REGLAMENTO (CE) Nº 322/96 DE LA COMISIÓN

de 22 de febrero de 1996

por el que se establecen las normas de aplicación del almacenamiento público de la leche desnatada en polvo

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) nº 804/68 del Consejo, de 27 de junio de 1968, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos [1], cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 2931/95 de la Comisión [2], y, en particular, el apartado 5 de su artículo 7 y su artículo 28,

Considerando que el Reglamento (CEE) nº 1014/68 del Consejo, de 20 de julio de 1968, por el que se establecen las normas generales reguladoras del almacenamiento público de la leche desnatada en polvo [3], cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 3577/90 [4], será derogado con efecto desde el 1 de marzo de 1996 por el Reglamento (CE) nº 1538/95 del Consejo [5]; que, por consiguiente, es necesario incluir las disposiciones que no se habían incorporado al Reglamento (CEE) nº 804/68 entre las normas de aplicación del almacenamiento público de la leche desnatada en polvo establecidas en el Reglamento (CEE) nº 625/78 de la Comisión [6], cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 1802/95 [7]; que la magnitud de las adaptaciones que deben introducirse en dicho Reglamento y el elevado número de modificaciones que se han introducido ya en el mismo aconsejan su refundición por razones de claridad y de transparencia; que, por consiguiente, es necesario derogar el Reglamento (CEE) nº 625/78;

Considerando que los organimos de intervención sólo pueden comprar leche desnatada en polvo que tenga un contenido mínimamente aceptable de materia proteica; que, por otra parte, el precio de compra puede variar según ese contenido; que es necesario fijar los métodos de análisis aplicables para comprobarlo y especificar la manera de calcular el precio de compra;

Considerando que, para evitar que se produzcan pagos indebidos por la leche desnatada en polvo comprada, cabe precisar que, antes de efectuarse el pago, es necesario cerciorarse de que se cumplen todos los requisitos exigidos y comprobar el contenido de materia proteínica;

Considerando que se ha descubierto un método de referencia para la detección de la mazada; que, con objeto de garantizar una aplicación uniforme de las medidas de control, conviene utilizar ese método de análisis en el control de la leche desnatada en polvo comprada por los organismos de intervención;

Considerando que la Directiva 92/46/CEE del Consejo, de 16 de junio de 1992, por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos [8], cuya última modificación la constituye la Directiva 94/71/CE [9], establece que la leche que presente un contenido de sustancias antimicrobianas mayor que el autorizado por el Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo [10], cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 282/96 [11], no puede destinarse al consumo humano; que es oportuno controlar la presencia de las sustancias antimicrobianas utilizadas corrientemente en la leche desnatada en polvo comprada por los organismos de intervención; que es preciso establecer para ello un método de control;

Considerando que, por lo demás, las disposiciones de almacenamiento público de leche desnatada en polvo han resultado idóneas y pueden mantenerse, si bien con algunas adaptaciones técnicas;

Considerando que los hechos generadores del tipo de conversión agrario aplicable al régimen de almacenamiento público están determinados en el Reglamento (CEE) nº 1756/93 de la Comisión [12], cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 693/95 [13];

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de la leche y de los productos lácteos,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

1. Los organismos de intervención únicamente comprarán leche desnatada en polvo que se ajuste a la definición del apartado 1 del artículo 7 del Reglamento (CEE) nº 804/68 y a los requisitos de calidad contemplados en el Anexo I y que cumpla las condiciones siguientes:

a) el control de calidad se habrá efectuado según los métodos de análisis que se indican en los Anexos I, V, VI y VII y sobre la base de las muestras recogidas según se especifica en el Anexo IV;

[1] DO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.
[2] DO nº L 307 de 20. 12. 1995, p. 10.
[3] DO nº L 173 de 22. 7. 1968, p. 4.
[4] DO nº L 353 de 17. 12. 1990, p. 23.
[5] DO nº L 148 de 30. 6. 1995, p. 17.
[6] DO nº L 84 de 31. 3. 1978, p. 19.
[7] DO nº L 174 de 26. 7. 1995, p. 27.
[8] DO nº L 268 de 14. 1. 1992, p. 1.
[9] DO nº L 368 de 31. 12. 1994, p. 33.
[10] DO nº L 224 de 18. 8. 1990, p. 1.
[11] DO nº L 37 de 15. 2. 1996, p. 9.
[12] DO nº L 161 de 2. 7. 1993, p. 48.
[13] DO nº L 71 de 31. 3. 1995, p. 52.

b) el marcado y el envasado deberán ajustarse a los requisitos establecidos en los Anexos II y III;

c) no contendrá otros productos, en concreto suero de leche ni mazada;

d) se habrá fabricado el período de un mes previo al día en que el organismo de intervención reciba la oferta de venta o, en el caso a que se refiere la segunda frase de la letra e) del Anexo III, durante las cuatro semanas anteriores a la semana en que se reciba la oferta;

e) la leche desnatada en polvo no sobrepasará los niveles máximos admisibles de radiactividad aplicables según la normativa comunitaria. Los niveles aplicables serán los establecidos en el artículo 3 del Reglamento (CEE) nº 737/90 del Consejo (1). El control del nivel de contaminación radiactiva del producto sólo se efectuará cuando lo exija la situación y durante el período que sea necesario. Si fuera preciso, la duración y el alcance de las medidas de control se determinarán según el procedimiento establecido en el artículo 30 del Reglamento (CEE) nº 804/68.

2. A efectos del presente Reglamento, se entenderá por:

a) *mazada:* el subproducto de la fabricación de mantequilla obtenido tras el batido o la elaboración de la mantequilla en continuo y separación de la fase grasa sólida;

b) *suero de leche:* el subproducto de la fabricación de queso o de caseína mediante la acción de ácidos, cuajo y procesos físico-químicos.

3. La cantidad mínima de la oferta será de 20 toneladas. Los Estados miembros la podrán aumentar y establecer que la leche desnatada en polvo se ofrezca por toneladas completas.

4. El organismo de intervención registrará tanto el día de la recepción de la oferta de venta, las cantidades y fechas de fabricación correspondientes y el lugar en que se vaya a almacenar la leche desnatada en polvo.

5. Las ofertas sólo serán válidas si se acompaña la prueba de que el licitador ha depositado una garantía igual a 12 ecus por tonelada de leche desnatada en polvo ofrecida.

Con arreglo al presente Reglamento, el mantenimiento de la oferta y la entrega de la leche desnatada en polvo en el almacén designado por el organismo de intervención constituyen las exigencias principales cuya ejecución cubre la garantía. No obstante, en caso de que el control a que se refiere la letra a) del apartado 1 ponga de manifiesto que la leche desnatada en polvo no se ajusta a los requisitos establecidos en el apartado 1, se devolverá la parte de la garantía correspondiente a las cantidades que no hayan sido aún entregadas.

La garantía se depositará en el Estado miembro en que se presente la oferta.

