

**REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2018/150 DELLA COMMISSIONE****del 30 gennaio 2018****che modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari ammissibili all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato**

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (UE) n. 1306/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 dicembre 2013, sul finanziamento, sulla gestione e sul monitoraggio della politica agricola comune e che abroga i regolamenti (CEE) n. 352/78, (CE) n. 165/94, (CE) n. 2799/98, (CE) n. 814/2000, (CE) n. 1290/2005 e (CE) n. 485/2008 del Consiglio <sup>(1)</sup>, in particolare l'articolo 62, paragrafo 2, lettera i),

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento delegato (UE) 2016/1238 della Commissione <sup>(2)</sup> e il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 della Commissione <sup>(3)</sup> stabiliscono le norme in materia di intervento pubblico e di aiuto all'ammasso privato. Il regolamento (CE) n. 273/2008 della Commissione <sup>(4)</sup> stabilisce i metodi applicabili per determinare se il latte e i prodotti lattiero-caseari soddisfano i requisiti di ammissibilità previsti nei suddetti regolamenti per l'intervento pubblico e l'aiuto all'ammasso privato.
- (2) Gli sviluppi tecnici realizzati nella metodologia impiegata per l'analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari rendono opportuno introdurre alcune modifiche sostanziali a fini di semplificazione e per fornire riferimenti aggiornati alle norme ISO. A fini di chiarezza e razionalità, e vista la portata e la natura tecnica delle modifiche alle disposizioni del regolamento (CE) n. 273/2008, le disposizioni pertinenti di tale regolamento dovrebbero essere incorporate nel regolamento (UE) 2016/1240.
- (3) Al fine di assicurare la conformità con le nuove norme e i nuovi metodi in tutti gli Stati membri, i laboratori dovrebbero poter disporre di un periodo di tempo sufficiente per rivedere le procedure e applicare i metodi aggiornati.
- (4) È pertanto opportuno modificare di conseguenza il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240.
- (5) Ai fini della certezza del diritto è opportuno abrogare il regolamento (CE) n. 273/2008.
- (6) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del Comitato per l'organizzazione comune dei mercati agricoli,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

*Articolo 1*

Il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 è così modificato:

1) L'articolo 4 è così modificato:

a) il paragrafo 1 è così modificato:

i) la lettera d) è sostituita dalla seguente:

«d) per il burro: nell'allegato IV, parti I e I bis, del presente regolamento;»

ii) la lettera e) è sostituita dalla seguente:

«e) per il latte scremato in polvere: nell'allegato V, parti I e I bis, del presente regolamento.»;

<sup>(1)</sup> GU L 347 del 20.12.2013, pag. 549.

<sup>(2)</sup> Regolamento delegato (UE) 2016/1238 della Commissione, del 18 maggio 2016, che integra il regolamento (UE) n. 1308/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'intervento pubblico e l'aiuto all'ammasso privato (GU L 206 del 30.7.2016, pag. 15).

<sup>(3)</sup> Regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 della Commissione, del 18 maggio 2016, recante modalità di applicazione del regolamento (UE) n. 1308/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'intervento pubblico e l'aiuto all'ammasso privato (GU L 206 del 30.7.2016, pag. 71).

<sup>(4)</sup> Regolamento (CE) n. 273/2008 della Commissione, del 5 marzo 2008, che stabilisce modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari (GU L 88 del 29.3.2008, pag. 1).

b) il paragrafo 2 è sostituito dal seguente:

«2. I metodi per determinare la qualità dei cereali, del burro e del latte scremato in polvere ammissibili all'intervento pubblico di cui agli allegati I, IV e V rispettivamente, sono definiti nell'ultima versione delle pertinenti norme europee o internazionali, secondo il caso, in vigore almeno 6 mesi prima del primo giorno del periodo d'intervento pubblico quale definito all'articolo 12 del regolamento (UE) n. 1308/2013.»;

2) è inserito il seguente articolo 60 bis:

«*Articolo 60 bis*

**Disposizioni specifiche sui controlli relativi all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato per il latte e i prodotti lattiero-caseari**

1. L'ammissibilità del burro, del latte scremato in polvere e del formaggio al beneficio degli aiuti all'ammasso privato è stabilita secondo i metodi previsti negli allegati VI, VII e VIII rispettivamente.

Tali metodi sono stabiliti facendo riferimento all'ultima versione delle pertinenti norme europee o internazionali, secondo il caso, in vigore almeno 6 mesi prima del primo giorno del periodo d'intervento pubblico quale definito all'articolo 12 del regolamento (UE) n. 1308/2013.

2. I risultati dei controlli effettuati applicando i metodi stabiliti nel presente regolamento sono valutati conformemente all'allegato IX.»;

3) gli allegati sono modificati conformemente all'allegato del presente regolamento.

*Articolo 2*

Il regolamento (CE) n. 273/2008 è abrogato.

*Articolo 3*

Il presente regolamento entra in vigore il settimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

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

Fatto a Bruxelles, il 30 gennaio 2018

*Per la Commissione*

*Il presidente*

Jean-Claude JUNCKER

---

## ALLEGATO

Gli allegati del regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 sono così modificati:

1) l'allegato IV è così modificato:

a) nella parte I, punto 2, il secondo comma è sostituito dal seguente:

«Ciascun campione deve essere valutato singolarmente. Non sono ammesse ripetizioni del campionamento e della valutazione.»;

b) è aggiunta la seguente parte I bis:

«PARTE I bis

**Metodi di analisi del burro non salato destinato all'intervento pubblico**

Parametro	Metodo
Grasso <sup>(1)</sup>	ISO 17189 o ISO 3727 parte 3
Acqua	ISO 3727 parte 1
Materie secche non grasse	ISO 3727 parte 2
Acidità delle materie grasse	ISO 1740
Indice di perossidi	ISO 3976
Grassi diversi da quelli del latte	ISO 17678
Caratteristiche organolettiche	ISO 22935 parti 2 e 3 e tabella di punteggio di seguito riportata.

<sup>(1)</sup> Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore.

**Tabella di punteggio**

Aspetto		Consistenza		Gusto e aroma	
Punti	Osservazioni	Punti	Osservazioni	Punti	Osservazioni
5	<i>Molto buono</i> tipo ideale massima qualità (uniformemente asciutto)	5	<i>Molto buono</i> tipo ideale massima qualità (ben spalmabile)	5	<i>Molto buono</i> tipo ideale massima qualità (aroma finissimo asso- lutamente puro)
4	<i>Buono</i> (nessun difetto evi- dente)	4	<i>Buono</i> (nessun difetto evi- dente)	4	<i>Buono</i> (nessun difetto evi- dente)
1, 2 o 3	Qualunque difetto	1, 2 o 3	Qualunque difetto	1, 2 o 3	Qualunque difetto»

2) all'allegato V è aggiunta la seguente parte I bis:

«PARTE I bis

**Metodi di analisi del latte scremato in polvere destinato all'intervento pubblico**

Parametro	Metodo
Proteine	ISO 8968 parte 1
Grasso	ISO 1736
Acqua	ISO 5537
Acidità	ISO 6091
Lattati	ISO 8069
Prova di fosfatasi	ISO 11816 parte 1
Indice di insolubilità	ISO 8156
Particelle combuste <sup>(1)</sup>	ADPI
Microrganismi	ISO 4833 parte 1
Latticello	Appendice I
Siero di latte presamico <sup>(2)</sup>	Appendici II e III
Siero di latte acido <sup>(3)</sup>	ISO 8069 o controlli in loco
Controlli organolettici <sup>(4)</sup>	ISO 22935 parti 2 e 3

<sup>(1)</sup> L'analisi delle particelle combuste può essere effettuata sistematicamente. Tuttavia, tale analisi deve essere effettuata in ogni caso se non vengono effettuati controlli organolettici.

<sup>(2)</sup> Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore (uno o entrambi i metodi).

<sup>(3)</sup> Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore.

<sup>(4)</sup> I controlli organolettici sono effettuati se ritenuti necessari previa un'analisi del rischio riconosciuta dall'organismo pagatore.

## Appendice I

**LATTE SCREMATO IN POLVERE: DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ DI FOSFATIDILSERINA E FOSFATIDILETANOLAMINA****Metodo: HPLC in fase inversa**

## 1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descrive una procedura per la determinazione quantitativa della fosfatidilserina (PS) e della fosfatidiletanolamina (PE) nel latte scremato in polvere (LSP) ed è adatto per rivelare particelle solide di latticello nel LSP.

## 2. DEFINIZIONE

Contenuto di PS + PE: la frazione in massa di sostanza determinata utilizzando la procedura qui specificata. Il risultato è espresso in milligrammi di dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PEDP) per 100 g di polvere.

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

Estrazione degli amminofosfolipidi mediante metanolo da latte in polvere ricostituito. Determinazione di PS e PE come derivati della dialdeide o-ftalica (OPA) mediante HPLC in fase inversa (RP) e rivelazione per fluorescenza. Quantificazione del contenuto di PS e PE nel campione d'analisi per riferimento ad un campione standard contenente una quantità nota di PEDP.

## 4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua deve essere distillata o di purezza almeno equivalente, salvo diversamente specificato.

