

UNION EUROPEA

REGLAMENTO (CE) N° 213/2001 DE LA COMISIÓN, DE 9 DE ENERO DE 2001, POR EL QUE SE ESTABLECEN LAS DISPOSICIONES DE APLICACIÓN DEL REGLAMENTO (CE) N° 1255/1999, EN LO QUE ATAÑE A LOS MÉTODOS QUE DEBEN UTILIZARSE PARA EL ANÁLISIS Y LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE Y DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS, Y SE MODIFICAN LOS REGLAMENTOS (CE) N° 2771/1999 Y (CE) N° 2799/1999

DOCE n° L 37 de 07/02/2001 página 1

Bruselas (Bruselas), enero 2001

I

(Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad)

**REGLAMENTO (CE) Nº 213/2001 DE LA COMISIÓN
de 9 de enero de 2001**

por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999, en lo que atañe a los métodos que deben utilizarse para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos, y se modifican los Reglamentos (CE) nº 2771/1999 y (CE) nº 2799/1999

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

incorporar al presente Reglamento sus anexos relativos a los métodos de análisis.

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo, de 17 de mayo de 1999, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos ⁽¹⁾, y, en particular, sus artículos 10 y 15, el apartado 3 de su artículo 26, el apartado 1 de su artículo 29 y el apartado 14 de su artículo 31,

Considerando lo siguiente:

(1) Los Reglamentos (CEE) nº 1216/68, (CEE) nº 3942/92, (CE) nº 86/94, (CE) nº 2721/95, (CE) nº 1080/96, (CE) nº 1081/96, (CE) nº 1082/96, (CE) nº 1854/96, (CE) nº 880/98 y (CE) nº 1459/98 de la Comisión, cuyas referencias completas figuran en el anexo XXVI del presente Reglamento, establecen los métodos de referencia y de rutina para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos, así como el ámbito y las normas de aplicación de los citados métodos. En aras de una mayor claridad y a fin de ofrecer a los agentes económicos del sector un corpus único de los citados métodos y sus normas de aplicación, es conveniente proceder a la refundición de los Reglamentos antes citados, reuniéndolos en un solo texto. Con ese mismo fin, es conveniente modificar los Reglamentos de la Comisión (CE) nº 2771/1999, de 16 de diciembre de 1999, por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo en lo que respecta a las medidas de intervención en el mercado de la mantequilla y la nata ⁽²⁾ y (CE) nº 2799/1999, de 17 de diciembre de 1999, por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999 en relación con la concesión de una ayuda a la leche desnatada y a la leche desnatada en polvo destinadas a la alimentación animal y con la venta de dicha leche desnatada en polvo ⁽³⁾, con el fin de

- (2) Las características de la composición y de la calidad de la leche y de los productos lácteos fijadas en el marco de los regímenes establecidos en el Reglamento (CE) nº 1255/1999 deben comprobarse a fin de garantizar que se ajusten estrictamente a los requisitos establecidos.
- (3) Se dispone con frecuencia que los métodos de referencia que deben utilizarse para tales comprobaciones son los publicados por organizaciones internacionales tales como CEN, FIL, ISO y AOAC International, los cuales son actualizados periódicamente por dichas organizaciones. En determinados casos, se establece un método de referencia comunitario. En otros casos, la normativa comunitaria no especifica ningún método de referencia. A fin de garantizar la uniformidad de la aplicación de los métodos de referencia, es conveniente establecer anualmente una lista de los métodos de referencia y especificar que el método aplicable debe figurar en tal lista.
- (4) No debe excluirse la utilización de métodos de rutina, por lo que deben especificarse las condiciones de su aplicación.
- (5) A fin de establecer una práctica uniforme en materia de evaluación de los resultados de análisis, es conveniente fijar también una serie de métodos comunes. Lo mismo se aplica a la evaluación organoléptica de los productos en cuestión y al reexamen de los resultados que hayan sido impugnados.
- (6) En el caso de determinados análisis no existen actualmente métodos de referencia aceptados a escala internacional que hayan sido validados. Por consiguiente, no se dispone de información relativa a las variaciones de los resultados de análisis entre los distintos laboratorios. Es conveniente por lo tanto fijar determinados métodos a escala comunitaria, que hayan sido validados de conformidad con las normas establecidas a escala internacional y que se apliquen como métodos de referencia.

⁽¹⁾ DO L 160 de 26.6.1999, p. 48.

⁽²⁾ DO L 333 de 24.12.1999, p. 11.

⁽³⁾ DO L 340 de 31.12.1999, p. 3.

(7) El Reglamento (CE) n° 2571/97 de la Comisión, de 15 de diciembre de 1997, relativo a la venta de mantequilla a precio reducido y a la concesión de una ayuda para la nata, la mantequilla y la mantequilla concentrada destinadas a la fabricación de productos de pastelería, helados y otros productos alimenticios⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 635/2000⁽²⁾, establece la adición de marcadores a la nata, la mantequilla y la mantequilla concentrada en determinadas circunstancias, con objeto de garantizar la correcta utilización final de esos productos. Teniendo en cuenta la importancia que la adición de marcadores reviste para la adecuada aplicación del régimen y a fin de garantizar un trato equitativo a los agentes económicos partícipes en el mismo, es conveniente establecer, en la medida de lo posible, unos métodos comunes para la determinación de algunos de esos marcadores.

(8) A la mantequilla concentrada deben añadirse marcadores bajo control, de conformidad con el Reglamento (CEE) n° 3143/85 de la Comisión, de 11 de noviembre de 1985, relativo a la comercialización a precio reducido de mantequilla de intervención destinada al consumo inmediato en forma de mantequilla concentrada⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 101/1999⁽⁴⁾, y el Reglamento (CEE) n° 429/90 de la Comisión, de 20 de febrero de 1990, relativo a la concesión mediante licitación de una ayuda para la mantequilla concentrada destinada al consumo inmediato en la Comunidad⁽⁵⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 124/1999⁽⁶⁾, y el Reglamento (CE) n° 2571/97. El estricto cumplimiento de los requisitos relativos a la adición de marcadores a la mantequilla concentrada es indispensable para prevenir el riesgo de desviación. Es conveniente por lo tanto definir un método común de detección de esos marcadores.

(9) Puede concederse una ayuda al almacenamiento privado de quesos a base de leche de oveja en virtud del artículo 9 del Reglamento (CE) n° 1255/1999. Puede concederse una restitución especial en el caso de esos mismos productos en virtud del artículo 31 del citado Reglamento. Está prevista la importación en la Comunidad de quesos a base de leche de oveja, leche de cabra y leche de búfala, o sus mezclas, procedentes de determinados terceros países en condiciones preferentes. Teniendo en cuenta las disposiciones antes citadas, es necesario comprobar mediante controles adecuados que no se ha incorporado leche de vaca a los productos en cuestión. Por consiguiente, es conveniente establecer un método de referencia comunitario para la detección de la leche de vaca, sin perjuicio de la utilización de métodos de rutina, siempre que éstos se ajusten a determinados criterios.

(10) Según el Reglamento (CEE) n° 2921/90 de la Comisión, de 10 de octubre de 1990, referente a la concesión de ayudas para la leche desnatada con vistas a la fabricación de caseína y de caseinatos⁽⁷⁾, cuya última modificación

la constituye el Reglamento (CE) n° 2654/1999⁽⁸⁾, debe comprobarse la ausencia de coliformes. El método de referencia aceptado a escala internacional para la detección de coliformes en la leche y los productos lácteos es la norma internacional FIL73A: 1985. No obstante, esta norma sólo es aplicable en forma modificada a la detección de coliformes en una cantidad determinada de producto. Se ha establecido por lo tanto un método comunitario de referencia para la detección de coliformes basado en la norma anteriormente mencionada.

(11) El Reglamento (CEE) n° 2658/87 del Consejo, de 23 de julio de 1987, relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común⁽⁹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 254/2000⁽¹⁰⁾, establece distintos tipos de derechos de aduana en el caso de los piensos compuestos de la partida arancelaria 2309, en función de su contenido de productos lácteos. Con objeto de garantizar una aplicación uniforme de las disposiciones consideradas, es conveniente establecer un método de análisis del contenido de lactosa obligatorio para todos los Estados miembros, eligiendo a tal fin un método que goce de reconocimiento general.

(12) Según el Reglamento (CE) n° 1255/1999, deben cumplirse determinadas condiciones relativas a la calidad de la mantequilla y la leche desnatada en polvo destinadas a la intervención o, en el caso de la leche desnatada en polvo, destinada a la alimentación animal. Es conveniente por lo tanto establecer determinados métodos de referencia que permitan comprobar si se cumplen dichas condiciones.

(13) La utilización de algunos de los métodos implantados por primera vez a través del presente Reglamento requiere un período de adaptación, por lo que es conveniente aplazar su aplicación.

(14) El Comité de gestión de la leche y los productos lácteos no ha emitido ningún dictamen en el plazo establecido por su presidente.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

CAPÍTULO I

DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1

Objeto y ámbito de aplicación

El presente Reglamento establece las disposiciones de aplicación de los métodos de análisis químico, físico y microbiológico y la evaluación organoléptica de la leche y los productos lácteos en el marco de los regímenes previstos en la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos establecida en el Reglamento (CE) n° 1255/1999, así como algunos de esos métodos.

⁽¹⁾ DO L 350 de 20.12.1997, p. 3.

⁽²⁾ DO L 76 de 25.3.2000, p. 9.

⁽³⁾ DO L 298 de 12.11.1985, p. 9.

⁽⁴⁾ DO L 11 de 16.1.1999, p. 14.

⁽⁵⁾ DO L 45 de 21.2.1990, p. 8.

⁽⁶⁾ DO L 16 de 21.1.1999, p. 19.

⁽⁷⁾ DO L 279 de 11.10.1990, p. 22.

⁽⁸⁾ DO L 325 de 17.12.1999, p. 10.

⁽⁹⁾ DO L 256 de 7.9.1987, p. 1.

⁽¹⁰⁾ DO L 28 de 3.2.2000, p. 16.

Artículo 2

Lista de métodos

1. Se establece en el anexo I la lista de los métodos de referencia aplicables a los análisis a que se refiere el artículo 1.
2. La Comisión actualizará la citada lista al menos una vez al año, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 42 del Reglamento (CE) nº 1255/1999.

Artículo 3

Métodos de rutina

Podrán utilizarse métodos de rutina para los análisis previstos en la normativa comunitaria siempre que dichos métodos sean correctamente calibrados y periódicamente controlados con respecto al método de referencia.

El procedimiento indicado en el anexo II podrá aplicarse a la comprobación de los resultados, obtenidos por medio de métodos de rutina, próximos de los límites establecidos en los Reglamentos correspondientes.

En caso de litigio, los resultados obtenidos con el método de referencia serán determinantes.

Artículo 4

Validación de los métodos de referencia

1. Los métodos de referencia serán validados si se ajustan a determinados criterios previamente establecidos, relativos a la precisión, en lo que atañe al límite de repetibilidad y reproducibilidad.
2. En caso de que no se haya validado un método de referencia establecido en los Reglamentos correspondientes, los Estados miembros establecerán un límite de reproducibilidad provisional.

Este límite se obtendrá mediante la aplicación del procedimiento establecido en la letra b) del anexo III. No obstante, los Estados miembros podrán utilizar un procedimiento equivalente durante los dieciocho meses siguientes a la entrada en vigor del presente Reglamento.

La observancia del límite establecido se comprobará al menos una vez al año.

3. En caso de que los resultados de la aplicación de métodos de referencia validados o de métodos con cifras provisionales relativas a la precisión indiquen que se ha rebasado un límite determinado, se aplicará el método de evaluación de los resultados de análisis descrito en el anexo IV para la determinación de la diferencia crítica con respecto a tal límite.

Artículo 5

Admisibilidad de los resultados de análisis

1. Los análisis se efectuarán en laboratorios que apliquen un método interno de control de calidad conforme al método

descrito en la letra a) del anexo V, o un método de nivel equivalente.

Deberá disponerse en el laboratorio de una descripción detallada del método aplicado.

2. Los laboratorios establecerán sus propias normas internas de precisión, dentro de una serie válida para todos los métodos, de acuerdo con:

- a) el método definido en la letra b) del anexo V, o
- b) un método validado y publicado, con una repetibilidad establecida.

La observancia del límite de reproducibilidad deberá comprobarse al menos una vez al año, de conformidad con el procedimiento establecido en la letra a) del anexo III.

Las disposiciones del párrafo segundo no se aplicarán si el laboratorio ha participado en un programa de pruebas de capacidad durante el año en cuestión.

3. El informe de laboratorio sobre los resultados de un análisis deberá incluir datos suficientes para proceder a una evaluación de los resultados de acuerdo con los anexos IV y VIII.

4. Los resultados de un análisis se considerarán admisibles si se han obtenido de conformidad con los criterios de aceptabilidad especificados en el método interno de control de calidad a que se refiere el apartado 1 y las normas internas de precisión contempladas en el apartado 2.

Artículo 6

Evaluación organoléptica

1. Por lo que se refiere a la mantequilla, la labor de los evaluadores y la fiabilidad de los resultados se comprobarán mediante la aplicación de los métodos establecidos en el anexo VI. El método descrito en el anexo VII se aplicará como método de referencia para la evaluación organoléptica.

2. En lo que atañe a la leche y los productos lácteos distintos de la mantequilla, los Estados miembros utilizarán como método de referencia para la evaluación organoléptica bien la norma FIL99C/1997, bien otros métodos equivalentes que comunicarán a la Comisión.

La labor de los evaluadores y la fiabilidad de los resultados podrán evaluarse mediante la aplicación de los métodos establecidos en el anexo VI.

Artículo 7

Muestreo e impugnación de los resultados de análisis

1. Se tomarán muestras por duplicado para la realización de los análisis previstos en la normativa comunitaria.

2. En caso de que el agente económico no acepte los resultados de un análisis determinado, se aplicará el procedimiento establecido en el anexo VIII.

CAPÍTULO II

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Artículo 8

Contenido de agua/extracto seco/materias grasas de la mantequilla

1. El método de análisis que figura en el anexo IX se aplicará como método de referencia para la determinación del contenido de agua de la mantequilla.
2. El método de análisis establecido en el anexo X se aplicará como método de referencia para la determinación del extracto seco magro de la mantequilla.
3. El método de análisis que figura en el anexo XI se aplicará como método de referencia para la determinación del contenido de materias grasas de la mantequilla.

Artículo 9

Marcadores

1. El método de análisis que figura en el anexo XII se aplicará como método de referencia para la determinación de la vainillina en la mantequilla concentrada, la mantequilla y la nata.
2. El método de análisis establecido en el anexo XIII se aplicará como método de referencia para la determinación de la cantidad de éster etílico del ácido β -apo-8'-caroténico en la mantequilla y la mantequilla concentrada.
3. El método de análisis que figura en el anexo XIV se aplicará como método de referencia para la determinación del contenido de estigmasterol y β -sitosterol en la mantequilla y la mantequilla concentrada.
4. La adición de marcadores a la mantequilla concentrada, la mantequilla y la nata se habrá efectuado de conformidad con la normativa comunitaria pertinente si los resultados obtenidos corresponden a las especificaciones del punto 8 de los anexos a que se refieren los apartados 1, 2 y 3.

Artículo 10

Detección de la caseína de la leche de vaca

1. El método de análisis de referencia que figura en el anexo XV se aplicará para garantizar que los quesos que han de elaborarse exclusivamente con leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o sus mezclas, no contienen caseína de leche de vaca.

Si el contenido aparente de caseína de leche de vaca de la muestra analizada es igual o superior al contenido de la muestra de referencia con un 1 % de leche de vaca que se describe en el anexo XV, se considerará que el producto contiene caseína de leche de vaca.

2. Los métodos de rutina utilizados para la detección de caseína de leche de vaca en los quesos mencionados en el

apartado 1 podrán emplearse en las siguientes condiciones:

- a) su límite de detección deberá ser igual o inferior al 0,5 %;
- b) no se deberán producir falsos positivos;
- c) la caseína de leche de vaca deberá poder detectarse con la sensibilidad necesaria incluso tras largos períodos de maduración, como puede suceder en las condiciones comerciales habituales.

En caso de no cumplirse la condición señalada en la letra b), toda muestra que dé resultado positivo deberá analizarse mediante la aplicación del método de referencia.

En caso de no cumplirse la condición señalada en la letra c) respecto a un determinado tipo de queso mencionado en el artículo 1, ese queso deberá analizarse mediante la aplicación del método de referencia.

Artículo 11

Detección de coliformes

1. El método de análisis de referencia que figura en el anexo XVI se utilizará para la detección de coliformes en la mantequilla, la leche desnatada en polvo, la caseína y los caseinatos.
2. Podrán utilizarse métodos de rutina para la detección de coliformes a condición de que los resultados conseguidos sean comparables a los obtenidos con el método de referencia que figura en dicho anexo. Los métodos de rutina tendrán que contar con un límite de detección suficiente. No se deberán producir falsos negativos. Si no puede descartarse la aparición de falsos positivos, todos los resultados positivos deberán confirmarse mediante la aplicación del método de referencia.

Artículo 12

Contenido de lactosa

El método de determinación del contenido de lactosa de los productos de la partida 2309 de la nomenclatura combinada es el que establece el anexo XVII.

Artículo 13

Detección del suero de cuajo

1. El método de detección del suero de cuajo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público es el que figura en el anexo XVIII.
2. El método de detección del suero de cuajo en la leche desnatada en polvo y en las mezclas destinadas a la alimentación animal es el que establece el anexo XIX.

Artículo 14

Detección del suero de mantequilla

El método de detección del suero de mantequilla en la leche desnatada en polvo es el que figura en el anexo XX.

Artículo 15

Residuos de antimicrobianos

El método de detección de los residuos de antibióticos y de sulfonamidas/dapsona en la leche desnatada en polvo es el que se establece en el anexo XXI.

Artículo 16

Contenido de leche desnatada en polvo

El método de determinación del contenido de leche desnatada en polvo de los piensos compuestos es el que figura en el anexo XXII.

Artículo 17

Detección del almidón

El método de detección del almidón en la leche desnatada en polvo, la leche en polvo desnaturalizada y los piensos compuestos es el que se establece en el anexo XXIII.

Artículo 18

Contenido de humedad del suero de mantequilla ácido en polvo

El método de determinación del contenido de humedad del suero de mantequilla ácido en polvo que vaya a utilizarse en los piensos es el que figura en el anexo XXIV.

Artículo 19

Detección de grasas extrañas

El método de detección de grasas extrañas en la grasa de la leche es el que se establece en el anexo XXV.

CAPÍTULO III

DISPOSICIONES FINALES

Artículo 20

Modificación del Reglamento (CE) nº 2771/1999

El Reglamento (CE) nº 2771/1999 queda modificado como sigue:

- 1) En el apartado 1 del artículo 4, la primera frase se sustituye por el texto siguiente: «Las autoridades competentes controlarán la calidad de la mantequilla de acuerdo con los métodos contemplados en el anexo I y sobre la base de las muestras tomadas con arreglo a lo dispuesto en el anexo IV.».
- 2) En el anexo I, el texto de la nota a pie de página nº 2 se sustituye por el siguiente: «Véase el anexo I del Reglamento (CE) nº 213/2001 (el presente Reglamento).».
- 3) Se suprimen los anexos II y III.
- 4) En el penúltimo renglón del punto 2 del anexo IV, los términos «al anexo III» se sustituyen por «al anexo VII del Reglamento (CE) 213/2001 (el presente Reglamento).».

Artículo 21

Modificación del Reglamento (CE) nº 2799/1999

El Reglamento (CE) nº 2799/1999 queda modificado como sigue:

- 1) En el artículo 20, el texto de los apartados 1, 2, 3 y 4 se sustituye por el siguiente:

«1. El contenido de leche desnatada en polvo de las mezclas y piensos compuestos se comprobará por medio de un análisis, efectuado al menos por duplicado, de acuerdo con el método que se indica en el anexo XXII del Reglamento (CE) 213/2001 (el presente Reglamento), completado por las medidas de control mencionadas en el apartado 3 del artículo 17 del presente Reglamento. En caso de discordancia entre los resultados de estas comprobaciones, el resultado de los controles realizados *in situ* será determinante.

2. La ausencia de suero de cuajo se determinará según el método especificado en el anexo XIX del Reglamento (CE) 213/2001 (el presente Reglamento).

3. El contenido de almidón de los piensos compuestos se determinará mediante la aplicación de las medidas de control mencionadas en el apartado 3 del artículo 17 del presente Reglamento, que deberán completarse con el método de análisis que figura en el anexo XXIII del Reglamento (CE) 213/2001 (el presente Reglamento).

4. El contenido de humedad del suero de mantequilla ácido en polvo se determinará según el método que figura en el anexo XXIV del Reglamento (CE) 213/2001 (el presente Reglamento).».

- 2) Se suprimen los anexos III, IV, V y VI.

Artículo 22

Derogaciones

Quedan derogados los Reglamentos (CEE) nº 1216/68, (CEE) nº 3942/92, (CEE) nº 86/94, (CE) nº 2721/95, (CE) nº 1854/96, (CE) nº 1080/96, (CE) nº 1081/96, (CE) nº 1082/96, (CE) nº 880/98 y (CEE) nº 1459/98.

Las referencias a dichos Reglamentos derogados se entenderán como referencias al presente Reglamento.

Artículo 23

Entrada en vigor

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

No obstante, los métodos establecidos en el anexo III, el punto 4 del anexo IV y los anexos V, VI y VIII serán aplicables a los dieciocho meses de la entrada en vigor del presente Reglamento.

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

Hecho en Bruselas, el 9 de enero de 2001.

Por la Comisión
Franz FISCHLER
Miembro de la Comisión

ANEXO I

(Artículo 2)

LISTA DE LOS MÉTODOS DE REFERENCIA

Índice

Mín. = mínimo, Máx. = máximo, Anexo = anexo del Reglamento citado, e.s.m. = extracto seco magro, AGL = ácidos grasos libres, IP = índice de peróxidos, A = aspecto, S = sabor, C = consistencia, RTB = recuento total de bacterias, Term. = recuento total de bacterias termófilas, EM = Estado miembro, FIL = Federación Internacional de Lechería, ISO = International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización), UIQPA = Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, ADPI = American Dairy Products Institute, LCA = leche concentrada azucarada, LNE = leche o nata evaporada, ESML = extracto seco magro lácteo.

PARTE A

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
Reglamento (CE) nº 2771/1999 Almacenamiento público (DO L 333 de 24.12.1999, p. 11)	Mantequilla no salada	Materia grasa láctea	Mín. 82 %	Anexo XI	Nota 1 Nota 3
		Agua	Máx. 16 %	Anexo IX	
		e.s.m.	Máx. 2 %	Anexo X	
		AGL (máx.)	1,2 mmol/100 g de grasa	Norma FIL 6B:1989	
		IP (máx.)	0,3 mequiv. oxígeno/1 000 g de grasa	Norma FIL 74A:1991 (versión inglesa)	
		Coliformes	No detectables en 1 g	Anexo XVII	
		Grasa de origen no lácteo	No detectable por análisis de triglicéridos	Anexo XXVI	
		Marcadores: esteroles	No detectables	Anexo XIV	
		Otros marcadores:			
		— vainillina	No detectables	Anexo XII	
— éster etílico del ácido caroténico	No detectables	Anexo XIII			
— triglicéridos del ácido enántico	No detectables	UIQPA 2.301 sub 5			
Características organolépticas	Como mínimo 4 puntos de los 5 para A, S y C	Anexo VII			
Dispersión de agua	Como mínimo 4 puntos	Norma FIL 112A:1989			
Reglamento (CE) nº 2771/1999 Almacenamiento privado	Mantequilla no salada	Materia grasa láctea	Mín. 82 %	Anexo XI	Nota 6
		Agua	Máx. 16 %	Anexo IX	
Reglamento (CE) nº 2771/1999 Almacenamiento privado	Mantequilla salada	Materia grasa láctea	Mín. 80 %	Anexo XI	Nota 6
		Agua	Máx. 16 %	Anexo IX	
		Sal	Máx. 2 %	Norma FIL 12B:1988	

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
Reglamento (CE) n° 2571/97 (DO L 350 de 20.12.1997, p. 3)	Mantequilla no salada	Materia grasa láctea Agua Marcadores: — esteroles — vainillina — éster etílico del ácido caroténico — triglicéridos del ácido enántico	Mín. 82 % Máx. 16 %	Anexo XI Anexo IX Anexo XIV Anexo XII Anexo XIII UIQPA 2.301 sub 5	
Reglamento (CE) n° 2571/97	Mantequilla salada	Materia grasa láctea Agua: Sal Marcadores: — esteroles — vainillina — éster etílico del ácido caroténico — triglicéridos del ácido enántico	Mín. 80 % Máx. 16 % Máx. 2 %	Anexo XI Anexo IX Norma FIL 12B:1988 Anexo XIV Anexo XII Anexo XIII UIQPA 2.301 sub 5	
Reglamento (CE) n° 2571/97	Mantequilla concentrada	Materia grasa láctea Humedad y ESML AGL IP (máx.) Grasa de origen no lácteo Sabor Olor Otros Marcadores: — esteroles — vainillina — éster etílico del ácido caroténico — triglicéridos del ácido enántico	Mín. 99,8 % Máx. 0,2 % Máx. 0,35 % (oleico) Máximo 0,5 mequiv. oxígeno/ 1 000 g de materia grasa Ausencia Natural Ausencia de olores extraños Ausencia de sustancias neutrali- zantes, antioxidantes y conservantes	Norma FIL 24:1964 Norma FIL 23A:1988 (humedad) Norma FIL 24:1964 (ESML) Norma FIL 6B:1989 Norma FIL 74A:1991 (versión inglesa) Anexo XXV Anexo XIV Anexo XII Anexo XIII UIQPA 2.301 sub 5	Nota 1

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
Reglamento (CE) n° 2571/97	Nata	Materias grasas Marcadores: — esteroles — vainillina — éster etílico del ácido caroténico — triglicéridos del ácido enántico	35 %	Norma FIL 16C:1987 Métodos aprobados por las autoridades competentes Anexo XII Métodos aprobados por las autoridades competentes UIQPA 2.301 sub 5	Nota 2 Nota 2
Reglamento (CE) n° 429/90 (DO L 45 de 21.2.1999, p. 8)	Mantequilla concentrada	Materia grasa láctea e.s.m. Marcadores: — estigmasterol (95 %) — estigmasterol (85 %) — triglicéridos del ácido enántico — éster etílico del ácido butírico e estigmasterol — Lecitina (E 322) NaCl AGL IP (Máx.) Sabor Olor Otros	Mín. 96 % Máx. 2 % 15 g/100 kg de mantequilla concentrada 17 g/100 kg de mantequilla concentrada 1,1 kg/100 kg de mantequilla concentrada Véase la letra c) del punto 1 del anexo Máx. 0,5 % Máx. 0,75 % Máx. 0,35 % (oleico) Máximo 0,5 mequiv. oxígeno/1 000 g de materia grasa Natural	Métodos aprobados por las autoridades competentes Métodos aprobados por las autoridades competentes Anexo XIV Anexo XIV UIQPA 2.301 sub 5 Anexo XIV Método aprobado por las autoridades competentes (ácido butírico) Método aprobado por las autoridades competentes Norma FIL 12B:1988 Norma FIL 6B:1989 Norma FIL 74A:1991 (versión inglesa)	Nota 2 Nota 2 Nota 2 Nota 2 Nota 1
Reglamento (CEE) n° 2191/81 (DO L 213 de 1.8.1981, p. 20)	Mantequilla no salada	Materia grasa láctea Agua	Mín. 82 % Máx. 16 %	Anexo XI Anexo IX	

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
Reglamento (CEE) n° 2191/81	Mantequilla salada	Materia grasa láctea Agua Sal	Mín. 80 % Máx. 16 % Máx. 2 %	Anexo XI Anexo IX Norma FIL 12B:1988	
Artículo 9 y título II del Reglamento (CE) n° 1255/1999	Queso a base de leche de oveja y/o cabra	Leche de vaca	< 1 %	Anexo XV	
Reglamento (CEE) n° 2921/90	Anexo I — caseína ácida	Agua Materia grasa Acidez libre	Máx. 12,00 % Máx. 1,75 % Máx. 0,30 % (láctico)	Norma FIL 78C:1991 FIL 127A: 1988 Norma FIL 91:1979	
Reglamento (CEE) n° 2921/90	Anexo I — caseína de cuajo	Agua Materia grasa Cenizas	Máx. 12,00 % Máx. 1,00 % Mín. 7,50 %	Norma FIL 78C:1991 FIL 127A:1998 Norma FIL 90:1979	
Reglamento (CEE) n° 2921/90	Anexo I — caseinatos	Agua Proteínas lácteas Materia grasa y cenizas	Máx. 6,00 % Mín. 88,00 % Máx. 6,00 %	Norma FIL 78C:1991 Norma FIL 92:1979 FIL 127A:1988 Norma FIL 89:1979 o Norma FIL 90:1979	
Reglamento (CEE) n° 2921/90	Anexo II — caseína ácida	Agua Materia grasa Acidez libre RTB (máx.) Coliformes Term. (máx.)	Máx. 10,00 % Máx. 1,50 % Máx. 0,20 % (láctico) 30 000 /1g Ausencia/0,1 g 5 000 /1g	Norma FIL 78C:1991 FIL 127A:1988 Norma FIL 91:1979 Norma FIL 100B:1991 Anexo XVI Norma FIL 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Notas 3 y 4
Reglamento (CEE) n° 2921/90	Anexo II — caseína de cuajo	Agua Materia grasa Cenizas RTB (máx.) Coliformes Term. (máx.)	Máx. 8,00 % Máx. 1,00 % Mín. 7,50 % 30 000 /1g Ausencia/0,1 g 5 000 /1g	Norma FIL 78C:1991 FIL 127A:1988 Norma FIL 90:1979 Norma FIL 100B:1991 Anexo XVI Norma FIL 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Notas 3 y 4

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
Reglamento (CEE) n° 2921/90	Anexo II — caseinatos	Agua Proteínas lácteas Materia grasa y cenizas RTB (máx.) Coliformes Term. (máx.)	Máx. 6,00 % Mín. 88,00 % Máx. 6,00 % 30 000 H/1g Ausencia/0,1 g 5 000 l/g	Norma FIL 78C:1991 Norma FIL 92:1979 FIL 127A:1988 FIL 89:1979 o FIL 90:1979 Norma FIL 100B:1991 Anexo XVI Norma FIL 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Notas 3 y 4
Reglamento (CEE) n° 2921/90	Anexo III — caseinatos	Agua Proteínas lácteas Materia grasa Lactosa Cenizas RTB (máx.) Coliformes Term. (máx.)	Máx. 6,00 % Mín. 85,00 % Máx. 1,50 % Máx. 1,00 % Máx. 6,50 % 30 000 H/1g Ausencia/0,1 g 5 000 H/1g	Norma FIL 78C:1991 Norma FIL 92:1979 FIL 127A:1988 Norma FIL 106:1982 FIL 89:1979 o FIL 90:1979 Norma FIL 100B:1991 Anexo XVI Norma FIL 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Notas 3 y 4
Reglamento (CEE) n° 2799/1999 (DO L 340 31.12.1999, p. 3)	Piensos compuestos y leche desnatada en polvo (LDP) (destinada a la alimentación animal)	Agua (suero de mantequilla en polvo ácido) Proteínas Agua (LDP) Materias grasas (LDP) Suero de cuajo (LDP) Almidón (LDP) Agua (mezcla) Materias grasas (mezcla) Suero de cuajo (mezcla) Contenido de LDP (del producto final) Materia grasa (del producto final final) Almidón (del producto final) Cobre (del producto final)	Máx. 5 % 31,4 % (mín. del extracto seco magro) Máx. 5 % Máx. 11 % Ausencia Ausencia 5 % máx. del extracto seco magro — Ausencia Mín. 50 % Mín. 2,5 % ou 5 % Mín. 2 % 25 ppm	Norma FIL 20B:1993 Norma FIL 26A:1993 Norma FIL 9C:1987 Anexo XIX Anexo XXIII Norma FIL 26A:1993 Directiva 84/4/CEE de la Comisión (DO L 15 de 18.1.1984, p. 28) Anexo XIX Anexo XXII Directiva 84/4/CEE de la Comisión Anexo XXIII Decisión 78/633/CEE d la Comisión (DO L 206 de 26.7.1987, p. 43)	Nota 7 Nota 7 Nota 8 Nota 9

Reglamento de la Comisión	Producto	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
Reglamento (CE) n° 322/96 (DO L 45 de 23.2.1996, p. 5)	LDP (por atomización)	Materia grasa	Máx. 1,0 %	Norma FIL 9C:1987	
		Proteínas	31,4 % (mín. del extracto seco magro)	Norma FIL 20B:1993	
		Agua	Máx. 3,5 %	Norma FIL 26A:1993	
		Acidez (N/10 NaOH)	Máx. 19,5 ml	Norma FIL 86:1981	
		Lactatos	Máx. 150 mg/100 g	Norma FIL 69B:1987	
		Fosfato	Negativo	Norma ISO 3356:1975	
		Solubilidad	Máx. 0,5 ml a 24 °C	FIL 129A:1988	
		Partículas quemadas	Placa B Mín. (15,0 mg)	ADPI:1990	
		RTB	40 000/1 g	Norma FIL 100B:1991	Nota 3
		Coliformes	Negativo/0,1 g	Anexo XVI	Nota 3
		Leitelho	Negativo	Anexo XX	
		Suero de mantequilla	Negativo	Anexo XVIII	
		Suero de cuajo	Negativo	Métodos aprobados por las autoridades competentes	Nota 2
		Lactosuero ácido			
Agentes anitmicrobianos		Anexo XXI			

PARTE B

Los métodos de referencia recogidos en la parte B son aplicables al análisis de los productos cubiertos por cualquiera de los Reglamentos indicados en la primera columna.