(1) DO nº L 82 de 29. 3. 1990, p. 1.

Artículo 2

1. La empresa a que se refiere el apartado 1 del artículo 7 del Reglamento (CEE) nº 804/68 sólo se autorizará si:

a) está autorizada con arreglo al artículo 10 de la Directiva 92/46/CEE y dispone de instalaciones técnicas adecuadas;

b) se compromete a llevar permanentemente los libros de registro establecidos por el organismo competente de cada Estado miembro y a anotar el origen de las materias primas, las cantidades de leche desnatada, mazada y suero de leche tratadas, el tipo de tratamiento térmico de la leche desnatada, las cantidades de productos obtenidas, el acondicionamiento, la identificación y la fecha de salida de cada lote de leche desnatada en polvo, mazada en polvo y suero de leche en polvo;

c) acepta someter a un control oficial específico su fabricación de leche desnatada en polvo cuando ésta pueda ser ofrecida a la intervención pública;

d) se compromete a notificar al organismo competente encargado del control, con una antelación mínima de dos días laborables su intención de fabricar leche desnatada en polvo para la intervención pública, pudiendo no obstante el Estado miembro fijar un plazo más breve.

2. A fin de garantizar el cumplimiento de las disposiciones del presente Reglamento los organismos competentes realizarán controles sobre el terreno sin previo aviso, en función del programa de fabricación de leche desnatada en polvo de intervención de las empresas correspondientes.

Estos controles incluirán como mínimo:

— un control por cada período de veintiocho días de fabricación para la intervención y, al menos, una vez al semestre a fin de examinar los elementos indicados en la letra b) del apartado 1,

— un control al semestre, a fin de comprobar el cumplimiento de las condiciones de autorización indicadas en el apartado 1.

3. La autorización se retirará si dejan de cumplirse los requisitos previos establecidos en el apartado 1. A instancia de la empresa correspondiente, la autorización podrá restablecerse tras un período de seis meses una vez realizado un control minucioso.

En caso de que se compruebe que una empresa no ha cumplido alguno de los compromisos a que se refieren las letras b), c) y d) del apartado 1, salvo que haya sido por causa de fuerza mayor, se dejará en suspenso la autorización durante un período comprendido entre uno y doce meses, en función de la gravedad de la irregularidad.

El Estado miembro podrá decidir no imponer dicha suspensión cuando se demuestre que la irregularidad no ha sido cometida deliberadamente o por negligencia grave y que reviste poca importancia en relación con la eficacia de los controles establecidos en el apartado 2.

4. Los controles efectuados con arreglo a los apartados 2 y 3 deberán ser objeto de un informe en el que se precisen los siguientes aspectos:

— fecha del control,

— duración,

— operaciones efectuadas.

Este informe deberá ir firmado por el oficial responsable.

5. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión las medidas adoptadas en relación con los controles establecidos en los apartados 2 y 3 en el plazo de un mes a partir de su adopción.

Artículo 3

El organismo que garantice el control de la observancia de lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 1 hará constar, especificando todas las características del producto enumeradas en el punto 1 del Anexo I, los resultados de los análisis de cada lote ofrecido, que posteriormente se indicarán en un certificado, expedido a instancia del interesado, en particular en caso de intercambio comercial entre Estados miembros o de exportación.

Artículo 4

1. Una vez comprobadas las características de la oferta, el organismo de intervención expedirá sin demora un albarán de entrega fechado y numerado en el que se indiquen:

a) la cantidad que debe entregarse;

b) la fecha límite de entrega de la leche desnatada en polvo;

c) el almacén en que debe efectuarse la entrega.

2. La entrega de la leche desnatada en polvo deberá efectuarse en un plazo de veintiocho días a partir de la recepción de la oferta de venta a que se refiere la letra d) del apartado 1 del artículo 1. La entrega podrá fraccionarse.

3. A efectos del presente Reglamento, la aceptación de la leche desnatada en polvo por el organismo de intervención tendrá lugar el día en que dicha leche ingrese en el almacén y, como muy pronto, el día siguiente a aquél en que se haya emitido el albarán de entrega a que se refiere el apartado 1.

4. El pago de la leche desnatada en polvo comprada por el organismo de intervención se efectuará entre 120 y 140 días después de la aceptación de la leche desnatada en polvo, siempre que se compruebe la observancia de los requisitos a que se refiere el artículo 1.

5. El precio de compra de la leche desnatada en polvo se calculará como sigue:

— si el contenido de materia proteínica del extracto seco no graso, medido según el método que se indica en el Anexo I, es igual o superior al 35,6 %, el precio de compra será igual al precio de intervención;

— si dicho contenido es del 31,4 % como mínimo e inferior al 35,6 %, el precio de compra será igual al precio de intervención menos un importe calculado de la manera siguiente: precio de intervención × [(0,356 − contenido de materia proteínica) × 1,75].

6. Mediante su oferta, el vendedor se comprometerá, en caso de que en el control se comprobara que la leche desnatada en polvo no se ajusta a los requisitos establecidos en el apartado 1 del artículo 1:

— a hacerse cargo de la mercancía correspondiente,

— a pagar los gastos de almacenamiento de las cantidades correspondientes a partir del día de la aceptación y hasta el día de la salida.

Estos gastos de almacenamiento se fijan globalmente por tonelada de la forma siguiente:

a) 21 ecus por gastos fijos;

b) 0,10 ecus por día de almacenamiento, por gastos de almacenamiento.

Los importes se abonarán en la cuenta de la Sección de Garantía del Fondo Europeo de Orientación y Garantía Agrícola (FEOGA).

Artículo 5

1. Los almacenes a que se refiere el párrafo cuarto del apartado 1 del artículo 7 del Reglamento (CEE) nº 804/68 deberán cumplir las siguientes condiciones:

a) estar secos, en buen estado de mantenimiento y exentos de parásitos;

b) no presentar ningún olor extraño;

c) permitir una buena ventilación;

d) disponer de capacidad suficiente y de un equipamiento adecuado a su capacidad.

Los riesgos correspondientes al almacenamiento de la leche desnatada en polvo serán cubiertos por un seguro que adoptará la forma de una obligación contractual de los almacenistas o bien de un seguro global del organismo de intervención. El Estado miembro podrá ser también su propio asegurador.

2. Los organismos de intervención exigirán que la entrada en almacén y el almacenamiento de la leche desnatada en polvo se efectúen en paletas y de forma que se constituyan los lotes fácilmente identificables y de acceso sencillo.

3. El organismo competente encargado del control procederá al control para comprobar la presencia de los productos en el almacén, establecido en el artículo 4 del Reglamento (CEE) nº 618/90 de la Comisión [1].

Artículo 6

1. El organismo de intervención elegirá el almacén disponible más cercano al lugar donde esté depositada la leche desnatada en polvo.

[1] DO nº L 67 de 15. 3. 1990, p. 21.