4.1. **Materiale standard: PEDP, purezza 99 % minimo**

*Nota:* Il materiale standard deve essere conservato a - 18 °C.

4.2. **Reagenti per le preparazioni del campione standard e del campione d'analisi**4.2.1. *Metanolo per HPLC*4.2.2. *Cloroformio per HPLC*4.2.3. *Triptamina monoclorigrato*4.3. **Reagenti per la derivatizzazione con dialdeide o-ftalica**4.3.1. *Idrossido di sodio, soluzione acquosa 12M*4.3.2. *Acido bórico, soluzione acquosa 0,4M regolata a pH 10,0 con idrossido di sodio (4.3.1)*4.3.3. *2-mercaptoetanololo*4.3.4. *Dialdeide o-ftalica (OPA)*4.4. **Solventi per l'eluizione HPLC**4.4.1. *I solventi di eluizione devono essere preparati utilizzando reagenti per HPLC*4.4.2. *Acqua per HPLC*4.4.3. *Metanolo di purezza fluorimetrica controllata*4.4.4. *Tetraidrofurano*4.4.5. *Diidrogenofosfato di sodio*4.4.6. *Acetato di sodio*4.4.7. *Acido acetico*

## 5. APPARECCHIATURA

5.1. **Bilancia analitica, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con risoluzione di 0,1 mg**5.2. **Becher da 25 e 100 ml**5.3. **Pipette da 1 e 10 ml**5.4. **Agitatore magnetico**5.5. **Pipette graduate da 0,2, 0,5 e 5 ml**5.6. **Matracci tarati da 10, 50 e 100 ml**5.7. **Siringhe da 20 e 100  $\mu$ l**5.8. **Bagno ad ultrasuoni**5.9. **Centrifuga a 27 000  $\times$  g**5.10. **Flaconi di vetro della capacit  di circa 5 ml**5.11. **Cilindro graduato da 25 ml**5.12. **pH-metro, con l'approssimazione di 0,1 unit  di pH**5.13. **Apparecchiatura HPLC**5.13.1. *Sistema di pompaggio a gradiente in grado di funzionare a 1,0 ml/min a 200 bar*5.13.2. *Autocampionatore con possibilit  di derivatizzazione*5.13.3. *Riscaldatore di colonna termostato a 30  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C*5.13.4. *Rivelatore a fluorescenza regolato alla lunghezza d'onda di eccitazione di 330 nm e alla lunghezza d'onda di emissione di 440 nm*5.13.5. *Integratore o software di elaborazione dati in grado di misurare l'area dei picchi*5.13.6. *Una colonna LiChrosphere<sup>®</sup> — 100 (250  $\times$  4,6 mm) o una colonna equivalente riempita con ottadecilsilano (C 18), granulometria 5  $\mu$ m.*

## 6. CAMPIONAMENTO

Il campionamento deve essere eseguito secondo la norma ISO 707.

## 7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparazione della soluzione dello standard interno**7.1.1. *Pesare 30,0  $\pm$  0,1 mg di triptamina monoclorigrato (4.2.3) in un matraccio tarato da 100 ml (5.6) e portare alla tacca con metanolo (4.2.1).*7.1.2. *Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 10 ml (5.6) e integrare alla tacca con metanolo (4.2.1) in modo da ottenere una concentrazione di triptamina pari a 0,15 mM.*7.2. **Preparazione della soluzione campione d'analisi**7.2.1. *Pesare 1,000  $\pm$  0,001 g del campione di LSP in un becher da 25 ml (5.2). Aggiungere 10 ml di acqua distillata a 40  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C mediante una pipetta (5.3) e agitare con l'agitatore magnetico (5.4) per 30 minuti per sciogliere eventuali grumi.*7.2.2. *Pipettare 0,2 ml (5.5) del latte ricostituito in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 100  $\mu$ l della soluzione di triptamina 0,15 mM (7.1) con una siringa (5.7) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Miscelare accuratamente capovolgendo il matraccio e sottoponendolo a bagno ultrasonico (5.8) per 15 minuti.*7.2.3. *Centrifugare (5.9) a 27 000 g per 10 minuti e raccogliere il surnatante in un flacone di vetro (5.10).*

Nota: La soluzione campione deve essere conservata a 4  $^{\circ}$ C fino al momento dell'esecuzione dell'analisi HPLC.

**7.3. Preparazione della soluzione dello standard esterno**

- 7.3.1. Pesare 55,4 mg di PEDP (4.1) in un matraccio tarato da 50 ml (5.6) e aggiungere circa 25 ml di cloroformio (4.2.2) mediante un cilindro graduato (5.11). Riscaldare il matraccio tappato a  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e miscelare accuratamente fino a quando il PEDP si scioglie. Raffreddare il matraccio a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , portare a volume con metanolo (4.2.1) e miscelare capovolgendolo.
- 7.3.2. Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 100 ml (5.6) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 100  $\mu\text{l}$  (5.7) di soluzione di triptamina 0,15 mM (7.1) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Miscelare mediante capovolgimento.

Nota: La soluzione del campione deve essere conservata a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'esecuzione dell'analisi HPLC.

**7.4. Preparazione del reagente di derivatizzazione**

Pesare  $25,0 \pm 0,1$  mg di OPA (4.3.4) in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 0,5 ml (5.5) di metanolo (4.2.1) e miscelare accuratamente per sciogliere l'OPA. Portare alla tacca con soluzione di acido borico (4.3.2) e aggiungere 20  $\mu\text{l}$  di 2-mercaptoetanolo (4.3.3) con una siringa (5.7).

Nota: Il reagente di derivatizzazione deve essere conservato a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in un flacone scuro; in tal modo rimane stabile per una settimana.

**7.5. Determinazione HPLC****7.5.1. Solventi di eluizione (4.4)**

Solvente A: soluzione di diidrogenofosfato di sodio 0,3 mM e di acetato di sodio 3 mM (regolata a pH  $6,5 \pm 0,1$  con acido acetico): metanolo:tetraidrofurano = 558:440:2 (v/v/v)

Solvente B: metanolo

**7.5.2. Gradiente di eluizione consigliato:**

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

Nota: Il gradiente di eluizione può richiedere leggere modifiche per ottenere la risoluzione mostrata in figura 1.

Temperatura della colonna:  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

7.5.3. Volume di iniezione: 50 µl di reagente di derivatizzazione e 50 µl di soluzione campione.

7.5.4. Equilibratura della colonna

Tutti i giorni, all'avviamento del sistema fluxare la colonna con solvente B al 100 % per 15 minuti, regolarla poi su A:B = 40:60 ed equilibrarla a 1 ml/min per 15 minuti. Eseguire una prova in bianco iniettando metanolo (4.2.1).

Nota: Se si prevede di non usare la colonna per un tempo prolungato, fluxarla con metanolo: cloroformio = 80:20 (v/v) per 30 minuti.

7.5.5. Determinazione del contenuto di PS + PE nel campione d'analisi

7.5.6. Eseguire la sequenza delle analisi cromatografiche mantenendo costante il tempo da una prova all'altra allo scopo di ottenere tempi di ritenzione costanti. Iniettare la soluzione dello standard esterno (7.3) ogni 5-10 soluzioni del campione d'analisi per calcolare il coefficiente di risposta.

Nota: La colonna deve essere pulita mediante fluxaggio con solvente B al 100 % (7.5.1) per almeno 30 minuti ogni 20-25 prove.

## 7.6. Modalità di integrazione

7.6.1. Picco PEDP

Il PEDP viene eluito come picco singolo. Determinare l'area del picco mediante integrazione da valle a valle.

7.6.2. Picco della triptamina

La triptamina viene eluita come picco singolo (figura 1). Determinare l'area del picco mediante integrazione da valle a valle.

7.6.3. Gruppo dei picchi PS e PE

Nelle condizioni descritte (figura 1), la PS eluisce nella forma di due picchi principali parzialmente non risolti preceduti da un picco minore; la PE eluisce nella forma di tre picchi principali parzialmente non risolti. Determinare l'area totale di ciascun gruppo di picchi fissando la linea di base come indicato nella figura 1.

## 8. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Calcolare il contenuto di PS e PE nel campione d'analisi con la formula seguente:

$$C = 55,36 \times [(A_2)/(A_1)] \times [(T_1)/(T_2)]$$

dove:

C = contenuto di PS o PE (mg/100 g di polvere) nel campione d'analisi;

A<sub>1</sub> = area del picco della PEDP della soluzione campione standard (7.3);

A<sub>2</sub> = area del picco PS o PE della soluzione campione d'analisi (7.3);

T<sub>1</sub> = area del picco della triptamina della soluzione campione standard (7.3);

T<sub>2</sub> = area del picco della triptamina della soluzione campione d'analisi (7.2).

## 9. PRECISIONE DEL METODO

Nota: I valori della ripetibilità sono stati calcolati secondo la norma internazionale FIL (\*).

### 9.1. Ripetibilità

La deviazione standard relativa della ripetibilità (che esprime la variabilità di risultati analitici indipendenti ottenuti dallo stesso operatore utilizzando la stessa apparecchiatura nelle stesse condizioni sullo stesso campione d'analisi e a breve distanza di tempo) non deve superare il 2 % in valore relativo. La differenza relativa tra i risultati di due determinazioni ottenute in queste condizioni non deve essere superiore al 6 % della media aritmetica dei risultati.