Reglamento de la Comisión	Producto	Código NC	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
Reglamento (CEE) n° 2658/87 (DO L 256 de 7.9.1987, p. 1) Reglamento (CE) n° 2414/98 (DO L 299 de 10.11.1998, p. 7) Reglamento (CE) n° 1374/98 (DO L 185 de 30.6.1998, p. 21) Reglamento (CE) n° 2508/97 (DO L 345 de 16.12.1997, p. 31) Reglamento (CE) n° 174/99 (DO L 20 de 27.1.1999, p. 8)	Leche y nata sin concentrar, azucarar ni edulcorar de otro modo	0401	Materia grasa (\leq 6 %)	Los límites son los que se indican en la descripción del código NC del producto concreto y, en su caso, los que especifican el Reglamento (CEE) n° 3846/87 de la Comisión (DO L 366, 24.12.1987, p. 1) la parte 9 de la nomenclatura relativa a la exportación o el Reglamento (CE) n° 1374/1998 (DO L 185 de 30.6.1998, p. 21)	Norma FIL 1D:1996	
			Materia grasa ($>$ 6 %)		Norma FIL 16C:1987	

Reglamento de la Comisión	Producto	Código NC	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
	Leche y nata concentradas, o azucaradas o edulcoradas de otro modo	0402	Materia grasa (forma líquida) Materia grasa (forma sólida) Proteínas Sacarosa (contenido normal) Sacarosa (contenido bajo)		Norma FIL 13C:1987 Norma FIL 9C:1987 Norma FIL 20B:1983 Norma FIL 35A:1992	Nota 2
	Suero de mantequilla, leche y nata fermentados o acidificados, concentrados o sin concentrar, azucarados o edulcorados de otro modo	0403	Materia grasa Proteínas Sacarosa (contenido normal) Sacarosa (contenido bajo) Agua (suero de mantequilla ácido en polvo) Agua (suero de mantequilla dulce en polvo) Extracto seco (otros productos)		FIL 1D:1996, FIL 9C:1987 FIL 16C:1987, FIL 22B:1987 FIL 126A:1988 Norma FIL 20B:1993 Norma FIL 35A:1992 Métodos aprobados por las autoridades competentes Anexo XXIV Norma FIL 26A:1993	Nota 2
	Lactosuero concentrado o sin concentrar, o azucarado o edulcorado de otro modo; productos a base de ingredientes lácteos naturales	0404	Materia grasa Proteínas Sacarosa (contenido normal) Sacarosa (contenido bajo)		FIL 9C:1987, FIL 16C:1987, FIL 22B:1987 Norma FIL 20B:1993 Norma FIL 35A:1992	Nota 2
		0404 90	Proteínas Agua Extracto seco (productos concentrados)		Norma FIL 20B:1993 Norma FIL 26A:1993 Norma FIL 15B:1991 Norma FIL 21B:1987	
	Mantequilla y otras materias grasas derivadas de la leche: productos lácteos para untar	0405	Materia grasa (si ≤ 85 %) Agua e.s.m. NaCl		Anexo XI Anexo IX Anexo X Norma FIL 12B:1998	
		Mantequilla			Norma FIL 24:1964	
		Butteroil	Materia grasa (si > 99 %) Agua (si materia grasa < 99 %)		Norma FIL 23A:1988	

Reglamento de la Comisión	Producto	Código NC	Parámetro	Límite	Método de referencia	Nota
	Queso y requesón	0406	Materia grasa Extracto seco Extracto seco (Ricotta) NaCl Lactosa		Norma FIL 5B:1986 Norma FIL 4A:1982 Norma FIL 58:1970 Norma FIL 88A:1988 Norma FIL 79B:1991	
Reglamento (CEE) n° 2658/87	Piensos compuestos	2309	Lactosa		Anexo XVII	

Notas relativas a la lista de métodos de referencia de la Unión Europea.

Nota 1: aislamiento de la materia grasa láctea según se describe en la norma FIL 6B:1989 (protección de la luz).

Nota 2: no se ha establecido ningún método de referencia.

Nota 3: la preparación de la muestra debe efectuarse con arreglo a la norma FIL 122C:1996 o FIL 73A:1985.

Nota 4: incubación durante 48 horas a una temperatura de 55 °C; deben tomarse precauciones para evitar la desecación de los medios de cultivo.

Nota 5: % e.s.m. = % extraco seco – % materia grasa.

Nota 6: la mantequilla debe corresponder a la clase nacional de calidad del Estado de producción a que se refiere el anexo V del Reglamento (CE) n° 2771/99 de la Comisión.

Nota 7: Directiva (CEE) n° 4/84 de la Comisión.

Nota 8: Reglamento (CE) n° 1758/94 de la Comisión (DO L 183 de 19.7.1994, p. 14).

Nota 9: Directiva 78/633/CEE de la Comisión.

ANEXO II

(Artículo 3)

COMPROBACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR MEDIO DE MÉTODOS DE RUTINA, PRÓXIMOS A LOS LÍMITES RELATIVOS A LAS CARACTERÍSTICAS DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD ESTABLECIDOS EN LOS REGLAMENTOS

Si m_0 constituye un límite relativo a las características de composición y calidad establecidas en un Reglamento, el límite de decisión (L) será

$$L = m_0$$

si $R_{Rut}/R_{Ref} \leq 1$

R_{Rut} : límite de reproducibilidad del método de rutina;

R_{Ref} : límite de reproducibilidad del método de referencia.

Si m_0 constituye un límite superior y $R_{Rut}/R_{Ref} > 1$, el límite de decisión se obtendrá mediante la fórmula:

$$L = m_0 - [(R_{Rut}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

Si, en las mismas condiciones, m_0 constituye un límite inferior, el límite de decisión se obtendrá mediante:

$$L = m_0 + [(R_{Rut}/R_{Ref}) - 1] \cdot CrD_{95}$$

donde

CrD_{95} : es la diferencia crítica del método de referencia (véase el anexo IV).

En caso de que m_0 constituya un límite superior, el resultado final obtenido por medio de un método de rutina, superior al límite de decisión, deberá ser sustituido por el resultado final obtenido por medio del método de referencia. Este resultado final deberá basarse al menos en el mismo número de análisis y de muestras que el resultado final del método de rutina.

En caso de que m_0 constituya un límite inferior, deberá aplicarse el mismo procedimiento en caso de que el resultado final obtenido por medio de un método de rutina sea inferior al límite de decisión.

Nota

El procedimiento descrito anteriormente podrá aplicarse cuando no haya efectos matriciales detectables.

Estos efectos pueden detectarse del siguiente modo: para cada una de las muestras utilizadas para el calibrado, se calcula la diferencia (w) entre los resultados obtenidos mediante el método de referencia y mediante el método de rutina.

La desviación típica calculada por medio de la fórmula siguiente:

$$s = \sqrt{(\sum w_i^2)/2m}$$

m : número de muestras utilizadas para el calibrado

se compara con la media aritmética de la desviación típica de repetibilidad del método de referencia y del método de rutina:

$$s_r = \sqrt{(s_{r(Ref)}^2 + s_{r(Rut)}^2)/2}$$

No puede excluirse un efecto matricial si

$$m \bullet s^2/s_r^2 > Chi_{f;1-\alpha}^2$$

siendo

$f = m$ (f : número de grados de libertad)

$\alpha =$ probabilidad de error; $\alpha = 0,05$.

En tal caso, serán necesarias investigaciones posteriores para poder fijar un límite de decisión.

ANEXO III

(Artículos 4 y 5)

a) Procedimiento de determinación de la conformidad con un límite de reproducibilidad establecido (análisis químico)

La conformidad con el límite de reproducibilidad se comprobará comparando los resultados del laboratorio con los de un laboratorio experimentado ⁽¹⁾, obtenidos con una muestra idéntica. Se efectuará una doble determinación en ambos laboratorios y se evaluarán los resultados mediante la siguiente fórmula:

$$CrD_{95}(|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

siendo:

CrD₉₅: diferencia crítica (P = 0,95) \bar{y}_1 : media aritmética de dos resultados obtenidos en el laboratorio 1 \bar{y}_2 : media aritmética de dos resultados obtenidos en el laboratorio 2

R: límite de reproducibilidad: deberá establecerse mediante interpolación

r: límite de repetibilidad: en caso de que la precisión varíe en función de la concentración.

Si se rebasa la diferencia crítica, deberá realizarse otra experiencia en un plazo de dos meses. En caso de que los resultados de esta segunda experiencia no se ajusten al límite de reproducibilidad, las autoridades competentes deberán adoptar todas las medidas necesarias.

b) Procedimiento aplicable a la obtención de un límite de reproducibilidad provisional (análisis químico)

Se obtendrá un límite de reproducibilidad provisional (R_{prov}) por medio de la siguiente ecuación:

$$R_{prov} = \sqrt{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

siendo:

 \bar{y}_1 : media de los resultados obtenidos en el laboratorio 1 \bar{y}_2 : media de dos resultados obtenidos en el laboratorio 2 [véase la letra a) del anexo III]

r: límite de repetibilidad o límite de repetibilidad provisional.

Notas:

1. R_{prov} podrá utilizarse para calcular las diferencias críticas (véase el anexo VI).
2. R_{prov} se establecerá en 2r en caso de que el valor calculado para R_{prov} sea inferior a 2r.
3. En caso de que el valor calculado sea superior a 3r o a dos veces el valor de R obtenido mediante la ecuación de Horwitz (*), R_{prov} resultará demasiado elevado y no podrá utilizarse para el cálculo de la diferencia crítica.
4. R_{prov} deberá calcularse al menos una vez al año sobre la base de los resultados obtenidos en dos laboratorios (véase el anexo IV).
5. El valor medio de R_{prov} deberá utilizarse para el cálculo de la diferencia crítica. Las normas recogidas en los puntos 2 y 3 se aplicarán al valor medio de R_{prov}.

(*) Ecuación de Horwitz:

$$RSD_R(\%) = 2^{1-0,5 \log_{10} C}$$

siendo:

RSD_R: desviación típica de la reproducibilidad

c: concentración expresada como fracción decimal (por ejemplo: 10 g/100 g = 0,1).

Referencia:

Peeler, J.T., Horwitz, W. y Albert, R.:
J. Ass. Off. Anal. Chem.
72 (5), 784-806 (1989).

⁽¹⁾ En términos generales, el laboratorio experimentado deberá ser un laboratorio que haya participado con resultados satisfactorios bien en la validación del método de prueba, bien en una prueba de capacidad.

El límite de reproducibilidad (valor R) se obtendrá a partir del valor de RSD_R del siguiente modo:

$$R = 0,0283 \bar{x} RSD_R$$

(\bar{x} = media aritmética de los resultados obtenidos).

Exemplos de valores de RSD_R calculados:

Concentración	RSD_R (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

Para una concentración del analito de 1 g/100 g se obtiene:

$$R = 0,0283 \times 1 \times 4 = 0,11 \text{ g/100 g.}$$

ANEXO IV

(Artículo 4)

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ANÁLISIS OBTENIDOS DE ACUERDO CON MÉTODOS VALIDADOS

En caso de que el resultado de un análisis indique que se ha superado un determinado límite, se calculará la media aritmética de dos resultados o más. Se aplicará el procedimiento siguiente:

- 1) En caso de que el resultado del análisis consista en un resultado único, deberá procederse a un segundo análisis en condiciones de repetibilidad. En caso de que los dos análisis no puedan llevarse a cabo en esas condiciones, deberá procederse a un nuevo análisis por duplicado en condiciones de repetibilidad y utilizarse esos resultados para la evaluación de la conformidad con la diferencia crítica.
- 2) Se calculará el valor absoluto de la diferencia entre la media aritmética de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad y el límite. En caso de que el valor absoluto de esta diferencia resulte superior a la diferencia crítica, ello significa que la muestra analizada no se ajusta a los requisitos.

La diferencia crítica se calculará por medio de la siguiente fórmula:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

siendo

\bar{y} : media aritmética de los resultados obtenidos;

m_0 : límite;

n : número de análisis/muestra.

En caso de que la precisión varíe en función de la concentración, posiblemente sea necesario determinar r y R mediante interpolación.

Normalmente, el resultado final registrado para una muestra determinada deberá indicar que se ha respetado un determinado límite.

Por consiguiente, sólo en casos excepcionales deberían registrarse unos resultados finales

- comprendidos entre m_0 y $m_0 + CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, en caso de que el límite constituya un valor máximo,
- o comprendidos entre m_0 y $m_0 - CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|)$, en caso de que el límite constituya un valor mínimo.

Los resultados finales situados en los intervalos antes mencionados sólo serán aceptables si se producen como máximo una vez por cada cinco muestras analizadas por lote. En caso de analizarse menos de cinco muestras por lote, será aceptable un resultado situado en el intervalo mencionado. No obstante, si se trata de envíos que proceden repetidamente de un determinado productor, deberá aplicarse la norma según la cual se obtendrá un solo resultado dentro de los intervalos citados por cada cinco muestras analizadas.

- 3) En caso de que el resultado final x se calcule por medio de una fórmula de tipo $x = y_1 \pm y_2$ (por ejemplo: agua + contenido de extracto seco magro de la mantequilla para calcular el contenido de materia grasa), en la que y_1 e y_2 representan los resultados finales de un solo tipo de análisis, los límites generales de repetibilidad y reproducibilidad r_x y R_x de los resultados finales x se calcularán del siguiente modo:

$$r_x = \sqrt{r_1^2 + r_2^2}$$

$$R_x = \sqrt{R_1^2 + R_2^2}$$

representando r_1 y r_2 los límites de repetibilidad y R_1 y R_2 los límites de reproducibilidad de y_1 e y_2 , respectivamente.

x se comparará con el límite m_0 , de acuerdo con las normas especificadas en los puntos 1 y 2. La diferencia crítica se calculará mediante la fórmula siguiente:

$$CrD_{95}(|x - m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

representando x la media aritmética de los resultados x_1 obtenidos.

- 4) En caso de que el resultado final se calcule mediante una fórmula de tipo

$$x = \frac{y_1}{y_2}$$

(por ejemplo, contenido de grasa del extracto seco del queso)

representando y_1 e y_2 los resultados finales de un solo tipo de análisis, los límites generales de repetibilidad y reproducibilidad r_x y R_x se calcularán del siguiente modo:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{s1}^2 + r_{s2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{s1}^2 + R_{s2}^2}$$

$$\mu_x = \mu_1 | \mu_2$$

μ_1 : valor límite u objetivo para y_1 (por ejemplo, materia grasa);

μ_2 : valor límite u objetivo para y_2 (por ejemplo, extracto seco);

$$r_{s1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0.15 \qquad r_{s2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

siendo

r_1 : límite de repetibilidad y_1

r_2 : límite de repetibilidad y_2

$$R_{s1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0.15 \qquad R_{s2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

siendo

R_1 límite de reproducibilidad y_1

R_2 límite de reproducibilidad y_2

Los procedimientos de cálculo de r_x y R_x sólo serán aplicables si los límites relativos de repetibilidad y reproducibilidad (r_{s1}^* , r_{s2}^* , R_{s1}^* y R_{s2}^*) son inferiores o iguales a 0,15.

x se comparará con el límite μ_x de acuerdo con las normas establecidas en los puntos 1 y 2. La diferencia crítica se calculará por medio de la fórmula siguiente:

$$CrD_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

en la que \bar{x} representa la media aritmética de los resultados x obtenidos por orden cronológico (*).

(*) Nota: Por ejemplo, si se obtienen los resultados y_{11} , y_{12} , y_{21} e y_{22} , deberá calcularse la media aritmética de y_{11}/y_{21} e y_{12}/y_{22} .

ANEXO V
CONTROL INTERNO

(Artículo 5)

a) Método de control interno de calidad (CIC) (análisis químico)

Definición del material de control

El material utilizado a efectos del CIC se someterá al mismo procedimiento, o parte del mismo procedimiento, que el que se aplica a los materiales sometidos a prueba.

El material de control podrá ser, por ejemplo:

- un material de referencia certificado,
- un material de referencia interno,
- un material aprobado mediante pruebas interlaboratorios,
- un material enriquecido.

Procedimiento que deberá aplicarse para establecer el CIC

El laboratorio deberá establecer el CIC de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento de la UIQPA titulado «Directrices Armonizadas Relativas al Control Interno de Calidad en los Laboratorios de Análisis»⁽¹⁾.

El CIC deberá realizarse mediante la inclusión de materiales de control en la secuencia analítica o mediante la replicación del análisis de la muestra problema. El material de control deberá ser similar a las muestras sometidas a prueba desde el punto de vista de la composición química y poseer una estabilidad adecuada a lo largo del período en cuestión. Deberá demostrarse que puede dividirse de forma adecuada en porciones idénticas para su análisis y que presenta una concentración del analito apropiada para la zona de interés.

Al menos una vez en cada serie de análisis, deberá insertarse material de control y el valor obtenido deberá señalarse en un gráfico de control con el fin de medir los errores a largo plazo. Además, el laboratorio deberá demostrar periódicamente que cumple las condiciones de repetibilidad durante la serie de análisis, lo cual podrá efectuarse mediante la repetición del análisis de los materiales de control o de los materiales que vayan a someterse a prueba. Los resultados de estos análisis deberán compararse con los límites de repetibilidad publicados y con los datos ya existentes relativos a la precisión interna.

En caso de que se utilicen materiales de control, los valores obtenidos para el análisis del material de control entre una serie y otra se indicarán en un gráfico de Shewhart [ISO 8258 (1991)] con límites adecuados de control. Los límites de actuación se establecerán en:

$$x \pm 3s_t$$

representando s_t la desviación típica total,

y los límites de aviso en:

$$x \pm 2s_t$$

Desviación típica total:

$$s_t = \sqrt{s_b^2 + s_w^2/n}$$

siendo

- s_b : desviación típica entre series
- s_w : desviación típica dentro de una serie
- n : número de determinaciones.

En los casos en los que no se utilicen materiales de control (por ejemplo, por falta de estabilidad), al menos uno de los materiales sometidos a prueba deberá analizarse por duplicado en cada serie.

Se indicarán en un gráfico las diferencias absolutas obtenidas a partir de los análisis por duplicado efectuados dentro de una serie (véase el anexo III). La línea central representa $1,128 s_w$, el límite inferior es igual a 0 y el límite superior (límite de actuación) es de $3,686 s_w$, representando s_w la desviación típica dentro de la serie.

El procedimiento de control deberá incluir materiales de niveles alto y bajo cuando exista una amplia gama de concentraciones.

⁽¹⁾ M Thompson and R. Wood: «Pure and Applied Chemistry» 67 (4), 649-666 (1995).

En caso de que los materiales sometidos a prueba cubran una amplia gama de concentraciones de analito, el laboratorio deberá establecer la relación entre precisión y nivel de concentración. En caso de que la precisión sea proporcional al nivel de concentración, el control siguiente deberá efectuarse sobre la base de la precisión relativa (es decir, la diferencia absoluta expresada en porcentaje del valor medio).

El sistema analítico deja de ser fiable en caso de darse una de las situaciones siguientes:

- A. el valor actual de la representación gráfica se sitúa fuera de los límites de actuación;
- B. el valor actual y el valor anterior se sitúan fuera de los límites de aviso, aunque dentro de los límites de actuación;
- C. en caso de utilizarse materiales de control, nueve valores sucesivos caen a un mismo lado de la línea mediana.

En estas situaciones, el laboratorio deberá:

- A. suspender el análisis en espera de los resultados de las pruebas de diagnóstico y de las medidas destinadas a paliar la situación y
- B. rechazar la serie de resultados y hacer un nuevo análisis de los materiales sometidos a prueba.

b) Procedimiento de selección del material de control interno y de determinación de los límites internos de precisión (análisis químico)

Los datos relativos a la precisión interna de las pruebas de laboratorio podrán obtenerse mediante la replicación de los análisis de materiales de control o de los análisis de las muestras que vayan a someterse a prueba.

El siguiente enfoque podrá ser aplicado por los laboratorios como línea directriz para la determinación de los parámetros de precisión relativos a las variaciones dentro de una misma serie y entre distintas series y utilizarlos posteriormente para la elaboración de gráficos de control. Los laboratorios podrán utilizar procedimientos alternativos siempre que puedan demostrar de forma fehaciente que han obtenido datos fidedignos en materia de precisión.

1. Selección de los materiales de control

En caso de que resulte oportuno que el laboratorio utilice un material de control determinado, ante todo deberán recopilarse datos con el fin de establecer límites. Si es posible, deberán utilizarse materiales de referencia certificados (MRC). Los materiales de control propuestos deberán ser analizados en condiciones de repetibilidad dentro de una misma serie que incluya unos MRC adecuados y ser objeto de repetición y de pruebas al azar. En caso de que no sea posible aplicar este enfoque, los laboratorios deberán intentar participar en pruebas de capacidad y establecer medios consensuados (valores asignados) que puedan considerarse como un auténtico medio convencional al que se le pueda atribuir una incertidumbre significativa. Otros procedimientos consisten en asignar un valor real mediante la formulación o utilización de materiales de control a los que se haya añadido un marcador.

Además, en caso de que el laboratorio efectúe regularmente este tipo de análisis y haya establecido ya un control estadístico, todo material nuevo de control (por ejemplo, en caso de agotamiento de las existencias) deberá obtenerse mediante referencia a los análisis en relación con los cuales esté en marcha un control con materiales existentes.

2. Determinación de límites

Después de seleccionar un material de control, el laboratorio deberá establecer valores relativos a la precisión dentro de una misma serie y entre distintas series por medio de este material.

Como requisito mínimo para la determinación de la precisión dentro de una misma serie, el material de control deberá ser analizado por duplicado en doce ocasiones. Los análisis por duplicado deberán llevarse a cabo en condiciones de repetibilidad, es decir que deberá efectuarse el mismo análisis, con los mismos reactivos, etc. El análisis por duplicado del material de control deberá efectuarse al azar dentro de una serie de análisis. Cada análisis por duplicado deberá efectuarse un día distinto a lo largo de un determinado período con el fin de reflejar una variación razonable entre las distintas series, habida cuenta de las variaciones normales relativas, por ejemplo, a los reactivos, a la recalibración de los instrumentos y, en su caso, a distintos analistas.

Nota: Cabe subrayar que la utilización de datos que no sean plenamente representativos de las variaciones entre distintas series puede dar lugar a una repetición innecesaria de los análisis debido a la determinación de límites demasiado estrechos. Al contrario, en caso de que un laboratorio presente datos relativos a la precisión demasiado imprecisos, es posible que no esté en condiciones de respetar los límites establecidos en los métodos de referencia, obteniendo probablemente resultados menos satisfactorios que otros laboratorios comparables y, además, posiblemente no consiga facilitar los datos adecuados al objetivo establecido.

2.1. Determinación de la precisión dentro de una misma serie

2.1.1. Precisión dentro de una misma serie en caso de estar disponible el material de control

Los datos duplicados (al menos 12 duplicados) deberán someterse en primer lugar a la prueba de varianza máxima de Cochran, lo que supone la comparación del cuadrado del valor máximo de la gama de duplicados con la suma del valor de las gamas al cuadrado.

$$c = \frac{d^2 \max}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

en la que

$d_i =$ diferencia entre duplicados.

El valor del criterio de Cochran, es decir C , se comparará con los valores recogidos en los cuadros [ISO 5725 (1994)]. En caso de que un valor pueda clasificarse como sospechoso o errático, el resultado deberá analizarse a fin de encontrar una explicación, como por ejemplo, error técnico o informático, error en la realización de la prueba o análisis de una muestra inadecuada. En caso de que la explicación del error técnico sea tal que resulte imposible sustituir el resultado dudoso, éste deberá descartarse como auténtico valor errático. En caso de que subsistan valores sospechosos o erráticos que no puedan ser explicados, los valores sospechosos se conservarán como correctos y los valores estadísticos erráticos se descartarán. El laboratorio deberá intentar obtener valores substitutivos.

Cuando el laboratorio tenga garantías de que los datos ya no contienen valores erráticos, la desviación típica dentro de una serie s_w se obtendrá del siguiente modo:

para cada par x_{i1} , x_{i2} de los datos p por duplicado, se calculará la suma de los duplicados

$$s_i = x_{i1} + x_{i2}$$

y la diferencia de los duplicados

$$d_i = x_{i2} - x_{i1}$$

y se suman para dar:

$$A = \sum_{i=1}^p s_i$$

$$B = \sum_{i=1}^p d_i^2$$

$$C = \sum_{i=1}^p s_i^2$$

El cálculo de la desviación típica dentro de una misma serie es el siguiente:

$$s_w = \sqrt{\frac{B}{2p}}$$

El límite de precisión interna es igual a $2,8 s_w$.

En caso de utilizarse un método de referencia, el límite interno de precisión deberá compararse con el límite de repetibilidad publicado. El laboratorio deberá ajustarse a los requisitos establecidos en el método de referencia; de lo contrario, deberá procederse a la correspondiente investigación.

Los límites fijados deberán considerarse provisionales y sujetos a revisión.

2.1.2. Precisión dentro de una misma serie en caso de no estar disponible un material de control

El laboratorio podrá optar por establecer la precisión dentro de una misma serie mediante el análisis por duplicado de muestras representativas (con un mínimo de 12 análisis por duplicado). En caso de que no sea posible utilizar materiales de control, por ejemplo debido a su inestabilidad, deberán recogerse datos por duplicado con este método.

Nota: Se supone que los análisis cubren una gama de valores relativamente estrecha y que, por lo tanto, puede aplicarse un valor único a todas las muestras. En caso de que la serie de resultados sea más amplia, superando por ejemplo un orden de magnitud, y la precisión dependa del nivel de concentración, los laboratorios deberán procurar utilizar desviaciones típicas relativas.

Los datos deberán someterse a la prueba de Cochran, al igual que en el punto 2.1.1. Cuando el laboratorio haya establecido que los datos no contienen valores erráticos podrán calcularse la desviación típica dentro de una misma serie y el límite interno de precisión, tal como indica el punto 2.1.1.

La desviación típica dentro de una serie s_w podrá utilizarse para la elaboración de gráficos de control (véase el anexo II). Los límites establecidos deberán considerarse provisionales y sujetos a revisión.

2.2. Determinación de la precisión entre distintas series

Deberá calcularse el valor medio ($s_1/2$) para cada par y someterse dichos valores a la prueba de Grubbs [ISO 5725 (1994)]. Los criterios de rechazo o aceptación de los valores erráticos o sospechosos serán los descritos en el punto 2.1.1. El laboratorio deberá intentar obtener un valor de sustitución para cada uno de los resultados descartados. Una vez que el laboratorio se haya cerciorado de que los datos no contienen valores erráticos, se calculará la desviación típica s_b entre distintas series.

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{4(p-1)} \left(C - \frac{p-1}{p} B - \frac{A^2}{p} \right)}$$

o se supone igual a 0 en caso de que la indicación debajo del signo de la raíz cuadrada sea negativa.

La desviación típica total s_t se utilizará para la elaboración de gráficos de control para la media de n determinaciones (véase el anexo II). Los límites establecidos deberán considerarse provisionales y sujetos a revisión.

3. Revisión de los límites iniciales

Los límites de control establecidos de la forma antes descrita deberán considerarse como cálculos preliminares.

A fin de actualizar los límites establecidos sobre la base de una precisión aceptable dentro de una misma serie (punto 2.1.2), deberán recogerse datos suplementarios por duplicado, relativos a las muestras sometidas a prueba. La frecuencia de la revisión de datos dependerá de la frecuencia de los análisis. A título indicativo, los datos se revisarán después de obtenerse diez valores suplementarios por duplicado. A continuación se someterán todos los datos a la prueba de Cochran y se volverán a establecer los límites sobre la base del nuevo valor de la desviación típica. Las decisiones posteriores relativas a la validez de los límites de control se adoptarán sobre la base de los datos suplementarios.

La revisión de los datos iniciales obtenidos para la precisión dentro de una misma serie dependerá también de la frecuencia del análisis. A título indicativo, los valores inicialmente establecidos, relativos a la desviación típica y a la media, deberán revisarse después de obtenerse otros diez datos a partir del análisis del material de control, con una frecuencia de un análisis por lote.

Todos los datos deberán someterse a la prueba de Grubbs a fin de detectar los valores extremos erráticos. La media y la desviación típica se calcularán otra vez sobre la base de los nuevos datos.

Además, en esta fase el laboratorio deberá utilizar un gráfico Cusum [BS 5700: (1984) y modificación 5480 (1987)], con el fin de analizar todos los problemas que puedan plantearse como, por ejemplo, en relación con el envejecimiento de los reactivos. Deberá analizarse cualquier resultado al margen de los límites de la «máscara V» del citado gráfico.

Los nuevos límites (desviación media y desviación típica) deberán someterse a controles periódicos por medio de la técnica Cusum. Deberá examinarse detenidamente cualquier posible duda acerca de la validez del material de control.

4. Comunicación de los datos relativos a la precisión

El laboratorio deberá facilitar a las autoridades nacionales competentes los datos siguientes:

- método utilizado,
- desviación típica dentro de una serie s_w y límite interno de precisión,
- desviación típica entre distintas series s_b ,
- desviación típica total s_t ,
- número de análisis necesarios para la obtención de los datos relativos a la precisión.

ANEXO VI

(Artículo 6)

EVALUACIÓN DE LOS EVALUADORES Y FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ORGANO-LÉPTICOS

Los procedimientos que se exponen a continuación serán aplicables en caso de utilizarse métodos de puntuación (norma FIL 99C/1997).

a) *Determinación del índice de repetibilidad*

Un evaluador deberá analizar como duplicados ciegos un mínimo de diez muestras a lo largo de un período de doce meses, habitualmente en distintas sesiones. Los resultados de las características de los distintos productos se evaluarán por medio de la fórmula siguiente:

$$w_i = 1 + \frac{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2}{n}$$

siendo

w_i : índice de repetibilidad;

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

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

n : número de muestras.

Las muestras sometidas a evaluación deberán reflejar una amplia gama de calidades. w_i no deberá sobrepasar 1,5 (escala de 5 puntos).

b) *Determinación del «índice de desviación»*

Este índice deberá utilizarse para controlar si un evaluador determinado utiliza la misma escala de evaluación cualitativa que un grupo experimentado de evaluadores. Las puntuaciones obtenidas por el evaluador se compararán con la media de las puntuaciones obtenidas por el grupo.

Se utilizará la siguiente fórmula para la evaluación de los resultados:

$$D_i = 1 + \frac{\sum [(x_{i1} - \bar{x}_{i1})^2 + (x_{i2} - \bar{x}_{i2})^2]}{2n}$$

siendo

x_{i1} ; x_{i2} : véase la letra a);

\bar{x}_{i1} ; \bar{x}_{i2} : puntuación media del grupo de evaluadores para la primera y la segunda evaluación de la muestra x_i , respectivamente;

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

Las muestras que vayan a evaluarse deberán reflejar una amplia gama de calidades. D_i no deberá superar 1,5 (escala de 5 puntos).

Los Estados miembros deberán indicar las posibles dificultades que plantee la aplicación de este procedimiento.

c) *Comparación de los resultados obtenidos en distintas regiones de un Estado miembro y en distintos Estados miembros*

Deberá organizarse al menos una vez al año, cuando corresponda, una prueba que permita comparar los resultados obtenidos por evaluadores de distintas regiones. En caso de que se detecten diferencias notables, deberán adoptarse las medidas necesarias con el fin de determinar el motivo y conseguir resultados comparables.

Los Estados miembros podrán organizar pruebas que permitan la comparación de los resultados obtenidos por sus propios evaluadores y por los evaluadores de Estados miembros vecinos. En caso de detectarse diferencias notables, deberá procederse a un estudio detenido con el fin de conseguir resultados comparables.

Los Estados miembros deberán notificar a la Comisión los resultados de estas comparaciones.

ANEXO VII

(Artículo 6)

EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LA MANTEQUILLA**1. Ámbito**

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

2. Definiciones

Se entenderá por:

Evaluación organoléptica: el examen de los atributos de un producto mediante los órganos sensoriales.

Comisión: un grupo de catadores seleccionados que trabajen durante la prueba sin comunicarse entre sí y sin influirse mutuamente.

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

Clasificación: una clasificación cualitativa realizada a partir de la puntuación obtenida.

Documentos de control: los documentos utilizados para registrar las puntuaciones obtenidas respecto a cada atributo y la clasificación final del producto. (Este documento puede utilizarse también para registrar la composición química).

