

I

(Atti per i quali la pubblicazione è una condizione di applicabilità)

REGOLAMENTO (CEE) N. 2188/81 DELLA COMMISSIONE

del 28 luglio 1981

che modifica il regolamento (CEE) n. 625/78 relativo alle modalità di applicazione per l'ammasso pubblico di latte scremato in polvere

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

visto il regolamento (CEE) n. 804/68 del Consiglio, del 27 giugno 1968, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari⁽¹⁾, modificato da ultimo dall'atto di adesione della Grecia, in particolare l'articolo 7, paragrafo 5,

considerando che, nell'allegato I del regolamento (CEE) n. 625/78 della Commissione, ⁽²⁾ modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 2937/80 ⁽³⁾, che definisce le condizioni di qualità cui deve soddisfare il latte scremato in polvere per essere offerto all'intervento, figurano in particolare talune prescrizioni relative ai metodi d'analisi ai fini della ricerca del siero di latte mediante il dosaggio di taluni componenti del latte scremato in polvere; che la nota in calce ⁽²⁾ del suddetto allegato ha previsto che si procede alla fissazione dei valori limiti comunitari per i suddetti componenti, dopo un certo periodo di sperimentazione negli Stati membri;

considerando che è ora possibile istituire, sul piano comunitario, un metodo di analisi che consenta la determinazione del siero di latte presamato nel latte scremato in polvere mediante il dosaggio dell'acido sialico libero; che tuttavia è opportuno rendere obbligatorio tale metodo di controllo soltanto dopo un certo periodo destinato a consentire agli organismi di controllo, nonché agli operatori, di familiarizzarsi con tale procedimento analitico;

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

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

1. L'allegato I del regolamento (CEE) n. 625/78 è modificato come segue:

a) Al punto 2, lettera b), il testo del secondo trattino è sostituito dal seguente testo:

« — siero di latte:

dosaggio dell'acido sialico libero ⁽²⁾ e/o del complesso cisteina-cistina, qualora almeno delle tre prove obbligatorie, e cioè quella dei glicomacropetidi del siero di latte (determinati con la prova semplificata), quella dei lattati o quella delle ceneri sia superiore rispettivamente del 3 %, a 150 mg/100 g e all'8 % ».

b) Il testo della nota in calce ⁽²⁾ è sostituito dal seguente testo:

« ⁽²⁾ Per quanto riguarda la ricerca del siero di latte presamato mediante il dosaggio dell'acido sialico libero, il metodo di analisi applicabile a decorrere dal 1° gennaio 1982 è quello fissato nell'allegato IV ».

2. L'allegato del presente regolamento diventa l'allegato IV del regolamento (CEE) n. 625/78.

Articolo 2

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

⁽¹⁾ GU n. L 148 del 28. 6. 1968, pag. 13.

⁽²⁾ GU n. L 84 del 31. 3. 1978, pag. 19.

⁽³⁾ GU n. L 305 del 14. 11. 1980, pag. 13.

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

Fatto a Bruxelles, il 28 luglio 1981.

Per la Commissione

Il Presidente

Gaston THORN

ALLEGATO

« ALLEGATO IV

RICERCA DEL SIERO DI LATTE PRESAMICO NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE DESTINATO ALL'AMMASSO PUBBLICO MEDIANTE IL DOSAGGIO DELL'ACIDO SIALICO LIBERO**1. Finalità e campo di applicazione**

Questo metodo permette di determinare la presenza di siero di latte nel latte scremato in polvere, destinato all'ammasso pubblico.

2. Principio del metodo

Durante la coagulazione del latte sotto l'azione del caglio si liberano alcuni glicomacropetidi della caseina, aventi un tenore di acido sialico elevato. Il dosaggio dell'acido sialico (acido N-acetilneuraminico) consente di stabilire l'eventuale presenza del siero di latte presamico nel latte scremato in polvere. Dopo ricostituzione del latte, i glicomacropetidi contenenti l'acido sialico vengono precipitati con acido fosfotungstico da un filtrato al 12 % di acido tricloroacetico. L'acido sialico liberato per idrolisi acida forma con la resorcina un complesso colorato, misurato per spettrofotometria a 580 nm.

3. Reattivi

Tutti i reattivi devono avere purezza analitica. L'acqua deve essere distillata o deionizzata.

3.1. Soluzione di acido tricloroacetico (TCA)

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

3.2. Soluzione di acido fosfotungstico

Sciogliere in acqua 20 g di acido fosfotungstico e portare a 100 ml.

3.3. Etanolo al 95 % (v/v)**3.4. Soluzione di acido solforico circa 0,1 N**

Diluire in acqua 28,1 ml di acido solforico concentrato (95 % di H_2SO_4) e portare a 1 000 ml in modo da ottenere una soluzione di acido solforico 1 N. Diluire in acqua 100 ml di acido solforico 1 N e portare a 1 000 ml in modo da ottenere una soluzione di acido solforico 0,1 N.