## 9.2. Riproducibilità

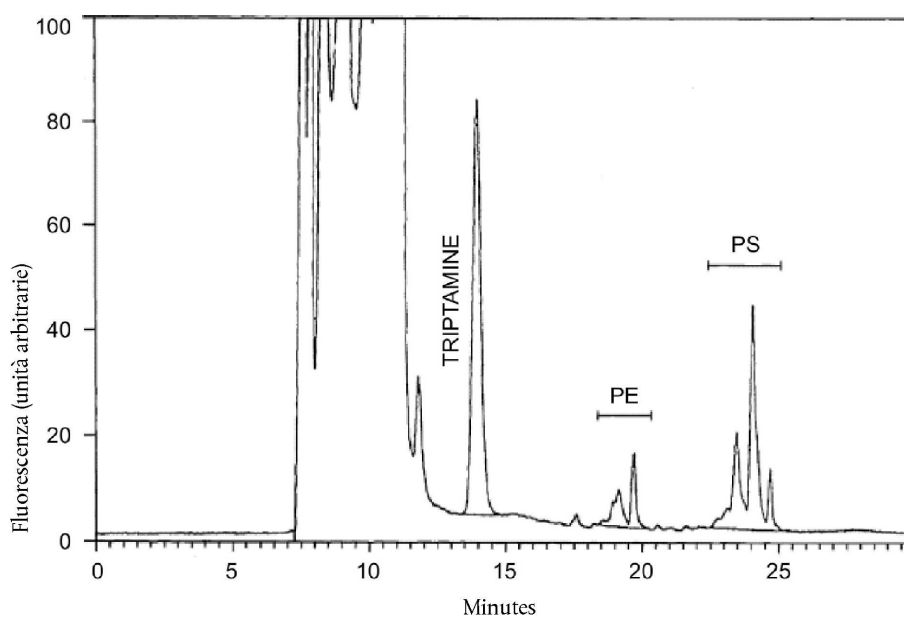
La differenza relativa tra i risultati di due determinazioni ottenute da operatori di differenti laboratori utilizzando apparecchiature differenti in differenti condizioni per l'analisi dello stesso campione non deve essere maggiore dell'11 % della media aritmetica dei risultati.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids." *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 39,395 (1988).

Figura 1

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



## Appendice II

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

## 1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

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

## 2. RIFERIMENTO

Norma internazionale ISO 707 - Latte e prodotti lattieri – Orientamenti in materia di campionamento.

## 3. DEFINIZIONE

Il contenuto di siero di latte presamico in polvere è espresso come percentuale di massa, determinato mediante il contenuto di caseinomacropeptidi secondo il metodo in appresso descritto.

## 4. PRINCIPIO

- Ricostituzione del latte scremato in polvere in acqua calda, eliminazione dei grassi e delle proteine con acido tricloroacetico, centrifugazione o filtrazione.
- Determinazione della quantità di caseinomacropeptidi (CMP) presente nel surnatante mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).
- Valutazione del risultato ottenuto in confronto con campioni di riferimento costituiti da latte scremato in polvere esente o addizionato di una percentuale nota di lattosiero in polvere.

## 5. REAGENTI

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

5.1. **Soluzione di acido tricloroacetico**

Sciogliere in acqua 240 g di acido tricloroacetico ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) e portare a 1 000 ml. La soluzione deve essere chiara e incolore.

5.2. **Soluzione eluente a pH 6,0**

Sciogliere 1,74 g di fosfato dipotassico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37 g di fosfato monopotassico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 21,41 g di solfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) in 700 ml d'acqua circa. Se necessario, regolare a pH 6,0 mediante una soluzione di acido fosforico o di idrossido di potassio.

Portare a 1 000 ml con acqua e miscelare.

*Nota:* La composizione dell'eluente può essere aggiornata per rispettare il certificato delle norme o le raccomandazioni del fabbricante del materiale di confezione della colonna.

Prima dell'impiego, filtrare la soluzione eluente su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45  $\mu\text{m}$ .

5.3. **Soluzione di lavaggio**

Miscelare 1 volume di acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) con 9 volumi d'acqua. Prima dell'utilizzazione, filtrare la miscela su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45  $\mu\text{m}$ .

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

5.4. **Campioni di riferimento**

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

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

6. APPARECCHIATURA
- 6.1. **Bilancia analitica**
- 6.2. **Centrifuga (facoltativa) capace di raggiungere 2 200 g e fornita di provette a tappo della capacità di 50 ml circa**
- 6.3. **Agitatore meccanico**
- 6.4. **Agitatore magnetico**
- 6.5. **Imbuti in vetro del diametro di 7 cm circa**
- 6.6. **Dischi di carta da filtro (porosità media) del diametro di 12,5 cm circa**
- 6.7. **Dispositivo di filtrazione in vetro provvisto di membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm**
- 6.8. **Pipette graduate capaci di erogare 10 ml (norma ISO 648, classe A o ISO/R 835) oppure un sistema capace di erogare 10,0 ml in due minuti**
- 6.9. **Sistema erogatore capace di erogare 20,0 ml di acqua a ca. 50 °C**
- 6.10. **Bagnomaria, termostato a 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Apparecchiatura HPLC comprendente:**
  - 6.11.1. *pompa;*
  - 6.11.2. *iniettore, manuale o automatico, da 15 a 30 µl di capacità;*
  - 6.11.3. *due colonne in serie TSK 2 000-SW (lunghezza 30 cm, diametro interno 0,75 cm) o colonne di pari efficacia (es. colonna singola TSK 2 000-SWxl, colonna singola Agilent Technologies Zorbax GF 250) ed una precolonna a monte (3 cm × 0,3 cm), caricata con I 125 o con un materiale di pari efficacia;*
  - 6.11.4. *forno a colonna, termostato a 35 ± 1 °C;*
  - 6.11.5. *rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, capace di effettuare misure a 205 nm con la sensibilità di 0,008 Å;*
  - 6.11.6. *integratore capace di misurare l'altezza dei picchi da valle a valle.*

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

7. CAMPIONAMENTO
- 7.1. Il prelievo dei campioni si effettua in base alla procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707. Gli Stati membri possono tuttavia impiegare un altro metodo di campionamento purché conforme ai principi della succitata norma.
- 7.2. Conservare il campione in condizioni tali da non consentire alcun deterioramento o modifica di composizione.
8. PROCEDIMENTO
- 8.1. **Preparazione del campione da analizzare**

Travasare la polvere in un recipiente di capacità all'incirca doppia del volume della polvere, provvisto di un coperchio impermeabile all'aria. Chiudere immediatamente il recipiente. Mescolare bene il latte in polvere capovolgendo più volte il recipiente.
- 8.2. **Aliquota da analizzare**

In una provetta da centrifuga (6.2) o in una bottiglia chiusa idonea (50 ml) pesare 2,000 g del campione con l'approssimazione di 0,001 g.
- 8.3. **Eliminazione dei grassi e delle proteine**
  - 8.3.1. *Aggiungere all'aliquota da analizzare 20,0 ml di acqua calda (50 °C). Sciogliere la polvere agitando per 5 minuti con l'agitatore (6.3). Mettere la provetta a bagnomaria (6.10) fino a raggiungere i 25 °C.*

8.3.2. Lavorando sotto agitazione magnetica (6.4), aggiungere 10,0 ml della soluzione di acido tricloroacetico (5.1) a ca. 25 °C in 2 minuti. Collocare la provetta nel bagnomaria (6.10) e mantenerla per 60 minuti.

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

#### 8.4. Determinazione cromatografica

8.4.1. Iniettare nell'apparecchio HPLC (6.11) da 15 a 30 µl del surnatante o del filtrato (8.3.3), misurati esattamente, mantenendo la velocità di flusso della soluzione eluente (5.2) sul valore di 1,0 ml/minuto.

Nota 1: Si può usare un'altra velocità di flusso in funzione del diametro interno delle colonne usate o delle istruzioni del fabbricante della colonna.

Nota 2: Al momento di ogni interruzione, risciacquare le colonne con acqua. Non lasciarle mai sotto la soluzione eluente (5.2).

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

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

Picco II:	secondo picco del cromatogramma, con RT uguale a 12,5 minuti circa.
Picco III:	terzo picco del cromatogramma, corrispondente ai CMP, con RT uguale a 15,5 minuti.

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

L'integratore (6.11.6) calcola automaticamente la superficie A di ogni picco:

A <sub>II</sub> :	superficie del picco II
A <sub>III</sub> :	superficie del picco III

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

In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

#### 8.5. Taratura

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

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

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

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

#### 9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

##### 9.1. Metodo di calcolo e formule

9.1.1. Calcolo dei coefficienti di risposta R:

Picco II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
-----------	----------------------------

dove:

R<sub>II</sub> = coefficiente di risposta del picco II,

A<sub>II</sub> [0] = le superfici dei picchi II del campione di riferimento [0] ottenute in 8.5.3.

Picco III:	$R_{III} = W / (A_{III}[5] - A_{III}[0])$
------------	---

dove:

- $R_{III}$  = coefficiente di risposta del picco III,  
 $A_{III}[0]$  and  $A_{III}[5]$  = le superfici del picco III nei campioni di riferimento [0] e [5] rispettivamente ottenute in 8.5.3,  
 $W$  = quantità di lattosiero presente nel campione di riferimento [5], cioè 5.