3. Sala de prueba

- 3.1. Deben tomarse precauciones a fin de que los catadores situados en la sala de prueba no se vean influidos por factores externos.
- 3.2. La sala de prueba debe estar libre de olores extraños y ser de fácil limpieza. Las paredes deben ser de color claro.
- 3.3. La sala de prueba y su iluminación deben ser tales que no se vean afectadas las propiedades de los productos examinados. La sala debe estar provista de un control adecuado de la temperatura.

4. Selección de los catadores

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

5. Requisitos de la comisión

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

Deberán tenerse en cuenta varios factores antes de la evaluación, con el fin de obtener resultados óptimos por parte de los integrantes del panel,

- éstos no deberán padecer ninguna enfermedad que pueda afectar a los resultados. En caso de darse tal circunstancia, será conveniente integrar a otra persona en el panel,
- los integrantes del panel deberán llegar puntualmente a la evaluación y asegurarse de que disponen de tiempo suficiente para efectuar dicha evaluación.
- deberán abstenerse de utilizar productos muy odoríferos tales como perfumes, lociones para después del afeitado y desodorantes, y de ingerir alimentos fuertemente aromatizados (picantes), etc,
- tampoco podrán fumar, comer ni beber, excepto agua, durante la media hora anterior a la evaluación.

6. Evaluación de cada atributo

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

El *aspecto* implica los siguientes caracteres: color, pureza visible, crecimiento de mohos y dispersión de agua. La dispersión de agua se evalúa de acuerdo con la Norma FIL 112A/1989.

La *consistencia* implica los siguientes caracteres: firmeza y untabilidad.

Pueden aplicarse métodos físicos para la evaluación de la consistencia de la mantequilla. La Comisión prevé armonizar estos métodos en el futuro.

El *aroma* supone los siguientes caracteres: sabor y olor.

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

- 6.2. Cada atributo debe evaluarse organolépticamente por separado. Debe darse una puntuación con arreglo al cuadro 1.
- 6.3. Puede ser conveniente que los catadores puntúen conjuntamente, antes de iniciar la evaluación, una o más muestras de referencia en cuanto a su aspecto, consistencia y aroma, a fin de aplicar criterios uniformes.
- 6.4. La puntuación para la aceptación es de la forma siguiente:

	Máximo	Necesario
Aspecto	5	4
Consistencia	5	4
Aroma	5	4

Cuando no se obtenga la puntuación necesaria, deberá describirse el defecto. La puntuación dada por cada evaluador para cada atributo debe registrarse en el documento de control. El producto se acepta o rechaza a partir de una decisión de la mayoría. No deben darse frecuentemente (no más de una vez cada 20 muestras) casos en que las diferencias entre la puntuación individual de cada atributo sea mayor que la distancia entre puntos adyacentes. En caso contrario, el presidente de la comisión deberá comprobar la competencia de dicha comisión.

7. Supervisión

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

8. Toma y preparación de las muestras

- 8.1. — Es conveniente que se oculte la identidad de las muestras durante la evaluación, para evitar cualquier posible desviación.
 - Este aspecto debe ser organizado por el presidente de la comisión antes de la evaluación y sin que estén presentes los otros miembros de la comisión.
- 8.2. Cuando la evaluación organoléptica se realice en el almacén frigorífico, se tomará la muestra utilizando una sonda para mantequilla. Si la evaluación organoléptica se realiza en un lugar distinto del almacén frigorífico, se tomará como mínimo una muestra de 500 g.
- 8.3. Durante la evaluación, la mantequilla deberá estar a la temperatura de 10 o 12 °C. Deberán evitarse a toda costa las desviaciones importantes de esta temperatura.

9. Nomenclatura

Véase el cuadro 2 adjunto.

Cuadro 1: puntuación de la mantequilla

Aspecto			Consistencia			Aroma		
Puntos	Nº (¹)	Observaciones	Puntos (clase de calidad)	Nº (¹)	Observaciones	Puntos (clase de calidad)	Nº (¹)	Observaciones
5		Muy bueno tipo ideal calidad superior (uniforme, seco)	5		Muy bueno tipo ideal calidad superior (buena untabilidad)	5		Muy bueno tipo ideal calidad superior (aroma fino absolutamente puro)
4		Buena (²) (sin defectos evidentes)	4	17 18	Buena (²) Dura Blanda	4		Buena (²) (sin defectos evidentes)
3	1 2 3 4 5 6 7 8	Corriente (defectos leves) Humedad libre No uniforme, bicolor Entreverado Veteado, jaspeado Manchado Separación de aceite Exceso de color Textura porosa	3	14 15 16 17 18	Corriente (defectos leves) Corta, frágil, grumosa Pastosa, grasienta Untuosa Dura Blanda	3	21 22 25 27 33 34 35	Corriente (defectos leves) Impuro Aroma extraño Ácido Aroma de cocido, aroma de quemado Aroma de pienso Acre, amargo Demasiado salado
2	1 3 4 5 6 10 11 12	Pobre (defectos evidentes) Humedad libre Entreverado Veteado, jaspeado Manchado Separación de aceite Materia extraña Enmohecido Sal sin disolver	2	14 15 16 17 18	Pobre (defectos evidentes) Corta, frágil, grumosa Pastosa, grasienta Untuosa Dura Blanda	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	Pobre (defectos evidentes) Impuro Aroma extraño Aroma a viejo Ácido Aroma de óxido, aroma metálico Aroma de pienso Acre, amargo Demasiado salado Mohoso, soso, corrompido Aroma químico
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	Muy pobre (defectos importantes) Humedad libre Entreverado Veteado, jaspeado Manchado Separación de aceite Demasiado color Granuloso Materia extraña Enmohecido Sal sin disolver	1	14 15 16 17 18	Muy pobre (defectos importantes) Corta, frágil, grumosa Pastosa, grasienta Untuosa Dura Blanda	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	Muy pobre (defectos importantes) Aroma extraño Caseoso, aroma a queso ácido Ácido Aroma de levadura Aroma de moho Rancio Aceitoso, aroma de pescado Aroma de sebo Aroma de óxido, aroma metálico Acre, amargo Mohoso, soso, corrompido Aroma de malta Aroma químico

(¹) Cuadro 2.

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

Cuadro 2: nomenclatura de defectos de la mantequillaI. *Aspecto*

1. Humedad libre
2. No uniforme, bicolor
3. Entreverado
4. Veteado, jaspeado
5. Manchado
6. Separación de aceite
7. Exceso de color
8. Textura porosa
9. Granuloso
10. Materia extraña
11. Enmohecido
12. Sal sin disolver

II. *Consistencia*

14. Corta, frágil, grumosa
15. Pastosa, grasienta
16. Untuosa
17. Dura
18. Blanda

III. *Aroma*

20. Sin aroma
21. Impuro ⁽¹⁾
22. Aroma extraño
23. Aroma a viejo
24. Caseoso, aroma a queso ácido
25. Ácido
26. Aroma de levadura
27. a) Aroma de cocido
b) Aroma de quemado
28. Aroma de moho
29. Rancio
30. Aceitoso, aroma de pescado
31. Aroma de sebo
32. a) Aroma de óxido
b) Aroma metálico
33. Aroma de pienso
34. Acre, amargo
35. Demasiado salado
36. Mohoso, soso, corrompido
37. Aroma de malta
38. Aroma químico.

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

ANEXO VIII

(Artículo 7)

PROCEDIMIENTO APLICABLE EN CASO DE IMPUGNACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS (ANÁLISIS QUÍMICO)

1. Podrá procederse a un nuevo análisis a petición del agente económico en los siete días hábiles siguientes a la comunicación de los resultados del primer análisis, siempre que los organismos competentes dispongan de muestras precintadas del producto, tomadas por duplicado y almacenadas adecuadamente.
2. El organismo competente enviará dichas muestras a un segundo laboratorio, a petición del agente económico y por cuenta de éste. Dicho laboratorio deberá estar autorizado para llevar a cabo análisis oficiales y su cualificación en los análisis en cuestión estará demostrada. Dicha cualificación deberá basarse en la participación en estudios de colaboración, con resultados satisfactorios, pruebas de capacidad o comparaciones entre distintos laboratorios. El segundo laboratorio deberá utilizar el método de referencia. Los resultados obtenidos por ambos laboratorios se evaluarán del siguiente modo:

a) *En caso de que ambos laboratorios se ajusten al requisito de repetibilidad y al de reproducibilidad*

Se registrará como resultado final la media aritmética de los resultados de las pruebas, obtenidos por ambos laboratorios. Dicho resultado final será evaluado sobre la base de la diferencia crítica, por medio de la siguiente fórmula:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

siendo

\bar{y} : media aritmética de todos los resultados obtenidos por ambos laboratorios

m_0 : límite

R: reproducibilidad

r: repetibilidad

n_1 : número de resultados obtenidos por el laboratorio 1

n_2 : número de resultados obtenidos por el laboratorio 2.

* En caso de que el resultado final se calcule por medio de la fórmula

$$x = y_1 \pm y_2 \text{ o } x = y_1/y_2$$

(véanse los puntos 3 y 4 del anexo IV respectivamente), R_x^2 y r_x^2 deberán sustituir a R^2 y r^2 en la fórmula.

b) *En caso de que ambos laboratorios se ajusten al requisito de repetibilidad, aunque no al de reproducibilidad*

En caso de que el segundo análisis confirme el primero, la cantidad sometida a análisis será rechazada por considerarse no conforme. En caso contrario, la cantidad será aceptada.

c) *En caso de que sólo uno de los laboratorios se ajuste al requisito de repetibilidad*

La decisión relativa a la admisibilidad de la cantidad sometida a análisis se basará en el resultado final del laboratorio que se ajuste al requisito de repetibilidad.

d) *En caso de que ninguno de los laboratorios se ajuste al requisito de repetibilidad, aunque sí el de reproducibilidad*

Será aplicable la letra a).

e) *En caso de que ninguno de los dos laboratorios se ajuste al requisito de repetibilidad, ni al de reproducibilidad*

La cantidad sometida a análisis se admitirá si los resultados obtenidos por uno de los laboratorios llevan a esa conclusión.

f) *En caso de que los resultados se hayan obtenido mediante métodos no validados*

La cantidad sometida a análisis se admitirá si los resultados obtenidos por uno de los laboratorios llevan a esa conclusión.

3. Las autoridades competentes notificarán al agente económico los resultados del segundo análisis con la mayor brevedad. El agente económico deberá sufragar los gastos del segundo análisis en caso de que la cantidad sometida a análisis quede rechazada.
4. En caso de que el agente económico presente la prueba de que el procedimiento de muestreo no es correcto, deberá procederse, si es posible, a un nuevo muestreo, en los cinco días hábiles siguientes al muestreo. Si no es posible un nuevo muestreo, se admitirá la cantidad sometida a análisis.

ANEXO IX

(Artículo 8)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA DE LA MANTEQUILLA**1. Objetivo y ámbito de aplicación**

El presente método de referencia especifica un método para la determinación del contenido de agua de la mantequilla.

2. Referencia

Norma IDF Standard 50 C: 1995. «Leche y productos lácteos». Métodos de muestreo.

3. Definición

Contenido de agua de la mantequilla: pérdida de masa tras la realización del proceso de calentamiento especificado en la presente norma. Se expresa en gramos por 100 gramos.

4. Principio

Evaporación del agua de una porción de la muestra en presencia de piedra pómez a la temperatura de 102 °C en una estufa de secado.

5. Materiales y equipo

Equipo normal de laboratorio y, en particular:

- 5.1. Balanza analítica, de 1 mg de sensibilidad.
- 5.2. Desecador provisto de un deshidratante eficaz (por ejemplo, gel de sílice recién deshidratado con indicador higroscópico).
- 5.3. Estufa de secado, ventilada, termostática, que se mantenga a 102 ± 2 °C en todo el espacio de trabajo.
- 5.4. Cápsulas de vidrio, porcelana o metal no corrosivo, de unos 20 mm de altura y 60 a 80 mm de diámetro.
- 5.5. Piedra pómez, granulada y lavada, con diámetro de 0,8–10 mm.

6. Muestreo

Véase la norma IDF 50 C: 1995

7. Procedimiento**7.1. Preparación de la muestra problema**

Calentar la muestra de laboratorio en el recipiente cerrado de vidrio o de plástico adecuado, que debe estar lleno hasta la mitad o los dos tercios, hasta una temperatura a la cual la muestra esté bastante blanda como para conseguir su homogeneización total (con un agitador mecánico o a mano). Normalmente, la temperatura de homogeneización no debe superar los 35 °C. Enfriar la muestra hasta temperatura ambiente. Lo antes posible tras el enfriamiento, abrir el recipiente de la muestra y agitar brevemente (durante no más de 10 s) con un instrumento adecuado, como puede ser una cuchara o una espátula, antes de pesar.

7.2. Determinación del contenido de agua

7.2.1. Poner unos 10 g de piedra pómez en la cápsula (5.4).

7.2.2. Secar la cápsula con la piedra pómez en la estufa (5.3) a 102 ± 2 °C durante al menos 1 h.

Nota: los períodos de secado mencionados en 7.2.2, 7.2.5 y 7.2.7 empiezan a partir del momento en que la temperatura de la estufa alcanza los 102 ± 2 °C.

7.2.3. Dejar enfriar la cápsula en el desecador (5.2) hasta alcanzar la temperatura de la sala de balanzas y pesar con precisión de 1 mg.

- 7.2.4. Poner en la cápsula, pesando con precisión de 1 mg, una porción de unos 5 g de la muestra problema.
- 7.2.5. Poner la cápsula en la estufa a 102 ± 2 °C y dejarla allí durante 3 h.
- 7.2.6. Dejar enfriar la cápsula en el desecador hasta alcanzar la temperatura de la sala de balanzas y pesar con precisión de 1 mg.
- 7.2.7. Repetir el proceso de secado durante períodos adicionales de 1 h, dejando enfriar y pesando cada vez según se indica en 7.2.6 hasta llegar a masa constante (cuando el cambio de masa no supere 1 mg).

En caso de que haya aumento de masa, tomar para los cálculos la masa más baja que se haya encontrado.

8. Expresión de los resultados

8.1. Método de cálculo y fórmula

Calcular el contenido de agua, W, como porcentaje en masa utilizando la fórmula siguiente:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

donde

m_0 es la masa en gramos de la cápsula con la piedra pómez (7.2.3)

m_1 es la masa en gramos de la porción de muestra, cápsula y piedra pómez antes del secado (7.2.4)

m_2 es la masa en gramos de la porción de muestra, cápsula y piedra pómez después del secado (7.2.7)

El resultado se redondea a una cifra decimal.

8.2. Repetibilidad

La diferencia absoluta entre los resultados de dos determinaciones simples, realizadas simultáneamente o en rápida sucesión por el mismo operario en las mismas condiciones con un material problema idéntico, no superará el 0,2 %.

8.3. Repetibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados simples e independientes, obtenidos por dos operarios en laboratorios diferentes con un material problema idéntico, no superará el 0,3 %.

9. Informe de la prueba

El informe de la prueba debe especificar el método utilizado y los resultados obtenidos. Debe mencionar asimismo todos los datos del procedimiento que no se especifiquen en esta norma internacional o se consideren optativos, junto con los datos de cualquier incidente que pueda haber influido en los resultados. El informe de la prueba debe incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

ANEXO X

(Artículo 8)

DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO MAGRO DE LA MANTEQUILLA

1. Objetivo y ámbito de aplicación

La presente norma especifica un método para la determinación del extracto seco magro de la mantequilla.

2. Referencia

Norma IDF Standard 50 C: 1995. «Leche y productos lácteos». Métodos de muestreo.

3. Definición

Extracto seco magro de la mantequilla: porcentaje en masa de las sustancias determinadas por el procedimiento especificado. Se expresa en gramos por 100 gramos.

4. Principio

Evaporación del agua de una masa conocida de mantequilla, extracción de la materia grasa con éter de petróleo y pesada del residuo.

5. Reactivo

Éter de petróleo con un intervalo de ebullición entre 30 y 60 °C. El reactivo no debe dejar más de 1 mg de residuo tras la evaporación de 100 ml.

6. Materiales y equipo

- 6.1. Balanza analítica, de 1 mg de sensibilidad.
- 6.2. Desecador provisto de un deshidratante eficaz (por ejemplo, gel del sílice recién deshidratado con indicador higroscópico).
- 6.3. Estufa de secado, ventilada, termostática, que se mantenga a 102 ± 2 °C en todo el espacio de trabajo.
- 6.4. Cápsulas de vidrio, porcelana o metal no corrosivo, de unos 20 mm de altura del pico y 60 a 80 mm de diámetro, con varilla agitadora de vidrio.
- 6.5. Filtro de vidrio fritado, con poros de 16 a 40 μm de diámetro y con frasco de succión.

7. Muestreo

Véase la norma IDF Standard 50 C: 1995.

8. Procedimiento**8.1. Preparación de la muestra problema**

Calentar la muestra de laboratorio en el recipiente cerrado de vidrio o de plástico adecuado, que debe estar lleno hasta la mitad o los dos tercios, hasta una temperatura a la cual la muestra esté bastante blanda como para conseguir su homogeneización total (con un agitador mecánico o a mano). Normalmente, la temperatura de homogeneización no debe superar los 35 °C. Enfriar la muestra hasta temperatura ambiente. Lo antes posible tras el enfriamiento, abrir el recipiente de la muestra y agitar brevemente (durante no más de 10 s) con un instrumento adecuado, como puede ser una cuchara o una espátula, antes de pesar.

8.2. Determinación

- 8.2.1. Secar la cápsula con la varilla (6.4) y el filtro (6.5) en la estufa (6.3) durante 1 h. Dejar enfriar estos objetos en el desecador y pesarlos todos juntos (es decir, cápsula, varilla y filtro) con precisión de 1 mg (m_0).

Notas: — Como norma, es suficiente un tiempo de enfriamiento de 45 min.

— Es importante que se utilice el mismo conjunto de cápsula, varilla y filtro con cada una de las porciones de muestra si son más de una las analizadas en el lote.

- 8.2.2. Quitar el filtro y anotar el peso de la cápsula junto con la varilla, con precisión de 1 mg (m_1).

- 8.2.3. Poner en la cápsula, pesando con precisión de 1 mg, una porción de la muestra problema (8.1) de unos 5 g (m_2).

- 8.2.4. Poner la cápsula (con la varilla y la mantequilla) en la estufa a 102 ± 2 °C y dejarla hasta el día siguiente.
- 8.2.5. Dejar enfriar la cápsula (8.2.3) hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- 8.2.6. Añadir a la cápsula 15 ml de éter de petróleo caliente (a unos 25 °C) y despegar todo lo que se pueda del sedimento adherido a la cápsula, utilizando la varilla de vidrio. Pasar el disolvente al filtro y hacer que pase filtrándose al frasco de succión.
- 8.2.7. Realizar la operación 8.2.6 otras cuatro veces. Si no quedan trazas de grasa en la superficie de la cápsula, pasar cuantitativamente al filtro, durante el cuarto lavado, todo lo que se pueda del sedimento. En caso contrario, repetir la operación 8.2.6 hasta la eliminación completa de todas las trazas de grasa.
- 8.2.8. Lavar el sedimento en el filtro con 25 ml de éter de petróleo caliente.
- 8.2.9. Secar la cápsula y la varilla de vidrio, junto con el filtro, en la estufa a 102 ± 2 °C durante 30 minutos.
- 8.2.10. Dejar enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente y pesar con precisión de 1 mg.
- 8.2.11. Repetir las operaciones 8.2.9 y 8.2.10 hasta llegar a masa constante (cuando el cambio de masa no supere 1 mg) de la cápsula, la varilla y filtro conjuntamente (m_3).

9. Expresión de los resultados

9.1. Cálculo del extracto seco magro

Calcular el extracto seco magro, ESM, como porcentaje en masa utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{ESM} = \frac{m_3 - m_0}{m_2 - m_1} \times 100$$

donde

m_0 es la masa en gramos de la cápsula vacía con la varilla de vidrio y el filtro (8.2.1)

m_1 es la masa en gramos de la cápsula vacía con la varilla de vidrio (8.2.2)

m_2 es la masa en gramos de la porción de muestra y la cápsula con la varilla de vidrio (8.2.3)

m_3 es la masa final en gramos de la cápsula con la varilla y el filtro con el sedimento (8.2.11)

El resultado se redondea a una cifra decimal.

9.2. Repetibilidad

La diferencia absoluta entre los resultados de dos determinaciones simples, realizadas simultáneamente o en rápida sucesión por el mismo operario en las mismas condiciones con un material problema idéntico, no superará el 0,1 %.

9.3. Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados simples e independientes, obtenidos por dos operarios en laboratorios diferentes con un material problema idéntico, no superará el 0,2 %.

10. Informe de la prueba

El informe de la prueba debe especificar el método utilizado y los resultados obtenidos. Debe mencionar asimismo todos los datos del procedimiento que no se especifiquen en esta norma internacional o se consideren optativos, junto con los datos de cualquier incidente que pueda haber influido en los resultados. El informe de la prueba debe incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

Nota:

Si se analiza mantequilla salada, la sal añadida se determina como parte del extracto seco magro. Para determinar el extracto seco magro lácteo hay que restar del extracto seco magro el contenido de sal añadida. Las cifras calculadas de precisión para la determinación del extracto seco magro lácteo son las siguientes:

Repetibilidad: $r = 0,104$ %

Reproducibilidad: $R = 0,206$ %.

Puede aceptarse que las cifras de precisión obtenidas para la determinación del extracto seco magro son válidas para la determinación del extracto seco magro lácteo.

ANEXO XI

(Artículo 8)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA GRASA DE LA MANTEQUILLA

El contenido de materia grasa se obtiene indirectamente mediante determinación del contenido de agua y del extracto seco magro con arreglo a los anexos IX y X, respectivamente. El porcentaje, en masa, de materia grasa es igual a:

$$100 - (W + \text{ESM})$$

donde

W es el porcentaje en masa de agua

ESM es el porcentaje en masa de extracto seco magro.

Las cifras calculadas de precisión para la determinación del contenido de materia grasa son las siguientes:

Repetibilidad: $r = 0,22 \%$

Reproducibilidad: $R = 0,36 \%$.

ANEXO XII

(Artículo 9)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE VAINILLINA DE LA MANTEQUILLA CONCENTRADA, LA MANTEQUILLA O LA NATA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTO RENDIMIENTO**1. Objeto y ámbito de aplicación**

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

2. Principio

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

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

3. Aparatos

Se trata del instrumental habitual de laboratorio y, en particular, el siguiente:

- 3.1. un congelador, que pueda funcionar a una temperatura comprendida entre -15 y -20 °C;
- 3.2. jeringas desechables de 2 ml de capacidad;
- 3.3. microfiltros de membrana de $0,45$ μm de tamaño de poro, resistentes a una solución que contenga un 5 % de la solución de extracción (4.4);
- 3.4. un cromatógrafo de líquidos provisto de una bomba (flujo de 1,0 ml/min), un inyector (inyección automática o manual de 20 μl), un detector de UV (regulado a 306 nm, escala completa de 0,01 AU), un registrador o integrador y un programador de la temperatura de columna regulado a 25 °C;
- 3.5. una columna analítica (250 mm \times 4,6 mm de diámetro interior), rellena con LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm), o equivalente;
- 3.6. una precolumna (aproximadamente 20 mm \times 3 mm de diámetro interior) con un relleno seco de Perisorb RP 18 (30-40 μm), o equivalente.

4. Reactivos

Todos los reactivos utilizados deberán ser de pureza para análisis.

- 4.1. Isopropanol
- 4.2. Etanol 96 % (v/v)
- 4.3. Acetonitrilo
- 4.4. Solución de extracción
- 4.5. Vainillina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído)
- 4.5.1. Solución madre de vainillina (= 500 $\mu\text{g/ml}$)

En un matraz aforado de 100 ml, pesar, con una precisión de 0,1 mg, unos 50 mg (CM mg) de vainillina (4.5), añadir 25 ml de solución de extracción (4.4) y enrasar con agua.

- 4.5.2. Solución patrón de vainillina (= 10 $\mu\text{g/ml}$)

En un matraz aforado de 250 ml introducir con una pipeta 5 ml de solución madre de vainillina (4.5.1) y enrasar con agua.

- 4.6. Metanol de calidad para CLAR
- 4.7. Ácido acético glacial
- 4.8. Agua de calidad para CLAR

4.9. Fase móvil para la CLAR

En un matraz aforado de 1 000 ml mezclar 300 ml de metanol (4.6), 500 ml aproximadamente de agua (4.8) y 20 ml de ácido acético (4.7) y enrasar con agua (4.8). Filtrar utilizando un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro (3.3).

5. Procedimiento

5.1. Preparación de la muestra problema

5.1.1. Mantequilla

Calentar la muestra hasta que comience a derretirse. Evitar un calentamiento local excesivo por encima de 40 °C. Cuando la muestra alcance una plasticidad suficiente, agitar para homogeneizarla. Remover la mantequilla durante 15 segundos antes de tomar la muestra. En un matraz aforado de 100 ml, pesar, con precisión de 1 mg, aproximadamente 5 g (SM g) de mantequilla.

5.1.2. Mantequilla concentrada

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

5.1.3. Nata

Calentar la muestra en un baño María o en una incubadora a 35-40 °C. Agitar para obtener una distribución homogénea de la grasa y, en caso necesario, remover. Enfriar rápidamente la muestra a una temperatura de 20 ± 2 °C. Si la muestra no presenta un aspecto homogéneo, debe repetirse el procedimiento. En un matraz aforado de 100 ml, pesar, con precisión de 1 mg, aproximadamente 10 g (SM g) de nata.

5.2. Preparación de la solución problema

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

5.3. Calibrado

En un matraz aforado de 100 ml, introducir con una pipeta 5 ml de solución patrón de vainillina (4.5.2), añadir 5 ml de la solución de extracción (4.4) y enrasar con agua. Esta solución contiene 0,5 µg/ml de vainillina.

5.4. Determinación mediante CLAR

Esperar unos 30 minutos a que el sistema cromatográfico se estabilice. Inyectar la solución patrón (5.3). Repetir la operación hasta que la diferencia de superficie de los picos o de altura de los picos entre dos inyecciones sucesivas sea inferior al 2 %. En las condiciones descritas, el tiempo de retención de la vainillina es de 9 minutos aproximadamente. Analizar la solución patrón (5.3) por duplicado inyectando 20 µl. Inyectar 20 µl de las soluciones problema (5.2). Determinar la superficie o la altura del pico obtenido para la vainillina. Repetir por duplicado la inyección de la solución patrón (5.3) después de efectuar 10 inyecciones de las muestras problema (5.2).

6. Cálculo de los resultados

Calcular la superficie (o la altura) media (AC) de los picos de vainillina asociados a las inyecciones efectuadas por duplicado con cada lote de soluciones problema (4 superficies o alturas).

Calcular el factor de respuesta (R):

$$R = AC/CM$$

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

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

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

siendo

AS = superficie del pico de vainillina de la muestra problema;

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

Cuando se analiza la nata para determinar la vainillina, la concentración de marcador debe expresarse en mg de marcador/kg de grasa láctea. Esto se calcula multiplicando C por 100/f, siendo f el contenido de grasa de la nata en porcentaje (m/m).

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

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

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

7. Precisión del método

7.1. Repetibilidad (r)

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

7.2. Reproducibilidad (R)

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas por analistas de distintos laboratorios, utilizando diferentes aparatos pero el mismo material problema, no debe ser superior a 27 mg/kg.

8. Límites de tolerancia

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

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

8.2.1. La proporción de incorporación de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído es de 250 g por tonelada de mantequilla concentrada o mantequilla. En caso de añadirse marcadores a la nata, la proporción de incorporación es de 250 g por tonelada de grasa láctea.

8.2.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica con un nivel de probabilidad del 95 % (CrD₉₅)]:
— 221,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima),
— 159,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima).

La concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo se utilizará por interpolación entre 221,0 mg/kg y 159,0 mg/kg.

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

8.3.1. La proporción de incorporación de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído es de 100 gramos por tonelada de mantequilla concentrada o mantequilla. En caso de añadirse marcadores a la nata, la proporción de incorporación es de 100 g por tonelada de grasa láctea.

8.3.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica con un nivel de probabilidad del 95 % (CrD₉₅)]:
— 79,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima),
— 54,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima).

La concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo se utilizará por interpolación entre 79,0 mg/kg y 54,0 mg/kg.

9. Notas

9.1. La repetibilidad (r) es el valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe, con una probabilidad determinada, la diferencia absoluta entre los resultados de dos ensayos individuales realizados con el mismo método e idéntico material problema y en las mismas condiciones (los mismos aparatos y el mismo laboratorio, en un intervalo breve de tiempo); salvo si se indica lo contrario, la probabilidad es del 95 %.

- 9.2. La reproducibilidad (R) es el valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe, con una probabilidad determinada, la diferencia absoluta entre los resultados de dos ensayos individuales realizados con el mismo método e idéntico material problema pero en condiciones diferentes (distintos analistas, distintos aparatos, distintos laboratorios o momentos distintos); salvo si se indica lo contrario, la probabilidad es del 95 %.
- 9.3. La recuperación de la vainillina añadida a un nivel de 250 mg/kg de butteroil oscila entre 97,0 y 103,8. El contenido medio hallado es del 99,9 %, con una desviación típica del 2,7 %.
- 9.4. La solución patrón contiene un 5 % de la solución de extracción para compensar el ensanchamiento de los picos provocado por la presencia de un 5 % de solución de extracción de las muestras problema. Ello permite efectuar la cuantificación a través de la altura de los picos.
- 9.5. El análisis se basa en una curva de calibrado lineal con una ordenada en el origen igual a cero.

La linealidad debe ser comprobada, utilizando diluciones apropiadas de la solución patrón (4.5.2), la primera vez que se realice el análisis y, además, a intervalos regulares y cada vez que se altere o renueve el equipo de CLAR.

ANEXO XIII

(Artículo 9)

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL ÉSTER ETÍLICO DEL ÁCIDO β -APO-8'-CAROTÉNICO EN LA MANTEQUILLA Y LA MANTEQUILLA CONCENTRADA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA**1. Objetivos y ámbito de aplicación**

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

2. Principio

La grasa láctea se disuelve en éter de petróleo y se mide la absorbancia a 440 nm. El contenido de éster apocaroténico se determina en relación con un patrón externo.

3. Aparatos

- 3.1. Pipetas graduadas de 0,25, 0,50, 0,75 y 1,0 ml de capacidad.
- 3.2. Espectrofotómetro apto para utilizarlo a 440 nm (y 447-449 nm) y equipado con cubetas de 1 cm de espesor óptico.
- 3.3. Matraces aforados de 20 ml y 100 ml de capacidad.
- 3.4. Balanza analítica con una sensibilidad de 0,1 mg.

4. Reactivos

Todos los reactivos deberán ser de pureza analítica reconocida.

- 4.1. Suspensión de éster apocaroténico (aproximadamente un 20 %).

- 4.1.1. Establecer el contenido de la suspensión como sigue:

Pesar con precisión aproximadamente 400 g en un matraz aforado de 100 ml, disolver en 20 ml de cloroformo (4.4) y enrasar con ciclohexano (4.5). Diluir 5 ml de esta solución hasta 100 ml con ciclohexano (solución A). Diluir 5 ml de la solución A hasta 100 ml con ciclohexano. Medir la absorbancia a 447-449 nm (medir el máximo frente al ciclohexano como blanco utilizando cubetas de 1 cm de espesor óptico).

$$\text{Contenido de éster apocaroténico (\%)} = \frac{A_{\max} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{\max} = absorbancia máxima de la solución

A = peso de la muestra (g)

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

La pureza de la suspensión es P (%).

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

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

Pesar con aproximación de 0,1 mg unos 0,100 g de suspensión de éster apocaroténico (4.1.1) (Wg), disolver en éter de petróleo (4.2), trasladar cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml de capacidad y enrasar con éter de petróleo.

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

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

- 4.2. Éter de petróleo (40-60 °C).
- 4.3. Sulfato sódico anhidro cristalizado, desecado previamente a 102 °C durante dos horas.
- 4.4. Cloroformo
- 4.5. Ciclohexano

5. Procedimiento

5.1. Preparación de la muestra

5.1.1. Mantequilla concentrada

Derretir la muestra en un horno a unos 45 °C.

5.1.2. Mantequilla

Derretir la muestra en un horno a unos 45 °C y filtrar una parte con un filtro que contenga unos 10 g de sulfato sódico anhidro (4.3) en un medio que se halle al abrigo de la luz natural o artificial fuerte y se mantenga a 45 °C. Recoger una cantidad adecuada de grasa láctea.

5.2. Determinación

Pesar con una aproximación de 1 mg alrededor de 1 g de mantequilla concentrada o grasa láctea (Mg). Trasladar cuantitativamente a un matraz aforado de 20 ml (Vml) de capacidad, enrasar con éter de petróleo (4.2) y mezclar a fondo.

Trasladar una pequeña parte de esta mezcla a una cubeta de 1 cm y medir la absorbancia a 440 nm, frente a un blanco de éter de petróleo. Obtener la concentración de éster apocaroténico en la solución en relación con el gráfico de calibración (C µg/ml).