3.5. Soluzione-tampone all'acetato, pH 4,8

Sciogliere in acqua 19,7 g d'acetato di sodio anidro, aggiungere 9 ml di acido acetico glaciale e portare a 1 000 ml con acqua.

Controllare e aggiustare eventualmente il pH.

3.6. Soluzione di solfato di rame 0,1 M

Sciogliere in acqua 2,497 g di solfato di rame ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e portare a 100 ml.

3.7. Soluzione di resorcina al 2 %

Sciogliere in acqua 2 g di resorcina e portare a 100 ml.

Questa soluzione, conservata a 5—8 °C, rimane stabile per 4 mesi.

- 3.8. **Reattivo al resorcinolo**
Mescolare 10 ml di soluzione di resorcina (3.7), 80 ml di acido cloridrico concentrato ($d_{20}^{\circ\text{C}} = 1,19 \text{ g/l}$) e 0,25 ml di soluzione di solfato di rame (3.6) e portare a 100 ml con acqua. Questa soluzione va preparata il giorno dell'impiego.
- 3.9. **Alcool isoamilico**
- 3.10. **Soluzione di acido N-acetilneuraminico (acido sialico)**
Sciogliere in acqua 20 mg di acido N-acetilneuraminico e portare a 100 ml.
Questa soluzione non può conservarsi più di una settimana a + 4 °C.
4. **Apparecchi**
- 4.1. **Bilancia analitica**
- 4.2. **Agitatore magnetico ; sbarrette magnetiche rivestite di teflon della lunghezza di 2 cm**
- 4.3. **pH-metro**
- 4.4. **Centrifuga che permetta di raggiungere 3 000 g**
- 4.5. **Provette da centrifuga della capacità di 75 ml circa**
- 4.6. **Bagnomaria con termostato regolabile a 80 °C**
- 4.7. **Bagnomaria bollente**
- 4.8. **Filtri, del diametro di 125 mm (Schleicher e Schüll n. 5892, tipo « fascia bianca », o di qualità equivalente)**
- 4.9. **Imbuti di vetro del diametro di 7 cm circa**
- 4.10. **Bicchieri da 100 e 150 ml**
- 4.11. **Palloncini tarati da 50, 100 e 1 000 ml**
- 4.12. **Provette con tappo a vite, della capacità di 10 ml**
- 4.13. **Spettrofotometro**
- 4.14. **Provette di vetro per spettrofotometro (4.13) con percorso ottico di 10 mm**
- 4.15. **Pipette graduate da 1, 2, 5, 10, 20, 25 e 50 ml**
- 4.16. **Bacchette di vetro**
- 4.17. **Stufa da essiccazione, termostata a 35 °C**
5. **Preparazione del campione**
Il campione, dopo essere stato omogeneizzato viene esaminato in base alle indicazioni di cui al paragrafo 6 e seguenti.
6. **Modo di operare**
- 6.1. **Separazione dell'acido sialico libero**
- 6.1.1. **In un bicchiere da 150 ml, pesare $5 \pm 0,005 \text{ g}$ di latte scremato in polvere.**
Aggiungere 50 ml d'acqua. Mescolare bene con l'agitatore magnetico (4,2), fino a completa dissoluzione.
Aggiungere lentamente 50 ml della soluzione di acido tricloroacetico (3.1), agitando costantemente.
Lasciar riposare per 30 minuti (a temperatura ambiente).