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

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

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

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

dove:

- $S_{II}[E]$ ,  $S_{III}[E]$ ,  $S_{IV}[E]$  = superfici relative, rispettivamente dei picchi II, III e IV nel campione [E],  
 $A_{II}[E]$ ,  $A_{III}[E]$  = superfici rispettivamente dei picchi II e III nel campione [E], ottenute in 8.4.2,  
 $R_{II}$ ,  $R_{III}$  = coefficienti di risposta calcolati in 9.1.1.

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

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E]) / (RT_{III}[5])$$

dove:

- $RRT_{III}[E]$  = tempo di ritenzione relativo del picco III del campione [E],  
 $RT_{III}[E]$  = tempo di ritenzione del picco III del campione [E] ottenuto in 8.4.2,  
 $RT_{III}[5]$  = tempo di ritenzione del picco III del campione di controllo [5] ottenuto in 8.5.3.

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

- $RRT_{III}[E] < 1,000$  se il contenuto di lattosiero è  $> 5\%$ ,  
 —  $RRT_{III}[E] \geq 1,000$  se il contenuto di lattosiero è  $\leq 5\%$ .

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

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

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

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

dove:

- $W$  = percentuale m/m di lattosiero presamico contenuto nel campione [E],  
 $S_{III}[E]$  = superficie relativa del picco III del campione da analizzare [E] ottenuto in 9.1.2,  
 1,3 = superficie relativa media del picco III, espressa in grammi di lattosiero presamico per 100 g determinato in latte scremato in polvere non sofisticato di diversa origine. Questa cifra è stata ottenuta sperimentalmente,  
 $S_{III}[0]$  = superficie relativa del picco III, che è uguale a  $R_{III} \times A_{III}[0]$ . Tali valori sono ottenuti rispettivamente nei punti 9.1.1 e 8.5.3,  
 $(S_{III}[0] - 0,9)$  = correzione da apportare alla superficie relativa media 1,3 quando il valore  $S_{III}[0]$  è diverso da 0,9. Sperimentalmente la superficie relativa media del picco III del campione di controllo [0] è di 0,9.

### 9.3. Precisione del metodo

#### 9.3.1. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o a breve distanza di tempo dallo stesso analista, impiegando la stessa apparecchiatura e sulla stessa aliquota di campione non deve superare lo 0,2 % m/m.

#### 9.3.2. Riproducibilità

La differenza tra due risultati individuali ed indipendenti ottenuti in due laboratori diversi sulla stessa aliquota di campione, non deve superare lo 0,4 % m/m.

### 9.4. Interpretazione

9.4.1. È possibile concludere per l'assenza di lattosiero se la superficie relativa del picco III,  $S_{III}$  [E], espressa in g di lattosiero presamico per 100 g di prodotto, è  $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$

dove:

2,0	è il valore massimo ammesso per la superficie relativa del picco III, che tiene conto della superficie media relativa del picco III, ossia 1,3, dell'incertezza dovuta alle variazioni di composizione del latte scremato in polvere e della riproducibilità del metodo (9.3.2),
$(S_{III}[0] - 0,9)$	è la correzione da apportare quando il valore $S_{III}[0]$ è diverso da 0,9 (cfr. punto 9.2).

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

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

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

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

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

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

$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7$	(grafico 1)
$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93$	(grafico 2)

dove:

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

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

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

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

Lo scarto ( $T_1$  e  $T_2$ ) tra la superficie relativa  $S_{III}$  [E] osservata e la superficie relativa  $S_{III}$  si ricava dalle seguenti relazioni:  $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$ ;  $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

9.4.3.2 Se  $T_1$  e/o  $T_2$  sono inferiori o uguali a zero, non si può concludere che è presente lattosiero presamico.

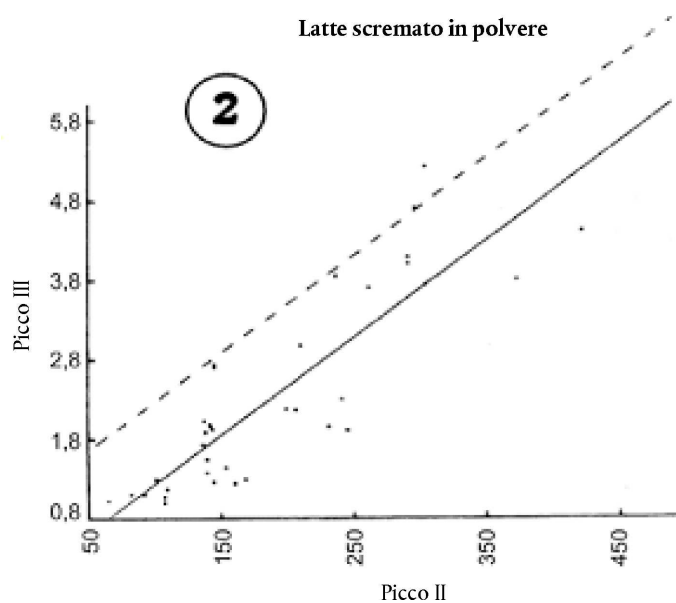
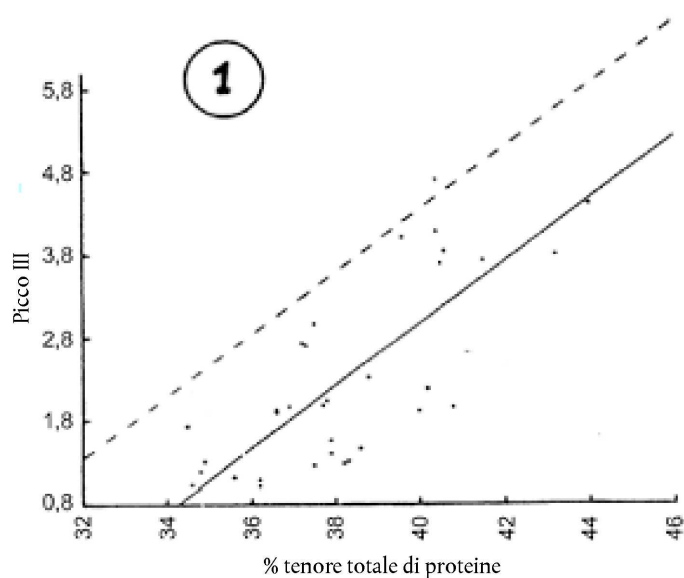
Se  $T_1$  e  $T_2$  sono superiori a zero, si può concludere che è presente lattosiero presamico.

Il tenore di lattosiero presente è calcolato utilizzando la formula seguente:  $W = T_2 + 0,91$

dove:

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

#### Latte scremato in polvere



## Appendice III

**DETERMINAZIONE DEL LATTOSIERO PRESAMICO IN POLVERE NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE**

1. OGGETTO: RICERCA DELL'AGGIUNTA DI SIERO DI LATTE PRESAMICO IN POLVERE AL LATTE SCREMATO IN POLVERE
2. RIFERIMENTI: NORMA INTERNAZIONALE ISO 707
3. DEFINIZIONE

Il contenuto di siero di latte presamico in polvere è espresso come percentuale di massa, determinato mediante il contenuto di caseinomacropetidi secondo il metodo in appresso descritto.
4. PRINCIPIO

I campioni sono analizzati ai fini della ricerca del caseinomacropetide A mediante il metodo per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) in fase inversa. Valutazione del risultato ottenuto in confronto con campioni di riferimento costituiti da latte scremato in polvere esente o addizionato di una percentuale nota di siero di latte in polvere. I risultati superiori all'1 % (m/m) mostrano la presenza di polvere di siero di latte presamico.
5. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua da impiegare deve essere acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente. L'acetonitrile deve essere di qualità spettroscopica o HPLC.

  - 5.1. **Soluzione di acido tricloroacetico**

Sciogliere in acqua 240 g di acido tricloroacetico ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) e portare a 1 000 ml.
  - 5.2. **Eluenti A e B**

Eluente A: in un pallone da 1 000 ml porre 150 ml di acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 20 ml di isopropanolo ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ) e 1,00 ml di acido trifluoroacetico (TFA,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) e portare al volume di 1 000 ml con acqua.