5.3. Gráfico de calibración

Llevar con una pipeta 0, 0,25, 0,5, 0,75 y 1,0 ml de solución patrón de éster apocaroténico (4.1.2) a cinco matraces aforados de 100 ml de capacidad. Diluir enrasando con éter de petróleo (4.2) y mezclar.

La concentración de las soluciones oscilará entre 0 y 2 µg/ml y se calculará de manera precisa en relación con la concentración de la solución patrón (4.1.2) (W.P) 10 mg/ml. Medir la absorbancia a 440 nm, frente a un blanco de éter de petróleo (4.2).

Colocar los valores de la absorbancia en el eje de ordenadas y la concentración del éster apocaroténico en el de abscisas.

6. Cálculo de los resultados

6.1. El contenido de éster apocaroténico, expresado en mg/kg de producto, se indica del modo siguiente:

Mantequilla concentrada: $(C.V)/M$

Mantequilla: $0,82 (C.V)/M$

siendo

C = contenido de éster apocaroténico, en µg/ml, indicado en el gráfico de calibración (5.3)

V = volumen (ml) de la solución problema (5.2)

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

0,82 = factor de corrección del contenido de grasa láctea de la mantequilla.

7. Precisión del método

7.1. Repetibilidad

7.1.1. Análisis de la mantequilla

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas en el intervalo de tiempo más breve posible por un mismo analista que utilice el mismo equipo con idéntico material problema no deberá exceder de 1,4 mg/kg.

7.1.2. Análisis de la mantequilla concentrada

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas en el intervalo de tiempo más breve posible por un mismo analista que utilice el mismo equipo con idéntico material problema no deberá exceder de 1,6 mg/kg.

7.2. Reproducibilidad

7.2.1. Análisis de la mantequilla

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por analistas de diferentes laboratorios que utilicen distinto equipo con idéntico material problema no deberá exceder de 4,7 mg/kg.

7.2.2. Análisis de la mantequilla concentrada

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por analistas de diferentes laboratorios que utilicen distinto equipo con idéntico material problema no deberá exceder de 5,3 mg/kg.

7.3. Fuente de los datos técnicos

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

8. Límites de tolerancia

8.1. Deberán tomarse tres muestras del producto para comprobar si la adición de marcadores se ha efectuado correctamente.

8.2. Mantequilla

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

8.2.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica con un nivel de probabilidad del 95 % (CrD_{9,5}):

- 18,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima),
- 13,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima).

Se utilizará la concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo por interpolación entre 18,0 mg/kg y 13,0 mg/kg.

8.3. Mantequilla concentrada

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

8.3.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica con un nivel de probabilidad del 95 % (CrD_{9,5}):

- 20,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima),
- 14,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima).

Se utilizará la concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo por interpolación entre 20,0 mg/kg y 14,0 mg/kg.

ANEXO XIV

(Artículo 9)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SITOSTEROL Y ESTIGMASTEROL EN LA MANTEQUILLA Y LA MANTEQUILLA CONCENTRADA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES EN COLUMNA CAPILAR**1. Objeto y ámbito de aplicación**

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

2. Principio

Saponificación de la mantequilla y de la mantequilla concentrada con una solución etanólica de hidróxido de potasio y extracción de los insaponificables con éter.

Los esteroides se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases en columna capilar con referencia a un patrón interno de betulina.

3. Aparatos

- 3.1. Matraz de saponificación de 150 ml provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas
- 3.2. Ampollas de decantación de 500 ml
- 3.3. Matraces de 250 ml
- 3.4. Embudos compensadores de presión, de 250 ml o similares, para recoger el sobrante de éter
- 3.5. Columna de vidrio de 350 mm \times 20 mm provista de una junta de vidrio sinterizado
- 3.6. Baño maría o manguito termostatzado
- 3.7. Viales para reacción de 2 ml
- 3.8. Equipo de cromatografía de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de funcionamiento formado por:
 - 3.8.1. una cámara termostática para columnas, capaz de mantener la temperatura deseada con una precisión de ± 1 °C;
 - 3.8.2. un inyector de temperatura ajustable;
 - 3.8.3. un detector de ionización de llama y convertidor-amplificador;
 - 3.8.4. un integrador-registrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.8.3);
- 3.9. una columna capilar de vidrio de sílice, recubierta completamente de BP1 o material equivalente, con un espesor uniforme de 0,25 μ m; la columna debe ser capaz de separar los trimetilsilil derivados del lanosterol y del sitosterol; es adecuada una columna con BP1, de 12 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interior.
- 3.10. Microjeringa de 1 μ l para cromatografía de gases, con aguja de acero templado.

4. Reactivos

Todos los reactivos deberán ser de grado analítico reconocido. El agua utilizada deberá ser agua destilada o de pureza al menos equivalente.

- 4.1. Etanol de una pureza mínima del 95 %.
- 4.2. Solución de hidróxido de potasio al 60 %: disolver 600 g de hidróxido de potasio (del 85 % como mínimo) en agua y completar hasta un litro con agua.
- 4.3. Betulina de una pureza mínima del 99 %
 - 4.3.1. Soluciones de betulina en éter dietílico (4.4)
 - 4.3.1.1. La concentración de la solución de betulina usada para la determinación del contenido de sitosterol será de 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. La concentración de la solución de betulina usada para la determinación del contenido de estigmasterol será de 0,4 mg/ml.

- 4.4. Éter dietílico de calidad para análisis (sin peróxidos ni residuos)
- 4.5. Sulfato sódico anhidro granulado, secado previamente a 102 °C durante dos horas
- 4.6. Reactivo de sililación, por ejemplo TRI-SIL (distribuido por Pierce Chemical Co, número de catálogo 49001) o equivalente (Atención: el TRI-SIL es inflamable, tóxico, corrosivo y posiblemente cancerígeno. El personal de laboratorio deberá tener un conocimiento adecuado de las medidas de seguridad aplicables a este producto y adoptar las debidas precauciones).
- 4.7. Lanosterol
- 4.8. Sitosterol de una pureza conocida del 90 % como mínimo (P)
Nota 1: La pureza de los materiales patrón utilizados para el calibrado deberá determinarse usando el método de normalización. Considérese que todos los esteroides presentes en la muestra están representados en el cromatograma, que el área total de los picos representa el 100 % de los componentes esteroides y que los esteroides dan la misma respuesta en la detección. La linealidad del sistema deberá comprobarse en la zona de concentraciones de interés.
- 4.8.1. Solución patrón de sitosterol: preparar una solución que contenga aproximadamente 0,5 mg/ml (W_1) de sitosterol (4.8) en éter dietílico (4.4), con una precisión de 0,001 mg/ml.
- 4.9. Estigmaterol, de una pureza conocida del 90 % como mínimo (P).
- 4.9.1. Solución patrón de estigmaterol: preparar una solución que contenga aproximadamente 0,2 mg/ml (W_1) de estigmaterol (4.9) en éter dietílico (4.4), con una precisión de 0,001 mg/ml.
- 4.10. Mezcla para la prueba de resolución: preparar una solución que contenga 0,05 mg/ml de lanosterol (4.7) y 0,5 mg/ml de sitosterol (4.8) en éter dietílico (4.4).

5. Procedimiento

- 5.1. Preparación de las soluciones patrón para cromatografía. La solución de patrón interno (4.3.1) deberá añadirse a la solución patrón de esterol correspondiente a la vez que se añade a la muestra saponificada (véase 5.2.2).
 - 5.1.1. Solución cromatográfica patrón de sitosterol; pasar 1 ml de solución patrón de sitosterol (4.8.1) a dos viales de reacción (3.7) y eliminar el éter con una corriente de nitrógeno. Añadir 1 ml de solución de patrón interno (4.3.1.1) y eliminar el éter con una corriente de nitrógeno.
 - 5.1.2. Solución cromatográfica patrón de estigmaterol; pasar 1 ml de solución patrón de estigmaterol (4.9.1) a 2 viales de reacción (3.7) y eliminar el éter con una corriente de nitrógeno. Añadir 1 ml de solución de patrón interno (4.3.1.2) y eliminar el éter con una corriente de nitrógeno.
- 5.2. *Preparación de los insaponificables*
 - 5.2.1. Derretir la muestra de mantequilla a una temperatura de 35 °C como máximo; mezclar perfectamente la muestra removiéndola.

Pesar en un matraz de 150 ml (3.1), con precisión de 1 mg, aproximadamente 1 g de mantequilla (W_2) o de mantequilla concentrada (W_2). Añadir 50 ml de etanol (4.1) y 10 ml de solución de hidróxido de potasio (4.2). Colocar el refrigerante de reflujo y calentar a unos 75 °C durante 30 minutos. Desmontar el refrigerante y enfriar el matraz hasta la temperatura ambiente.
 - 5.2.2. Añadir al matraz 1,0 ml de solución de patrón interno (4.3.1.1 si va a determinarse el sitosterol, o bien 4.3.1.2 si se va a determinar el estigmaterol). Homogeneizar completamente. Pasar cuantitativamente el contenido del matraz a una ampolla de decantación de 500 ml (3.2) y lavar el matraz con 50 ml de agua y después con 250 ml de éter dietílico (4.4). Agitar enérgicamente la ampolla de decantación durante dos minutos y dejar que se separen las fases. Eliminar la capa acuosa inferior y lavar la capa etérea agitándola sucesivamente con 4 partes alícuotas sucesivas de 100 ml de agua.

Nota 2: Para evitar que se forme una emulsión, es fundamental que los dos primeros lavados con agua se realicen suavemente (diez inversiones). El tercer lavado podrá hacerse agitando enérgicamente durante 30 segundos. Si se forma una emulsión, podrá deshacerse añadiendo de 5 a 10 ml de etanol. Si se añade etanol, es necesario realizar otros dos lavados enérgicos con agua.
 - 5.2.3. Pasar la capa etérea transparente y exenta de jabones a través de una columna de vidrio (3.5) que contenga 30 g de sulfato sódico anhidro (4.5). Recoger el éter en un matraz de 250 ml (3.3). Añadir perlas para regular la ebullición y evaporar casi hasta sequedad con baño maría o manguito termostatzado, recogiendo los disolventes residuales.

Nota 3: Si los extractos de la muestra se llevan a sequedad completa a una temperatura demasiado elevada, pueden darse pérdidas de esteroides.

5.3. Preparación de los trimetilsililéteres

- 5.3.1. Pasar la solución etérea restante en el matraz a un vial de reacción de 2 ml (3.7) con 2 ml de éter y eliminar el éter con una corriente de nitrógeno. Lavar el matraz dos veces con sendas partes alícuotas suplementarias de 2 ml de éter, pasando el líquido al vial y eliminando el éter con nitrógeno cada vez.
- 5.3.2. Sililar la muestra añadiendo 1 ml de TRI-SIL (4.6). Cerrar el vial y agitar enérgicamente para disolver el contenido. Si la disolución no es completa, calentar hasta 65-70 °C. Dejar en reposo durante al menos 5 minutos antes de inyectar en el cromatógrafo de gases. Sililar los patrones de la misma forma que las muestras. Sililar la mezcla para la prueba de resolución (4.10) de la misma forma que las muestras.

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

La presencia de etanol durante la sililación interfiere con este proceso. El etanol puede estar presente cuando el lavado en la etapa de extracción no es el adecuado. Si este problema persiste, puede realizarse un quinto lavado, agitando enérgicamente durante 30 segundos, en la etapa de extracción.

5.4. Análisis por cromatografía de gases

5.4.1. Condiciones de funcionamiento:

Ajustar el cromatógrafo de gases con arreglo a las instrucciones del fabricante.

Las condiciones de funcionamiento son las siguientes:

- temperatura de la columna: 265 °C
- temperatura del inyector: 280 °C
- temperatura del detector: 300 °C
- velocidad del gas portador: 0,6 ml/min.
- presión del hidrógeno: 84 kPa
- presión del aire: 155 kPa
- fraccionamiento de la inyección: de 10:1 a 50:1; la proporción de división debe optimizarse con arreglo a las instrucciones del fabricante, y después debe validarse la linealidad de la respuesta del detector en toda la zona de concentraciones de interés.

Nota 5: Es fundamental limpiar regularmente la cámara de vaporización.

- cantidad de sustancia inyectada: 1 µl de solución de TMSE.

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

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

- el pico de sitosterol deberá estar suficientemente separado del de lanosterol. La figura 1 muestra un cromatograma típico como el que debe obtenerse con una mezcla sililada de la prueba de resolución (4.10)
- los tiempos relativos de retención de los siguientes esteroides deberán aproximarse a los valores indicados a continuación:
 - colesterol: 1,0
 - estigmasterol: 1,3
 - sitosterol: 1,5
 - betulina: 2,5
- el tiempo de retención de la betulina deberá ser de 24 minutos aproximadamente.

5.4.2. Procedimiento analítico:

Inyectar 1 µl de solución patrón sililada (estigmasterol o sitosterol) y ajustar los parámetros de calibración del integrador.

Inyectar de nuevo 1 µl de solución patrón sililada para determinar los factores de respuesta en relación con la betulina.

Inyectar 1 µl de solución de muestra sililada y medir las áreas de los picos. Cada tanda cromatográfica debe ir precedida y seguida por una inyección de patrones.

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

Nota 6: La integración del pico del estigmasterol deberá incluir las posibles colas indicadas en los puntos 1, 2 y 3 de la figura 2 b.

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

6. Cálculo de los resultados

- 6.1. Determinar el área de los picos de esterol y de betulina en los dos patrones que preceden y siguen a una tanda y calcular R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{área media del pico del esterol en el patrón}}{\text{área media del pico de betulina en el patrón}}$$

Determinar el área del pico del esterol (estigmasterol y sitosterol) y del pico de betulina en la muestra y calcular R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{área del pico del esterol en la muestra}}{\text{área del pico de betulina en la muestra}}$$

W_1 = contenido de esterol del patrón (mg) de 1 ml de solución patrón (4.8.1 0 4.9.1)

W_2 = peso de la muestra (g) (5.2.1)

P = pureza del esterol patrón (4.8 0 4.9)

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

7. Precisión del método

7.1. Mantequilla

7.1.1. Repetibilidad

7.1.1.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por un analista dentro del período de tiempo más breve posible, utilizando el mismo equipo y con el mismo material problema, no deberá exceder de 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas en el período de tiempo más breve posible, por un mismo analista, utilizando el mismo equipo y con el mismo material problema, no deberá exceder de 23,0 mg/kg.

7.1.2. Reproducibilidad

7.1.2.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por analistas de diferentes laboratorios, utilizando equipos diferentes y con el mismo material problema, no excederá de 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterol

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

7.1.3. Fuente de los datos sobre la precisión

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

7.2. Mantequilla concentrada

7.2.1. Repetibilidad

7.2.1.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas dentro del período de tiempo más breve posible por un mismo analista, utilizando el mismo equipo y con el mismo material problema, no deberá exceder de 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterol

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

7.2.2. Reproducibilidad

7.2.2.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por analistas de diferentes laboratorios, utilizando equipos diferentes y con el mismo material problema, no excederá de 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterol

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

7.2.3. Fuente de los datos sobre la precisión

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

8. Límites de tolerancia

8.1. Deberán tomarse tres muestras del producto para comprobar si la adición de marcadores se ha efectuado correctamente.

8.2. Mantequilla

8.2.1. Estigmasterol

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

8.2.1.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD_{95})]

- 116,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 95 %),
- 118,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 85 %),
- 81,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 95 %),
- 82,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 85 %).

La concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo se utilizará junto con la interpolación entre 116,0 mg/kg y 81,0 mg/kg, o entre 118,0 mg/kg y 82,0 mg/kg.

8.2.2. Sitosterol

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

- 8.2.2.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD₉₅):
- 486,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a sitosterol de una pureza del 90 %),
 - 358,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a sitosterol de una pureza del 90 %).

La concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo se utilizará por interpolación entre 486,0 mg/kg y 358,0 mg/kg.

8.3. Mantequilla concentrada

8.3.1. Estigmasterol

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

- 8.3.1.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD₉₅):]
- 120,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 95 %),
 - 122,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 85 %),
 - 84,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 95 %),
 - 86,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza del 85 %).

La concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo se utilizará por interpolación entre 120,0 mg/kg y 84,0 mg/kg, o entre 122,0 mg/kg y 86,0 mg/kg.

8.3.2. Sitosterol

- 8.3.2.1. La proporción de incorporación de sitosterol es de 600 g de sitosterol de una pureza mínima del 90 % por tonelada de mantequilla concentrada, es decir, 540 mg/kg.
- 8.3.2.2. Los resultados de las tres muestras obtenidos del análisis del producto se utilizarán para comprobar la proporción y la homogeneidad de la incorporación del marcador y el resultado más bajo se comparará con los límites siguientes [teniendo en cuenta la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD₉₅):]
- 486,0 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a sitosterol de una pureza del 90 %),
 - 358,0 mg/kg (el 70 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a sitosterol de una pureza del 90 %).

La concentración de marcador de la muestra que proporcione el resultado más bajo se utilizará por la interpolación entre 486,0 mg/kg y 358,0 mg/kg.

Figura 1

Cromatograma de la mezcla para la prueba de resolución

Es preferible la resolución completa, es decir, la línea del pico del lanosterol debe volver a la línea de base antes de volver a subir para formar el pico del sitosterol, pero puede aceptarse la resolución incompleta.

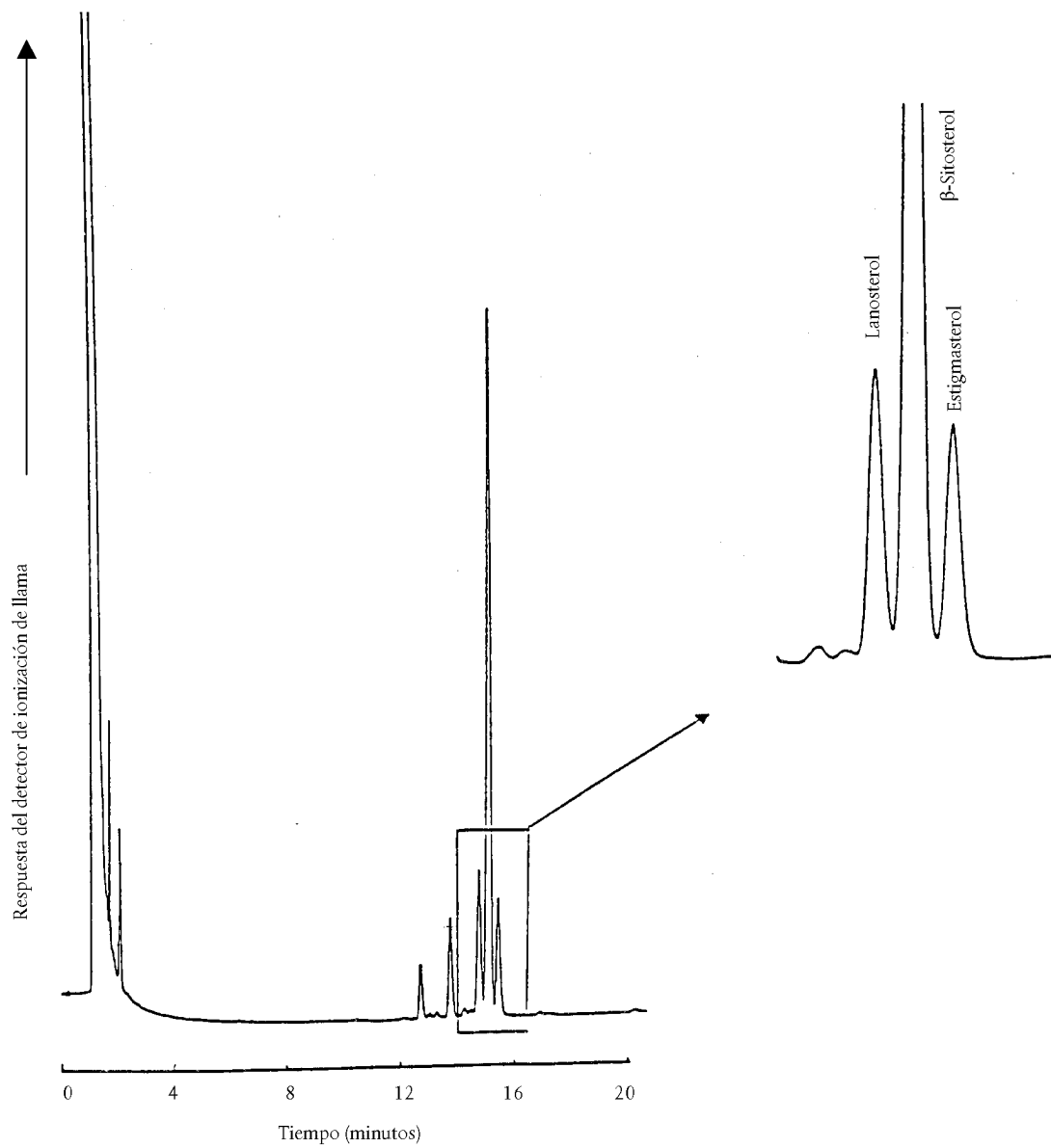


Figura 2a
Patrón de estigmasterol

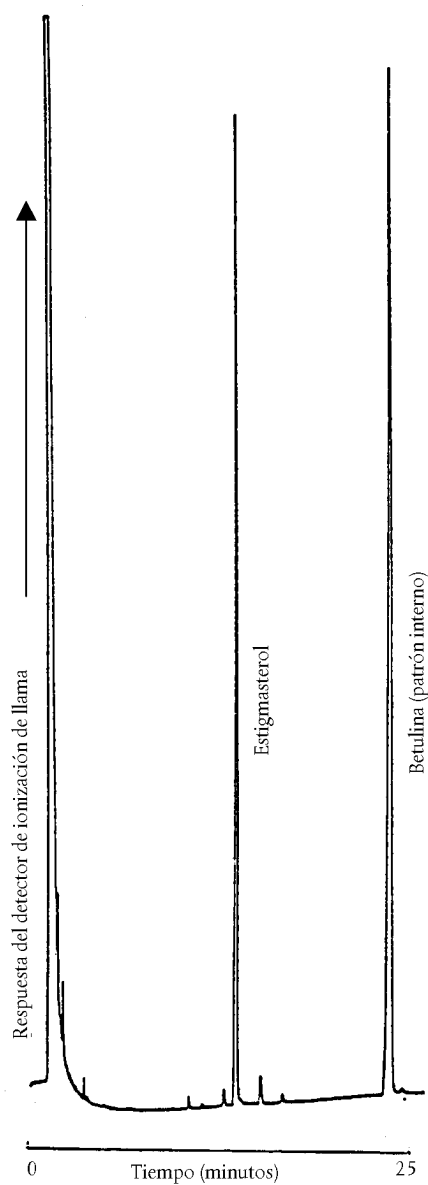
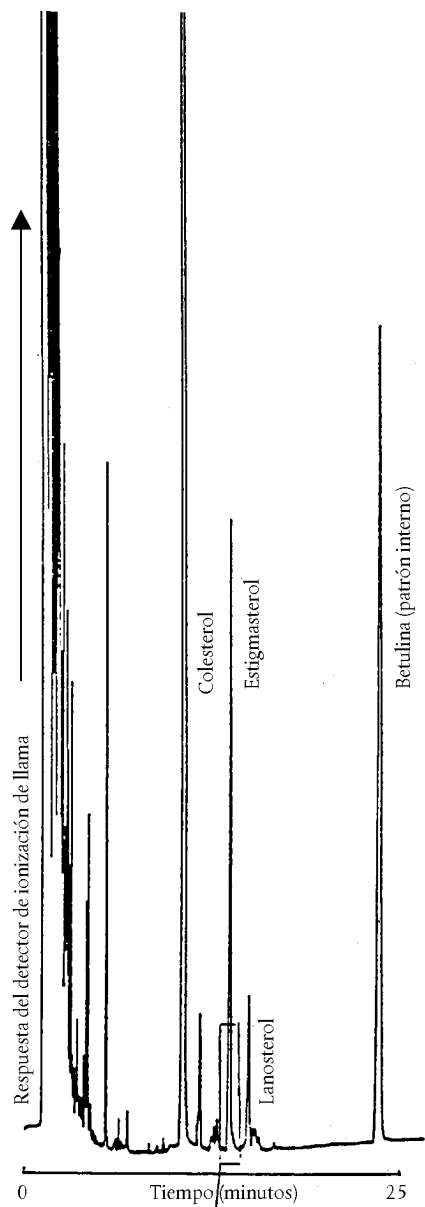


Figura 2b
Muestra de mantequilla
desnaturalizada con estigmasterol



Nota: La integración del pico del estigmasterol debe incluir las posibles colas, según se define con los puntos 1, 2 y 3.

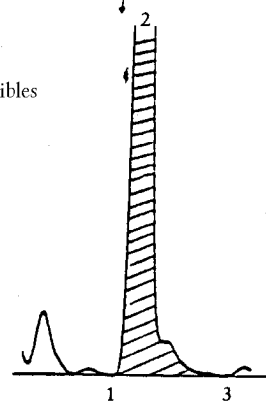


Figura 3a
Patrón de β -sitosterol

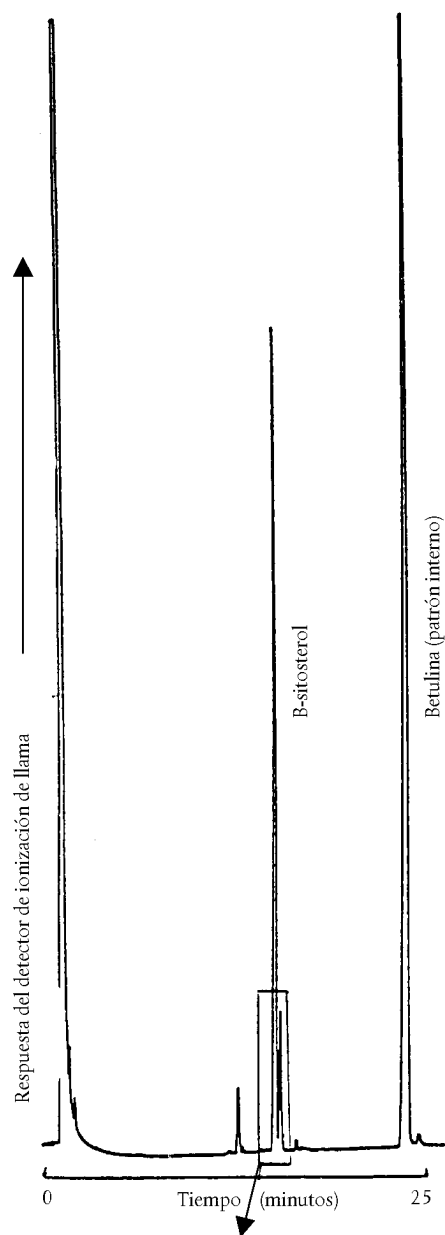
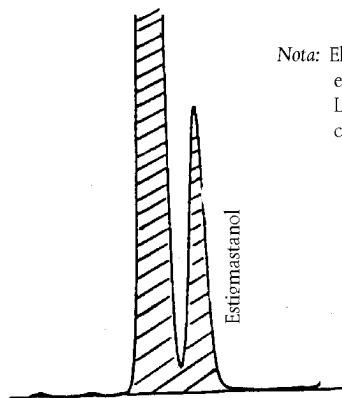
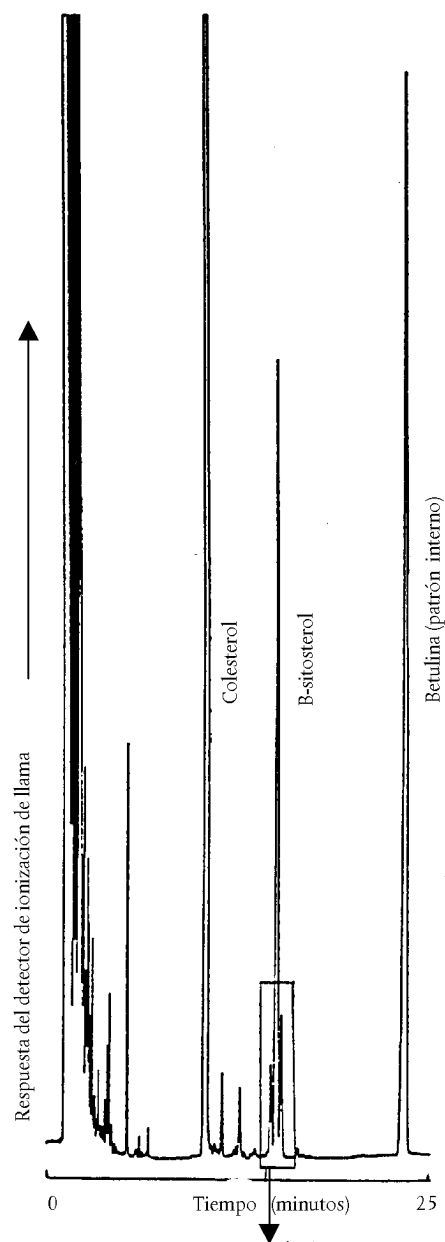
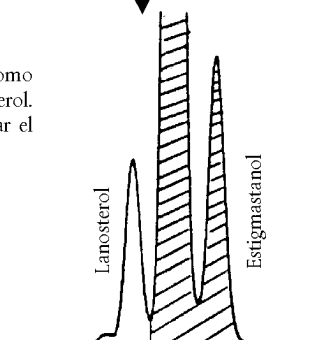


Figura 3b
Muestra de mantequilla
desnaturalizada con β -sitosterol



Nota: El β -sitosterol suele contener una impureza (identificada como estigmastanol) que eluye inmediatamente tras el β -sitosterol. Las áreas de estos dos picos deben sumarse para evaluar el contenido total en β -sitosterol.



ANEXO XV

(Artículo 10)

MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE CASEÍNA DE LECHE DE VACA EN QUESOS ELABORADOS CON LECHE DE OVEJA, DE CABRA, DE BÚFALA O CON SUS MEZCLAS**1. Objetivo**

Detección de leche y caseína de leche de vaca en quesos elaborados con leche de oveja, leche de cabra, leche de búfala o con sus mezclas mediante isoelectroenfoque de γ -caseínas tras plasminolisis.

2. Ámbito de aplicación

El método es adecuado para la detección sensible y específica de leche y caseína de leche de vaca natural y tratada térmicamente en quesos de oveja frescos y maduros elaborados con leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o con sus mezclas. No es adecuado para la detección de la adulteración de la leche y el queso con concentrados de proteínas del suero de leche de vaca tratados térmicamente.

3. Principio del método

- 3.1. Aislamiento de las caseínas del queso y los patrones de referencia.
- 3.2. Disolución de las caseínas aisladas y ruptura plasmínica (EC. 3.4.21.7).
- 3.3. Isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmina en presencia de urea y tinción de las proteínas.
- 3.4. Evaluación de los modelos de las γ_3 y γ_2 -caseínas teñidas (prueba de la presencia de leche de vaca) mediante comparación del modelo obtenido en la muestra con los obtenidos en el mismo gel en patrones de referencia que contienen 0 y 1 % de leche de vaca.

4. Reactivos

Salvo indicación en contra, se utilizarán reactivos de grado de pureza para análisis. El agua será bidestilada o de pureza equivalente.

Nota: La siguiente descripción se refiere a los geles finos de poliacrilamida con urea, de dimensiones $265 \times 125 \times 0,25$ mm, producidos en el laboratorio. En caso de que se utilicen otros tamaños o tipos de gel, podrá ser necesario ajustar las condiciones de separación.

Isoelectroenfoque

- 4.1. *Reactivos para la producción de geles de poliacrilamida con urea.*

4.1.1. Solución madre del gel

Disolver en agua:

4,85 g de acrilamida

0,15 g N, N-metileno-bis-acrilamida (BIS)

48,05 g de urea

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

Enrasar a 100 ml y guardar en un frasco de cristal de color topacio en frigorífico.

Nota: Puede utilizarse una solución comercial preparada de acrilamida/BIS en lugar de las cantidades establecidas de acrilamidas neurotóxicas. Si una solución de este tipo contiene 30 % p/v de acrilamida y 0,8 % p/v de BIS, habrá que utilizar un volumen de 16,2 ml en lugar de las cantidades indicadas. La vida útil de la solución madre es de 10 días como máximo; si su conductividad es superior a 5 mS, hay que desionizar agitando con 2 g de amberlita MB-3 durante 30 minutos; después se filtra por membrana de 0,45 μ m.

4.1.2. Solución de gel

Preparar una solución de gel mezclando las siguientes cantidades de aditivos, anfólitos y solución madre de gel (véase 4.1.1).

9,0 ml de solución madre

24 mg de β -alanina

500 μ l de anfólito pH 3,5-9,5 ⁽¹⁾

250 μ l de anfólito pH 5-7 ⁽¹⁾

250 μ l de anfólito pH 6-8 ⁽¹⁾.

Homogeneizar la solución de gel y desgasificar durante 2-3 minutos en un baño de ultrasonidos o en vacío.

