte. In commercio esistono apparecchiature complete d'analisi utilizzabili, purché abbiano la sensibilità richiesta per benzilpenicillina e sulfadimidina (1).

Per l'analisi usare latte in polvere scremato ricostituito (1 g di polvere + 9 ml di acqua distillata). Procedere come descritto nel bollettino IDF N. 258/1991, sezione 1, capitolo 2, o secondo le istruzioni del fabbricante dell'apparecchiatura d'analisi.

I risultati positivi devono essere interpretati come segue:

1) Ripetere la prova aggiungendo penicillinasi al sistema d'analisi:

   Risultato positivo: La sostanza inibitrice non può venire identificata mediante questa procedura.

   Risultato negativo: La sostanza inibitrice è un antibiotico β-lattamico.

2) Ripetere la prova aggiungendo acido p-amminobenzoico al sistema d'analisi:

   Risultato positivo: La sostanza inibitrice non può venire identificata mediante questa procedura.

   Risultato negativo: La sostanza inibitrice è una solfonammide/dapson.

3) Ripetere la prova aggiungendo penicillinasi + acido p-amminobenzoico al sistema d'analisi:

   Risultato positivo: La sostanza inibitrice non può venire identificata mediante questa procedura.

   Risultato negativo: Le sostanze inibitrici sono un antibiotico β-lattamico e una solfonammide/dapson.

---

(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-posiviti.