No obstante, siempre que la elección de otro almacén no implique gastos suplementarios de almacenamiento, el organismo podrá:

a) elegir otro almacén dentro de la distancia contemplada en el apartado 2;

b) más allá de esta distancia, elegir otro almacén cuando esto suponga un gasto menor, teniendo en cuenta los gastos de almacenamiento y transporte correspondientes. En este caso, el organismo de intervención comunicará su elección sin demora a la Comisión.

2. La distancia máxima contemplada en el párrafo tercero del apartado 1 del artículo 7 del Reglamento (CEE) nº 804/68 se establece en 350 kilómetros. Más allá de esta distancia, los gastos suplementarios de transporte a cargo del organismo de intervención se fijan en 0,05 ecus por tonelada y kilómetro.

No obstante, en caso de que el organismo de intervención comprador dependa de un Estado miembro que no sea aquél en cuyo territorio esté almacenada la leche desnatada en polvo, para el cálculo de la distancia entre el almacén del vendedor y la frontera del Estado miembro del organismo de intervención comprador.

Artículo 7

Al dejar de formar parte de las existencias, en caso de entrega a salida de almacén, el organismo de intervención pondrá a disposición la leche desnatada en polvo:

— cargada, sobre medio de transporte en el muelle del almacén, con excepción de la estiba, cuando se trate de un camión o de un vagón de ferrocarril,

— sobre muelle almacén, cuando se trate de otro medio de transporte, en especial de un contenedor.

Los gastos de estiba y descarga de las paletas, en su caso, correrán a cargo del comprador de la leche desnatada en polvo. El Estado miembro fijará dichos gastos de manera global e informará de ello a cada interesado que lo solicite.

Artículo 8

Queda derogado el Reglamento (CEE) nº 625/78.

Las referencias al Reglamento (CEE) nº 625/78 se entenderán como referencias al presente Reglamento.

Artículo 9

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

Será aplicable a partir del 1 de marzo de 1996.

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

Hecho en Bruselas, el 22 de febrero de 1996.

Por la Comisión

Franz FISCHLER

Miembro de la Comisión

ANEXO I

CALIDAD DE LA LECHE DESNATADA EN POLVO

1. **Características:**

a) contenido de materia proteínica:	como mínimo 31,4 % del extracto seco magro
b) contenido de materia grasa:	como máximo 1,00 %
c) contenido de agua:	como máximo 3,5 %
d) acidez valorable en ml de solución de hidróxido sódico 0,1 N:	como máximo 19,5 ml
e) contenido de lactatos:	como máximo 150 mg/100 g
f) aditivos:	ninguno
g) prueba de la fosfatasa:	negativa, es decir, igual o inferior a 4 µg de fenol por gramo de leche reconstituida
h) índice de insolubilidad:	como máximo 0,5 ml (24 °C)
i) contenido de partículas quemadas:	como máximo 15,0 mg, a saber, como mínimo disco B
j) contenido de microorganismos:	máximo 40 000 por g
k) presencia de coliformes:	negativa en 0,1 g
l) presencia de mazada:	negativa
m) presencia de suero de leche:	negativa
n) sabor y olor:	nítidos
o) aspecto:	color blanco o ligeramente amarillento, ausencia de impurezas y de partículas coloreadas
p) antimicrobióticos:	negativa (1).

2. **Métodos de control**

a) Sin perjuicio de las disposiciones relativas a la armonización de los métodos de análisis, serán obligatorios, en aplicación del presente Reglamento, los métodos de referencia que se mencionan a continuación:

— determinación de la materia proteínica (N × 6,38):	norma internacional FIL 20B: 1993
— determinación de la materia grasa:	norma internacional FIL 9C: 1987
— determinación del agua:	norma internacional FIL 26A: 1993
— determinación de la acidez:	norma internacional FIL 86: 1981
— determinación de lactatos:	norma internacional FIL 69B: 1987
— prueba de la fosfatasa:	norma internacional ISO 3356: 1975
— índice de insolubilidad:	norma internacional FIL 129A: 1988
— determinación del contenido de partículas quemadas:	ADPI Standard Methods 1990
— recuento de microorganismos:	norma internacional FIL 100B: 1991
— presencia de coliformes:	norma internacional FIL 73A: 1985.

b) En lo que se refiere a la presencia de:

— suero de leche en polvo:	determinación de los glicomacropéptidos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento según el método de análisis que se describe en el Anexo V
— suero de leche ácido:	pruebas establecidas por los Estados miembros
— mazada:	la ausencia de mazada puede establecerse, bien mediante un control sin previo aviso en los centros de fabricación, realizado una vez a la semana por lo menos, o bien por medio del análisis en laboratorio, según el método que se describe en el Anexo VI, del producto acabado, indicando como máximo 69,31 mg de FEDP por 100 g
— sustancias antimicrobianas:	según el método que se describe en el Anexo VII.

c) La recogida de muestras se efectuará según el procedimiento de la norma internacional ISO 707; no obstante, los Estados miembros podrán utilizar otro método de muestreo siempre que se ajuste a los principios de la mencionada norma.

---

(1) La leche cruda que se utilice en la fabricación de leche desnatada en polvo debe reunir los requisitos establecidos en la parte D del capítulo III del Anexo A de la Directiva 92/46/CEE.

ANEXO II

ENVASADO

1. **Envases**

Los envases serán nuevos y estarán secos e intactos, con capacidad para un peso neto de 25 kg y una preparación que se ajuste a una de las fórmulas siguientes:

a) 4 sacos de papel kraft, con una resistencia que corresponda a un peso mínimo de 70 g por m^2,

1 saco de papel alquitranado intercalado, con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 140 g por m^2,

1 bolsa interior de polietileno, con un espesor mínimo de 0,08 mm, soldada o con costura doble;

b) 1 saco de papel kraft con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 70 g por m^2,

1 saco de papel kraft con capa de polietileno, con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 80 g + 15 g por m^2,

3 sacos de papel kraft con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 70 g por m^2,

1 bolsa interior de polietileno con un espesor mínimo de 0,08 mm, soldada o con costura doble;

c) 1 saco exterior de papel kraft con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 85 g por m^2,

1 saco de papel kraft con capa de polietileno, con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 70 g + 15 g por m^2,

2 sacos de papel kraft con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 70 g por m^2,

1 bolsa interior de polietileno con un espesor mínimo de 0,12 mm, soldada o con costura doble;

d) 1 saco exterior de papel kraft semiextensible, con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 95 g por m^2,

1 saco de papel kraft semiextensible con capa interior de polietileno, con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 95 g + 15 g por m^2,

1 saco de papel kraft semiextensible con una resistencia correspondiente a un peso mínimo de 85 g por m^2,

1 bolsa interior de polietileno con un espesor mínimo de 0,12 mm, soldada o con costura doble.