Eluente B: in un pallone da 1 000 ml porre 550 ml di acetonitrile, 20 ml di isopropanolo e 1,00 ml di TFA e portare al volume di 1 000 ml con acqua. Prima dell'impiego, filtrare la soluzione eluente su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45  $\mu\text{m}$ .
  - 5.3. **Conservazione della colonna**

Dopo le analisi la colonna viene lavata con l'eluente B (con gradiente) e successivamente con acetonitrile (con gradiente per 30 minuti). La colonna è conservata in acetonitrile.
  - 5.4. **Campioni di riferimento**
    - 5.4.1. *Latte scremato in polvere rispondente ai requisiti previsti per l'ammasso pubblico, indicato in appresso con [0].*
    - 5.4.2. *Lo stesso latte, sofisticato al 5 % (m/m) con lattosiero in polvere di tipo presamico di composizione media, indicato in seguito con [5].*
    - 5.4.3. *Lo stesso latte, sofisticato al 50 % (m/m) con lattosiero in polvere di tipo presamico di composizione media, indicato in seguito con [50].*
6. APPARECCHIATURA
  - 6.1. **Bilancia analitica**
  - 6.2. **Centrifuga (facoltativa) capace di raggiungere 2 200 g e fornita di provette a tappo della capacità di 50 ml circa**
  - 6.3. **Agitatore meccanico**
  - 6.4. **Agitatore magnetico**
  - 6.5. **Imbuti in vetro del diametro di 7 cm circa**

- 6.6. **Dischi di carta da filtro (porosità media) del diametro di 12,5 cm circa**
- 6.7. **Dispositivo di filtrazione in vetro provvisto di membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm**
- 6.8. **Pipette graduate capaci di erogare 10 ml (norma ISO 648, classe A o ISO/R 835) oppure un sistema capace di erogare 10,0 ml in due minuti**
- 6.9. **Sistema erogatore capace di erogare 20,0 ml di acqua a ca. 50 °C**
- 6.10. **Bagnomaria, termostato a 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Apparecchiatura HPLC comprendente:**
  - 6.11.1. *sistema di pompaggio a gradiente binario;*
  - 6.11.2. *iniettore manuale o automatico da 100 µl di capacità;*
  - 6.11.3. *colonna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (lunghezza 25 cm × diametro interno 0,46 cm) o una colonna equivalente per fase inversa a base di silice a pori larghi;*
  - 6.11.4. *forno a colonna, termostato a 35 ± 1 °C;*
  - 6.11.5. *rilevatore UV a lunghezza d'onda variabile, capace di effettuare misure fino a 210 nm (se necessario si può utilizzare una lunghezza d'onda superiore, fino a 220 nm), con la sensibilità di 0,02 Å;*
  - 6.11.6. *integratore capace di impostare l'integrazione o sulla linea di base o da valle a valle.*

Nota: È possibile far funzionare la colonna a temperatura ambiente purché tale temperatura non abbia fluttuazioni superiori ad 1 °C, altrimenti il tempo di ritenzione del CMP<sub>A</sub> sarebbe soggetto a variazioni troppo grandi.

## 7. CAMPIONAMENTO

- 7.1. **Il prelievo dei campioni si effettua in base alla procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707. Gli Stati membri possono tuttavia impiegare un altro metodo di campionamento purché conforme ai principi della succitata norma.**
- 7.2. **Conservare il campione in condizioni tali da non consentire alcun deterioramento o modifica di composizione.**

## 8. PROCEDIMENTO

### 8.1. Preparazione del campione da analizzare

Trasversare la polvere in un recipiente di capacità all'incirca doppia del volume della polvere, provvisto di un coperchio impermeabile all'aria. Chiudere immediatamente il recipiente. Mescolare bene il latte in polvere capovolgendo più volte il recipiente.

### 8.2. Aliquota da analizzare

In una provetta da centrifuga (6.2) o in una bottiglia chiusa idonea (50 ml) pesare 2,00 g del campione con l'approssimazione di 0,001 g.

Nota: Nel caso delle miscele, pesare una porzione dell'aliquota da analizzare in modo che la porzione sgrassata del campione corrisponda a 2,00 g.

### 8.3. Eliminazione dei grassi e delle proteine

- 8.3.1. *Aggiungere all'aliquota da analizzare 20,0 ml di acqua calda (50 °C). Sciogliere la polvere agitando per 5 minuti con l'agitatore meccanico (6.3). Mettere la provetta a bagnomaria (6.10) fino a raggiungere i 25 °C.*
- 8.3.2. *Aggiungere 10,0 ml di soluzione di acido tricloroacetico a ca. 25 °C (5.1) senza interruzione per 2 minuti, agitando vigorosamente con l'agitatore magnetico (6.4). Collocare la provetta nel bagnomaria (6.10) e mantenerla per 60 minuti.*
- 8.3.3. *Centrifugare a 2 200 g (6.2) per 10 minuti oppure filtrare su carta (6.6), eliminando i primi 5 ml di filtrato.*

#### 8.4. Determinazione cromatografica

8.4.1. Il metodo HPLC in fase inversa esclude la possibilità di falsi positivi a causa della presenza di latticello acido in polvere.

8.4.2. Prima di eseguire l'analisi HPLC in fase inversa andranno ottimizzate le condizioni del gradiente. Un tempo di ritenzione di 26 minuti  $\pm$  2 minuti per il  $CMP_A$  è ottimale per i sistemi a gradiente con un volume morto di circa 6 ml (volume dal punto in cui i solventi confluiscono sino al volume del circuito dell'iniettore compreso). Per i sistemi a gradiente con un volume morto inferiore (ad esempio 2 ml) si deve utilizzare come tempo ottimale di ritenzione un tempo di 22 minuti.

Prendere soluzioni dei campioni di riferimento (5.4) con e senza lattosiero presamico al 50 %.

Iniettare 100  $\mu$ l del surnatante o del filtrato (8.3.3) nell'apparecchiatura HPLC operante alle condizioni di gradiente di esplorazione date nella tabella 1.

Tabella 1

#### Condizioni del gradiente di esplorazione per l'ottimizzazione della cromatografia

Tempo (min)	Flusso (ml/min)	% A	% B	Curva
Iniziale	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

Confrontando i due cromatogrammi si dovrebbe individuare il picco del  $CMP_A$ .

Utilizzando la formula che segue si può calcolare la composizione del solvente iniziale da utilizzare per il gradiente normale (secondo 8.4.3):  
 $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 30 / 27$   
 $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 1,11$

dove:

$RT_{cmpA}$ : tempo di ritenzione del  $CMP_A$  nel gradiente di esplorazione

10: la % B iniziale del gradiente di esplorazione

2,5: la % B al punto intermedio meno la % B al punto iniziale nel gradiente normale

13,5: tempo del punto intermedio del gradiente di esplorazione

26: tempo di ritenzione necessario del  $CMP_A$

6: rapporto dei coefficienti di direzione del gradiente di esplorazione e del gradiente normale

30: la % B al punto iniziale meno la % B a 27 minuti nel gradiente di esplorazione

27: tempo di operazione del gradiente di esplorazione

#### 8.4.3. Prendere soluzioni dei campioni da analizzare

Iniettare nell'apparecchio HPLC 100  $\mu$ l del surnatante o del filtrato (8.3.3) misurati esattamente, mantenendo la velocità di flusso della soluzione eluente (5.2) sul valore di 1,0 ml/minuto.

La composizione dell'eluente all'inizio dell'analisi si ottiene da 8.4.2. Normalmente essa è prossima ad A: B = 76:24 (5.2). Subito dopo l'iniezione viene avviato un gradiente lineare che dopo 27 minuti porta ad una percentuale di B maggiore del 5 %. Successivamente viene avviato un gradiente lineare che in 5 minuti porta la composizione dell'eluente a 90 % B. Questa composizione viene mantenuta per 5 minuti, dopo di che con un gradiente lineare la composizione cambia e torna in 5 minuti a quella iniziale. Sulla base del volume interno del sistema di pompaggio l'iniezione successiva può essere effettuata 15 minuti dopo aver raggiunto le condizioni iniziali.

Nota 1: Il tempo di ritenzione del  $CMP_A$  deve essere di 26 minuti  $\pm$  2 minuti. Esso può essere ottenuto variando le condizioni iniziali e finali del primo gradiente. Tuttavia la differenza nella % B per quanto riguarda le condizioni iniziali e finali del primo gradiente deve rimanere del 5 % B.

*Nota 2:* Gli eluenti devono essere adeguatamente degassati e restare tali. Ciò è essenziale per il corretto funzionamento del sistema di pompaggio del gradiente. La deviazione standard per il tempo di ritenzione del picco  $CMP_A$  deve essere inferiore a 0,1 minuto ( $n = 10$ ).

*Nota 3:* Ogni 5 campioni è necessario iniettare il campione di riferimento [5] da utilizzare per calcolare un nuovo coefficiente di risposta R (9.1.1).

- 8.4.4. *I risultati dell'analisi cromatografica del campione da analizzare [E] sono ottenuti sotto forma di un cromatogramma in cui il picco  $CMP_A$  è identificato dal suo tempo di ritenzione che è di circa 26 minuti.*

L'integratore (6.11.6) calcola automaticamente l'altezza di picco H del picco  $CMP_A$ . In ogni cromatogramma si deve controllare la posizione della linea di base. Se la linea di base non è correttamente localizzata occorre ripetere l'analisi o l'integrazione.

*Nota:* Se il picco  $CMP_A$  è separato sufficientemente dagli altri picchi occorre usare il metodo dell'integrazione attraverso l'assegnazione della linea di base da valle a valle; altrimenti tracciare linee perpendicolari ad una linea di base comune, il cui punto di partenza deve essere vicino al picco  $CMP_A$  (ma non a  $t = 0$  min!). Usare lo stesso tipo di integratore per lo standard di riferimento e i campioni e, nel caso di una linea di base comune, verificarne la coerenza per i campioni e lo standard di riferimento.