Nota: Preparar la solución de gel inmediatamente antes de verterla (véase 6.2).

4.1.3. Soluciones de catalizadoras.

4.1.3.1. N,N,N',N'-tetrametileno diamina (TEMED).

4.1.3.2. 40 % de persulfato amónico (PER)

Disolver 800 mg de PER en agua y llevar a 2 ml.

Nota: Utilizar siempre solución de PER recién preparada.

4.2. Líquido de contacto

Queroseno o parafina líquida.

4.3. Solución anódica

Disolver 5,77 g de ácido fosfórico (85 % p/p) en agua y diluir hasta 100 ml.

4.4. Solución catódica

Disolver 2,00 g de hidróxido sódico en agua y diluir hasta 100 ml con agua.

Preparación de la muestra

4.5. Reactivos de aislamiento de las proteínas.

4.5.1. Ácido acético diluido (25,0 ml de ácido glacial enrasado hasta 100 ml con agua).

4.5.2. Diclorometano.

4.5.3. Acetona.

4.6. Solución tampón de disolución de proteínas.

Disolver en agua y enrasar a 50 ml:

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

24,03 g de urea

250 mg de ditiotreitól.

Nota: Conservar en frigorífico; tiempo máximo de conservación: una semana.

4.7. Reactivos para la ruptura plasmínica de las caseínas.

4.7.1. Solución tampón de carbonato amónico.

Ajustar una solución de hidrogenocarbonato de amonio de 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml de agua) que contenga ácido etilendiaminotetraacético 0,05 mol/l (EDTA, 1,46 g/100 ml) a pH8 con una solución de carbonato de amonio de 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml de agua) que contenga EDTA 0,05 mol/l.

4.7.2. Plasmina bovina (EC 3.4.21.7), actividad mínima 5 U/ml.

4.7.3. Solución de ácido ϵ -aminocaproico de inhibición de enzimas.

Disolver 2,624 g de ácido aminocaproico (ácido 6-amino-n-hexanoico) en 100 ml de etanol al 40 % (v/v).

⁽¹⁾ Se ha comprobado que los productos Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) y Resolyte® pH 5-7 y pH 6-8 (BDH, Merck) son especialmente adecuados para obtener la separación deseada de las γ -caseínas.

4.8. Patrones.

4.8.1. Los patrones de referencia certificados de una mezcla de leche de oveja y de cabra desnatada cuajada con un contenido de leche de vaca del 0 % y del 1 % pueden obtenerse en el Instituto Comunitario de Materiales y Medidas de Referencia, B-2440 Geel, Bélgica.

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

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

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

Reactivos de tinción de proteínas

4.9. Fijador.

Disolver 150 g de ácido tricloroacético en agua y enrasar en 1 000 ml.

4.10. Solución decolorante.

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

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

4.11. Soluciones colorantes.

4.11.1. Solución colorante (solución madre 1).

Disolver 3,0 g de azul brillante Coomassie G 250 (C.I. 42 655) en 1 000 ml de metanol al 90 % (v/v) utilizando un agitador magnético (durante unos 45 minutos) y filtrar a través de dos filtros de pliegues de velocidad media.

4.11.2. Solución colorante (solución madre 2).

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

4.11.3. Solución colorante (solución de trabajo).

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

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

5. Equipo

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

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

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

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

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

5.6. Centrífuga, ajustable a 3 000 g.

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

- 5.8. Frascos de plástico para el goteo de las soluciones anódica y catódica.
- 5.9. Aplicadores de la muestra (10 × 5 mm, papel de filtro de escasa absorción de proteínas o viscosa).
- 5.10. Escalpelos, pinzas y tijeras de acero inoxidable.
- 5.11. Placas de cristal o acero inoxidable para teñir y decolorar (por ejemplo, bandejas de instrumentos de 280 × 150 mm).
- 5.12. Homogeneizador de varilla ajustable (10 mm de diámetro del cilindro, velocidad entre 8 000 y 20 000 rpm).
- 5.13. Agitador magnético.
- 5.14. Baño de ultrasonidos.
- 5.15. Soldador de películas.
- 5.16. Micropipetas de 5-25 µl.
- 5.17. Concentrador a vacío o liofilizador.
- 5.18. Baño de agua termostatzado a 35 y 40 ± 1 °C con agitador.
- 5.19. Equipo de densitometría capaz de medir a una longitud de onda de 634 nm.

6. Procedimiento

6.1. Preparación de la muestra.

6.1.1. Aislamiento de las caseínas.

Pesar la cantidad equivalente a 5 g de peso seco de queso o de patrón en un tubo de centrifuga de 100 ml, añadir 60 ml de agua destilada y homogeneizar con un homogeneizador de varilla (8 000-10 000 rpm). Ajustar el pH a 4,6 con ácido acético diluido (4.5.1) y centrifugar (5 minutos, 3 000 g). Decantar la grasa y el suero, homogeneizar el residuo a 20 000 rpm en 40 ml de agua destilada [con el pH ajustado a 4,5 con ácido acético diluido (4.5.1)], añadir 20 ml de diclorometano (4.5.2) y homogeneizar y centrifugar (5 minutos, 3 000 g). Con una espátula extraer la capa de caseína que se halla entre las fases acuosa y orgánica (véase figura 2) y decantar ambas fases. Volver a homogeneizar la caseína en 40 ml de agua destilada (véase más arriba) y 20 ml de diclorometano (4.5.2) y centrifugar. Repetir esta operación hasta que las dos fases de extracción sean incoloras (2 o 3 veces). Homogeneizar el residuo de proteína con 50 ml de acetona (4.5.3) y pasar a través de un filtro de pliegues de velocidad media. Lavar el residuo que queda en el filtro con dos porciones de acetona, de 25 ml cada una, y dejar secar al aire o en corriente de nitrógeno; después se pulveriza bien en mortero.

Nota: La proteína aislada seca debe conservarse a -20 °C.

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

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

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

6.2. Preparación de los geles de poliacrilamida con urea.

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

Añadir 10 µl de TEMED (4.1.3.1) a la solución de gel preparada y desgasificada (4.1.2), agitar y añadir 10 µl de solución PER (4.1.3.2), mezclar bien y verter de inmediato y uniformemente en el centro de la hoja de cobertura. Colocar un extremo de la placa de soporte del gel (con la cara de la hoja hacia abajo) sobre la placa de la hoja de cobertura y bajar lentamente de manera que se forma una película de gel entre las hojas, extendiéndose de forma regular y sin burbujas (figura 3). Con una fina espátula hacer bajar cuidadosa y completamente la placa de soporte del gel y colocar otras tres placas de vidrio encima para que actúen de peso. Una vez completada la polimerización (alrededor de 60 minutos), extraer el gel polimerizado sobre la hoja de soporte del gel junto con la hoja de cobertura, inclinando las placas de vidrio. Limpiar el revés de la hoja de soporte cuidadosamente para eliminar los residuos de gel y la urea. Soldar el «emparedado de gel» para formar un tubo de película y guardar en frigorífico (durante 6 semanas como máximo).

Nota: Puede volver a utilizarse la hoja de cobertura con los espaciadores. El gel de poliacrilamida puede cortarse en trozos más pequeños, lo que es recomendable cuando hay pocas muestras o si se utiliza un equipo automático de electroforesis (2 geles de 4,5 × 5 cm).

6.3. Isoelectroenfoque

Graduar el termostato de refrigeración a 12 °C. Frotar el revés de la hoja de soporte del gel con queroseno y después dejar caer unas cuantas gotas de queroseno (4.2) sobre el centro del bloque de refrigeración. Extender encima el «emparedado» de gel, con la cara del soporte hacia abajo, con cuidado para evitar la formación de burbujas. Enjuagar el exceso de queroseno y quitar la hoja de cobertura. Empapar las tiras de los electrodos con las soluciones electródicas (4.3 y 4.4), cortar para ajustarlas a la longitud del gel y colocar en los lugares previstos (9,5 cm de distancia de los electrodos).

Realizar el enfoque en las siguientes condiciones:

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

Fase	Tiempo (min)	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)	Voltios (hora)
1. Preenfoque	30	máx. 2 500	máx. 15	const. 4	ca. 300
2. Enfoque de la muestra (1)	60	máx. 2 500	máx. 15	const. 4	ca. 1 000
3. Enfoque final	60	máx. 2 500	máx. 5	máx. 20	ca. 3 000
	40	máx. 2 500	máx. 6	máx. 20	ca. 3 000
	30	máx. 2 500	máx. 7	máx. 25	ca. 2 500

(1) Aplicación de la muestra: una vez realizado el preenfoco (fase 1), se ponen con pipeta en los aplicadores de muestra (10 × 5 mm) 18 µl de la muestra y de las soluciones patrón, se colocan en el gel a intervalos de 1 mm a 5 mm del ánodo en sentido longitudinal y se aprieta ligeramente. Se realiza el enfoque en las condiciones arriba indicadas, se extraen cuidadosamente los aplicadores de muestra tras 60 minutos de enfoque de la muestra.

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

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

Fase	Tensión	Intensidad	Potencia	Temperatura	Voltios (hora)
1. Preenfoque	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Ve
2. Enfoque de la muestra	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Ve
3. Enfoque	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Ve
4. Enfoque	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Ve

El aplicador de muestra se coloca en la fase 2 a 00 Ve.

El aplicador de muestra se saca en la fase 2 a 30 Ve.

6.4. Tinción de proteínas.

6.4.1. Fijación de proteínas.

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

6.4.2. Lavado y tinción de la placa de gel.

Ecurrir totalmente el fijador y lavar la placa de gel dos veces durante 30 segundos cada vez con 100 ml de solución decolorante (4.10). Retirar la solución decolorante y llenar el recipiente con 250 ml de solución colorante (4.11.3) se deja actuar 45 minutos con agitación suave.

6.4.3. Decoloración de la placa de gel.

Retirar la solución colorante, lavar la placa de gel dos veces con 100 ml de solución decolorante (4.10) cada vez y después agitar durante 15 minutos con 200 ml de solución decolorante y repetir la fase de decoloración al menos 2 o 3 veces hasta que el fondo se vea claro e incoloro. A continuación, enjuagar la placa de gel con agua destilada (2 x 2 minutos) y secar al aire (2 a 3 horas) o con un secador de pelo (de 10 a 15 minutos).

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

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

7. Evaluación

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

7.1. Evaluación visual

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

7.2. Evaluación densitométrica

A ser posible aplicar la densitometría (5.19) para determinar las relaciones de las áreas de los picos de las γ_2 y γ_3 -caseínas de vaca con respecto a las de oveja, cabra y búfala (véase la figura 5). Compárese este valor con la relación de las áreas de los picos de las γ_2 y γ_3 -caseínas del patrón de referencia del 1 % (oveja, cabra) o del patrón provisional de laboratorio (búfala) analizados en el mismo gel.

Nota: El método funciona satisfactoriamente si se encuentra una señal claramente positiva de γ_2 y γ_3 -caseínas de vaca en el patrón del 1 % pero no en el patrón de 0 %. En caso contrario, deberá optimarse el procedimiento respetando los detalles del método con precisión.

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

8. Bibliografía

1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: *Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins.* *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: *A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting.* *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause L., Berner L., Klostermeyer H.: *Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilised pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier.* En: *Electrophoresis-Forum '89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, Munich (1989).
4. Krause L., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: *Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen.* *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: *Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 mm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films.* *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

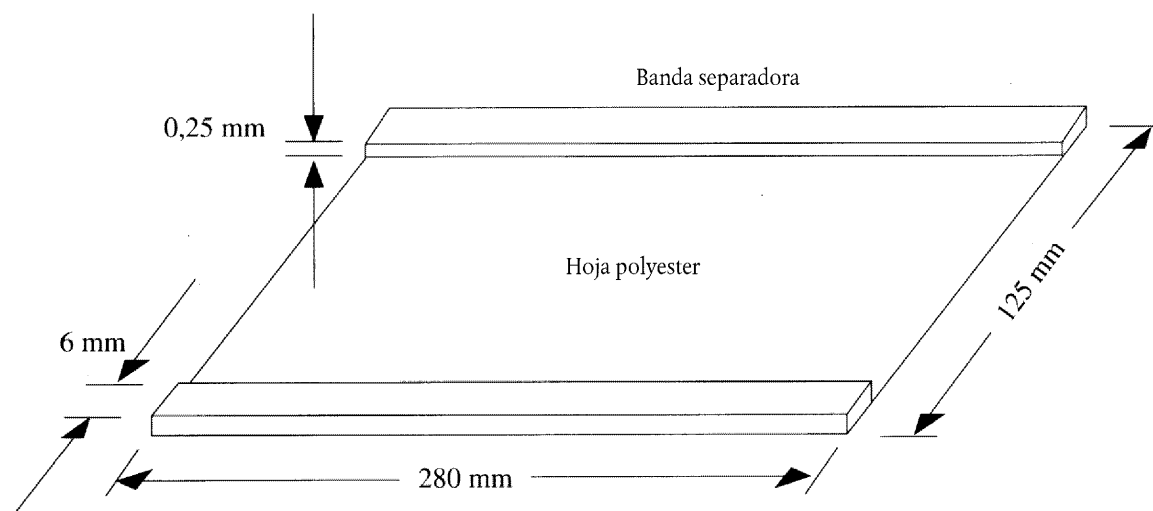


Figura 1: Esquema de la hoja de cobertura

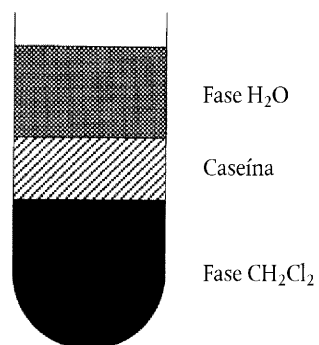


Figura 2: Capa de caseína flotando entre las fases acuosa y orgánica tras la centrifugación

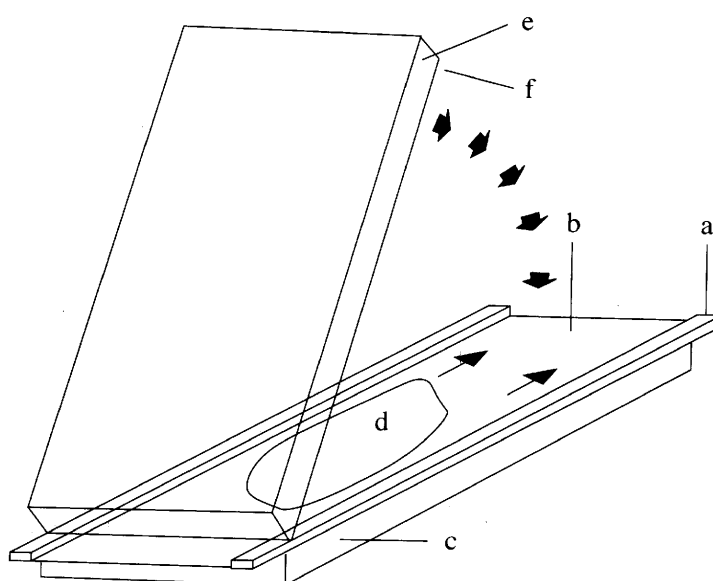


Figura 3: Técnica de inclinación para moldear ultrafinos de poliacrilamida.

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

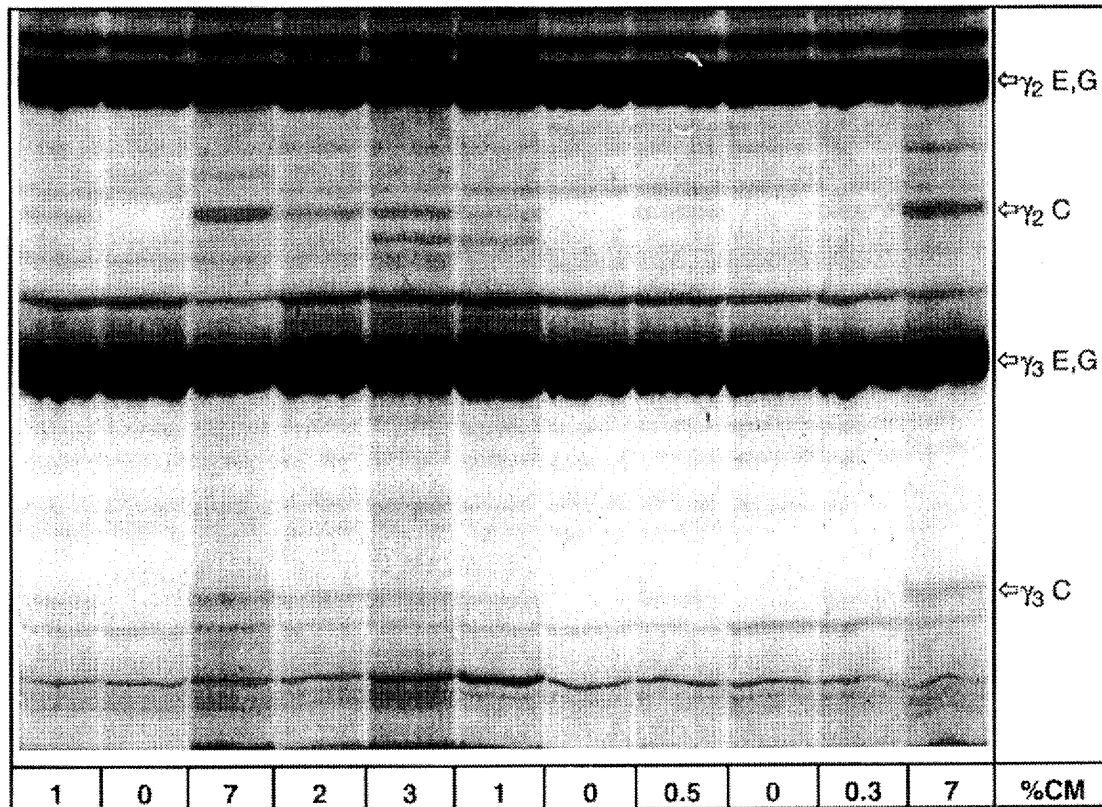


Figura 4a: Isoelectrofoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con leche de oveja y cabra con cantidades diferentes de leche de vaca.

% CM = porcentaje de leche de vaca, C = vaca, E = oveja, G = cabra.

Se muestra la mitad superior del gel IEF.

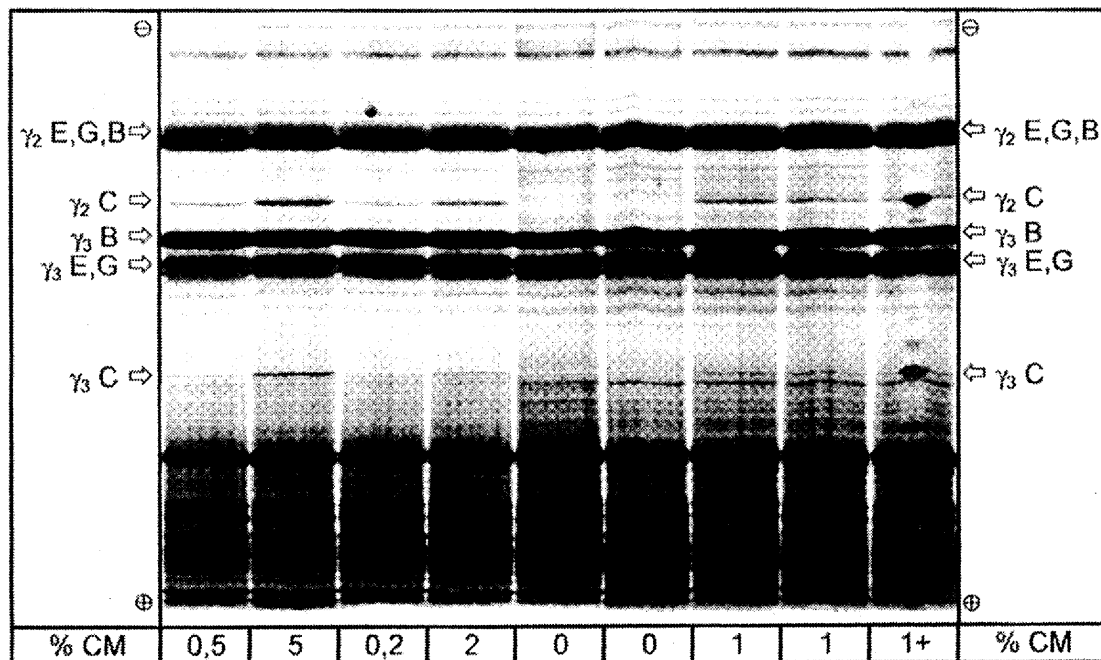


Figura 4b: Isoelectrofoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con mezclas de leche de oveja, cabra y búfala con cantidades diferentes de leche de vaca.

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

Se muestra la distancia de separación total del gel IEF.

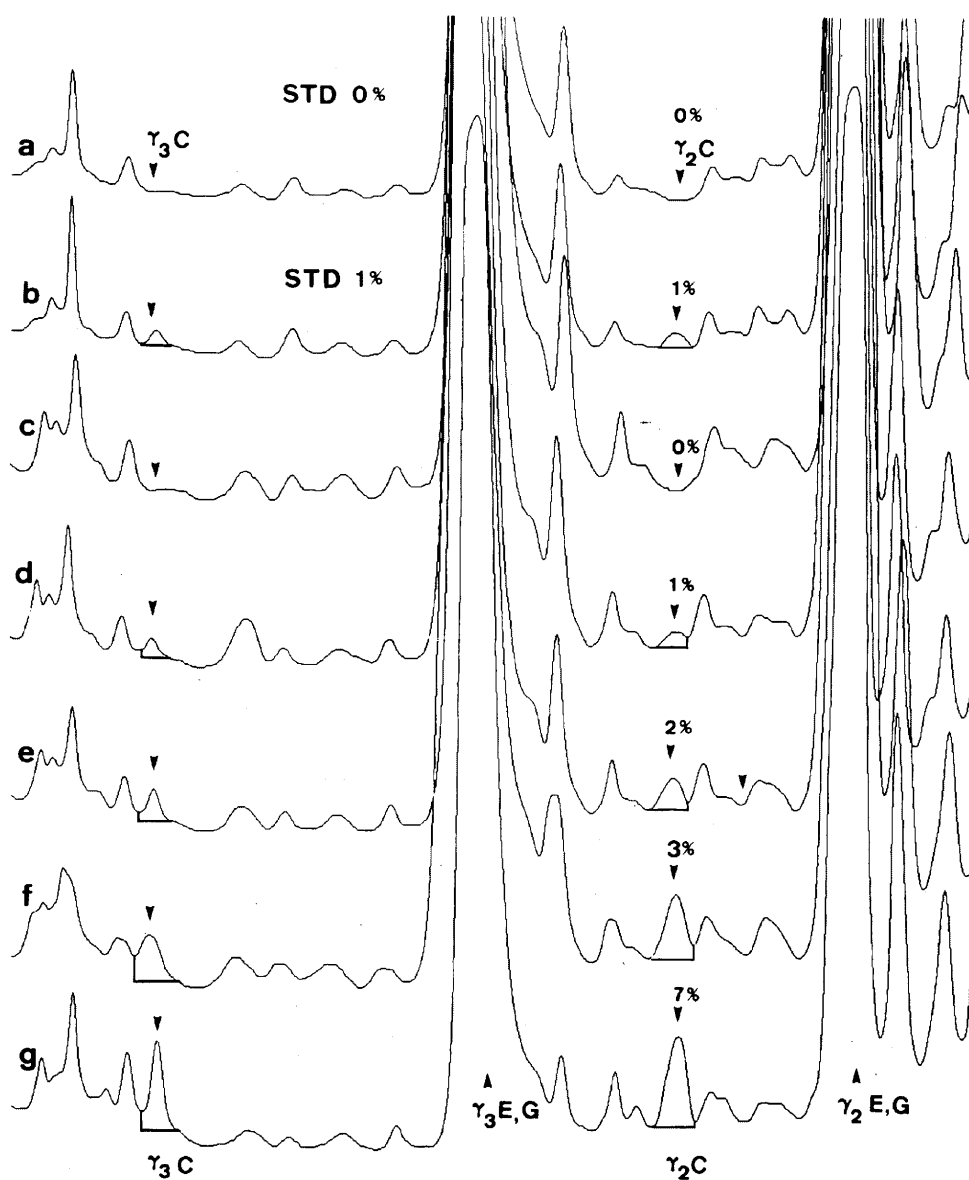


Figura 5: Superposición de densitogramas de patrones (STD) y muestras de quesos elaborados con una mezcla de leche de oveja y cabra tras el isoelectroenfoco.

a, b = patrones con 0 % y 1 % de leche de vaca; c-g = muestras de quesos con 0 %, 1 %, 2 %, 3 % y 7 % de leche de vaca. C = vaca, E = oveja, G = cabra.

La mitad superior del gel IEF se leyó a $\lambda = 634 \text{ nm}$.

ANEXO XVI

(Artículo 11)

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

Cuando se estudie la presencia de coliformes en la mantequilla, se inocularán en el medio de cultivo muestras correspondientes a 1 g de mantequilla.

Cuando se estudie la presencia de coliformes en la leche desnatada en polvo, la caseína y los caseinatos, se inocularán en el medio de cultivo muestras de 0,1 g.

Se aplicará la norma FIL 73A:1985, método B, con las siguientes modificaciones:

- 1) La preparación de las muestras se efectuará de acuerdo con la norma FIL 122B:1992. Para la caseína ácida, también podrá optarse por el procedimiento de preparación de muestras descrito en la norma FIL 73A:1985.
- 2) Sólo se incubarán y evaluarán los tubos en los que se hayan inoculado muestras de 1 g (mantequilla) o 0,1 g (leche desnatada en polvo y caseína y caseinatos). No se elaborarán diluciones decimales.

Evaluación de los resultados

Tres resultados negativos:	Se considera cumplido el requisito.
Dos o tres resultados positivos:	No se considera cumplido el requisito.
Dos resultados negativos:	Es preciso analizar dos muestras más de 1 g (mantequilla) y 0,1 g (leche desnatada en polvo y caseína y caseinatos), respectivamente. Sólo se considera cumplido el requisito si los dos últimos resultados son negativos.

Observación

Contenido de coliformes: 1/10 g en el caso de la mantequilla, 1/g en el caso de la leche desnatada en polvo, la caseína o los caseinatos, basado en una media.

Los resultados que indican que se ha cumplido el requisito se obtienen con una probabilidad del 93 %.

Contenido de coliformes: 1/g en el caso de la mantequilla, 1/0,1 g en el caso de la leche desnatada en polvo, la caseína o los caseinatos, basado en una media.

Los resultados que indican que no se ha cumplido el requisito se obtienen con una probabilidad del 91 %.

(Hipótesis: distribución de Poisson).

ANEXO XVII

(Artículo 12)

MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LACTOSA DE LOS PRODUCTOS DE LA PARTIDA 2309 DE LA NOMENCLATURA COMBINADA ⁽¹⁾

PARTE I

1. Ámbito de aplicación

El método se aplicará en los casos en los que el contenido de lactosa sea superior a un 0,5 %.

2. Principio

Disolver los azúcares en agua. Dejar actuar la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) que deja intacta la lactosa. Determinar el contenido de lactosa de la solución, según el método de Luff-Schoorl, después de la floculación y filtración.

3. Reactivos

Tiosulfato de sodio 0,1 N

Indicador: solución de almidón. Se añade una mezcla de 5 g de almidón soluble (añadir, en su caso, 10 mg de yoduro de mercurio como agente de conservación) y de 30 ml de agua a 1 litro de agua hirviendo; mantener dicha mezcla en ebullición durante 3 minutos; esperar a que se enfríe.

Solución de yoduro de potasio para análisis al 30 % (p/v).

Solución de ácido sulfúrico 6 N

Reactivo de Luff-Schoorl:

- disolver 25 g de sulfato de cobre para análisis libre de hierro ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 100 ml de agua;
- disolver 50 g de ácido cítrico para análisis ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 50 ml de agua;
- disolver en unos 300 ml de agua caliente 143,8 g de carbonato de sodio para análisis anhidro (Na_2CO_3).

Verter b) en c) (previo enfriamiento), agitar con cuidado y añadir a continuación a). Enrasar a 1 litro, dejar reposar durante una noche y filtrar. Deben comprobarse las normalidades del reactivo así obtenido (0,1 N en Cu, 2 N en Na_2CO_3). El pH debe ser próximo a 9,4.

Solución Carrez I: disolver 23,8 g de Zn ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂·2H₂O y 3 g de ácido acético glacial en agua y enrasar a 100 ml.

Solución Carrez II: disolver 10,6 g de $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua y enrasar a 100 ml.

Granos de piedra pómez, tratados por ebullición en ácido clorhídrico, lavados con agua y desecados; suspensión de *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g de levadura fresca en 100 ml de agua (no conservarla más de una semana en el frigorífico).

4. Procedimiento

Pesar 1 g de la muestra que se vaya a analizar, con una precisión de 1 mg, e introducir la porción en un matraz aforado de 100 ml. Añadir entre 25 y 30 ml de agua. Colocar el matraz durante 30 minutos en un baño María hirviendo (4.1); dejar enfriar a unos 35 °C.

Añadir 5 ml de la suspensión de levadura ⁽²⁾ y agitar. Mantener el matraz aforado y su contenido durante 2 h en un baño María a una temperatura de 38 a 40 °C.

Tras la fermentación, enfriar a una temperatura de aproximadamente 20 °C. Añadir 2,5 ml de la solución Carrez I y agitar durante 30 segundos; añadir a continuación 2,5 ml de la solución Carrez II y agitar de nuevo durante 30 segundos. Enrasar a 100 ml con agua, mezclar y filtrar. Tomar con una pipeta una cantidad de filtrado que no exceda de 25 ml y que contenga preferentemente de 40 a 80 mg de lactosa; si fuere necesario, completar hasta 25 ml con agua y determinar el contenido de lactosa anhidra según el método de Luff-Schoorl.

Efectuar un ensayo en blanco completo con la levadura sola.

⁽¹⁾ Reglamento (CEE) n° 222/88.

⁽²⁾ En el caso de los productos que contengan más de un 40 % de azúcares fermentables, deberá aumentarse la cantidad de suspensión.

PARTE II

1. Determinación del contenido de lactosa según el método de Luff-Schoorl

Tomar con una pipeta 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl y ponerlos en un matraz Erlenmeyer de 300 ml; añadir 25 ml, medidos exactamente, de la solución floculada.

Después de añadir dos granos de piedra pómez, calentar, agitando con la mano, por encima de una llama libre de mediana altura, y llevar el líquido a ebullición durante aproximadamente 2 minutos. Colocar inmediatamente el Erlenmeyer encima de una tela metálica de amianto, debajo de la cual se habrá encendido previamente una llama. Ésta se regulará de tal forma que sólo caliente la base del Erlenmeyer; a continuación, adaptar un refrigerante de reflujo. A partir de este momento, hervir durante 10 minutos exactamente. Enfriar inmediatamente en agua fría y después de unos 5 minutos valorar de la siguiente forma:

Añadir al líquido 10 ml de yoduro de potasio e inmediatamente después, pero con precaución (por la formación de una espuma abundante), 25 ml de ácido sulfúrico 6 N.

Valorar entonces con el tiosulfato de sodio hasta que aparezca una tonalidad amarilla apagada y, hacia el final de la valoración, añadir el indicador de almidón.

Realizar la misma valoración con una mezcla exactamente medida de 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl y 25 ml de agua, tras añadir 10 ml de yoduro de potasio y 25 ml de ácido sulfúrico 6 N, sin llevarla a ebullición esta vez.

Determinar mediante la tabla siguiente la cantidad de lactosa en mg correspondiente a la diferencia de los resultados de las dos valoraciones (expresados en ml de tiosulfato de sodio 0,1 N).

TABLA

Tabla correspondiente a 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl

(véanse las condiciones en el texto)

1. Tiosulfato de sodio 0,1 N

2. Lactosa $C_{12}H_{22}O_{11}$

1			2		
ml	mg	Diferencia	ml	mg	Diferencia
1	3,6	3,7	12	44,6	3,8
2	7,3	3,7	13	48,4	3,8
3	11,0	3,7	14	52,2	3,8
4	14,7	3,7	15	56,0	3,9
5	18,4	3,7	16	59,9	3,9
6	22,1	3,7	17	63,8	3,9
7	25,8	3,7	18	67,7	4,0
8	29,5	3,7	19	71,7	4,0
9	33,2	3,8	20	75,7	4,1
10	37,0	3,8	21	79,8	4,1
11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
		3,8	23	88,0	4,1

ANEXO XVIII

(Artículo 13)

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 triclororacético 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:

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

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

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

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

donde:

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

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

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

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

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

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

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

donde:

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

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

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

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

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

donde:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

donde:

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

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

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

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

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

9.3. *Precisión del método*

9.3.1. Repetibilidad

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

9.3.2. Reproducibilidad

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

9.4. Interpretación

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

donde:

2,0 es el valor máximo admitido para la superficie relativa de la cresta III que toma en consideración la superficie relativa de la cresta III, digamos 1,3, el margen de incertidumbre debido a las variaciones en la composición de la leche descremada en polvo y la 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, $S_{II} [E] \leq 160$, 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:

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

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

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.