2. **Llenado**

Al realizar el llenado, el contenido del saco deberá comprimirse bien. Se habrá de evitar totalmente la penetración de polvo a granel en los diferentes pliegues.

3. **Procedimiento de prueba**

De conformidad con el punto 1, el envase debe resistir una tensión media de absorción de 420 julios/m^2 con tres capas de papel como mínimo, según el método ISO 1924-2-1985.

ANEXO III

MARCADO

El envase incluirá, como mínimo, las indicaciones siguientes, en su caso en clave:

a) denominación «leche desnatada en polvo "spray"», en una de las lenguas de la Comunidad;

b) peso neto;

c) número de la partida de fabricación;

d) número de autorización que identifique el centro de producción y el Estado miembro en que esté situado;

e) fecha de fabricación; si la leche desnatada en polvo se almacena en silos, la fecha de fabricación se sustituirá por la semana de fabricación.

ANEXO IV

MUESTREO Y ANÁLISIS DE LA LECHE DESNATADA EN POLVO OFRECIDA

1. Número de envases que se elegirán por sondeo para el muestreo:
   — ofertas de hasta 800 sacos de 25 kg: 8 como mínimo,
   — ofertas de más de 800 sacos de 25 kg: 8 + 1 por cada nuevo lote o parte de lote de 800 sacos, como mínimo.
2. Peso de la muestra: se recogerán como mínimo 200 g de cada envase.
3. Agrupación de las muestras: se reunirán como máximo 9 muestras en una muestra global.
4. Análisis de las muestras: cada muestra global se someterá a un análisis mediante el cual se puedan comprobar todas las características cualitativas enumeradas en el Anexo I.
5. Directrices en caso de muestras defectuosas:
   a) si una muestra compuesta resulta defectuosa en relación con un parámetro se rechazará la cantidad representada por dicha muestra;
   b) si una muestra compuesta resulta defectuosa en relación con varios parámetros se rechazará la cantidad representada por dicha muestra y se efectuará un segundo muestreo del resto de las cantidades de la oferta que procedan del mismo centro de fabricación; este segundo muestreo será definitivo para el análisis. En este caso:
      — se duplicará el número de muestras a que se refiere el punto 1,
      — si una muestra compuesta resulta defectuosa en relación con uno o varios parámetros se rechazará la cantidad representada por dicha muestra.

ANEXO V

INVESTIGACIÓN DEL SUERO DE LECHE EN POLVO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO DESTINADA AL ALMACENAMIENTO PÚBLICO MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LOS GLICOMACROPÉPTIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (CLHP)

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite poner de manifiesto la presencia de suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante determinación de los glicomacropéptidos.

2. Referencia

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

3. Definición

Contenido en glicomacropéptidos de la leche desnatada en polvo: contenido en sustancias determinado según el método descrito a continuación y expresado en porcentaje en peso.

4. Principio

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

— determinación de la cantidad de glicomacropéptidos (GMP) presentes en el sobrenadante por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP),

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

5. Reactivos

Todos los reactivos serán de calidad analítica reconocida. El agua utilizada será destilada o de pureza por lo menos equivalente.

5.1. *Solución de ácido tricloroacético*

Disolver 240 g de ácido tricloroacético (Cl_3CCOOH) en el agua y completar hasta 1 000 ml.

5.2. *Solución eluyente pH 6,0*

Disolver 1,74 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 21,41 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) en 700 ml de agua aproximadamente.

Ajustar, si es necesario, a pH 6,0 con ayuda de una solución de ácido fosfórico o de hidróxido de potasio.

Completar hasta 1 000 ml con agua y homogeneizar.

Filtrar la solución eluyente, antes de su utilización, sobre una membrana filtrante de 0,45 µm de diámetro de poro.

5.3. *Solución de lavado y de conservación de las columnas*

Mezclar un volumen de acetonitrilo (CH_3CN) en nueve volúmenes de agua. Filtrar la mezcla, antes de su utilización, sobre una membrana filtrante de 0,45 µm de diámetro de poro.

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

5.4. *Muestras testigos*

5.4.1. Leche desnatada en polvo que responda a las exigencias del presente Reglamento o sea [0].

5.4.2. La misma leche en polvo adulterada con 5 % (m/m) por suero de leche en polvo de composición media, o sea [5].

6. **Aparatos**

6.1. Balanza analítica.

6.2. Centrifugadora que pueda alcanzar una fuerza centrífuga de 2 200 g y provista de tubos para centrifugar cerrados de una capacidad de 25 ml aproximadamente.

6.3. Agitador mecánico.

6.4. Agitador magnético.

6.5. Embudos de vidrio de 7 cm de diámetro aproximadamente.

6.6. Papeles de filtro, de filtración media, de 12,5 cm de diámetro aproximadamente.

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

6.8. Pipeta graduada que permita entregar 10 ml, según ISO 648, clase A, o ISO/R 835.

6.9. Baño de agua con termostato regulado a 25 más o menos 0,5 °C.

6.10. Equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento que comprenda:

6.10.1. bomba,

6.10.2. inyector, manual o automático, de 15 a 30 µl de capacidad,

6.10.3. dos columnas en serie TSK 2 000 SW (30 cm de longitud, diámetro interior de 0,75 cm) y/o columnas de eficacia equivalente y una precolumna previa (3 cm × 0,3 cm) rellena de I 125 o de un material de eficacia equivalente,

6.10.4. horno de columna con termostato regulado a 35 más o menos 1 °C,

6.10.5. detector por luz ultravioleta de longitud de onda variable, que permita efectuar mediciones de 205 mm de una sensibilidad de 0,008 A,

6.10.6. integrador que pueda integrar de valle en valle.

Nota: Se puede trabajar con columnas, mantenidas a temperatura ambiente, pero su poder de resolución es ligeramente menor. En este caso las variaciones de temperatura durante una misma serie de análisis deberán ser inferiores a más o menos 5 °C.

7. **Muestreo**

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

7.2. Conservar la muestra de modo que no pueda producirse deterioro ni modificación de composición.

8. **Modo operatorio**

8.1. *Preparación de la muestra para ensayo*

Trasvasar la leche en polvo a un recipiente de capacidad aproximadamente doble del volumen del polvo, provisto de tapadera hermética al aire. Cerrar el recipiente inmediatamente.

Mezclar bien la leche en polvo por sucesivas inversiones del recipiente.

8.2. *Toma de ensayo*

Pesar 2,000 más o menos 0,001 g de muestra para ensayo en un tubo de centrifugar (6.2).

8.3. *Eliminación de las materias grasas y de las proteínas*

8.3.1. Añadir 20,0 g de agua tibia (50 °C) a la toma de ensayo. Disolver el polvo agitando durante 5 minutos con ayuda del agitador (6.3). Llevar la temperatura del tubo hasta 25 °C.

