

381R2188

1. 8. 81

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

Nº L 213/1

REGLAMENTO (CEE) Nº 2188/81 DE LA COMISIÓN

de 28 de julio de 1981

por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 625/78 relativo a las modalidades del almacenamiento público de la leche desnatada en polvo

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento (CEE) nº 804/68 del Consejo, de 27 de junio de 1968, sobre organización común de mercado en el sector de la leche y de los productos lácteos⁽¹⁾, modificado en último lugar por el Acto de adhesión de Grecia, y, en particular, el apartado 5 de su artículo 7,

Considerando que, en el Anexo I del Reglamento (CEE) nº 625/78 de la Comisión⁽²⁾, modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) nº 2937/80⁽³⁾, por el que se definen las condiciones de calidad a las que debe responder la leche desnatada en polvo para ser ofertada a la intervención, figuran en particular determinadas prescripciones relativas a los procedimientos de análisis para la detección del suero de leche mediante la determinación de determinados componentes en la leche desnatada en polvo; que la nota 2 de dicho Anexo ha previsto la determinación de valores límites comunitarios que deben tenerse en cuenta para los mencionados componentes, después de un determinado período de experimentación en los Estados miembros;

Considerando que en el momento presente resulta posible establecer, a nivel comunitario, un método de análisis que permita la determinación del suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo por medio de la determinación del ácido siálico libre; que, sin embargo, no resulta conveniente hacer obligatorio dicho método hasta después de que transcurra un determinado período de tiempo destinado a familiarizar a los organismos de control y a los operadores con este procedimiento analítico;

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

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

1. El Anexo del Reglamento (CEE) nº 625/78 se modificará como sigue:

a) en el punto 2 letra b), el texto del segundo guión se sustituirá por el texto siguiente:

«— suero de leche:

determinación del ácido siálico libre^(*) y/o del complejo cisteinacistina en la medida en que una de las tres pruebas obligatorias, por lo menos, a saber, la de los glucomacropéptidos del suero de leche (determinados por una prueba simplificada), la de los lactatos o las de las cenizas, sea superior al 3 %, a 150 mg/100 g y al 8 % respectivamente»;

b) el texto de la nota 2 se sustituirá por el texto siguiente:

«^(?) En lo referente a la presencia del suero de leche en polvo mediante la determinación del ácido siálico libre, el método de análisis aplicable a partir del 1 de enero de 1982 será el que se determina en el Anexo IV.»

2. El Anexo del presente Reglamento se añadirá como Anexo IV al Reglamento (CEE) nº 625/78.

Artículo 2

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

⁽¹⁾ DO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.

⁽²⁾ DO nº L 84 de 31. 3. 1978, p. 19.

⁽³⁾ DO nº L 305 de 14. 11. 1980, p. 13.

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

Hecho en Bruselas, el 28 de julio de 1981.

Por la Comisión

El Presidente

Gaston THORN

ANEXO

«ANEXO IV

PRESENCIA DEL SUERO DE LECHE EN POLVO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO DESTINADA AL ALMACENAMIENTO PÚBLICO MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO SIÁLICO LIBRE**1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite la determinación del suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público.

2. Principio del método

En el momento de la coagulación de la leche bajo la acción del cuajo, son liberados glucomacropéptidos de la caseína con un alto contenido en ácido siálico. La determinación del ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) permite establecer la presencia eventual de suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo. Después de la reconstitución de la leche, los glucomacropéptidos que contienen el ácido siálico son precipitados por el ácido fosfotúngstico a partir de un filtrado tricloroacético al 12 %. El ácido siálico liberado por hidrólisis ácida forma, con el resorcinol, un complejo coloreado medido por espectrofotometría a 580 nm.

3. Reactivos

Todos los reactivos deben ser de una pureza analítica. El agua debe ser destilada o desionizada.

3.1. Solución de ácido tricloroacético (TCA)

Disolver 240 g de ácido tricloroacético en agua y completar a 1 000 ml.

3.2. Solución de ácido fosfotúngstico

Disolver 20 g de ácido fosfotúngstico en agua y completar a 100 ml.

3.3. Etanol del 95 % (v/v)**3.4. Solución de ácido sulfúrico aproximadamente 0,1 N**

Diluir 28,1 ml de ácido sulfúrico concentrado (95 % de H_2SO_4) en agua y completar a 1 000 ml para obtener una solución de ácido sulfúrico 1 N. Diluir 100 ml de ácido sulfúrico 1 N en agua y completar a 1 000 ml para obtener una solución de ácido sulfúrico 0,1 N.