Prima di procedere all'interpretazione quantitativa è necessario esaminare l'aspetto di ciascun cromatogramma al fine di individuare anomalie dovute al cattivo funzionamento dell'apparecchio o della colonna, oppure all'origine e alla natura del campione analizzato. In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

## 8.5. **Taratura**

- 8.5.1. *Applicare esattamente ai campioni di riferimento (5.4.1-5.4.2) il modo di operare descritto dal punto 8.2 al punto 8.4.4. Utilizzare soluzioni preparate di recente, in quanto a temperatura ambiente il CMP si degrada in ambiente tricloroacetico all'8 %. A 4 °C la soluzione rimane stabile per 24 ore. Nel caso si debba procedere a lunghe serie di analisi è opportuno l'impiego, nell'iniettore automatico, di una vaschetta raffreddata per il campione.*

*Nota:* 8.4.2. può essere omesso se la % B alle condizioni iniziali è nota da analisi precedenti.

Il cromatogramma del campione di riferimento [5] dovrebbe essere analogo alla figura 1. In questa figura il picco  $CMP_A$  è preceduto da due piccoli picchi. È essenziale ottenere una separazione analoga.

- 8.5.2. *Prima di procedere alla determinazione cromatografica dei campioni iniettare 100 µl del campione di riferimento senza lattosiero presamico [0] (5.4.1).*

Nel cromatogramma non si deve vedere un picco al tempo di ritenzione del picco  $CMP_A$ .

- 8.5.3. *Determinare i coefficienti di risposta R iniettando un volume di filtrato (8.5.1) pari a quello utilizzato per i campioni.*

## 9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

### 9.1. **Metodo di calcolo e formule**

- 9.1.1. *Calcolo del coefficiente di risposta R:*

$$\text{Picco } CMP_A: R = W/H$$

dove:

R = coefficiente di risposta del picco  $CMP_A$

H = altezza del picco  $CMP_A$

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

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

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

dove:

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

R = coefficiente di risposta del picco  $CMP_A$  (9.1.1)

H(E) = altezza del picco  $CMP_A$  del campione [E]

Se W[E] è maggiore dell'1 % e la differenza fra il tempo di ritenzione e quello del campione di riferimento [5] è inferiore a 0,2 minuti, è presente lattosiero presamico in polvere.

## 9.3. Precisione del metodo

### 9.3.1. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o a breve distanza di tempo dallo stesso analista, impiegando la stessa apparecchiatura e sulla stessa aliquota di campione non deve superare lo 0,2 % m/m.

### 9.3.2. Riproducibilità

Non determinata.

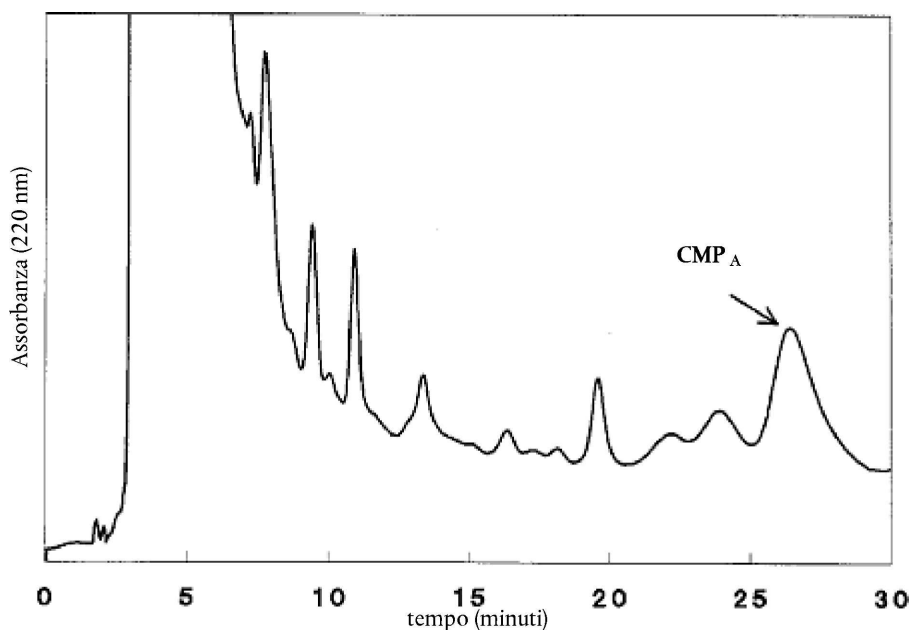
### 9.3.3. Linearità

Dallo 0 al 16 % di lattosiero presamico si deve ottenere una relazione lineare con un coefficiente di correlazione > 0,99.

## 9.4. Interpretazione

Il limite del 1 % tiene conto dell'incertezza dovuta alla riproducibilità.

Figura 1  
Ni—4.6 standard



(\*) Norma internazionale FIL 135B/1991. Latte e prodotti lattiero-caseari. Caratteristiche di precisione dei metodi di analisi. Descrizione di un metodo di studio in collaborazione.»;

3) sono aggiunti i seguenti allegati:

«ALLEGATO VI

**Metodi di analisi del burro conferito all'ammasso privato**

Parametro	Metodo
Grasso <sup>(1)</sup>	ISO 17189 o ISO 3727 parte 3
Acqua	ISO 3727 parte 1
Materie secche non grasse (escluso il sale)	ISO 3727 parte 2
Sale	ISO 15648

<sup>(1)</sup> Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore.

ALLEGATO VII

**Metodi di analisi del latte scremato in polvere conferito all'ammasso privato**

Parametro	Metodo
Grasso	ISO 1736
Proteine	ISO 8968 parte 1
Acqua	ISO 5537

## ALLEGATO VIII

**Metodi di analisi dei formaggi conferiti all'ammasso privato**

1. Per verificare che i formaggi che devono essere prodotti esclusivamente con latte di pecora, con latte di capra o con latte di bufala oppure con miscele di latte di pecora, capra o bufala non contengano caseina di latte vaccino si applica il metodo d'analisi descritto nell'appendice.

La caseina di latte vaccino si considera presente se il contenuto di caseina di latte vaccino nel campione analizzato è pari o superiore a quello del campione di riferimento contenente l'1 % di latte vaccino descritto nell'appendice.

2. I metodi per individuare la presenza di caseina di latte vaccino nei formaggi di cui al paragrafo 1 possono essere applicati alle seguenti condizioni:
  - a) il limite di individuazione non deve essere superiore allo 0,5 %;
  - b) non si devono ottenere risultati falsamente positivi; e
  - c) la caseina di latte vaccino è individuabile con la sensibilità richiesta anche dopo i lunghi periodi di maturazione consueti in commercio.

In caso di mancato rispetto di una delle condizioni sopra elencate si ricorre al metodo descritto nell'appendice.

---

## Appendice

**METODO PER LA RIVELAZIONE DI CASEINATO E DI LATTE VACCINI IN FORMAGGI PRODOTTI CON LATTE DI PECORA, DI CAPRA O DI BUFALA O CON MISCELE DI LATTI DI PECORA, DI CAPRA E DI BUFALA**

## 1. OGGETTO

Rivelazione di caseinato e latte vaccini in formaggi di latte di pecora, di capra o di bufala o di miscele di latti di pecora, capra e bufala mediante focalizzazione isoelettrica delle  $\gamma$ -caseine dopo plasminolisi.

## 2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo è idoneo per una rivelazione sensibile e specifica di latte vaccino crudo o trattato termicamente e di caseinato in formaggi freschi e stagionati di latte di pecora, di capra o di bufala o di miscele di latti di pecora, capra e bufala. Il metodo non è adatto per la rivelazione dell'adulterazione di latte e formaggi mediante concentrati di proteine del siero di latte vaccino trattate termicamente.

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

3.1. **Isolamento delle caseine dal formaggio e dagli standard di riferimento.**3.2. **Solubilizzazione delle caseine isolate ed azione plasminica sulle stesse (EC.3.4.21.7).**3.3. **Focalizzazione isoelettrica delle caseine trattate con plasmina in presenza di urea e colorazione delle proteine.**3.4. **Valutazione dei profili di  $\gamma_3$ - e  $\gamma_2$ -caseina (prova della presenza di latte vaccino) per confronto del profilo del campione con quelli ottenuti sullo stesso gel da standard di riferimento contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino.**

## 4. REAGENTI

Salvo dove diversamente indicato, utilizzare solo reagenti chimici per analisi. L'acqua deve essere bidistillata o di purezza equivalente.

*Nota:* Le indicazioni che seguono valgono per gel di poliacrilammide preparati in laboratorio, contenenti urea, delle dimensioni di 265 × 125 × 0,25 mm. Nel caso vengano utilizzati gel di differenti dimensioni o differente tipo, può rendersi necessario modificare le condizioni di separazione.

**Focalizzazione isoelettrica**4.1. **Reagenti per la produzione di gel di poliacrilammide contenenti urea**4.1.1. *Soluzione madre di gel*

Sciogliere in acqua:

4,85 g di acrilammide

0,15 g N, N'-metilen-bis-acrilammide (BIS)

48,05 g di urea

15,00 g di glicerolo (87 % p/p),

e portare a 100 ml. Conservare in frigorifero in un flacone di vetro scuro.