8.3.2. Añadir en 2 minutos, 10,0 ml de la solución de ácido tricloroacético (5.1) bajo agitación magnética (6.4). Poner el tubo en el baño de agua (6.9) y mantenerlo allí 60 minutos.

8.3.3. Centrifugar (6.2) 2 200 g durante 10 minutos. O filtrar sobre papel (6.6), desechar los 5 primeros milímetros de filtrado.

8.4. *Determinación cromatográfica*

8.4.1. Inyectar de 15 a 30 µl medidos exactamente, de sobrenadante o de filtrado (8.3.3), en el aparato de cromatografía líquida de alto rendimiento (6.10) con un caudal de 1,0 ml de solución eluyente (5.2) por minuto.

Nota:

1. Mantener la solución eluyente (5.2) a 85 °C durante todo el análisis cromatográfico con el fin de conservar el eluyente desgasificado y de evitar toda proliferación bacteriana. Es aceptable cualquier precaución que tenga un efecto similar.
2. En cada interrupción, lavar las columnas con agua. No dejarlas nunca bajo la solución eluyente (5.2).

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

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

pico II: segundo pico del cromatograma en el que el RT es de 12,5 minutos aproximadamente,

pico III: tercer pico del cromatograma, correspondiente a los GMP, cuyo RT es de 15,5 más menos 1,0 minutos,

pico IV: cuarto pico del cromatograma cuyo RT es de 17,5 minutos aproximadamente.

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

El integrado (6.10.6) calcula automáticamente la superficie A de cada pico, o sea:

A_{II}: superficie del pico II,

A_{III}: superficie del pico III,

A_{IV}: superficie del pico IV.

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

En caso de duda, repetir el análisis.

8.5. *Calibrado*

8.5.1. Aplicar exactamente a las muestras testigos (5.4) el modo operatorio descrito desde el punto 8.2 al punto 8.4.2.

Utilizar soluciones recientemente preparadas pues los GMP se degradan en medio tricloroacético al 8 %. En efecto, su contenido disminuye aproximadamente 0,2 % por hora a 30 °C.

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

8.5.3. Determinar los coeficientes de respuesta R inyectando el mismo volumen de filtrados (8.5.1) que el utilizado para las muestras.

9. Expresión de los resultados

9.1. *Modo de cálculo y fórmulas*

9.1.1. Cálculo de los coeficientes de respuesta R:

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

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

donde:

R_{II} y R_{IV} = respectivamente los coeficientes de respuesta de los picos II y IV,

A_{II} [0] y A_{IV} [0] = respectivamente las superficies de los picos II y IV de la muestra testigo [0] obtenidas en el punto 8.5.3

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

donde:

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

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

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

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

S_{II} [E] = R_{II} × A_{II} [E]

S_{III} [E] = R_{III} × A_{III} [E]

S_{IV} [E] = R_{IV} × A_{IV} [E]

donde:

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

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

R_{II}, R_{III}, R_{IV} = los coeficientes de respuesta calculados en el punto 9.1.1.

9.1.3. Cálculo del tiempo de retención relativo del pico III de la muestra [E]:

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

donde:

RRT_{III} [E] = el tiempo de retención relativo del pico III de la muestra [E],

RT_{III} [E] = el tiempo de retención del pico III de la muestra [E] obtenido en el punto 8.4.2,

RT_{III} [5] = el tiempo de retención del pico III de la muestra testigo [5] obtenido en el punto 8.5.3.

9.1.4. Por la experimentación, se ha demostrado que existe una relación lineal entre el tipo de retención relativo del pico III es decir RRT_{III} [E] y el porcentaje de suero de leche en polvo añadido hasta el 10 %:

— con un contenido > 5 % el RRT_{III} [E] es < 1,000,

— con un contenido ≤ 5 % el RRT_{III} [E] es ≥ 1,000.

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

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

9.2. *Cálculo del porcentaje de suero de leche en polvo presente en la muestra, es decir:*

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

donde:

W = el porcentaje m/m de suero de leche en polvo presente en la muestra [E],

S_{III} [E] = la superficie relativa del pico III de la muestra para ensayo [E] obtenida en el punto 9.1.2,

1,3 = la superficie relativa media del pico III, expresada en g por 100 g de suero de leche en polvo determinado en las leches desnatadas en polvo no adulteradas de origen diverso. Esta cifra se ha obtenido experimentalmente,

S_{III} [0] = la superficie relativa del pico III que es igual a R_{III} × A_{III} [0]. Estos valores se obtienen respectivamente en los puntos 9.1.1 y 8.5.3,

(S_{III} [0] − 0,9) = la corrección que hay que efectuar en la superficie relativa media 1,3 cuando el valor S_{III} [0] se aparta en 0,9. Experimentalmente, la superficie relativa media del pico III de la muestra testigo [0] es de 0,9.

9.3. *Precisión del método*

9.3.1. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o en un corto intervalo de tiempo por el mismo analista que utilice los mismos aparatos, con la misma toma de muestra, no debe sobrepasar el 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproducibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales e independientes obtenidos en dos laboratorios diferentes, con la misma toma de muestra, no debe sobrepasar el 0,4 % m/m.

9.4. *Interpretación*

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

donde:

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

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

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

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

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

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

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

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

gráficos:

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

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

donde:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

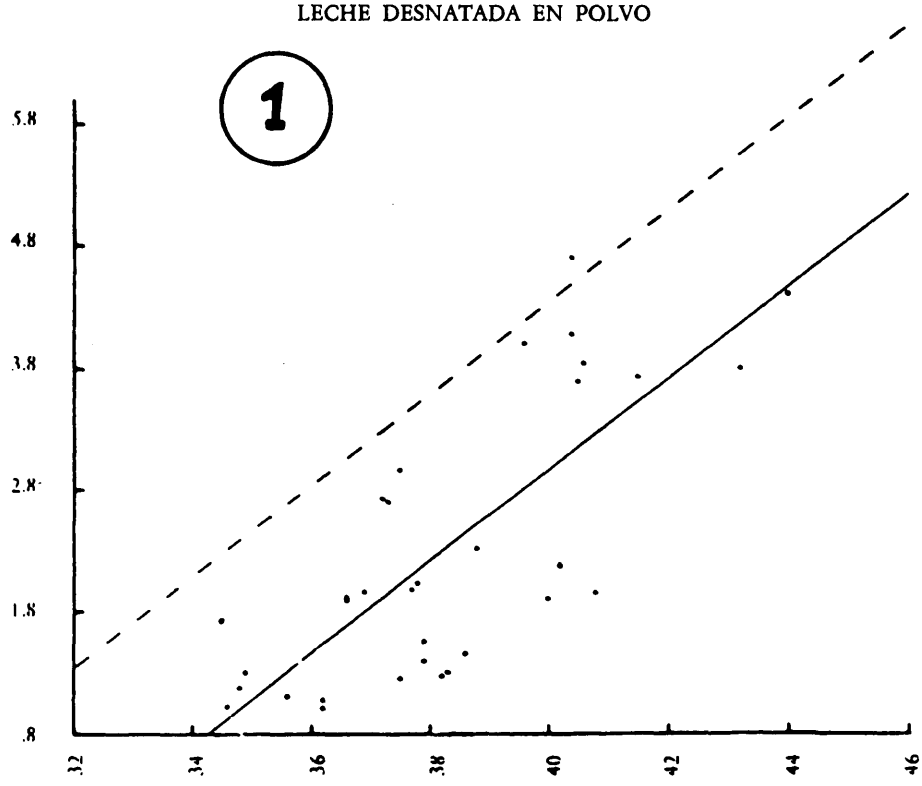
El contenido en suero de leche existente se calculará mediante la fórmula:

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

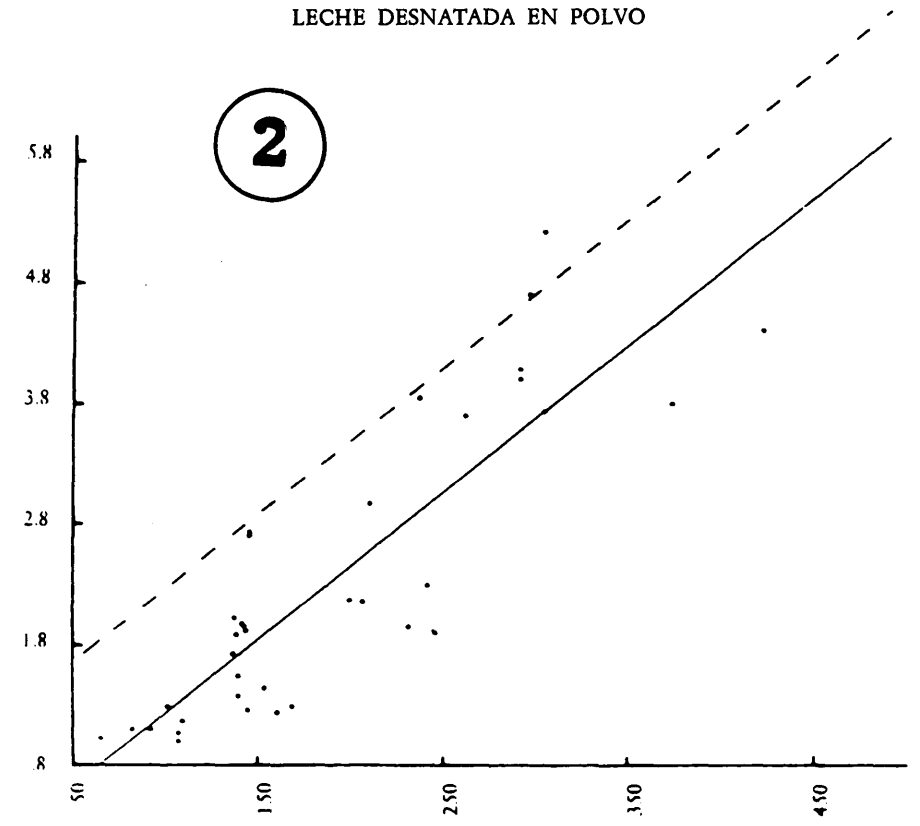
donde:

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

LECHE DESNATADA EN POLVO



LECHE DESNATADA EN POLVO



ANEXO VI

LECHE DESNATADA EN POLVO DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFATIDILSERINA Y FOSFATIDILETANOLAMINA

MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO DE FASE INVERSA (CLAR)

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de fosfatidilserina (FS) y fosfatidiletanolamina (FE) de la leche desnatada en polvo (LDP) y permite detectar los sólidos de suero de leche en la LDP.

2. Definición

Contenido de FS + FE: la fracción de masa de la substancia determinada mediante la aplicación del presente procedimiento. El resultado se expresa en mg de fosfatidiletanolamina dipalmitoilo (FEDP) por cada 100 g de polvo.

3. Principio

Extracción de los aminofosfolípidos por medio de metanol a partir de leche en polvo reconstituida. Determinación del contenido de FS y FE en forma de derivados de o-ftaldialdehído mediante el método de CLAR de fase inversa y detección por fluorescencia. Determinación del contenido de FS y FE en la muestra problema sometida a prueba por referencia a una muestra patrón que contiene una cantidad conocida de FEDP.

4. Reactivos

Todos los reactivos deberán ser de grado analítico reconocido. El agua utilizada deberá ser agua destilada o de pureza al menos equivalente, salvo que se indique lo contrario.

4.1. *Material de referencia: FEDP con una pureza de un 99 %, como mínimo*

Nota: el material de referencia deberá almacenarse a − 18 °C.

4.2. *Reactivos para la muestra problema de referencia y la preparación de la muestra problema.*

4.2.1. Metanol de grado CLAR.

4.2.2. Cloroformo de grado CLAR.

4.2.3. Monoclorhidrato de triptamina.

4.3. *Reactivos para la obtención del derivado o-ftaldialdehído*

4.3.1. Hidróxido de sodio, solución acuosa 12M.

4.3.2. Ácido bórico, solución acuosa 0,4 M ajustada a pH 10,0 por medio de hidróxido de sodio (4.3.1).

4.3.3. 2-mercaptoetanol.

4.3.4. O-ftaldialdehído (OFA).

4.4. *Solventes de elución de CLAR*

Los solventes de elución deberán prepararse por medio de reactivos de grado CLAR.

4.4.1. Agua de grado CLAR.

4.4.2. Metanol de pureza fluorimétrica sometida a prueba.

4.4.3. Tetrahidrofurano.

4.4.4. Fosfato de sodio y dihidrógeno.

4.4.5. Acetato de sodio.

4.4.6. Ácido acético.

5. Material

5.1. *Balanza analítica*

5.2. *Vasos de precipitados de 25 y 100 ml de capacidad*

5.3. *Pipetas que permitan medir entre 1 y 10 ml*

5.4. *Agitador magnético*

5.5. *Pipetas graduadas que permitan medir 0,2, 0,5 y 5 ml*

5.6. *Matraces aforados de 10, 50 y 100 ml de capacidad*

5.7. *Jeringas de 20 y 100 µl* de capacidad

5.8. *Baño de ultrasonidos*

5.9. *Centrifugadora que funcione a 27 000 × g*

5.10 *Frascos de vidrio de unos 5 ml de capacidad*

5.11. *Probeta de 25 ml de capacidad*

5.12. *pH-metro*

5.13. *Equipo de CLAR*

5.13.1. Sistema de bombeo de gradiente capaz de funcionar a razón de 1,0 ml/min a 200 bar.

5.13.2. Muestreador con capacidad de formar derivados.

5.13.3. Calentador de columna regulado a 30 °C.

5.13.4. Detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 330 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm.