3.5. Tampón acetato, pH 4,8

Disolver 19,7 g de acetato de sodio anhidro en agua, añadir 9 ml de ácido acético glacial y completar a 1 000 ml con agua. Comprobar y ajustar eventualmente el pH.

3.6. Solución de sulfato de cobre 0,1 M

Disolver 2,497 g de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en agua y completar a 100 ml.

3.7. Solución de resorcina al 2 %

Disolver 2 g de resorcina en agua y completar a 100 ml. Esta solución puede conservarse 4 meses a 5-8 °C

- 3.8. Reactivo al resorcinol
Mezclar 10 ml de solución de resorcina (3.7), 80 ml de ácido clorhídrico concentrado ($d_{20}^{\circ}\text{C} = 1,19 \text{ g/l}$) y 0,25 ml de solución de sulfato de cobre (3.6) y completar a 100 ml con agua. Preparar esta solución el día de su utilización.
- 3.9. Alcohol isoamílico
- 3.10. Solución de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico)
Disolver 20 mg de ácido N-acetilneuramínico en agua y completar a 100 ml. Esta solución no puede conservarse más de una semana a $+ 4^{\circ}\text{C}$.

4. Material

- 4.1. Balanza analítica.
- 4.2. Agitador magnético, barras magnéticas revestidas de teflón de 2 cm de largo.
- 4.3. pHmetro.
- 4.4. Centrifugadora que permita alcanzar una fuerza centrífuga de 3 000 g.
- 4.5. Tubos para centrifugar de una capacidad aproximada de 75 ml.
- 4.6. Baño de agua con termostato regulable a 80°C .
- 4.7. Baño de agua hirviendo.
- 4.8. Filtros de 125 mm de diámetro (Schleicher y Schüll n° 589 (?), tipo «Weissband» o de calidad equivalente).
- 4.9. Embudos de vidrio, de un diámetro aproximado de 7 cm.
- 4.10. Copas de vidrio de 100 y 150 ml.
- 4.11. Matraces graduados de 50, 100 y 1 000 ml.
- 4.12. Tubos de ensayo de tapón roscado de una capacidad de 10 ml.
- 4.13. Espectrofotómetro.
- 4.14. Cubetas de vidrio para espectrofotómetro (4.13), trayecto óptico 10 mm.
- 4.15. Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10, 20, 25 y 50 ml.
- 4.16. Varillas de vidrio.
- 4.17. Estufa con termostato a 35°C .

5. Preparación de la muestra

La muestra, después de homogeneizada, será examinada según las indicaciones previstas en los puntos 6 y siguientes.

6. Modo de operar

- 6.1. Aislamiento del ácido siálico libre.
- 6.1.1. Pesar $5 \pm 0,005 \text{ g}$ de leche desnatada en polvo en una copa de vidrio de 150 ml.
Añadir 50 ml de agua. Mezclar bien por agitación magnética (4.2) hasta la completa disolución.
Añadir lentamente, siguiendo la agitación, 50 ml de la solución de ácido tricloroacético (3.1).
Dejar reposar 30 minutos (a temperatura ambiente).