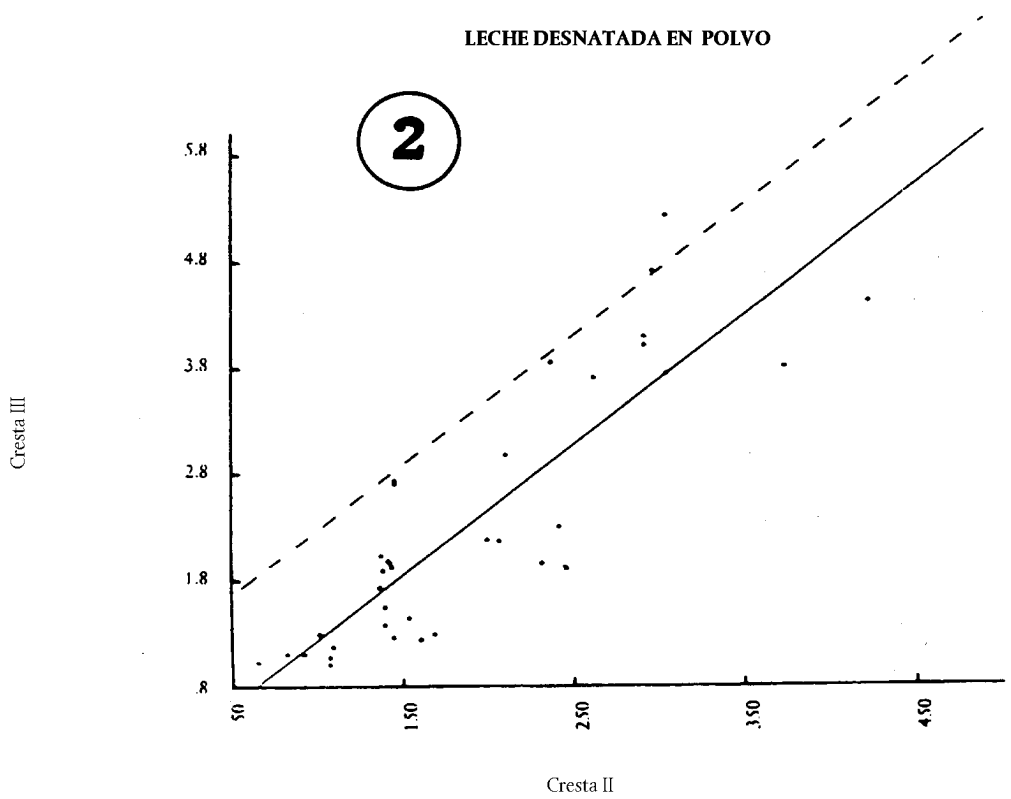
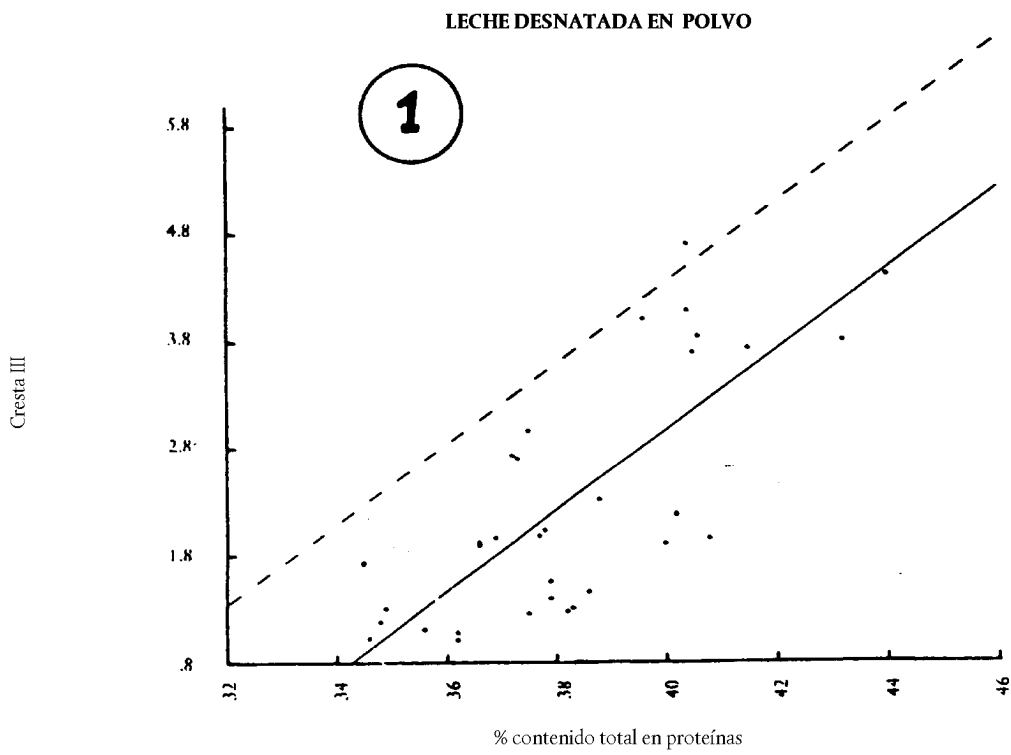
Si T_1 y T_2 son superiores a cero, la conclusión será la presencia de suero de leche en polvo.

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.



ANEXO XIX

(Artículo 13)

DETERMINACIÓN DE LOS SÓLIDOS DE SUERO DE CUAJO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO Y EN LAS MEZCLAS A QUE SE REFIERE EL REGLAMENTO (CE) N° 2799/1999**1. Ámbito: detección de la adición de sólidos de suero de cuajo en los productos siguientes:**

- a) leche desnatada en polvo según la definición del artículo 2 del Reglamento (CE) n° 2799/1999 y
- b) mezclas según la definición del artículo 4 del Reglamento (CE) n° 2799/1999.

2. Referencias: norma internacional ISO 707.**3. Definición**

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

4. Principio

Determinación de la cantidad de glucomacropéptidos A conforme al anexo XVIII. Las muestras que den resultado positivo se analizarán con vistas a la detección de glucomacropéptidos A (GMPA) por el procedimiento de cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (procedimiento de CLAR). El resultado se evaluará por comparación con muestras patrón constituidas por leche desnatada en polvo exenta de lactosuero en polvo o con adición de un porcentaje conocido de dicho lactosuero. Si se obtiene un resultado superior al 1 % (m/m), ello es prueba de la presencia de sólidos de suero de cuajo.

5. Reactivos

Todos los reactivos deberán ser de grado analítico reconocido. El agua que se emplee será destilada, o de pureza al menos equivalente. El acetonitrilo deberá ser de calidad espectroscópica o adecuada para el procedimiento de CLAR.

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

Reactivos para el procedimiento de CLAR en fase inversa.

5.1. Solución de ácido tricloroacético

Disolver 240 g de ácido tricloroacético (CCl_3COOH) en agua y completar hasta 1 000 ml.

5.2. Eluyentes A y B

Eluyente A: introducir, en un matraz aforado de 1 000 ml, 150 ml de acetonitrilo (CH_3CN), 20 ml de isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) y 1,00 ml de ácido trifluoroacético (TFA, CF_3COOH). Enrasar con agua. Eluyente B: introducir, en un matraz aforado de 1 000 ml, 550 ml de acetonitrilo, 20 ml de isopropanol y 1,00 ml de TFA. Enrasar con agua. Antes de utilizarla, filtrar la solución de eluyente a través de una membrana filtrante con un diámetro de poro de 0,45 micrómetros (μm).

5.3. Conservación de la columna

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

5.4. Muestras testigo

- 5.4.1. Leche desnatada en polvo que se ajuste a los requisitos aplicables al almacenamiento público, es decir (0).
- 5.4.2. La misma leche desnatada en polvo adulterada con un 5 % (m/m) de suero de cuajo en polvo de composición media, es decir (5).
- 5.4.3. La misma leche desnatada en polvo adulterada con 50 % (m/m) de suero de cuajo en polvo de composición media, es decir (50) ⁽¹⁾.

6. Aparatos

Los aparatos necesarios para el procedimiento descrito son los que se indican en el anexo XVIII del presente Reglamento.

6.1.1. Balanza analítica

- 6.2. Centrifugadora que pueda alcanzar una fuerza centrífuga de 2 200 g, provista de tubos para centrifugar cerrados de una capacidad de 50 ml aproximadamente

⁽¹⁾ El suero de cuajo en polvo de composición media y la leche desnatada en polvo adulterada pueden obtenerse de NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA. También pueden emplearse otros productos en polvo que den resultados equivalentes al de los productos NIZO.

- 6.3. Agitador mecánico con dispositivo para agitar a una temperatura de 50 °C
- 6.4. Agitador magnético
- 6.5. Embudos de vidrio de 7 cm de diámetro aproximadamente
- 6.6. Papeles de filtro, de filtración media, de unos 12,5 cm de diámetro
- 6.7. Dispositivo de filtración de vidrio provisto de membrana filtrante de 0,45 µm de diámetro de poro
- 6.8. Pipetas graduadas que permitan medir 10 ml (ISO 648, clase A, o ISO R/835) o un sistema capaz de introducir 10,0 ml en 2 minutos
- 6.9. Baño de agua con termostato regulado a $25 \pm 0,5$ °C
- 6.10. Equipo de CLAR que comprenda:
 - 6.10.1. Sistema de bombeo de gradiente binario
 - 6.10.2. Inyector, manual o automático, con capacidad de 100 microlitros (µl)
 - 6.10.3. Columna Dupont Protein Plus (longitud: 25 cm; diámetro interior: 0,46 cm) o una columna equivalente de fase inversa de poro grueso, a base de sílice
 - 6.10.4. Horno de columna con termostato regulado a 35 ± 1 °C
 - 6.10.5. Detector de luz ultravioleta de longitud de onda variable, que permita tomar medidas a 210 nm (de ser necesario, puede utilizarse una longitud de onda mayor, hasta 220 nm), con una sensibilidad de 0,02 Å
 - 6.10.6. Integrador que pueda integrar de valle en valle.

Observación

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

7. Muestreo

- 7.1. La toma de muestras se efectuará según el procedimiento establecido por la Norma Internacional ISO 707. No obstante, los Estados miembros podrán utilizar otro método de toma de muestras, siempre que se atenga a los principios de la norma antes citada.
- 7.2. Conservar la muestra de modo que no pueda producirse deterioro ni modificación de composición.

8. Procedimiento

8.1. Preparación de la muestra problema

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 invirtiendo varias veces el recipiente.

8.2. Porción de ensayo

Pesar $2,00 \pm 0,001$ g de la muestra problema en un tubo de centrifuga (6.2) o en un matraz apropiado con tapón (50 ml).

8.3. Eliminación de las materias grasas y de las proteínas

- 8.3.1. Añadir 20,0 g de agua caliente (50 °C) a la porción de ensayo. Disolver el polvo agitándolo durante 5 minutos, o 30 minutos en el caso del suero de mantequilla ácido, empleando un agitador mecánico (6.3). Colocar el tubo en un baño de agua (6.9) y mantenerlo hasta que se estabilice a 25 °C.
- 8.3.2. Añadir en 2 minutos 10,0 ml de solución de ácido tricloroacético a 25 °C (5.1), a la vez que se agita enérgicamente con el agitador magnético (6.4). Mantener el tubo en reposo en un baño de agua (6.9) durante 60 minutos.
- 8.3.3. Centrifugar a 2 200 g (6.2) durante 10 minutos, o pasar a través de un filtro de papel (6.6), desechando los primeros 5 ml del filtrado.

8.4. Determinación cromatográfica

- 8.4.1. Realizar el análisis por CLAR tal como se indica en el anexo XVIII. Si el resultado es negativo, se concluye que la muestra no contiene una cantidad detectable de sólidos de suero de cuajo. En caso de resultado positivo, debe aplicarse el procedimiento de CLAR en fase inversa descrito a continuación. La presencia de suero de mantequilla ácido en polvo puede dar lugar a falsos resultados positivos, posibilidad que queda excluida gracias al procedimiento de CLAR en fase inversa.

- 8.4.2. Antes de llevar a cabo el análisis por HPLC con inversión de fase deben optimizarse las condiciones de gradiente. Un tiempo de retención de 26 minutos \pm 2 minutos para GMP_A es óptimo para sistemas de gradiente con un volumen muerto de aproximadamente 6 ml (volumen desde el punto en que confluyen los solventes hasta el volumen del circuito de inyección, incluido este último). Para los sistemas de gradiente con un volumen muerto inferior (por ejemplo, 2 ml) debería emplearse un tiempo de retención óptimo de 22 minutos.

Tomar soluciones de las muestras patrón (5.4) con y sin un 50 % de suero lácteo.

Inyectar 100 μ l de sobrenadante o filtrado (8.3.3) en el aparato de HPLC que deberá funcionar en las condiciones de gradiente de exploración que figuran en la tabla 1.

Tabla 1

Condiciones de gradiente de exploración para la optimización de la cromatografía

Tiempo (en minutos)	Flujo (en ml/minutos)	% A	% B	Curva
Inicial	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

La situación del pico del GMP_A se obtendrá por comparación de los dos cromatogramas.

La composición inicial del solvente que deberá emplearse para el gradiente normal (apartado 8.4.3) se obtiene a partir de la fórmula siguiente:

$$\% B = 10 - 2,5 + [13,5 + (RT_{\text{GMP}_A} - 26)/6] * 30/27$$

$$\% B = 7,5 + [13,5 + (RT_{\text{GMP}_A} - 26)/6] * 1,11$$

siendo

RT_{GMP_A}: el tiempo de retención del GMP_A en el gradiente de exploración % B inicial del gradiente de exploración

- 10: el % B inicial del gradiente de exploración
 2,5: % B en el punto medio menos % B en el punto inicial del gradiente normal
 13,5: el tiempo correspondiente al punto medio del gradiente de exploración
 26: el tiempo de retención requerido del GMP_A
 6: la proporción de las pendientes del gradiente normal y del de exploración
 30: % B en el punto inicial menos % B a 27 minutos en el gradiente de exploración
 27: tiempo de recorrido del gradiente de exploración.

- 8.4.3. Tomar soluciones de las muestras problema

Inyectar 100 μ l de sobrenadante o filtrado (8.3.3), medidos con precisión, en el aparato HPLC que deberá estar funcionando a un caudal de 1,0 ml de solución de eluyente (5.2) por minuto.

La composición del eluyente al iniciarse el análisis se obtiene de 8.4.2. Normalmente se sitúa próxima a A:B = 76:24 (5.2). Inmediatamente después de la inyección se inicia un gradiente lineal que da lugar, al cabo de 27 minutos, a un porcentaje de B superior en un 5 %. A continuación comienza un gradiente lineal por el cual la composición del eluyente alcanza el 90 % de B en 5 minutos. Esta composición se mantiene durante 5 minutos, transcurridos los cuales la composición se modifica mediante un gradiente lineal para alcanzar en 5 minutos la composición inicial. Dependiendo del volumen interno del sistema de bombeo, la siguiente inyección puede llevarse a cabo 15 minutos después de haberse alcanzado las condiciones iniciales.

Observaciones

- El tiempo de retención del glicomacropéptido debe ser de unos 26 minutos \pm 2 minutos, lo cual puede conseguirse haciendo variar las condiciones iniciales y finales del primer gradiente. Sin embargo, la diferencia de % B entre las condiciones iniciales y finales del primer gradiente debe mantenerse en 5 % B.
- Los eluyentes deben desgasificarse suficientemente y mantenerse desgasificados. Ello es esencial para que el sistema de bombeo por gradiente pueda funcionar correctamente. La desviación típica del tiempo de retención del pico de los GMP debe ser inferior a 0,1 minutos ($n = 10$).
- Cada 5 muestras debe inyectarse la muestra testigo (5) y emplearse para calcular un nuevo factor de respuesta R (9.1.1).

- 8.4.4. Los resultados del análisis cromatográfico de la muestra problema (E) se obtienen en forma de un cromatograma en el que el pico de los GMP se identifica por su tiempo de retención de 26 minutos aproximadamente.

El integrador (6.10.6) calcula automáticamente la altura máxima H del pico de los GMP. La situación de la línea de base deberá comprobarse en cada cromatograma y se repetirá el análisis o la integración si esta línea no estaba situada correctamente.

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 una interpretación cuantitativa. En caso de duda, repetir el análisis.

8.5. Calibrado

- 8.5.1. Aplicar a las muestras patrón (5.4.1 y 5.4.2) el procedimiento desde el punto 8.2 al 8.4.4, exactamente tal y como se describe. Utilizar soluciones recién preparadas, pues los GMP se degradan en medio tricloroacético al 8 % a temperatura ambiente. A 4 °C, la solución permanece estable durante 24 horas. Cuando se realice una larga serie de análisis, es recomendable emplear una bandeja refrigerada para las muestras en el inyector automático.

Observación

El punto 8.4.2 puede omitirse si el % B en las condiciones iniciales se conoce por análisis previos.

El cromatograma de la muestra patrón (5) debería ser análogo al representado en la figura 1. Aquí, el pico del GMP_A viene precedido por dos picos pequeños. Es imprescindible obtener una separación similar.

- 8.5.2. Antes de proceder a una determinación cromatográfica de las muestras, inyectar 100 µl de la muestra patrón sin suero (0) (5.4.1).

El cromatograma no debe presentar un pico en el tiempo de retención del GMP_A .

- 8.5.3. Determinar los factores 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. Método de cálculo y fórmulas

- 9.1.1. Cálculo del factor de respuesta R:

pico GMP: $R = W/H$

siendo

R = el factor de respuesta del pico de los GMP

H = la altura del pico de los GMP

W = la cantidad de suero en la muestra patrón (5)

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

$W(E) = R \times H(E)$

siendo

W(E) = el porcentaje (m/m) de suero lácteo en la muestra (E)

R = el factor de respuesta del pico de los GMP (9.1.1)

H(E) = la altura del pico de los GMP de la muestra (E)

Si W(E) es superior al 1 % y la diferencia entre el tiempo de retención de la muestra y el de la muestra patrón (5) es inferior a 0,2 minutos, se concluye la presencia de sólidos de suero lácteo.

9.3. Precisión del método

- 9.3.1. Repetibilidad

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

9.3.2. Reproducibilidad

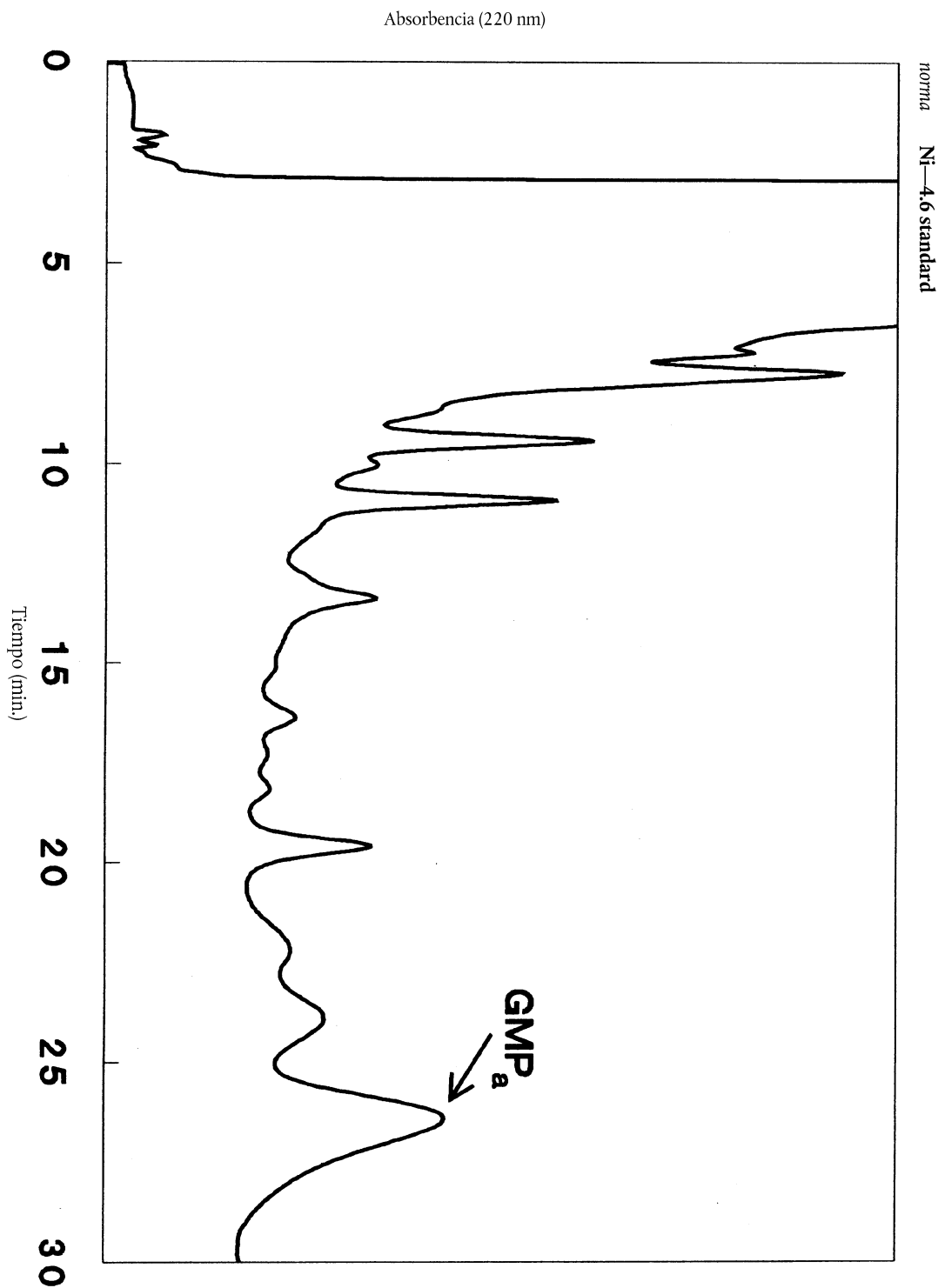
No se ha determinado aún.

9.3.3. Linealidad

Entre 0 y 16 % de suero lácteo debe obtenerse una relación lineal con un coeficiente de correlación $> 0,99$.

9.4. Interpretación

9.4.1. Se concluye la presencia de suero si el resultado obtenido en 9.2 es superior al 1 % m/m y el tiempo de retención del pico de los GMP difiere del tiempo correspondiente a la muestra patrón (5) en menos de 0,2 minutos. El límite del 1 % se establece de conformidad con lo dispuesto en los puntos 9.2 y 9.4.1 del anexo V del Reglamento (CEE) n° 625/78.



ANEXO XX

(Artículo 14)

LECHE DESNATADA EN POLVO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFATIDILSERINA Y DE FOSFATIDILETANOLAMINA**Método de CLAR en fase inversa****1. Objeto y ámbito de aplicación**

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

2. Definición

Contenido de FS + FE: la fracción de masa de la sustancia 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 (OFA) mediante el método de CLAR en fase inversa y detección por fluorescencia. Determinación del contenido de FS y FE en la muestra problema por referencia a una muestra patrón que contiene una cantidad conocida de FEDP.

4. Reactivos

Todos los reactivos 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 patrón 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 de o-ftaldialdehído*

4.3.1. Hidróxido de sodio, solución acuosa 12M

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

4.3.3. 2-mercaptoetanol

4.3.4. o-ftaldialdehído (OFA)

4.4. *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 comprobada

4.4.3. Tetrahidrofurano

4.4.4. Fosfato de sodio y dihidrógeno

4.4.5. Acetato de sodio

4.4.6. Ácido acético

5. Aparatos

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. Matrazes aforados de 10, 50 y 100 ml de capacidad
- 5.7. Jeringas de 20 y 100 μ l de capacidad
- 5.8. Baño ultrasónico
- 5.9. Centrifugadora que funcione a $27\,000 \times g$
- 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 regulable capaz de funcionar a razón de 1,0 ml/min a 200 bar
 - 5.13.2. Automuestreador con capacidad de formar derivados
 - 5.13.3. Calentador de columna regulado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - 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 programa de tratamiento de datos capaz de medir el área bajo los picos
 - 5.13.6. Columna de Licosphere – 100 ($250 \times 4,6$ mm) o una columna equivalente que lleve octadecilsilano (C 18) con una granulometría de 5 μ m.

6. Muestro

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

7. Procedimiento

7.1. Preparación de la solución del patrón interno

Pesar $30,0 \pm 0,1$ mg de monoclóhidrato de triptamina (4.2.3) en un 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 a 0,15 mM.

7.2. Preparación de la solución de muestra problema

Pesar $1,000 \pm 0,001$ g de la muestra de LDP en un vaso de precipitados de 25 ml (5.2). Añadir 10 ml de agua destilada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 μ l de solución de triptamina de 0,15 mM (7.1) con una jeringa (5.7) y enrasar con metanol (4.2.1). Mezclar a fondo por inversión y someter a ultrasonidos (5.8) durante 15 minutos. Centrifugar (5.9) a $27\,000 \times g$ durante 10 minutos y recoger la solución sobrenadante en un frasco de vidrio (5.10).

Nota: la solución de muestra problema deberá almacenarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se proceda al análisis CLAR.

7.3. Preparación de la solución de patrón externo

Pesar 55,4 mg de FEDP (4.1) en un matraz aforado de 50 ml (5.6) y añadir unos 25 ml de cloroformo (4.2.2) con una probeta (5.11). Calentar el matraz de tapón esmerilado a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mezclar a fondo hasta que se disuelva el FEDP. Enfriar el matraz hasta $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 μ l (5.7) de solución de triptamina 0,15 mM (7.1) y enrasar con metanol (4.2.1). Mezclar por inversión.

Nota: la solución de patrón externo deberá almacenarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se proceda al análisis CLAR.

7.4. Preparación del reactivo de derivación

Pesar $25,0 \pm 0,1$ 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 a fondo hasta que se disuelva el OFA. Enrasar con una solución de ácido bórico (4.3.2) y añadir 20 μ l de 2-mercaptoetanol (4.3.3) con una jeringa (5.7).

Nota: el reactivo de derivación deberá conservarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un frasco de vidrio oscuro; permanece estable durante una semana.

7.5. Determinación por CLAR

7.5.1. Solventes de elución (4.4).

Solvente A:

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

Solvente B:

Metanol

7.5.2. Grado de elución preconizado:

Tiempo (min)	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 la muestra.

7.5.4. Equilibrado de la columna

El sistema se pondrá en marcha a diario. Llenar la columna con solución de 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, enjuagar 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

7.5.6. Efectuar la serie de análisis cromatográficos sin modificar el tiempo entre ciclos con el fin de obtener periodos 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 enjuagarse con solución de 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 el área del pico mediante la integración de valle a valle.

7.6.2. Pico de la triptamina

La triptamina se eluye en forma de un solo pico (figura 1). 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), la FS se eluye en forma de dos picos principales parcialmente no resueltos precedidos de un pico menor. La FE se eluye en forma de tres picos parcialmente no resueltos. 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:

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

siendo

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

A₁ = área del pico de FEDP de la solución de patrón externo (7.3)

A₂ = área del pico de FS o FE de la solución de la muestra problema (7.2)

T₁ = área del pico de triptamina de la solución de patrón externo (7.3)

T₂ = 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 FIL (¹). El límite de reproducibilidad provisional se ha calculado de conformidad con la letra b) del anexo III.

9.1. Repetibilidad

La desviación típica relativa de la repetibilidad, que expresa la variabilidad de los resultados de análisis independientes obtenidos por el mismo analista 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 analistas de distintos laboratorios, utilizando materiales distintos y en distintas condiciones para el análisis de la misma muestra problema, la diferencia relativa entre ambos resultados no deberá sobrepasar el 11 % de la media aritmética de los resultados.

10. Bibliografía

- 10.1. Resmini (P.), Pellegrino (L.), Hogenboom (J.A.), Sadini (V.), Rampilli (M.), *Détection des solides du babeurre dans le lait écrémé en poudre par dosage des aminophospholipides à la CLHP*, Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39, 395 (1988).

⁽¹⁾ Norma internacional FIL 135B/1991; leche y productos lácteos; características de precisión de los métodos analíticos; esquema relativo a un método de estudio en colaboración.

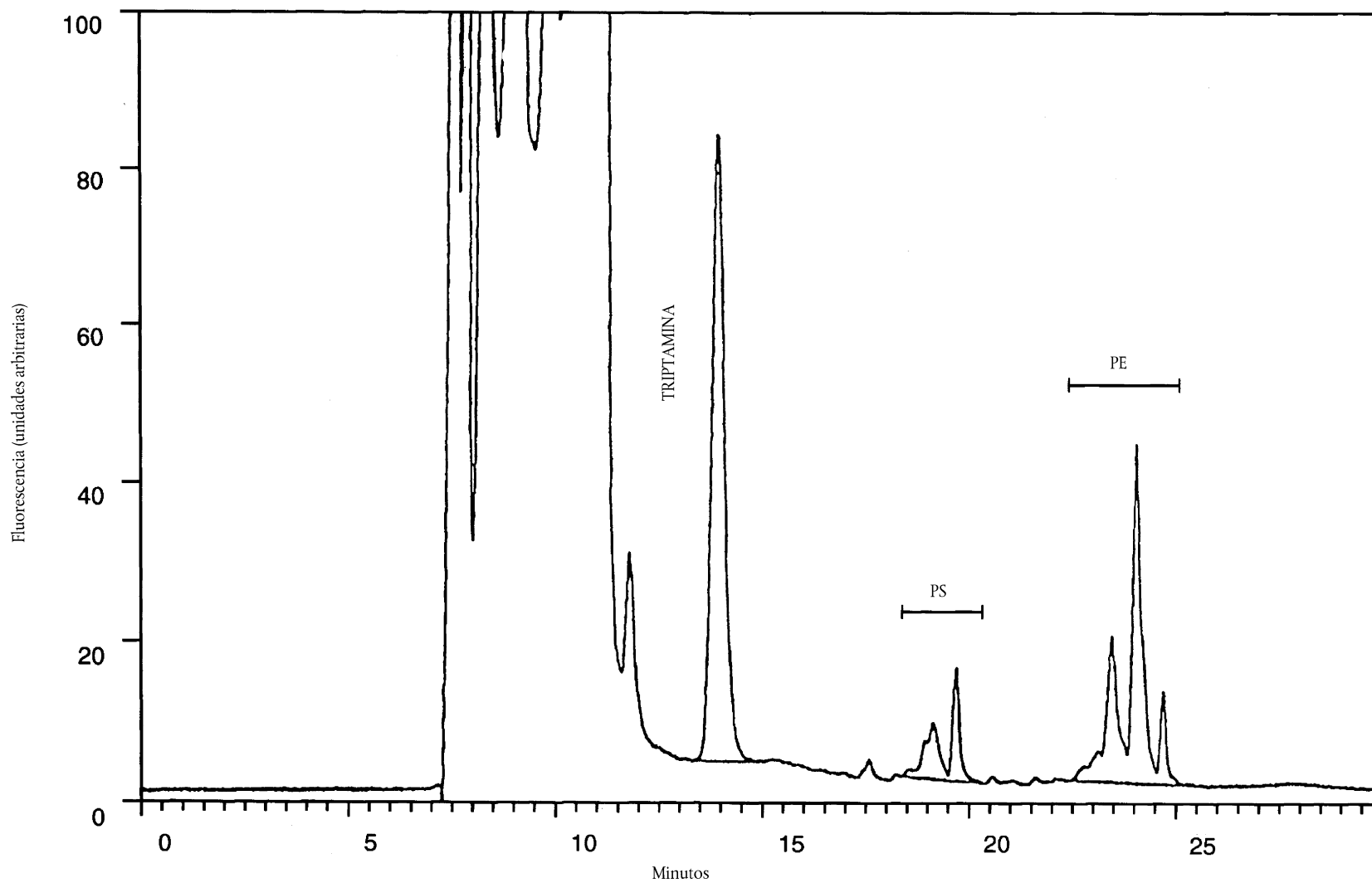


Figura 1: CLAR de los derivados de la fosfatidilserina (FS) y de la fosfatidiletanolamina (FE) contenidos en el extracto de metanol de la leche desnatada en polvo reconstituida. Se indica el modo de integración de los picos de FS, FE y de la triptamina (patrón interno).

ANEXO XXI

(Artículo 15)

DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICO 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 de polvo + 9 ml agua destilada) para realizar el ensayo. Éste se llevará a cabo 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 penicilinasas 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 penicilinasas + 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.

ANEXO XXII

(Artículo 16)

DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE LECHE DESNATADA EN POLVO PRESENTE EN LOS PIENSOS COMPUESTOS POR COAGULACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PARACASEÍNA**1. Objetivo**

Determinación de la cantidad de leche desnatada en polvo presente en un pienso compuesto por coagulación enzimática de la paracaseína.

2. Ámbito de aplicación

Este método se aplica a los piensos compuestos que contengan al menos un 10 % de leche desnatada en polvo; la presencia de cantidades importantes de suero de mantequilla o de determinadas proteínas no lácteas puede provocar interferencias.