5.13.5. Integrador o equipo de tratamiento de datos capaz de medir la superficie bajo picos.

5.13.6. Una columna de Licrosphere — 100 (250 × 4,6 mm) o una columna equivalente que lleve octadecil-silano (C18) con una granulometría de 5 µm.

6. Toma de muestras

La toma de muestras se llevará a cabo de acuerdo con la norma IDF 50B. 1985.

7. Procedimiento

7.1. *Preparación de la solución del patrón interno*

Pesar 30,0 ± 0,1 mg de monoclorhidrato de triptamina (4.2.3) en matraz aforado de 100 ml (5.6) y enrasar con metanol (4.2.1). Verter con la pipeta (5.3) 1 ml de esta solución en un matraz aforado de 10 ml (5.6) y enrasar con metanol (4.2.1) con el fin de obtener una concentración de triptamina de 0,15 mM.

7.2. *Preparación de la solución de muestra problema*

Pesar 1,000 ± 0,001 g de la muestra problema de LDP en un vaso de precipitados de 25 ml (5.2). Añadir 10 ml de agua destilada a 40 °C con una pipeta (5.3) y agitar con el agitador magnético (5.4) durante treinta minutos para disolver los grumos. Verter con la pipeta (5.5) 0,2 ml de leche reconstituida en un matraz aforado de 10 ml (5.6), añadir 100 µl de solución de triptamina 0,15 mM (7.1) con una jeringa (5.7) y enrasar con metanol (4.2.1). Mezclar cuidadosamente por inversión y someter a ultrasonidos (5.8) durante 15 minutos. Centrifugar (5.9) a 27 000 × g durante 10 minutos y recoger la solución sobrenadante en un frasco de vidrio (5.10).

Nota: la solución de muestra problema deberá almacenarse a 4 °C hasta que se proceda al análisis CLAR.

7.3. *Preparación de la solución del patrón externo*

Pesar 55,4 mg de FEDP (4.1) en un matraz aforado de 50 ml (5.6) y añadir 25 ml de cloroformo (4.2.2) con una probeta (5.11). Calentar el matraz taponado a 50 °C y mezclar cuidadosamente hasta que se disuelva el FEDP. Enfriar el matraz hasta 20 °C, enrasar con metanol (4.2.1) y mezclar por inversión. Verter con una pipeta (5.3) 1 ml de esta solución en un matraz aforado de 100 ml (5.6) y enrasar con metanol (4.2.1). Pasar con pipeta (5.3) 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml (5.6), añadir 100 µl (5.7) de solución de triptamina 0,15 mM (7.1) y enrasar con metanol (4.2.1). Mezcla por inversión.

Nota: la solución de muestra patrón deberá almacenarse a 4 °C hasta que se proceda al análisis CLAR.

7.4. *Preparación del reactivo de derivación*

Pesar 25,0 ± 0,1 mg de OFA (4.3.4) en un matraz aforado de 10 ml (5.6), añadir 0,5 ml (5.5) de metanol (4.2.1) y mezclar hasta que disuelva el OFA. Enrasar con una solución de ácido bórico (4.3.2) y añadir 20 µl de 2-mercaptoetanol (4.3.3) con una jeringa (5.7).

Nota: el reactivo de derivación deberá almacenarse a 4 °C en un frasco oscuro y permanecer estable durante una semana.

7.5. *Determinación del contenido mediante CLAR*

7.5.1. Solventes de elución (4.4).

Solvente A:

solución de fosfato de sodio y dihidrógeno a 0,3 mM y de acetato de sodio 3 mM (ajustada a un pH de 6,5 por medio de ácido acético) metanol: tetrahidrofurano = 558: 440: 2 (v/v/v).

Solvente B:

metanol.

7.5.2. Grado de elución preconizado:

Tiempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Caudal (ml/min.)
Inicial	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Nota: el grado de elución podrá requerir una ligera modificación con vistas a la obtención de la resolución indicada en la figura nº 1.

Temperatura de la columna: 30 °C.

7.5.3. Volumen de inyección: 50 µl de reactivo de derivación y 50 µl de solución de muestra problema.

7.5.4. Equilibrado de la columna

El sistema se pondrá en marcha a diario. Llenar la columna con solvente B al 100 % durante 15 minutos y, a continuación, regular la proporción a razón de A: B = 40: 60 y equilibrar a 1 ml/min. durante 15 minutos. Efectuar un ciclo en blanco mediante la inyección de metanol (4.2.1).

Nota: antes de su almacenamiento a largo plazo, llenar la columna con metanol y cloroformo en una proporción de 80: 20 (v/v) durante 30 minutos.

7.5.5. Determinación del contenido de FS y FE de la muestra problema.

Efectuar la serie de análisis cromatográficos sin modificar el tiempo entre ciclos con el fin de obtener períodos de retención constantes. Inyectar la solución del patrón externo (7.3) cada 5 a 10 soluciones de muestra problema a fin de evaluar el factor de respuesta.

Nota: La columna deberá llenarse con el solvente B al 100 % (7.5.1) durante al menos 30 minutos cada 20 o 25 ciclos.

7.6. *Modo de integración*

7.6.1. Pico del FEDP

El FEDP se eluye en forma de un solo pico. Determinar al área del pico mediante la integración de valle a valle.

7.6.2. Pico de la triptamina

La triptamina se eluye en forma de un solo pico (figura 1). Determinar el área del pico mediante la integración de valle a valle.

7.6.3. Grupos de picos de FS y FE

En las condiciones descritas anteriormente (figura 1), FS se eluye en forma de dos picos principales parcialmente no resueltos precedidos de un pico menor. FE se eluye en forma de tres picos principales parcialmente no resueltos. Determinar la superficie total de cada grupo de picos estableciendo la línea de base tal como se indica en la figura 1.

8. **Cálculo y expresión de los resultados**

El contenido de FS y FE de la muestra problema se calculará como sigue:

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

fórmula en la que:

C = contenido de FS o FE de la muestra problema (mg/100 g de polvo)

A_1 = área del pico de FEDP de la solución de muestra patrón (7.3)

A_2 = área del pico de FS o FE de la solución de la muestra problema (7.2)

T_1 = área del pico de triptamina de la solución de la muestra patrón (7.3)

T_2 = área del pico de triptamina de la solución de muestra problema (7.2).

9. **Precisión**

Nota: los valores relativos a la repetibilidad se han calculado de acuerdo con la norma internacional IDF (1). El límite de reproducibilidad provisional se ha calculado de acuerdo con las «directrices relativas a la interpretación de los resultados analíticos y la aplicación de la evaluación sensorial en relación con la leche y los productos lácteos regulados por la organización común de mercado» (documento VI/2721/95 de la Comisión).