- 6.1.2. Agitar y después filtrar inmediatamente (4.8).
- 6.1.3. Introducir en un tubo para centrifugar (4.5) 50 ml de filtrado tomados en los 60 minutos siguientes al comienzo de la filtración.
- Añadir 1 ml de ácido fosfotúngstico (3.2). Homogeneizar por agitación y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 3 000 g durante 10 minutos.
- 6.1.4. Eliminar el sobrenadante. Lavar 2 veces el sedimento con 5 ml de etanol (3.3) teniendo cuidado de ponerlo en suspensión con ayuda de un agitador magnético o de una varilla de vidrio (4.16). (En este último caso, introducir 2 ml de etanol para la puesta en suspensión y enjuagar la varilla con ayuda de los 3 ml de etanol restantes). Centrifugar cada vez a 3 000 g durante 10 minutos.
- Dejar secar el sedimento así obtenido durante una noche a temperatura ambiente o durante 90 minutos a 35 °C.
- 6.1.5. Añadir 4 ml de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4) al sedimento seco y agitar para ponerlo en suspensión.
- Tapar los tubos para centrifugar y colocarlos durante 40 minutos en un baño de agua a 80 °C agitándolos de vez en cuando para asegurar una buena dispersión. Enfriar a temperatura ambiente y añadir 4 ml de tampón acetato (3.5). Mezclar cuidadosamente.
- 6.1.6. Centrifugar 10 minutos a 3 000 g. La determinación del ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico se efectúa en el sobrenadante.
- 6.2. Determinación espectrofotométrica del ácido siálico libre.
- 6.2.1. Introducir 2 ml de sobrenadante en un tubo de ensayo (4.12) y añadir 2 ml de reactivo al resorcinol (3.8).
- 6.2.2. Tapar los tubos, mezclar cuidadosamente el contenido, colocar los tubos durante 15 minutos exactos en un baño de agua a 100 °C (4.7).
- Enfriar a temperatura ambiente, bajo chorro de agua.
- 6.2.3. Añadir 5 ml de alcohol isoamílico (3.9), tapar y mezclar cuidadosamente el contenido agitando energicamente los tubos y después colocarlos 15 minutos en un baño de agua helada.
- 6.2.4. Centrifugar a 1 000 g durante 2 minutos para separar debidamente las dos fases.
- 6.2.5. Introducir aproximadamente 3 ml de la capa superior (fase alcohólica) en una cubeta de vidrio y medir la extinción a 580 nm por comparación con la prueba en blanco en los 30 minutos siguientes a la retirada de los tubos del baño de agua helada.
- 6.3. Prueba en blanco.
- Preparar una prueba en blanco de conformidad con los puntos 6.2.1. a 6.2.5. utilizando 1 ml de solución de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4) y 1 ml de tampón acetato (3.5) en lugar de 2 ml de filtrado como se prevé en el punto 6.2.1.
- 6.4. Curva patrón
- 6.4.1. Introducir exactamente 0-2-5-10-20 y 30 ml de la solución (3.10) correspondiente a 0-0,4-1-2-4-6 mg de ácido siálico siálico, en matraces graduados de 50 ml de capacidad, completar a 50 ml con la solución de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4) y mezclar bien.
- 6.4.2. Introducir 1 ml de contenido de cada matraz graduado en un tubo de ensayo (4.12). Añadir 1 ml de tampón acetato (3.5), para obtener una serie de soluciones testigo conteniendo 0 (valor cero), 8, 20, 40, 80, 120 microgramos de ácido siálico. Una vez bien mezclados, proceder a la determinación de conformidad con los puntos 6.2.2 a 6.2.5.
- 6.4.3. Para establecer la curva de contraste, llevar sobre un gráfico las extinciones obtenidas en el punto 6.4.2 y las cantidades de ácido siálico correspondientes en microgramos indicados en el punto 6.4.2.

7. **Expresión de los resultados**

7.1. **Modo de cálculo**

Calcular el contenido en ácido siálico, expresado en microgramos por gramo, según la fórmula siguiente:

$$\frac{C \cdot 8}{E}$$

en la que C representa la masa de ácido siálico en microgramos, leída en la curva de contraste correspondiente a la medida de extinción obtenida en el punto 6.2.5 y E es la masa de la toma de ensayo (6.1.1) en gramos. Expresar el resultado al microgramo.

7.2. **Fiabilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o rápidamente una después de otra por el mismo analista no debe exceder en un 5 % de la media aritmética de los resultados.

8. **Interpretación de los resultados**

Este método permite cuantificar la presencia eventual de suero de leche en la leche desnatada en polvo.

8.1. **Cálculo del valor medio de ácido siálico libre en microgramos por gramo de muestra, referido a su contenido en proteínas expresado en porcentaje (m/m)**

$$Y = 40 + 3 (X - 34)^2$$

siendo:

40 el contenido medio en ácido siálico en microgramos por gramo para una leche desnatada en polvo que contenga al menos un 34 % de proteínas,

X, por acuerdo, el contenido en proteínas totales, determinado según el método Kjeldahl FIL IDF 20: 1962.

8.2. **Cálculo del porcentaje de suero de leche en polvo eventualmente presente**

$$\% \text{ suero de leche} = \frac{Z - Y}{10}$$

siendo:

Z el contenido en ácido siálico de la muestra determinado en el punto 7.1 en microgramos por gramo,

Y el contenido medio en ácido siálico libre de la muestra calculado en el punto 8.1,

10 representa, por convenio, el contenido en ácido siálico libre expresado en microgramos, de un gramo de suero de leche en polvo.

8.3. **Debido a los errores inherentes al método y a las variaciones naturales de composición de la muestra, se puede llegar a la conclusión definitiva de ausencia de suero de leche cuando el valor obtenido en el punto 8.2 sea inferior o igual a 2,0.**

En el caso de un valor superior, la conclusión sobre la presencia de suero de leche será afirmativa. La misma se cuantifica según la fórmula dada en el punto 8.2.»