3. Principio del método

- 3.1. Solubilización de la caseína contenida en el pienso compuesto por extracción con una solución de citrato de sodio.
- 3.2. Restablecimiento de la concentración en iones calcio necesaria para la precipitación de la paracaseína; transformación de la caseína en paracaseína por medio del cuajo.
- 3.3. Determinación del nitrógeno de la paracaseína previa mineralización por el método de Kjeldahl, contemplado en la norma FIL 20 A 1986; cálculo de la cantidad de leche desnatada en polvo presente tomando como base un contenido mínimo en caseína del 27,5 % (véase el punto 9.1).

4. Reactivos

Los reactivos utilizados serán de pureza analítica. El agua utilizada será agua destilada o de pureza equivalente. Con excepción del cuajo (4,5), todos los reactivos y soluciones empleados deberán estar libres de sustancias nitrogenadas.

- 4.1. Citrato trisódico dihidratado (solución al 1 % p/v)
- 4.2. Cloruro de calcio (solución 2 M). Pesar 20,018 g de CaCO_3 (pureza analítica) en una cápsula de porcelana de tamaño adecuado (150-200 ml) o en un vaso de precipitados. Cubrir con agua destilada y transferir a un baño maría. Añadir lentamente de 50 a 60 ml de una solución de HCl (proporción HCl: agua = 1:1) para disolver completamente el carbonato. Mantener en el baño maría hasta deshidratación del CaCl_2 para eliminar el HCl que no haya reaccionado. Trasvasar con agua destilada a un matraz redondo aforado de 100 ml y diluir hasta enrasar. Controlar el valor de pH para que no sea inferior a 4,0. Guardar la solución en refrigerador.
- 4.3. Hidróxido de sodio 0,1 N
- 4.4. Ácido clorhídrico 0,1 N
- 4.5. Solución de cuajo normalizada al 1:10 000 (extracto de cuajar de ternero); conservar en frigorífico a 4-6 °C.
- 4.6. Reactivos para la determinación del nitrógeno según el método de Kjeldahl contemplado en la norma FIL 20 A 1986.

5. Equipo

Material habitual de laboratorio y, en particular:

- 5.1. Mortero o molino homogeneizador
- 5.2. Balanza analítica
- 5.3. Centrifugadora de mesa (de 2 000 a 3 000 rpm) con tubos de centrífuga de 50 ml
- 5.4. Agitador magnético con varillas de 10-15 mm
- 5.5. Vasos de precipitados de 150-200 ml
- 5.6. Matraces de 250 ml y de 500 ml
- 5.7. Embudos de vidrio de 60-80 mm de diámetro
- 5.8. Filtros circulares sin cenizas, de filtración rápida, con un diámetro de 150 mm (S.S. 589² S.S. 595 1/2)
- 5.9. Pipetas de diferentes tamaños

- 5.10. Baño maría con termostato regulado a 37 °C
- 5.11. pHmetro
- 5.12. Mineralizador y destilador para el método de Kjeldahl con los accesorios correspondientes
- 5.13. Bureta graduada de 25 ml para la determinación
- 5.14. Frasco lavador de plástico para agua destilada
- 5.15. Espátulas de acero inoxidable
- 5.16. Termómetro
- 5.17. Horno de temperatura regulable

6. Procedimiento

- 6.1. Preparación de la muestra

Triturar 10-20 g de la muestra en un mortero o agitarlos en un homogeneizador mezclador con el fin de obtener una mezcla homogénea.
- 6.2. Disolución de la leche en polvo y separación del residuo insoluble
 - 6.2.1. Pesar 1,000 g \pm 0,002 g de pienso compuesto bien homogeneizado (6.1) directamente en un tubo de centrifuga de 50 ml. Añadir 30 ml de solución de citrato trisódico (4.1) previamente calentado a 45 °C. Dispersar el polvo por agitación magnética durante 5 minutos como mínimo.
 - 6.2.2. Centrifugar a 500 g (de 2 000 a 3 000 rpm) durante 10 minutos y recoger el sobrenadante acuoso en un vaso de precipitados de 150-200 ml. Evitar la pérdida de partículas insolubles durante el trasvase del sobrenadante.
 - 6.2.3. Realizar otras dos extracciones del residuo, siguiendo el mismo procedimiento y mezclando los tres extractos acuosos.
 - 6.2.4. En caso de que se produjera una subida de materia grasa, enfriar hasta solidificación de la fase grasa, y quitarla a continuación con una espátula.
- 6.3. Coagulación de la caseína por las enzimas del cuajo
 - 6.3.1. Al extracto acuoso total (alrededor de 100 ml) añadir gota a gota, con agitación, 3,4 ml de una solución saturada de cloruro de calcio (4.2). Ajustar el pH a 6,4 - 6,5 con soluciones diluidas de NaOH (4.3) o HCl (4.4). Poner la solución en un baño termostatzado a 37 °C durante 15 o 20 minutos para que se establezca el equilibrio salino, que se manifestará por la aparición de un aspecto lactescente.
 - 6.3.2. Trasvasar el líquido a uno o dos tubos de centrifuga y centrifugar a 2 000 g durante 10 minutos para eliminar el precipitado. Trasvasar el sobrenadante, sin lavar el sedimento, a uno o dos tubos de cyriotiske
 - 6.3.3. Llevar la temperatura del sobrenadante a 37 °C. Añadir gota a gota al extracto, agitando a la vez, 0,5 ml de cuajo líquido (4.5). La coagulación se producirá en 1 o 2 minutos.
 - 6.3.4. Poner de nuevo la muestra en el baño maría y dejarlo a la temperatura de 37 °C durante 15 minutos. Sacar la muestra del baño y romper el coágulo por agitación. Centrifugar a 2 000 g durante 10 minutos. Filtrar el sobrenadante con un filtro de papel adecuado ⁽¹⁾ (Whatman n° 541 o equivalente) y conservar el filtro. Lavar el sedimento en el tubo de centrifuga con 50 ml de agua a 35 °C, aproximadamente, agitando el sedimento.

Centrifugar de nuevo a 2 000 g durante 10 minutos. Filtrar el sobrenadante empleando el mismo filtro anterior.
- 6.4. Determinación del nitrógeno caseínico
 - 6.4.1. Después del lavado, transferir cuantitativamente el sedimento al mismo papel de filtro (6.3.4) utilizando agua destilada. Introducir el filtro en el matraz Kjeldahl. Determinar el nitrógeno siguiendo el método Kjeldahl descrito en la norma FIL 20 A 1986.

7. Ensayo en blanco

- 7.1. Efectuar sistemáticamente un ensayo en blanco utilizando un filtro sin cenizas (5.8) humedecido con una mezcla compuesta de 90 ml de solución de citrato de sodio (4.1), 1 ml de solución saturada de cloruro de calcio (4.2) y 0,5 ml de cuajo líquido (4.5), y lavado 3 veces con 15 ml de agua antes de su mineralización por el método Kjeldahl contemplado en la norma FIL 20 A 1986.
- 7.2. Restar al volumen de ácido (4.4) utilizado para la determinación de la muestra examinada el volumen necesario para el ensayo en blanco.

⁽¹⁾ Deberá usarse un papel de filtro rápido sin cenizas.

8. Ensayo de control

- 8.1. Con el fin de controlar el procedimiento analítico y los reactivos mencionados más arriba, realizar una determinación con un pienso compuesto, de composición normalizada, cuyo contenido en leche desnatada en polvo se haya establecido mediante un análisis circular. El resultado medio de una determinación por duplicado no deberá apartarse en más de un 1 % del obtenido por el análisis circular.

9. Expresión de los resultados

- 9.1. El porcentaje de leche desnatada en polvo en el pienso compuesto se calculará mediante la fórmula siguiente

$$\% \text{ MMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) - 2,81}{0,908}$$

donde N representa el porcentaje en nitrógeno de la paracaseína; 27,5 es el factor de conversión de la caseína determinada en porcentaje de leche desnatada en polvo; 2,81 y 0,908 son factores de corrección obtenidos por análisis de regresión.

10. Precisión del método**10.1. Repetibilidad**

Al menos en el 95 % de los casos estudiados, la diferencia entre dos resultados individuales, obtenidos con una misma muestra, en el mismo laboratorio y por el mismo operador, no deberá superar los 2,3 g de leche desnatada en polvo por 100 g de pienso compuesto examinado.

10.2. Reproducibilidad

Al menos en el 95 % de los casos estudiados, la diferencia entre los resultados obtenidos por los laboratorios con una misma muestra no deberá superar los 6,5 g de leche desnatada en polvo por 100 g de pienso compuesto examinado.

11. Límite de tolerancia

El valor CrD_{95} (diferencia crítica; límite de confianza del 95 %) se calculará aplicando la siguiente fórmula (ISO 5725):

$$CrD_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

(R: reproducibilidad; r: repetibilidad)

Doble determinación: $CrD_{95} = 4,5$ g

Si el resultado del análisis químico no difiere del contenido declarado de leche desnatada en polvo en más de 4,5 g (doble determinación), se considerará que la partida de piensos compuestos cumple esta disposición del Reglamento.

12. Observaciones

- 12.1. La adición de un porcentaje importante de determinadas proteínas no lácteas, como las de soja, siempre que se hayan calentado con la leche desnatada en polvo, produce resultados demasiado elevados debido a la coprecipitación de éstas con la paracaseína de la leche.
- 12.2. La adición de suero de mantequilla puede originar a veces cifras demasiado bajas, pues la determinación no se refiere más que al extracto magro. La adición de determinados sueros de mantequilla de nata ácida puede dar lugar a cifras claramente inferiores, ya que su disolución en la solución de citrato no es completa.
- 12.3. La adición de, al menos, 0,5 % de lícitina puede dar lugar asimismo a resultados demasiado bajos.
- 12.4. La incorporación de leche en polvo calentada a alta temperatura (*high-heat*) puede producir valores demasiado elevados, debido a la coprecipitación de determinadas proteínas del lactosuero con la paracaseína de la leche.

ANEXO XXIII

(Artículo 17)

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ALMIDÓN EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO, EN LA LECHE EN POLVO DESNATURALIZADA Y EN LOS PIENSOS COMPUESTOS**1. Ámbito**

El presente método sirve para la detección del almidón que se utiliza como marcador en la leche en polvo desnaturalizada.

El nivel más bajo de detección del método es de aproximadamente 0,05 g de almidón por 100 g de muestra.

2. Principio

La reacción se basa en la utilizada en yodometría:

- fijación por parte de los coloides del yodo libre en la solución acuosa,
- absorción por parte de las micelas de almidón y formación de color.

3. Reactivos**3.1. Solución de yodo**

- Yodo: 1 g,
- Yoduro de potasio: 2 g,
- Agua destilada: 100 ml.

4. Instrumentos

- 4.1. Balanza analítica.
- 4.2. Baño de agua.
- 4.3. Tubos de ensayo de 25 mm por 200 mm.

5. Procedimiento

Pésese 1 g de la muestra y viértase en el tubo de ensayo (4.3).

Añádanse 20 ml de agua destilada y agítese el tubo para dispersar la muestra.

Introdúzcase en el baño de agua hirviendo (4.2) y deposítase en éste durante cinco minutos.

Retírese del baño y enfríese a la temperatura ambiente.

Añádanse 0,5 ml de solución de yodo (3.1), agítese y obsérvese el color resultante.

6. Expresión de los resultados

La presencia de almidón nativo en la muestra se refleja mediante una coloración azul.

Si la muestra contiene almidón modificado, es posible que el color no sea azul.

7. Observaciones

El color, la intensidad del color y la apariencia microscópica del almidón variarán dependiendo del origen del almidón nativo, por ejemplo, maíz o patata y del tipo de almidón modificado presente en la muestra.

En presencia de almidones modificados, el color se vuelve violeta, rojo o marrón, dependiendo del grado de modificación de la estructura cristalina del almidón nativo.

ANEXO XXIV

Artículo 18

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN EL SUERO DE MANTEQUILLA ÁCIDO EN POLVO**1. Objetivo**

Determinar el contenido de humedad del suero de mantequilla ácido en polvo destinado a la alimentación animal.

2. Principio

La muestra se seca al vacío. La pérdida de masa se determina pesando la muestra.

3. Equipo

3.1. Balanza analítica.

3.2. Recipientes secos de metal inoxidable o de cristal, provistos de tapadera que garantice un cierre hermético; superficie útil que permita obtener un reparto de la muestra del orden de 0,3 g/cm².

3.3. Estufa de vacío de calentamiento eléctrico regulable, provista de una bomba de aceite y de un dispositivo para introducción de aire caliente deshidratado o de un deshidratante (por ejemplo, óxido de calcio).

3.4. Desecador que contenga un deshidratante eficaz.

3.5. Estufa de secado ventilada, controlada termostáticamente, a 102 ± 2 °C.

4. Método operativo

Calentar un recipiente (3.2), provisto de tapadera, en la estufa de secado (3.5) durante 1 hora como mínimo. Colocar la tapadera en el recipiente, trasladarlo inmediatamente al desecador (3.4), dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar con precisión de 0,5 mg.

Pesar un recipiente (3.2) provisto de tapadera con precisión de 0,5 mg. Pesar en el recipiente pesado, con precisión de 1 mg, aproximadamente 5 g de la muestra, y repartirla uniformemente. Colocar el recipiente sin tapadera en la estufa de vacío (3.3) previamente calentada a 83 °C. Para evitar que la temperatura de la estufa descienda demasiado, introducir el recipiente lo más rápidamente posible.

Llevar la presión a 100 Torr (13,3 kPa) y dejar secar a dicha presión durante 4 horas, bien bajo una corriente de aire seco y caliente, o bien mediante la utilización de un deshidratante (300 gr aproximadamente para veinte muestras). En este último caso, interrumpir la conexión con la bomba de vacío cuando se haya alcanzado la presión establecida. Contar la duración del secado a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo la temperatura de 83 °C. Con precaución, restablecer la presión atmosférica en la estufa. Abrir la estufa, cubrir inmediatamente el recipiente con la tapadera, retirar el recipiente de la estufa, dejar enfriar durante 30 a 45 minutos en el desecador (3.4) y pesar con precisión de 1 mg. Proceder a una desecación complementaria de 30 minutos en la estufa de vacío (3.3) a una temperatura de 83 °C y pesar de nuevo. La diferencia entre las dos pesadas no deberá exceder del 0,1 % de humedad.

5. Cálculo de los resultados

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

donde:

E = masa inicial, en gramos, de la muestra,

m = masa, en gramos, de la muestra seca.

6. Precisión**6.1. Límite de repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas en el más corto intervalo de tiempo posible por un técnico que utilice el mismo equipo en un material de prueba idéntico no deberá exceder de 0,4 gr de agua por 100 gr de suero de mantequilla ácido en polvo.

6.2. *Límite de reproducibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas por técnicos en laboratorios diferentes, utilizando equipos diferentes en un material de prueba idéntico, no deberá exceder de 0,6 gr de agua por 100 gr de suero de mantequilla ácido en polvo.

6.3. *Fuentes de los datos de precisión*

Los datos de precisión fueron determinados en un experimento realizado en 1995 en el que participaron ocho laboratorios y doce muestras (seis experimentos secretos).

ANEXO XXV

(Artículo 19)

MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE GRASAS EXTRAÑAS EN LA GRASA DE LA LECHE MEDIANTE ANÁLISIS DE TRIGLICÉRIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES — REVISIÓN 1**1. Objetivo y ámbito de aplicación**

En esta norma se establece un método de detección de grasas extrañas, tanto vegetales como animales, sebo de bovino y manteca de cerdo en la grasa láctea de la leche y de los productos lácteos, mediante análisis de triglicéridos por cromatografía de gases.

El uso de fórmulas definidas de triglicéridos permite detectar cualitativa y cuantitativamente las grasas vegetales y animales en la grasa láctea pura, independientemente de las condiciones de alimentación o lactancia.

Nota 1: Aunque el ácido butírico (C4), que sólo se presenta en la grasa láctea, permite que se hagan estimaciones cuantitativas de cantidades pequeñas a medias de grasa láctea en grasas vegetales, es difícil que proporcione información cualitativa y cuantitativa en caso de adición de hasta, al menos, 20 % (en peso) de grasa extraña a grasa láctea pura, debido a la amplia variación de C4, que oscila aproximadamente entre 3,5 y 4,5 % (en peso).

Nota 2: Prácticamente sólo pueden obtenerse resultados cuantitativos con el análisis de triglicéridos, ya que el contenido en esteroides de las grasas vegetales es diferente según las condiciones de producción y tratamiento.

2. Definición

En la presente norma, se entenderá por grasas extrañas en la grasa láctea todas las grasas vegetales y animales excepto la grasa láctea.

3. Principio del método

Tras extracción de la grasa láctea, se prepara una solución madre. A partir de esta solución, se determina los triglicéridos (números de carbono total) por cromatografía de gases en columnas empaquetadas. Introduciendo el peso porcentual de las moléculas grasas de diferente tamaño (C24 — C54 — sólo números pares) en la fórmula de triglicéridos, las grasas extrañas se detectan cualitativamente o bien se determinan cuantitativamente.

Nota: Para la evaluación descrita aquí, puede utilizarse la cromatografía capilar de gases, se si tienen garantías de obtener resultados comparables ⁽¹⁾.

4. Reactivos

Deben utilizarse productos químicos de calidad analítica.

- 4.1. Gas portador: nitrógeno, pureza $\geq 99,996$ %.
- 4.2. Triglicéridos patrón ⁽²⁾ saturados, así como colesterol, para normalizar una grasa láctea patrón, con arreglo a la sección 6.5.4.
- 4.3. Metanol, exento de agua.
- 4.4. n-Hexano.
- 4.5. n-Heptano.
- 4.6. Tolueno.
- 4.7. Solución de dimetilclorosilano: se disuelven 50 ml de dimetilclorosilano en 283 ml de tolueno.
- 4.8. Gas combustible: hidrógeno y aire sintético.
- 4.9. Fase estacionaria: 3 % OV-1 sobre 125/150 μm (100/120 mallas) de Gas ChromQ ⁽³⁾.
- 4.10. Solución al 10 % de manteca de cacao.

5. Instrumentos

Equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

- 5.1. Cromatógrafo de gases de temperatura elevada, apropiado para funcionar al menos a 400 o 450 °C, equipado con un detector de ionización de llama y un controlador de flujo de masa constante para el gas portador. Gas de combustión: 30 ml/min H₂, 270 ml/min de aire sintético.

⁽¹⁾ Ya se han descrito métodos adecuados: véase D. Precht y J. Molkentin: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4, 16-17 (1993).

⁽²⁾ Existen productos adecuados en el comercio.

⁽³⁾ Los nombres comerciales, por ejemplo, Extrelut, Gas ChromQ, Chrompack, indican la existencia de productos adecuados disponibles en el comercio especializado. Esta información sirve para facilitar la preparación del patrón por el usuario, pero no supone que se exija utilizar este producto. La indicación del grano se pasó a la unidad del SI μm con arreglo al BS 410: 1988 «British Standard Specification for test sieves».

Debido a lo elevado del flujo de gas portador, la boquilla de la llama debe ser particularmente ancha.

Nota: Debido a las elevadas temperaturas que se dan durante el análisis de los triglicéridos, las piezas de contacto de cristal en el detector o en el sistema inyector deben limpiarse frecuentemente.

El cromatógrafo de gases debe estar dotado de diafragmas, resistentes a las temperaturas elevadas, que puedan utilizarse frecuentemente y muestren en general un grado muy bajo de fugas.

Nota: Son adecuados los diafragmas Chromblue (marca comercial) (Chrompack).

Los diafragmas deben cambiar periódicamente, por ejemplo cada 100 inyecciones aproximadamente o tan pronto como la resolución disminuya (véase la figura 4).

5.2. Columna de cromatografía:

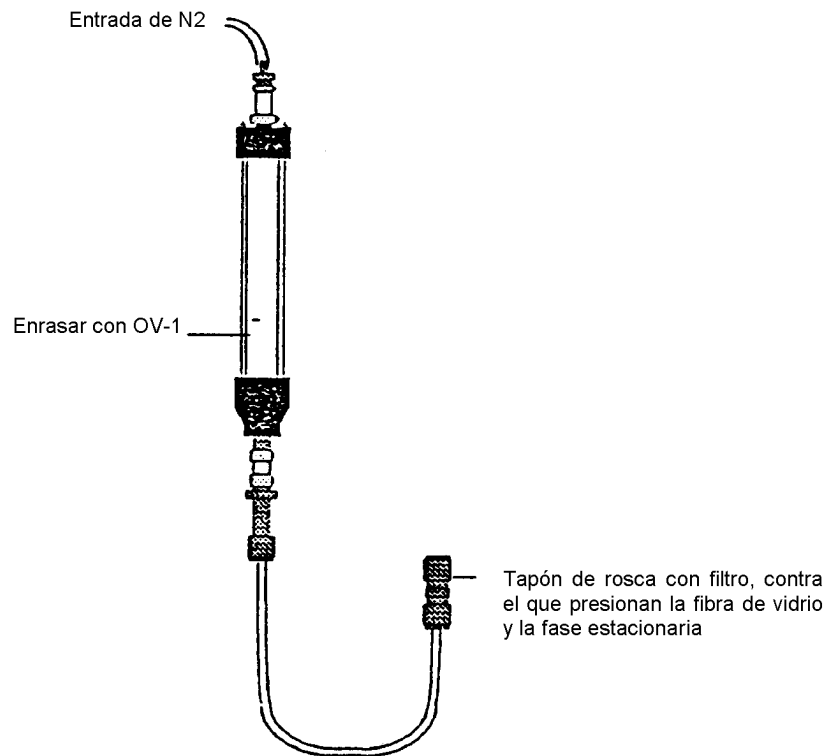
Columna de vidrio en forma de U (2 mm de diámetro interno, 500 mm de longitud), que se silaniza en primer lugar según la sección 6.1 con dimetilclorosilano, a fin de desactivar la superficie del vidrio.

Nota: También son adecuadas las columnas empaquetadas algo más largas (800-2 000 mm de longitud), con las que puede lograrse una reproducibilidad de los resultados ligeramente superior. Por otra parte, la fase estacionaria presenta ocasionalmente fracturas tras el funcionamiento, lo que puede provocar, a su vez, peores resultados cuantitativos. Por otra parte, la llama del detector se apaga fácilmente como resultado del elevadísimo flujo del gas portador necesario, que es de 75 a 82 ml/min.

5.3. Dispositivo para rellenar la columna (véase la figura 1):

Figura 1

Rellenado de la columna



Columna de vidrio por rellenar

- 5.3.1. Columna de plástico con extremos dotados de tapones de rosca, provista de un enrase hasta el que puede ponerse la cantidad necesaria de fase estacionaria.
- 5.3.2. Tamiz fino (tamaño de malla de 100 μm) con tapón de rosca, adecuado para cerrar la columna de vidrio según la figura 1.
- 5.3.3. Lana de vidrio desactivada y sinalizada.
- 5.3.4. Vibrador para distribuir uniformemente la fase estacionaria durante la operación de rellenado.
- 5.4. Columna Extrelut⁽¹⁾ de 1 a 3 ml con silica gel. Esta columna puede utilizarse de forma alternativa en la extracción para obtener la grasa láctea.

⁽¹⁾ Véase la nota 3 de la página 86.

- 5.5. Junta de grafito de 6,4 mm (1/4") con perforación de 6 mm.
- 5.6. Dispositivos para silanizar la superficie de vidrio de la columna según la sección 6.1.
 - 5.6.1. Frasco de Woulff.
 - 5.6.2. Bomba de succión de agua.
- 5.7. Baño María, regulable a (50 ± 2) °C.
- 5.8. Estufa secadora, regulable (50 ± 2) °C y (100 ± 2) °C.
- 5.9. Pipeta de microlitro.
- 5.10. Pipeta graduada de 5 ml para medir 1,5 ml de metanol.
- 5.11. Matraz redondo de 50 ml.
- 5.12. Matraz Erlenmeyer, de 50 ml de volumen nominal.
- 5.13. Embudo.
- 5.14. Filtro de poro fino.
- 5.15. Evaporador giratorio.
- 5.16. Ampollas de 1 ml de volumen nominal, con tapón de aluminio, con diafragma en el interior.
- 5.17. Jeringa de inyección, cuyo émbolo no debe llegar a la boquilla de la aguja.

Nota: Estas jeringas permiten obtener una reproducibilidad mejor de los resultados.

A fin de evitar que se estropee el diafragma, es necesario verificar periódicamente el estado de la boquilla de la aguja (por ejemplo, con un microscopio binocular).

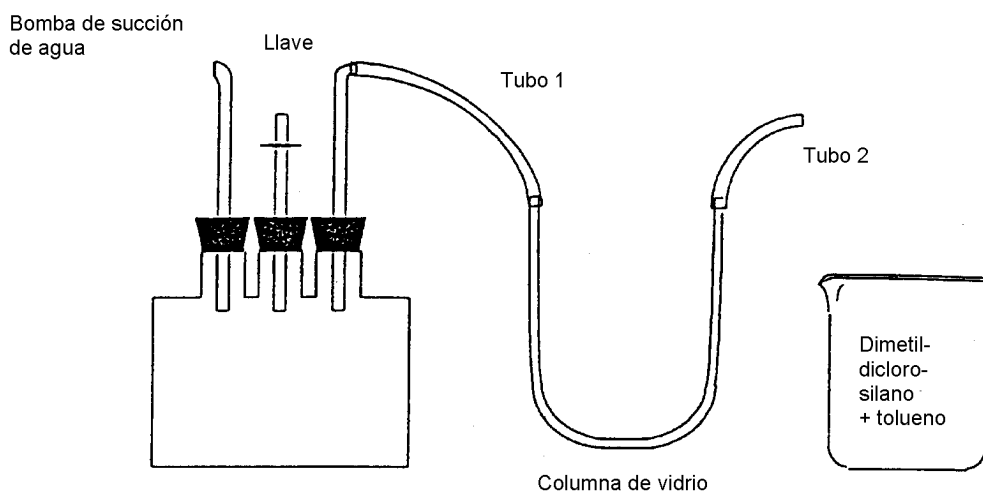
6. Procedimiento

6.1. Preparación de la columna (sinalización):

Tras conectar el frasco de Woulff, según se indica en la figura 2, con la bomba de succión de agua se introduce el tubo 2 en la solución del punto 4.7. Al cerrar la llave se llena la columna; posteriormente se retiran los dos tubos.

Figura 2

Montaje para la silanización



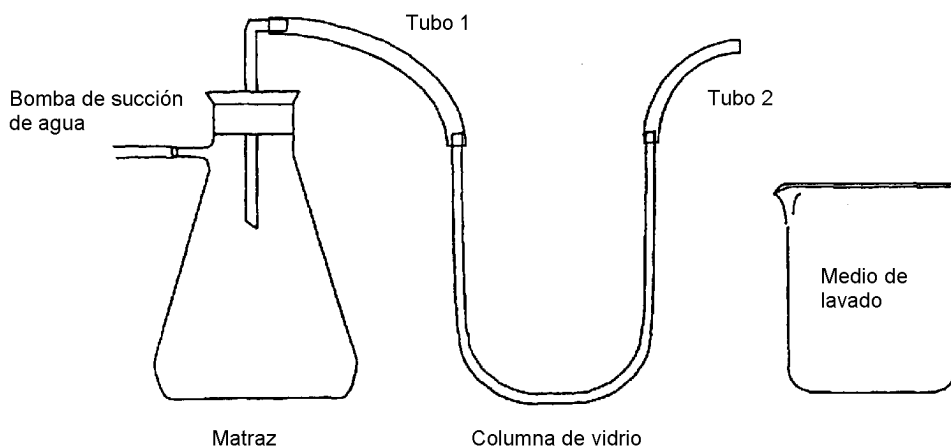
La columna se fija a un soporte y se rellena completamente con la solución de dimetildiclorosilano mediante una pipeta.

Al cabo de 20 o 30 minutos, el frasco de Woulff es sustituido por un frasco de vacío y se vacía la columna conectándola con la bomba de succión de agua (véase la figura 3).

6.2. *Rellenado de la columna:*

A continuación se lava sucesivamente con 75 ml de tolueno y 50 ml de metanol; después, la columna vaciada se seca en la estufa secadora a 100 °C durante unos 30 minutos.

Figura 3

Montaje para el lavado

Para el relleno de la columna, se utiliza el montaje representado en la figura 1. La fase estacionaria del punto 4.9 se introduce en la columna de plástico hasta el enrase.

El extremo inferior de la columna de vidrio que debe rellenarse se cierra con un tapón, de aproximadamente 1 cm de longitud, de lana de vidrio, previamente silanizada, y que se aprieta mediante una varilla de acero. Después se cierra el extremo de la columna con el tamiz del punto 5.3.2.

La columna se rellena a presión (3 bar, con N₂) con la fase estacionaria. Para obtener un empaquetamiento uniforme, continuo y firme, se va desplazando un vibrador arriba y abajo de la columna de vidrio durante la operación de relleno. Una vez terminado éste, se introduce un tapón sólido de lana de vidrio sinalizada que se aprieta en el otro extremo de la columna empaquetada, se cortan los extremos salientes y se aprieta con una espátula para que el tapón se introduzca en la columna unos cuantos milímetros.

6.3. *Preparación de la muestra:*

Para la preparación de la muestra puede seguirse uno de los tres métodos siguientes:

6.3.1. *Aislamiento de la grasa láctea de la mantequilla.*

Se funden de 5 a 10 g de mantequilla en un recipiente adecuado mediante un baño María (5.7) a 50°C.

Se calientan a 50 °C en la estufa secadora un matraz Erlenmeyer de 50 ml y un embudo con filtro (5.14). Se filtra por aquí la capa de la muestra fundida de mantequilla.

Esta grasa láctea está casi exenta de fosfolípidos.

6.3.2. *Extracción de la fracción grasa según el método de Röse-Gottlieb.*

La extracción se puede hacer según la norma FIL 1C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 o 22B: 1987.

Con esta grasa láctea, los fosfolípidos permiten que se obtenga un pico de colesterol que se encuentra aumentado en, aproximadamente, un 0,1 %.

El aspecto de triglicéridos normalizado a 100 cm con el colesterol se ve así influido sólo en una proporción despreciable.

6.3.3. *Extracción de la leche con columnas de gel de sílice.*

Con una pipeta de un microlitro se ponen 0,7 ml de una muestra de leche atemperada a 20 °C en una columna Extrelut de 1 a 3 ml (5.4) y se deja que se distribuya de forma uniforme por el gel de sílice durante unos 5 minutos.

Para desnaturalizar los complejos proteicolípidicos, se añade con pipeta 1,5 ml de metanol. Posteriormente se extrae la muestra con 20 ml de n-hexano. El n-hexano se va añadiendo lentamente en pequeñas cantidades y se recoge a la salida en un matraz redondo de 50 ml, previamente desecado hasta alcanzar un peso constante y conocido.

Tras la extracción, se deja escurrir la columna hasta que quede vacía.

Se eliminan por destilación los disolventes del eluido mediante un evaporador giratorio en un baño María a la temperatura de 40 o 50 °C.

Se seca el matraz y se determina la cantidad de grasa mediante pesada.

Nota: Las extracciones de grasa según los métodos de Gerber, Weibull-Berntrop, Schmid-Bondznyi-Ratzlaff o de aislamiento de grasa láctea con detergentes (método BDI) no son adecuados para el análisis de triglicéridos, ya que estos métodos permiten que pasen a la fase cantidades más o menos grandes de fosfolípidos o glicéridos parciales.

6.4. Preparación de la solución de muestra.

Para la cromatografía de gases, se utiliza una solución al 5 % de la grasa en n-heptano obtenida según la sección 6.3. Para preparar esta solución de la muestra, se pesan y disuelven en cantidades correspondientes de n-heptano las cantidades proporcionales de la muestra obtenida con arreglo a las secciones 6.3.1 y 6.3.2.

Si se ha preparado la muestra con arreglo a la sección 6.3.3, la cantidad de n-heptano que debe añadirse a la muestra contenida del matraz se calcula según el resultado de la pesada y en ella se disuelve el residuo.

Se pone en una ampolla (5.1.6) aproximadamente 1 ml de la solución de la muestra.

6.5. Determinación de los triglicéridos por cromatografía.

Con las elevadas temperaturas de hasta 350 °C para eluir los triglicéridos de cadena larga C 52-C 56, es fácil que se produzca un aumento en la línea de base, especialmente si las columnas no se han acondicionado de forma adecuada al principio. Esta elevación de la línea de base a temperaturas elevadas puede evitarse completamente combinando 2 columnas o bien mediante sustracción de la línea de base.

Con el modo de compensación o funcionamiento con columnas sencillas, así como para las piezas de contacto de vidrio del inyector y del detector, deberán utilizarse juntas de grafito (5.5).

6.5.1. Corrección de la línea de base.

Para evitar la elevación de la línea de base se utilizará uno de los 4 métodos siguientes:

6.5.1.1. Combinación de columnas.

Se utilizan 2 columnas empaquetadas en modo de compensación.

6.5.1.2. Corrección de la línea de base por el cromatógrafo de gases.

Mediante aplicación de un ciclo del cromatógrafo de gases sin inyección de solución de grasa y posterior sustracción de la línea de base mantenida puede evitarse la elevación de la línea de base.