9.1. *Repetibilidad*

La desviación típica relativa de la repetibilidad, que expresa la variabilidad de los resultados analíticos independientes obtenidos por el mismo operador que utilice el mismo material en las mismas condiciones y con la misma muestra problema, durante un breve lapso de tiempo, no deberá sobrepasar un 2 % en valor relativo. En caso de que se proceda a dos determinaciones en esas condiciones, la diferencia relativa entre ambos resultados no deberá sobrepasar el 6 % de la media aritmética de los resultados.

9.2. *Reproducibilidad*

En caso de que se efectúen dos determinaciones por parte de operadores en distintos laboratorios, utilizando materiales distintos y en distintas condiciones para el análisis de la misma muestra problema, la diferencia relativa entre ambos resultados no deberá sobrepasar el 11 % de la media aritmética de los resultados.

10. **Bibliografía**

10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M. *Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39.395 (1988).*

(1) International IDF Standard 135B/1991. Leche y productos lácteos. Características de los métodos analíticos. Resumen de método de análisis en colaboración.

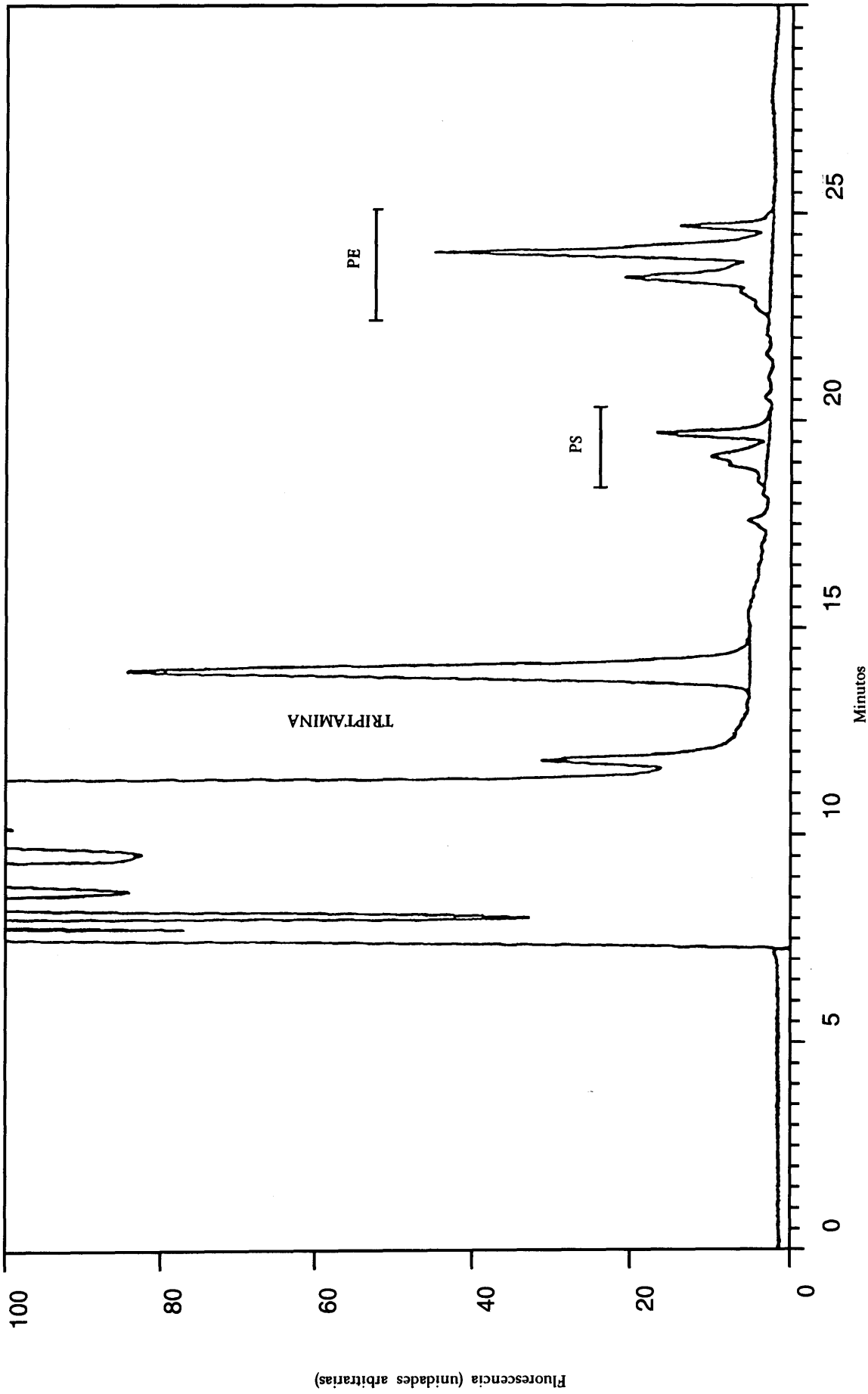


Figura 1: CLAR de los derivados de la fosfatidilserina (FS) y de la fosfatidiletanolamina (FE) contenidos en el extracto de metanol de la leche desnatada en polvo reconstituida. Se indica el modo de integración de los picos de FS, FE y de la triptamina (patrón interno).

ANEXO VII

DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y DE SULFONAMIDA/DAPSONA EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO

Se utilizará un ensayo de cribado de inhibidores microbianos por medio de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 como microorganismo de ensayo, que tenga una sensibilidad suficiente para detectar 4 µg de bencilpenicilina por litro de leche y 100 µg de sulfadimidina por litro de leche. Existen equipos comerciales para ensayos que pueden utilizarse siempre que tengan la sensibilidad requerida para la bencilpenicilina y la sulfadimidina (1).

Se utilizará leche desnatada en polvo reconstituida (1 g polvo + 9 ml de agua destilada) para realizar el ensayo. Éste se llevará a cabo de acuerdo con el capítulo 2 de la sección 1 del boletín nº 258/1991 del procedimiento IDF o conforme a las instrucciones del fabricante del equipo para ensayos.

Los resultados positivos deberán interpretarse como sigue:

1. Repetir el ensayo añadiendo penicilinasa al sistema de ensayo:

   Resultado positivo: la substancia inhibidora no puede identificarse con este procedimiento.

   Resultado negativo: la substancia inhibidora es un antibiótico β-lactámico.

2. Repetir el ensayo añadiendo ácido p-aminobenzoico al sistema de ensayo:

   Resultado positivo: la substancia inhibidora no puede identificarse con este procedimiento.

   Resultado negativo: la substancia inhibidora es una sulfonamida/dapsona.

3. Repetir el ensayo añadiendo penicilinasa + ácido p-aminobenzoico al sistema de ensayo:

   Resultado positivo: la substancia inhibidora no puede identificarse con este procedimiento.

   Resultado negativo: las substancias inhibidoras son un antibiótico β-lactámico y una sulfonamida/dapsona.

---

(1) *Nota importante:* dado que en ocasiones se obtienen resultados falsamente positivos en el análisis de la leche desnatada en polvo, es importante comprobar que el sistema de ensayo utilizado no dé ese tipo de resultados.