*Nota:* È preferibile utilizzare una soluzione premiscelata di acrilammide/BIS, disponibile in commercio, invece dei pesi prestabiliti delle acrilammidi neurotossiche. Se una tale soluzione contiene il 30 % p/v di acrilammide e lo 0,8 % p/v di BIS, utilizzare per la formulazione un volume di 16,2 ml invece del peso prestabilito. La soluzione madre può venire conservata per un massimo di 10 giorni; se la sua conducibilità è superiore a 5  $\mu$ S, deionizzarla agitando per 30 minuti con 2 g di Amberlite MB-3, poi filtrare attraverso una membrana da 0,45  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Soluzione di gel

Preparare una soluzione di gel miscelando additivi e anfoliti (\*) con la soluzione madre di gel (4.1.1).

9,0 ml di soluzione madre

24 mg di  $\beta$ -alanina

500  $\mu$ l di anfolita pH 3,5-9,5

250  $\mu$ l di anfolita pH 5-7

250  $\mu$ l di anfolita pH 6-8

Miscelare la soluzione di gel e degassarla per due o tre minuti in un bagno a ultrasuoni o sotto vuoto.

*Nota:* La soluzione di gel va preparata appena prima dell'uso (cfr. 6.2).

#### 4.1.3. Soluzioni dei catalizzatori

##### 4.1.3.1 N, N, N' N' — tetrametiletilendiammina (Temed)

##### 4.1.3.2 Persolfato d'ammonio (PER) al 40 % p/v:

Sciogliere 800 mg di PER in acqua e portare a 2 ml.

*Nota:* Usare sempre soluzioni di PER appena preparate.

#### 4.2. **Fluido di contatto**

Cherosene o paraffina liquida

#### 4.3. **Soluzione anodica**

Sciogliere 5,77 g di acido fosforico (85 % p/p) in acqua e portare a 100 ml.

#### 4.4. **Soluzione catodica**

Sciogliere 2 g di idrossido di sodio in acqua e portare a 100 ml con acqua.

#### **Preparazione del campione**

#### 4.5. **Reagenti per l'isolamento delle proteine**

4.5.1. *Acido acetico diluito (25 ml di acido acetico glaciale portati a 100 ml con acqua).*

4.5.2. *Diclorometano*

4.5.3. *Acetone*

#### 4.6. **Tampone per la solubilizzazione delle proteine**

Sciogliere in acqua:

5,75 g di glicerolo (87 % p/p),

24,03 g di urea

250 mg di ditiotreitolo

e portare al volume di 50 ml.

*Nota:* Conservare in frigorifero, per una settimana al massimo.

**4.7. Reagenti per la scissione plasmidica delle caseine****4.7.1. Tampone di carbonato di ammonio**

Titolare una soluzione di idrogenocarbonato d'ammonio a 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml di acqua) contenente 0,05 mol/l di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, 1,46 g/100 ml), con una soluzione di carbonato d'ammonio a 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml di acqua) contenente 0,05 mol/l EDTA a pH 8.

**4.7.2. Plasmina bovina (EC. 3.4.21.7), attività non minore di 5 U/ml****4.7.3. Soluzione di acido  $\epsilon$ -amminocapronico per l'inibizione dell'enzima**

Sciogliere 2,624 g di acido  $\epsilon$ -amminocapronico (acido 6-ammino-n-esanoico) in 100 ml di etanolo al 40 % (v/v).

**4.8. Standard**

**4.8.1. Standard di riferimento certificati di una miscela di coagulo presamico a partire da latte scremato di pecora e capra contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino possono essere richiesti all'Istituto dei materiali e delle misure di riferimento della Commissione (Institute for Reference Materials and Measurements), B-2440 Geel, Belgio**

**4.8.2. Preparazione di standard di laboratorio provvisori di coagulo presamico di latte di bufala contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino**

Il latte scremato viene preparato mediante centrifugazione di latte crudo di bufala o di vacca, a 37 °C, a 500 g per 20 minuti. Dopo aver raffreddato rapidamente a 6-8 °C la provetta e il contenuto, lo strato superiore di grasso viene completamente rimosso. Per la preparazione dello standard all'1 %, aggiungere 5 ml di latte vaccino scremato a 495 ml di latte scremato di bufala in un becher da 1 litro, regolare il pH a 6,4 aggiungendo acido lattico diluito (10 % p/v). Regolare la temperatura su 35 °C e aggiungere 100  $\mu$ l di caglio di vitello (attività 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), agitare per 1 minuto e poi lasciare a riposo il becher coperto con un foglio di alluminio a 35 °C per 1 ora per permettere la formazione della cagliata. Dopo la formazione della cagliata, liofilizzare l'intero latte coagulato, senza preventiva omogeneizzazione né drenaggio del siero. Dopo la liofilizzazione, macinare finemente fino ad ottenere una polvere omogenea. Per la preparazione dello standard allo 0 %, eseguire la stessa procedura usando latte scremato di bufala puro. Conservare gli standard a - 20 °C.

*Nota:* È consigliabile controllare la purezza del latte di bufala mediante focalizzazione isoelettrica delle caseine trattate con plasmina prima della preparazione degli standard.

**Reagenti per la colorazione delle proteine****4.9. Fissativo**

Sciogliere 150 g di acido tricloroacetico in acqua e portare a 1 000 ml.

**4.10. Soluzione decolorante**

Portare 500 ml di metanolo e 200 ml di acido acetico glaciale a 2 000 ml con acqua distillata.

*Nota:* Preparare la soluzione decolorante ogni giorno; per la preparazione si possono utilizzare soluzioni madre di metanolo al 50 % (v/v) e acido acetico glaciale al 20 % (v/v), da miscelare in volumi uguali.

**4.11. Soluzioni coloranti****4.11.1. Soluzioni di colorante (soluzione madre 1)**

Sciogliere 3,0 g di blu brillante Coomassie G 250 (C.I. 42655) in 1 000 ml di metanolo al 90 % (v/v) con un agitatore magnetico (circa 45 minuti), filtrare attraverso due filtri a pieghe, a velocità media.

**4.11.2. Soluzioni di colorante (soluzione madre 2)**

Sciogliere 5 g di solfato di rame pentaidrato in 1 000 ml di acido acetico al 20 % (v/v).

**4.11.3. Soluzioni di colorante (soluzione di lavoro)**

Miscelare 125 ml di ciascuna delle soluzioni madre (4.11.1, 4.11.2) appena prima della colorazione.

*Nota:* La soluzione colorante deve essere preparata il giorno stesso in cui viene usata.

5. APPARECCHIATURA
  - 5.1. **Lastre di vetro (265 x 125 x 4 mm); rullo di gomma (larghezza 15 cm); tavolo con piano regolabile**
  - 5.2. **Foglio di supporto del gel (265 × 125 mm)**
  - 5.3. **Foglio di copertura (280 × 125 mm). Applicare una striscia di nastro adesivo (280 × 6 × 0,25 mm) a ciascun bordo lungo (cfr. figura 1).**
  - 5.4. **Camera di elettrofocalizzazione con piastra di raffreddamento (per esempio 265 × 125 mm) e alimentazione elettrica adatta ( $\geq 2,5$  kV) o dispositivo per elettroforesi automatica**
  - 5.5. **Criostato a circolazione, con regolazione termostatica su  $12 \pm 0,5$  °C**
  - 5.6. **Centrifuga regolabile su 3 000 g**
  - 5.7. **Strisce elettrodiche (lunghezza  $\geq 265$  mm)**
  - 5.8. **Flaconi contagocce per le soluzioni anodica e catodica**
  - 5.9. **Applicatori per campioni (10 × 5 mm, viscosa o carta da filtro a scarso assorbimento di proteine)**
  - 5.10. **Vaschette di colorazione e decolorazione in acciaio inossidabile o vetro (per esempio vassoi portastrumenti da 280 × 150 mm)**
  - 5.12. **Omogeneizzatore ad asta regolabile (diametro 10 mm), velocità 8 000-20 000 g al minuto**
  - 5.13. **Agitatore magnetico**
  - 5.14. **Bagno ad ultrasuoni**
  - 5.15. **Saldatore per pellicola**
  - 5.16. **Micropipette da 25  $\mu$ l**
  - 5.17. **Concentratore sotto vuoto o liofilizzatore**
  - 5.18. **Bagnomaria a controllo termostatico regolabile su 35 e  $40 \pm 1$  °C con agitatore**
  - 5.19. **Densitometro con lettura a  $\lambda = 634$  nm**

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1. Preparazione del campione

#### 6.1.1. Isolamento delle caseine

Pesare una quantità equivalente a 5 g di sostanza secca di formaggio o degli standard di riferimento in una provetta da centrifuga da 100 ml, aggiungere 60 ml di acqua distillata e omogeneizzare con un omogeneizzatore ad asta (8 000-10 000 rpm). Regolare di pH 4,6 con acido acetico diluito (4.5.1) e centrifugare (5 min, 3 000 g). Decantare il grasso e il siero, omogeneizzare il residuo a 20 000 rpm in 40 ml di acqua distillata portata a pH 4,5 con acido acetico diluito (4.5.1), aggiungere 20 ml di diclorometano (4.5.2), omogeneizzare di nuovo e centrifugare (5 min, 3 000 g). Recuperare con una spatola lo strato di caseina disposto tra la fase acquosa e la fase organica (cfr. figura 2) e separare le due fasi per decantazione. Riomogeneizzare la caseina in 40 ml di acqua distillata (cfr. sopra) e 20 ml di diclorometano (4.5.2) e centrifugare. Ripetere questo procedimento fino a quando le due fasi di estrazione diventano incolore (2 o 3 volte). Omogeneizzare il residuo proteico con 50 ml di acetone (4.5.3) e filtrare attraverso carta da filtro a pieghe di media velocità. Lavare il residuo sul filtro con due aliquote separate di acetone di 25 ml ciascuna e far essiccare all'aria o in corrente d'azoto, quindi polverizzare finemente nel mortaio.