6.5.1.3. Corrección de la línea de base mediante programas informáticos de integración.

Mediante aplicación de un ciclo por el sistema de integración sin inyección de solución de grasa y posterior sustracción de la línea de base mantenida, puede evitarse la elevación de la línea de base.

6.5.1.4. Corrección de la línea de base por acondicionamiento adecuado.

Con un acondicionamiento inicial adecuado de la columna, y unas 20 inyecciones con soluciones de grasa láctea, la elevación de la línea de base a temperaturas elevadas suele ser tan baja que no es necesario aportar ninguna corrección.

6.5.2. Técnica de la inyección.

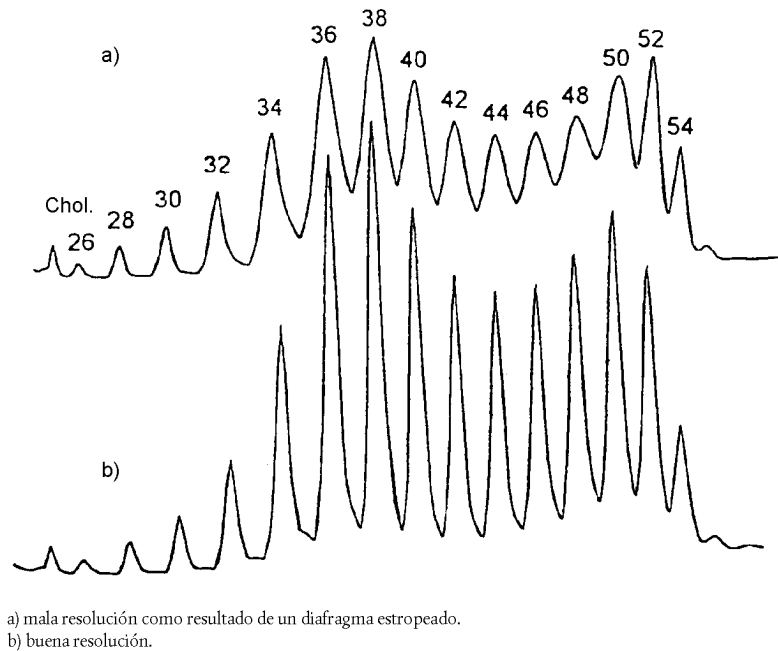
A fin de evitar efectos discriminatorios, se aplica la técnica de la «inyección caliente» para lograr mejores resultados cuantitativos con los componentes de los triglicéridos de elevado punto de ebullición. De esta forma la solución de grasa se introduce en la jeringa y la aguja fría de ésta se calienta antes de realizar la inyección durante unos 3 segundos en la cabeza del inyector. Después se procede a inyectar rápidamente el contenido de la jeringa.

Nota: Con esta técnica de inyección se reduce el riesgo de fenómenos de fraccionamiento dentro de la jeringa o del bloque de inyección. La inyección directa «en columna» en la parte superior, extendida y calentada de la columna no se aplica porque los fragmentos de diafragma que se acumulan en este punto y las contaminaciones pueden eliminarse fácilmente con la técnica utilizada cambiando periódicamente la pieza de contacto del inyector sin tener que desmontar la columna.

Debe evitarse absolutamente curvar el extremo de la aguja por tocar el fondo del vaso de la muestra (incluso aunque apenas sea visible al ojo humano), a fin de no estropear el diafragma.

Figura 4

Cromatograma de los triglicéridos de una muestra de grasa láctea



6.5.3. Acondicionamiento de una columna empaquetada.

Durante las fases a) a c), la parte superior de la columna no estará conectada al detector para evitar contaminaciones.

Las columnas rellenas de acuerdo con la sección 6.2 se acondicionarán de la forma siguiente:

- 15 minutos de flujo de N_2 de 40 ml/min a 50 °C;
- calentamiento al ritmo de 1 °C/min hasta llegar a 355 °C con 10 ml N_2 /min;
- mantenimiento a 355 °C durante 12 o 15 horas;
- 2 inyecciones de 1 μ l de la solución de manteca de cacao (4.10) y programa respectivo de temperatura;
- 20 inyecciones de 0,5 μ l de una solución de grasa láctea durante 2 o 3 días, con arreglo a la sección 6.4.

Nota: La manteca de cacao consiste casi exclusivamente en triglicéridos de elevado punto de ebullición C50 a C 56. La inyección de manteca de cacao sirve para el acondicionamiento especial de esta gama de cadenas largas. Con los triglicéridos de elevado punto de ebullición C 50 a C 54, pueden darse parcialmente factores de respuesta de hasta, aproximadamente, 1,20. Normalmente, al repetir la inyección de una solución de grasa láctea, puede esperarse la reducción de los factores de respuesta inicialmente elevados para C 50 a C 54. Con los triglicéridos de bajo número de acílico, el factor se aproxima a 1.

Se preparan tres pares de columnas rellenas con arreglo a la sección 6.2. Se someten a prueba estos pares acondicionados con un análisis de grasa láctea para ensayo sistemático. Se seleccionará el par que presente los mejores resultados cuantitativos (factores de respuesta casi iguales a 1). Deben desecharse las columnas con factores de respuesta superiores a 1,20.

6.5.4. Calibración.

Para la calibración se determinarán los factores de respuesta de los triglicéridos correspondientes, así como del colesterol, de una grasa láctea (grasa normalizada), utilizando los triglicéridos normalizados (al menos los triglicéridos saturados C 24, C 30, C 36, C 42, C 48 y C 54, así como colesterol; es mejor añadir también C 50 y C 52). Los factores de respuesta intermedios pueden obtenerse mediante interpolación matemática.

Deben hacerse cada día 2 o 3 calibraciones con la grasa normalizada. Si se obtienen resultados casi idénticos, se obtendrán buenos resultados cuantitativos reproducibles en el análisis de triglicéridos de las muestras.

La grasa láctea normalizada tiene un período de validez de varios meses a una temperatura máxima de almacenamiento de - 18 °C y, por tanto, puede utilizarse como patrón.

Nota: el factor de respuesta de cada componente podrá determinarse también mediante la utilización de una grasa de referencia cuya composición de triglicéridos esté certificada, como por ejemplo la DRM 519 (materia grasa láctea anhidra) comercializada por el «Institut de Matériaux de Référence et de Mesures» de Geel, Bélgica.

6.5.5. Programa de temperatura, gas portador y otras condiciones del análisis de los triglicéridos.

Programa de temperatura: temperatura inicial de la columna 210 °C, mantenida durante 1 min, después programar a 6 °C min hasta 350 °C y mantener la temperatura final durante 5 minutos.

Temperatura del detector y del inyector: 370 °C.

Nota: Las temperaturas del detector, del inyector y del horno (temperatura inicial) deben mantenerse constantes (también durante la noche, fines de semana y vacaciones).

Gas portador: nitrógeno, caudal de 40 ml/min.

Nota: Si se utilizan columnas de 80 cm, el caudal debe ser como mínimo de 75 ml/min N₂. El flujo de gas portador debe mantenerse constante (también durante la noche, fines de semana y vacaciones). El flujo del gas portador debe ajustarse de manera que, independientemente de la longitud de la columna, el C 54 se eluya a 341 °C.

Duración del análisis: 29,3 minutos.

Volumen de inyección: 0,5 µl.

Nota: La jeringa debe aclararse varias veces con heptano puro tras cada inyección.

Condiciones del detector de ionización de llama: véase la sección 5.1.

Nota: El detector de ionización de llama se encenderá al iniciarse cada día de trabajo.

7. Integración, evaluación y control de las condiciones de medición

Los triglicéridos con un número impar de *c* acílico ($2n + 1$) se combinan con el triglicérido precedente del número par ($2n$). No se tienen en cuenta los bajos contenidos poco reproducibles de C 56. Los restantes triglicéridos (área de los picos) del cromatograma, incluido el colesterol (pico junto a C 24) se multiplican por los respectivos factores de respuesta de la grasa patrón (última calibración) y se normalizan conjuntamente a 100. Junto al colesterol libre, se evalúan, pues, los triglicéridos C 24, C 26, C 28, C 30, C 32, C 34, C 36, C 38, C 40, C 42, C 44, C 46, C 48, C 50, C 52 y C 54. Los resultados se dan en % en peso (g/100 g).

La evaluación de los picos del cromatograma debe hacerse con un integrador, con el que pueda representarse gráficamente la línea de base. Debe ser posible reintegrar con parámetros optimizados de integración.

Las figuras 5 y 6 muestran dos ejemplos de cromatogramas de triglicéridos. La figura 5 presenta un cromatograma que puede evaluarse bien, mientras que la figura 6 representa un error esporádico en la gama de C 50 a C 54, ya que la línea de base es incorrecta en relación con la de la figura 5. Estos errores típicos pueden detectarse con un elevado grado de certidumbre y evitarse sólo mediante el uso de un integrador con el que se represente gráficamente la línea de base.

Figura 5

Cromatograma de triglicéridos de fácil evaluación de una grasa láctea con la línea de base dibujada

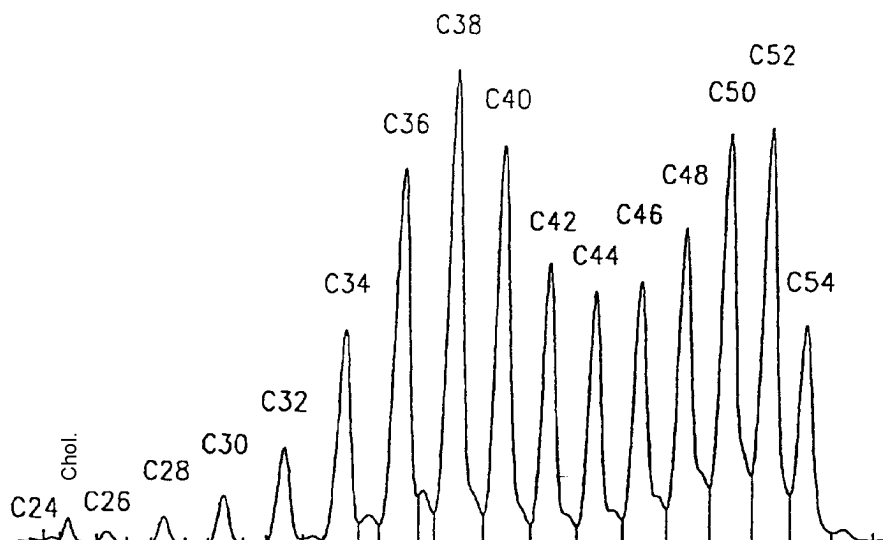
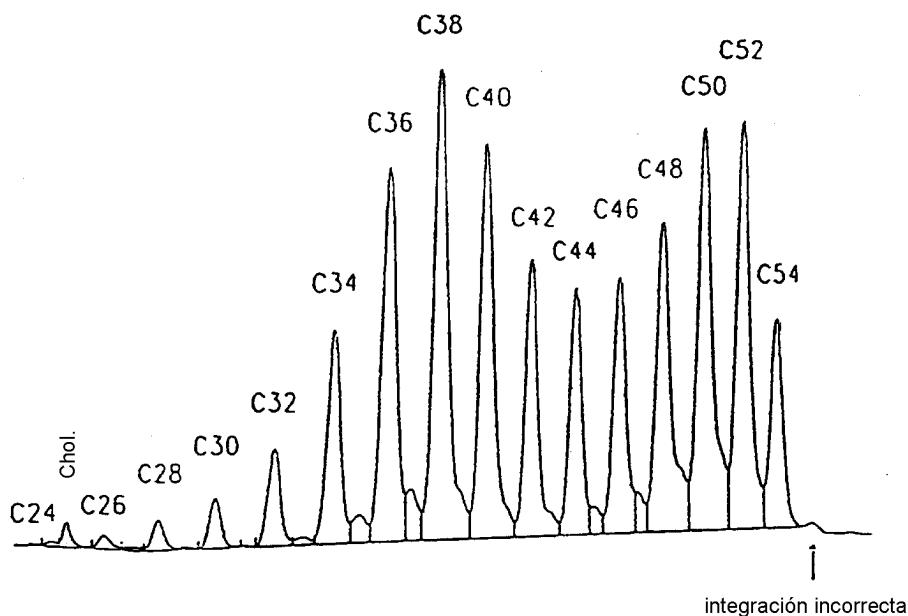


Figura 6
Cromograma de grasa láctea con integración errónea



Para controlar las condiciones de medición se podrán utilizar las desviaciones típicas relativas (DTR: coeficiente de variación x100) presentadas en el cuadro 1, correspondientes a los distintos triglicéridos. Dichas desviaciones han sido calculadas a partir de 19 análisis consecutivos de la misma materia grasa láctea.

Cuadro 1

Desviaciones típicas relativas (DTR) de los contenidos de triglicéridos (n=19)

Triglicéridos	DTR (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

En caso de que las DTR resulten muy superiores a los valores señalados en el cuadro 1, ello significa que las condiciones cromatográficas no son las adecuadas, por lo que deben comprobarse los diafragmas o el flujo del gas portador. Asimismo, es posible que ciertas pequeñas partículas del diafragma hayan formado depósitos sobre la lana de vidrio a la entrada de la columna o que la columna se haya deteriorado por envejecimiento, por la temperatura, etc. (véase la figura 3).

Nota: los valores recogidos en el cuadro 1 no son obligatorios, sino simplemente orientativos para el control de calidad. En caso de admitirse niveles de DTR más elevados, es preciso cumplir pese a todo los límites de repetibilidad y reproducibilidad señalados en el punto 11.

8. Detección cualitativa de grasas extrañas

Para la detección de grasas extrañas, se han elaborado fórmulas de triglicéridos (véase el cuadro 2) con límites S (véase el cuadro 3), dentro de los que pueden fluctuar los valores S de las grasas lácteas puras. Si se superan estos límites, puede aceptarse la presencia de una grasa extraña.

Las fórmulas más sensibles para la detección de la adición de manteca de cerdo es, por ejemplo:

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$$

Nota: Utilizando 755 muestras diferentes de grasa láctea, se estableció un margen de confianza del 99 % de $S = 97,96 - 102,04$ para las muestras de grasa láctea pura con una desviación típica para todos los valores S de $DT = 0,39897$.

A partir de la composición en triglicéridos de una muestra de grasa desconocida, una fórmula de este tipo permite, sin tener que recurrir a un ordenador, verificar de forma simple si la suma del contenido en triglicéridos observado aquí con los factores correspondientes cae fuera del margen de $97,96 - 102,04$ y es muy probable que se trate entonces de un caso de adición de grasa extraña.

Para detectar distintas grasas extrañas, el cuadro 2 presenta diferentes fórmulas de triglicéridos. Para la detección de las grasas extrañas de aceite de soja, aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de linaza, aceite de germen de trigo, aceite de germen de maíz, aceite de algodón y aceite hidrogenado de pescado, para las grasas vegetales, grasa de coco y grasa de palmiste, así como para aceite de palma y sebo de vacuno, puede utilizarse una fórmula común.

Dado que la composición en triglicéridos de las grasas extrañas también está sujeta a fluctuaciones, se han utilizado hasta 4 datos diferentes sobre triglicéridos de grasas, extrañas, medidas experimentalmente del mismo tipo. [Con los mismos tipos de grasa extraña, se ha considerado el límite menos favorable en cada caso (véase el cuadro 4)].

Con la siguiente «fórmula total» pueden obtenerse resultados igualmente buenos con todas las grasas extrañas:

$$- 2,7575 \cdot C26 + 6,4077 \cdot C28 + 5,5437 \cdot C30 - 15,3247 \cdot C32 + 6,2600 \cdot C34 + 8,0108 \cdot C40 - 5,0336 \cdot C42 + 0,6356 \cdot C44 + 6,0171 \cdot C46 = S$$

Se ha visto con cálculos realizados para la detección de cualquier combinación de grasas extrañas en la grasa láctea que, por ejemplo, aunque con la fórmula, para la manteca de cerdo indicada en el cuadro 2 el límite para esta grasa extraña es bajo, tan sólo del 2,7, otras grasas como la grasa de coco, el aceite de palma o la grasa de palmiste con límites de detección de, respectivamente, 26,8, 12,5 y 19,3 %, sólo pueden detectarse con esta fórmula si se han añadido a la grasa láctea cantidades muy elevadas. Esto es aplicable también a otras fórmulas del cuadro 2.

Cuadro 2

Fórmulas de triglicéridos para detectar diversas grasas extrañas en la grasa láctea, con indicación de las desviaciones típicas DT del valor S

Fórmula para aceite de soja, de girasol, de oliva, de colza, de linaza, de germen de trigo, de germen de maíz, de algodón y de pescado

$$2,0983 \cdot C30 + 0,7288 \cdot C34 + 0,6927 \cdot C36 + 0,6353 \cdot C38 + 3,7452 \cdot C40 - 1,2929 \cdot C42 + 1,3544 \cdot C44 + 1,7013 \cdot C46 + 2,5283 \cdot C50 = S; SD = 0,38157$$

Fórmula para grasa de coco y de palmiste

$$3,7453 \cdot C32 + 1,1134 \cdot C36 + 1,3648 \cdot C38 + 2,1544 \cdot C42 + 0,4273 \cdot C44 + 0,5809 \cdot C46 + 1,2926 \cdot C48 + 1,0306 \cdot C50 + 0,9953 \cdot C52 + 1,2396 \cdot C54 = S; SD = 0,11323$$

Fórmula para aceite de palma y sebo de vacuno

$$3,6644 \cdot C28 + 5,2297 \cdot C30 - 12,5073 \cdot C32 + 4,4285 \cdot C34 - 0,2010 \cdot C36 + 1,2791 \cdot C38 + 6,7433 \cdot C40 - 4,2714 \cdot C42 + 6,3739 \cdot C46 = S; SD = 0,81094$$

Fórmula para manteca de cerdo

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S; SD = 0,39897$$

Por tanto, para comprobar una muestra de grasa desconocida deberán utilizar todas las fórmulas recogidas en el cuadro 2 y la fórmula total (2), si es probable que la muestra consista en una mezcla de grasa láctea y una de las catorce diferentes grasas extrañas o una combinación de dichas grasas extrañas. Si, al introducir los triglicéridos de una muestra de grasa para analizar se obtiene un valor S que cae fuera de los márgenes del cuadro 3 de sólo una de las cinco fórmulas, entonces lo más probable es que la muestra consista en una grasa láctea modificada. La detección de una grasa extraña en grasa láctea mediante una de las cuatro fórmulas del cuadro 2 no permite extraer conclusiones sobre el tipo de la mezcla de grasa extraña.

Cuadro 3

Límites S para grasas lácteas

Fórmula para la detección	Margen de S
De aceite de soja, girasol, oliva, colza, linaza, germen de trigo, germen de maíz, algodón, pescado	98,05 — 101,95
De grasa de coco y de palmiste	99,42 — 100,58
De aceite de palma y sebo de vacuno	95,90 — 104,10
De manteca de cerdo	97,96 — 102,04
Fórmula total	95,68 — 104,32

En el cuadro 4, se indican los límites de detección correspondientes a las distintas grasas extrañas con una confianza del 99 %. La primera columna presenta los límites mínimos de detección correspondientes a las mejores fórmulas de grasa láctea del cuadro 2. En la segunda columna se muestran los límites de detección correspondientes a la fórmula total. Aunque los límites son algo superiores, sólo esta fórmula es necesaria para detectar cantidades ligeramente más elevadas de grasas extrañas. Con todas las fórmulas pueden detectarse también combinaciones de las distintas grasas extrañas. Los márgenes de variación de los triglicéridos de diferentes grasas extrañas de un solo tipo no tienen influencia considerable sobre los límites de detección.

Cuadro 4

Límites de detección del 99 % por adición de grasa extraña a la grasa láctea en %

	Fórmula individual	Fórmula total
Aceite de soja	2,1	4,4
Aceite de girasol	2,3	4,8
Aceite de oliva	2,4	4,7
Grasa de coco	3,5	4,3
Aceite de palma	4,4	4,7
Grasa de palmiste	4,6	5,9
Aceite de colza	2,0	4,4
Aceite de linaza	2,0	4,0
Aceite de germen de trigo	2,7	6,4
Aceite de germen de maíz	2,2	4,5
Aceite de algodón	3,3	4,4
Manteca de cerdo	2,7	4,7
Sebo de vacuno	5,2	5,4
Aceite hidrogenado de pescado	5,4	6,1

Nota: Los márgenes de S se calculan de forma que sólo se supone la presencia de grasa extraña si se exceden los límites de las distintas fórmulas (véase el cuadro 4).

9. Determinación cuantitativa de las grasas extrañas

A fin de obtener información cuantitativa sobre la concentración de grasa extraña en una muestra de grasa láctea, se utiliza la siguiente fórmula:

$$X (\%) = 100 \cdot | (100 - S)/(3) / (100 - S_f) |,$$

donde X es la cantidad de grasa extraña o mezcla de grasas extrañas desconocidas en una grasa láctea desconocida. S se obtiene de la adición de una grasa extraña desconocida introduciendo los triglicéridos de la mezcla grasa extraña/grasa láctea en la fórmula total de triglicéridos recogida anteriormente. Si se añade a la grasa láctea una grasa extraña desconocida, se elige para S_f el valor medio de S de las distintas grasas extrañas para la fórmula total; este valor medio de S de las distintas grasas extrañas para la fórmula total; este valor medio de S se obtiene introduciendo los datos de los triglicéridos de las grasas extrañas puras en esta fórmula y calculando un valor medio ($S_f = 7,46$). También se obtienen buenos resultados cuantitativos en relación con las adiciones de cualquier grasa extraña utilizando la fórmula correspondiente al aceite de palma/sebo de vacuno (cuadro 2) y un valor medio S_f de 10,57.

Si se conocen los tipos de grasa extraña, se introducirán los siguientes valores de S_f en la fórmula anterior y se tomará del cuadro 2 la fórmula respectiva de grasa extraña:

Cuadro 5

Valores de S_F correspondientes a varias grasas extrañas

Grasa extraña	S_F
Aceite de soja	8,18
Aceite de girasol	9,43
Aceite de oliva	12,75
Grasa de coco	118,13
Aceite de palma	7,55
Grasa de palmiste	112,32
Aceite de colza	3,30
Aceite de linaza	4,44
Aceite de germen de trigo	27,45
Aceite de germen de maíz	9,29
Aceite de algodón	41,18
Manteca de cerdo	177,55
Sebo de vacuno	17,56
Aceite hidrogenado de pescado	64,12

10. **Ámbito de aplicación del método de detección**

El método descrito se aplica a la leche de mezcla y se basa en la representatividad de las muestras de grasa láctea.

Sería posible una detección muy específica si, con un número representativo de grasas lácteas, se derivaran fórmulas como las descritas anteriormente para distintos países.

Podrían obtenerse posibilidades de detección especialmente adecuadas si en los diferentes países se elaboraran fórmulas, como las descritas aquí, de un número representativo de grasas lácteas. En este caso, no es necesario el uso de complejos programas informáticos, si se aplican las combinaciones de triglicéridos utilizadas en el cuadro 2 y se vuelven a determinar los factores utilizando el método de los mínimos cuadrados.

Aplicando los márgenes de S indicados en el cuadro 3, las fórmulas son de aplicación general, en condiciones particulares de alimentación como, por ejemplo, subalimentación o alimentación de vacas con levaduras de pienso o jabones de Ca. Solo en caso de condiciones extremas de alimentación (por ejemplo, elevada ingesta de aceites puros en piensos, elevada administración de jabones de Ca combinados con grasa de piensos, etc.), las fórmulas indican parcialmente una grasa láctea modificada.

Nota: Las grasas lácteas fraccionadas se reconocen generalmente como grasa láctea sin modificar, si se supone una modificación sólo cuando se superan los límites. Sólo con grasas lácteas fraccionadas con una composición inusual, elevadas de aproximadamente 30 °C con bajo rendimiento de un pequeño porcentaje o con fraccionamiento con CO supercrítico, las fórmulas indican una modificación.

No obstante, el fraccionamiento de la grasa láctea puede detectarse mediante otros procedimientos como, por ejemplo, calorimetría de exploración diferencial.

11. **Exactitud del método**

Determinada con grasa láctea a partir de las fórmulas del cuadro 2 y de los márgenes de S del cuadro 3.

11.1. *Repetibilidad*

Diferencia de los valores S de dos determinaciones realizadas en el plazo mínimo posible de tiempo por un solo operador siguiendo el mismo procedimiento y utilizando la misma muestra en condiciones idénticas (misma persona, mismos instrumentos o aparatos, mismo laboratorio):

Cuadro 6

Límites de repetibilidad (r) de las diferentes fórmulas

Fórmula para la detección	r
De aceite de soja, girasol, oliva, colza, linaza, germen de trigo, germen de maíz, algodón, pescado	0,67
De grasa de coco y de palmiste	0,12
De aceite de palma y sebo de vacuno	1,20
De manteca de cerdo	0,58
Fórmula total	1,49

11.2. *Reproducibilidad*

Diferencia de los valores S de dos determinaciones realizadas por distintos operadores en laboratorios diferentes, siguiendo el mismo procedimiento con la misma muestra en condiciones diferentes (persona diferente, instrumentos diferentes) en momentos diferentes.

Cuadro 7

Límites de reproducibilidad (R) de las distintas fórmulas

Fórmula para la detección	R
De aceite de soja, girasol, oliva, colza, linaza, germen de trigo, germen de maíz, algodón, pescado	1,08
De grasa de coco y de palmiste	0,40
De aceite de palma y sebo de vacuno	1,81
De manteca de cerdo	0,60
Fórmula total	2,07

11.3. *Diferencia crítica*

A partir de los límites de repetibilidad (r) y de reproducibilidad (R) pueden calcularse las diferencias críticas de todos los márgenes de S del cuadro 3 (análisis duplicado). En el cuadro 8 se recogen los valores correspondientes.

Cuadro 8

Diferencias críticas de todas las fórmulas de triglicéridos

Fórmula para la detección	Margen
De aceite de soja, girasol, oliva, colza, linaza, germen de trigo, germen de maíz, algodón, pescado	97,43 — 102,57
De grasa de coco y de palmiste	99,14 — 100,86
De aceite de palma y sebo de vacuno	94,91 — 105,09
De manteca de cerdo	97,65 — 102,35
Fórmula total	94,58 — 105,42

11.4. *Aceptabilidad de los resultados*

Todos los contenidos en triglicéridos calibrados y redondeados a la segunda cifra decimal de C24, C26, C28 a C54, así como el colesterol, deben normalizarse exactamente a 100.

Los resultados del análisis duplicado se utilizarán para comprobar la repetibilidad. Si la diferencia absoluta entre los dos resultados S correspondientes a la totalidad de las cinco fórmulas de triglicéridos no supera el límite de repetibilidad r del cuadro 6, entonces se cumple el requisito de repetibilidad.

Para, controlar las condiciones óptimas de cromatografía de gases y, especialmente, la calidad de la columna, debe garantizarse que con diez ciclos repetidos, la diferencia entre los valores máximo y mínimo de S de la totalidad de las cinco fórmulas de triglicéridos no se sale del margen $x \cdot r$, siendo $x = 1,58$ (para diez ciclos, véase la referencia bibliográfica 16) y r de los límites de repetibilidad del cuadro 6 correspondientes a las distintas fórmulas.

12. **Normas citadas**

DIN 10 336: 1994	Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse
Norma FIL IC: 1987	Leche. Determinación del contenido en grasa — Método gravimétrico de Röse Gottlieb.
Norma FIL 16C: 1987	Nata: Determinación del contenido en grasa — Método gravimétrico de Röse Gottlieb.
Norma FIL 116A: 1987	Helados y mezclas de helados comestibles a base de leche. Determinación del contenido en grasa — Método gravimétrico de Röse Gottlieb.
Norma FIL 22B: 1987	Leche desnatada, lactosuero y suero de mantequilla. Determinación del contenido en grasa — Método gravimétrico de Röse Gottlieb.

13. **Bibliografía**

1. Comisión de las Comunidades Europeas: *Detection of foreign fats in milk fat by means of gas chromatographic triglyceride analysis*; Doc. n° VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Comisión de las Comunidades Europeas: *Control of butter fat purity of 100 different samples of different feeding periods from 11 EEC countries*; Doc. n° VI/4577/93.
3. Comisión de las Comunidades Europeas: *Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat*, Doc. n° VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92 e VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: *Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats*, Dairy Research 47 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: *Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen* 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: *Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse*. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 20-35 (1987).
7. Precht, D.: *Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143/157 (1989).
8. Precht D.: *Schnelle Extraktion von Milchfett*, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: *Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: *Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: *Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis*. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: *Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992).
13. Precht, D.: *Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns in CRC Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids*, p. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D.: *Molkentin, J.: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns*, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molkentin, J., Precht, D.: *Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat*. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: *Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme*, Springer-Verlag, Berlin, p. 378 (1970).

ANEXO XXVI

LISTA DE LOS REGLAMENTOS A QUE SE REFIERE EL PRIMER CONSIDERANDO

- Reglamento (CEE) n° 1216/68 de la Comisión, de 9 de agosto de 1968, por el que se determina el método de comprobación del contenido en lactosa de los piensos compuestos importados procedentes de terceros países ⁽¹⁾, modificado por el Reglamento (CEE) n° 222/88 de la Comisión, de 22 de diciembre de 1987, por el que se modifican determinados actos en el sector de la leche y de los productos lácteos como consecuencia de la introducción de la nomenclatura combinada ⁽²⁾,
- Reglamento (CEE) n° 3942/92 de la Comisión, de 22 de diciembre de 1992, por el que se establece un método de referencia para la determinación del contenido de sitosterol y estigmasterol en el butteroil ⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 175/1999 de la Comisión, que modifica los Reglamentos (CEE) n° 3942/92, (CE) n° 86/94, (CE) n° 1082/96 y (CE) n° 1459/98 por los que se establecen métodos de referencia para la determinación de determinados marcadores en la mantequilla, el butteroil y la nata ⁽⁴⁾,
- Reglamento (CE) n° 86/94 de la Comisión, de 19 de enero de 1994, por el que se establece un método de referencia para la determinación del contenido de sitosterol y estigmasterol en la mantequilla ⁽⁵⁾, modificado por el Reglamento (CE) n° 175/1999,
- Reglamento (CE) n° 2721/95 de la Comisión, de 24 de noviembre de 1995, por el que se establecen las disposiciones de aplicación de los métodos de referencia y de rutina para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos en el marco de la organización común de mercados ⁽⁶⁾,
- Reglamento (CE) n° 1080/96 de la Comisión, de 14 de junio de 1996, por el que se establece un método de referencia para la detección de coliformes en la mantequilla, la leche desnatada en polvo y las caseínas y caseinatos ⁽⁷⁾,
- Reglamento (CE) n° 1081/96 de la Comisión, de 14 de junio de 1996, por el que se establece un método de referencia para la detección de leche y caseína de leche de vaca en quesos a base de leche de oveja, de leche de cabra o de leche de búfala o de sus mezclas y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 690/92 ⁽⁸⁾,
- Reglamento (CE) n° 1082/96 de la Comisión, de 14 de junio de 1996, por el que se establece un método de referencia para la determinación del éster etílico del ácido β -apo-8'-caroténico en la mantequilla y la mantequilla concentrada ⁽⁹⁾, modificado por el Reglamento (CE) n° 175/1999,
- Reglamento (CE) n° 1854/96 de la Comisión, de 26 de septiembre de 1996, por el que se establece una lista de métodos de referencia para la realización del análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos en el marco de la organización común de mercados ⁽¹⁰⁾, modificado por el Reglamento (CE) n° 881/1999 ⁽¹¹⁾,
- Reglamento (CE) n° 880/98 de la Comisión, de 24 de abril de 1998, por el que se establecen métodos de referencia para la determinación del contenido de agua, del extracto seco magro y del contenido de materias grasas de la mantequilla ⁽¹²⁾,
- Reglamento (CE) n° 1459/98 de la Comisión, de 8 de julio de 1998, por el que se establece un método de referencia para la determinación de la vainillina en la mantequilla concentrada, la mantequilla o la nata ⁽¹³⁾, modificado por el Reglamento (CE) n° 175/1999.

⁽¹⁾ DO L 198 de 10.8.1968, p. 13.

⁽²⁾ DO L 28 de 1.2.1988, p. 1.

⁽³⁾ DO L 399 de 31.12.1992, p. 29.

⁽⁴⁾ DO L 20 de 27.1.1999, p. 22.

⁽⁵⁾ DO L 17 de 20.1.1994, p. 7.

⁽⁶⁾ DO L 283 de 25.11.1995, p. 7.

⁽⁷⁾ DO L 142 de 15.6.1996, p. 13.

⁽⁸⁾ DO L 142 de 15.6.1996, p. 15.

⁽⁹⁾ DO L 142 de 15.6.1996, p. 26.

⁽¹⁰⁾ DO L 246 de 27.9.1996, p. 5.

⁽¹¹⁾ DO L 111 de 29.4.1999, p. 24.

⁽¹²⁾ DO L 124 de 25.4.1998, p. 16.

⁽¹³⁾ DO L 193 de 9.7.1998, p. 16.