- 6.1.2. Agitare e filtrare subito (4.8).
- 6.1.3. In un tubo da centrifuga (4.5), introdurre 50 ml di filtrato prelevato 60 minuti dopo l'inizio della filtrazione.
Aggiungere 1 ml d'acido fosfotungstico (3.2). Omogeneizzare agitando e lasciar riposare 10 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare a 3 000 g per 10 minuti.
- 6.1.4. Eliminare il liquido superiore. Lavare due volte il sedimento con 5 ml di etanolo (3.3), avendo cura di portarlo in sospensione con un agitatore magnetico o una bacchetta di vetro (4.16). (In quest'ultimo caso, introdurre 2 ml di etanolo e risciacquare l'agitatore con i 3 ml di etanolo che rimangono.) Centrifugare ogni volta a 3 000 g per 10 minuti.
Essiccare il sedimento così ottenuto per una notte a temperatura ambiente o per 90 minuti a 35 °C.
- 6.1.5. Aggiungere al sedimento secco 4 ml di acido solforico 0,1 N (3.4) e agitare per facilitare la sospensione.
Tappare le provette e porle 40 minuti in bagnomaria a 80 °C, agitando di tanto in tanto, per garantire una buona dispersione. Raffreddare a temperatura ambiente ed aggiungere 4 ml di soluzione-tampone all'acetato (3.5). Mescolare accuratamente.
- 6.1.6. Centrifugare per 10 minuti a 3 000 g. Il dosaggio dell'acido sialico, od acido N-acetilneuraminico, si effettua sul liquido superiore.
- 6.2. Dosaggio spettrofotometrico dell'acido sialico libero
- 6.2.1. Introdurre in una provetta (4.12) 2 ml del liquido superiore ed aggiungere 2 ml di reattivo al resorcinolo (3.8).
- 6.2.2. Tappare i tubi, mescolare accuratamente il contenuto, porre i tubi per 15 minuti esatti in bagnomaria a 100 °C (4.7). Raffreddare a temperatura ambiente sotto acqua corrente.
- 6.2.3. Aggiungere 5 ml di alcool isoamilico (3.9). Tappare e mescolare accuratamente il contenuto agitando vigorosamente le provette, poi collocarle per 15 minuti in un bagno di acqua gelata.
- 6.2.4. Centrifugare per 2 minuti a 1 000 g per separare bene le due fasi.
- 6.2.5. Introdurre 3 ml circa dello strato superiore (fase alcoolica) in una cuvetta di vetro, e misurare l'estinzione a 580 nm rispetto alla prova in bianco, nei 30 minuti successivi al ritiro delle provette dal bagno di acqua ghiacciata.
- 6.3. Prova in bianco
Preparare una prova in bianco conformemente ai punti da 6.2.1 a 6.2.5 utilizzando 1 ml di soluzione d'acido solforico 0,1 N (3.4) e 1 ml di soluzione-tampone all'acetato (3.5) in luogo dei 2 ml di filtrato previsti al punto 6.2.1.
- 6.4. Curva di taratura.
- 6.4.1. Introdurre esattamente 0-2-5-10-20 e 30 ml della soluzione (3.10), corrispondenti a 0-0,4-1-2-4-6- mg di acido sialico, in palloni tarati della capacità di 50 ml; portare a 50 ml con la soluzione di acido solforico 0,1 N (3.4) e mescolare bene.
- 6.4.2. Introdurre 1 ml del contenuto di ciascun pallone tarato in una provetta (4.12). Aggiungere 1 ml di soluzione-tampone all'acetato (3.5) per ottenere una serie di soluzioni di riferimento contenenti 0 (valore 0) 8, 20, 40, 80, 120 microgrammi di acido sialico. Dopo aver mescolato bene, procedere al dosaggio conformemente ai punti da 6.2.2. a 6.2.5.
- 6.4.3. Per stabilire la curva di taratura riportare su un grafico le estinzioni di cui al punto 6.4.2. e le corrispondenti quantità di acido sialico, espresse in microgrammi, indicate al punto 6.4.2.

7. **Espressione dei risultati**7.1. **Modo di calcolo**

Calcolare il tenore in acido sialico, espresso in microgrammi per grammo, con la seguente formula :

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

nella quale C rappresenta la massa di acido sialico, in microgrammi, letta sulla curva di taratura e corrispondente alla misura di estinzione di cui al punto 6.2.5., ed E la massa del campione esaminato (6.1.1.), espressa in grammi.

Indicare il risultato con l'approssimazione dell'1 microgrammo.

7.2. **Ripetibilità**

La differenza fra i risultati di due determinazioni eseguite simultaneamente o in immediata successione dallo stesso analista non deve superare il 5 % della media aritmetica dei risultati.

8. **Interpretazione dei risultati**

Questo metodo consente di precisare le quantità di siero di latte eventualmente presenti nel latte scremato in polvere.

8.1. **Calcolo del valore medio di acido sialico libero in microgrammi per grammo del campione, riferito al suo tenore di proteine espresso in percentuale (m/m)**

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

dove:

40 è il tenore medio di acido sialico in microgrammi per grammo per un latte scremato in polvere avente almeno il 34 % di proteine.

X è il tenore di proteine totali, determinato secondo il metodo Kjeldahl FIL IDF 20 : 1962.

8.2. **Calcolo della percentuale di siero di latte in polvere eventualmente presente**

$$\% \text{ siero di latte} = \frac{Z - Y}{10}$$

dove :

Z è il tenore di acido sialico del campione determinato al paragrafo 7.1 in microgrammi per grammo.

Y è il tenore medio di acido sialico libero del campione calcolato al paragrafo 8.1.

10 rappresenta, convenzionalmente, il tenore di acido sialico libero, espresso in microgrammi, di un grammo di siero di latte presamico in polvere.

8.3. **Dati gli errori di metodo e le variazioni naturali di composizione del campione, si può giungere definitivamente alla conclusione che il siero di latte non è presente quando il valore ottenuto al paragrafo 8.2 è inferiore o uguale a 2,0.**

Qualora si riscontri un valore più elevato, si può affermare che il siero di latte è presente. La quantità di siero di latte presente è definita in base alla formula che figura al paragrafo 8.2».