*Nota:* Gli isolati di caseina secchi devono essere conservati a  $-20$  °C.

#### 6.1.2. Scissione plasminica delle $\beta$ -caseine per intensificare le bande di $\gamma$ -caseine

Disperdere 25 mg di caseine isolate (6.1.1) in 0,5 ml di tampone di carbonato d'ammonio (4.7.1) e omogeneizzare per 20 minuti, ad esempio utilizzando un trattamento ad ultrasuoni. Riscaldare a 40 °C e aggiungere 10  $\mu$ l di plasmina (4.7.2), miscelare e incubare per 1 ora a 40 °C agitando in continuazione. Per inibire l'enzima, aggiungere 20  $\mu$ l di soluzione di acido  $\epsilon$ -amminocapronico (4.7.3), poi aggiungere 200 mg di urea solida e 2 mg di ditiotreitolo.

*Nota:* Per ottenere una maggiore simmetria nelle bande di caseina focalizzate, è consigliabile liofilizzare la soluzione dopo aver aggiunto l'acido  $\epsilon$ -amminocapronico e disciolto poi i residui in 0,5 ml di tampone di solubilizzazione delle proteine (4.6).

## 6.2. Preparazione di gel di poliacrilammide contenenti urea

Con qualche goccia d'acqua e col rullo stendere il foglio di supporto del gel (5.2) su una lastra di vetro (5.1) rimuovendo l'acqua in eccesso con carta assorbente o con un panno. Con il rullo, stendere il foglio di copertura (5.3) con distanziatori (0,25 mm) su un'altra lastra di vetro nello stesso modo. Posare la lastra orizzontalmente su un piano a livello regolabile.

Aggiungere 10 µl di Temed (4.1.3.1) alla soluzione di gel preparata e disaerata (4.1.2), agitare e aggiungere 10 µl di soluzione di PER (4.1.3.2), miscelare accuratamente e versare immediatamente in modo regolare sul centro del foglio di copertura. Posizionare un bordo della lastra di supporto del gel (con il lato del foglio in basso) sulla lastra del foglio di copertura e abbassarla lentamente in modo che tra i fogli si formi una pellicola di gel uniforme e senza bolle (figura 3). Abbassare completamente la lastra di supporto del gel con attenzione usando una spatola sottile e porre altre tre lastre di vetro su di essa come pesi. Dopo il completamento della polimerizzazione (circa 60 minuti), rimuovere il gel polimerizzato sul foglio di supporto insieme con il foglio di copertura scostando le lastre di vetro. Pulire accuratamente il rovescio della lastra di supporto per rimuovere residui di gel e urea. Saldare il "sandwich di gel" in una pellicola tubolare e conservare in frigorifero (massimo 6 settimane).

*Nota:* Il foglio di copertura con i distanziatori può essere riutilizzato. Il gel di poliacrilammide può essere tagliato in porzioni più piccole, cosa raccomandata quando i campioni sono pochi o si utilizza un dispositivo automatico per elettroforesi (2 gel, dimensioni 4,5 × 5 cm).

## 6.3. Focalizzazione isoelettrica

Regolare il termostato di raffreddamento su 12 °C. Detergere il rovescio del foglio di supporto del gel con cherosene, poi far cadere qualche goccia di cherosene (4.2) sul centro del blocco di raffreddamento. Far ruotare su di esso il sandwich di gel con il lato del supporto verso il basso, facendo attenzione che non rimangano bolle. Detergere l'eccesso di cherosene e rimuovere il foglio di copertura. Bagnare le strisce elettrodeiche con le soluzioni elettrodeiche (4.3, 4.4), tagliarle nel senso della lunghezza del gel e posizionarle nei punti previsti (distanza tra gli elettrodi 9,5 cm).

### Condizioni della focalizzazione isoelettrica

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

Operazione	Tempo (min.)	Tensione (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Volt/ora (Vh)
1. Prefocalizzazione	30	massimo 2 500	massimo 15	cost. 4	c. 300
2. Focalizzazione campione <sup>(1)</sup>	60	massimo 2 500	massimo 15	cost. 4	c. 1 000
3. Focalizzazione finale	60	massimo 2 500	massimo 5	massimo 20	c. 3 000
	40	massimo 2 500	massimo 6	massimo 20	c. 3 000
	30	massimo 2 500	massimo 7	massimo 25	c. 3 000

<sup>(1)</sup> Applicazione del campione: dopo la prefocalizzazione (fase 1), pipettare 18 µl di soluzioni campione e standard sugli applicatori del campione (10 × 5 mm), posizzionarli sul gel a distanze di 1 mm uno dall'altro e a 5 mm di distanza in senso longitudinale dall'anodo e premere leggermente. Eseguire la focalizzazione nelle condizioni suddette rimuovendo con attenzione gli applicatori dei campioni dopo 60 minuti di focalizzazione.

*Nota:* Se lo spessore o la larghezza del gel vengono modificati, i valori di corrente e potenza devono essere regolati di conseguenza (per esempio raddoppiare i valori della corrente elettrica e della potenza se si utilizza un gel a 265 × 125 × 0,5 mm).

- 6.3.2. *Esempio di un programma di tensione per un dispositivo per elettroforesi automatica (2 gel da 5,0 × 4,5 cm), elettrodi senza strisce applicate direttamente al gel*

Operazione	Tensione	Corrente	Potenza	Temp.	Volt/ora
1. Prefocalizzazione	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8°C	85 Vh
2. Focalizzazione campione	250 V	5,0 mA	2,5 W	8°C	30 Vh
3. Focalizzazione	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8°C	80 Vh
4. Focalizzazione	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8°C	570 Vh

Posizionare l'applicatore del campione nella fase 2 a 0 Vh

Rimuovere l'applicatore del campione nella fase 2 a 30 Vh

#### 6.4. **Colorazione delle proteine**

##### 6.4.1. *Fissaggio delle proteine*

Rimuovere le strisce elettrodiche immediatamente dopo aver interrotto l'alimentazione elettrica e porre il gel immediatamente in una bacinella di colorazione/decolorazione con 200 ml di fissativo (4.9). Lasciare per 15 minuti agitando continuamente.

##### 6.4.2. *Lavaggio e colorazione della lastra di gel*

Eliminare accuratamente il fissativo e lavare la lastra di gel due volte per 30 secondi, ogni volta con 100 ml di soluzione decolorante (4.10). Eliminare la soluzione decolorante e riempire la bacinella con 250 ml di soluzione colorante (4.11.3); lasciar colorare per 45 minuti agitando delicatamente.

##### 6.4.3. *Decolorazione della lastra di gel*

Eliminare la soluzione colorante, lavare due volte la lastra di gel con 100 ml di soluzione decolorante (4.10) ogni volta; agitare con 200 ml di soluzione di decolorazione per 15 minuti e ripetere l'operazione almeno due o tre volte fino a quando il fondo è chiaro e incolore. Risciacquare poi la lastra di gel con acqua distillata (2 × 2 min) e asciugare all'aria per 2 o 3 ore o con un asciugacapelli per 10-15 minuti.

*Nota 1:* Eseguire il fissaggio, il lavaggio, la colorazione e la decolorazione a 20 °C. Non usare temperature elevate.

*Nota 2:* Se si preferisce una colorazione più sensibile con argento (per esempio Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, codice n. 17-1150-01) i campioni di caseina trattata con plasmina devono essere diluiti a 5 mg/ml.

## 7. VALUTAZIONE

La valutazione è eseguita confrontando i profili proteici del campione sconosciuto con quello dello standard di riferimento sullo stesso gel. La presenza di latte vaccino nei formaggi di latte di pecora, di capra o di bufala e di miscele di lattini di pecora, capra e bufala, viene rivelata attraverso le  $\gamma_3$ - e  $\gamma_2$ -caseine, i cui punti isoelettrici sono compresi tra pH 6,5 e pH 7,5 (figure 4a, 4b e 5). Il limite di rivelazione è inferiore allo 0,5 %.

### 7.1. **Stima visiva**

Per una valutazione visiva della quantità di latte vaccino, è consigliabile regolare le concentrazioni dei campioni e degli standard in modo da ottenere lo stesso livello di intensità delle  $\gamma_2$ - and  $\gamma_3$ -caseine ovine, caprine e/o di bufala (cfr. " $\gamma_2$  E,G,B" e " $\gamma_3$  E,G,B" nelle figure 4a, 4b e 5). Dopo di ciò, la quantità di latte vaccino (minore, uguale o maggiore dell'1 %) nel campione in esame può venire valutata direttamente confrontando l'intensità delle  $\gamma_3$ - e  $\gamma_2$ -caseine vaccine (cfr. " $\gamma_3$  C" e " $\gamma_2$  C" nelle figure 4a, 4b e 5) con quella degli standard di riferimento allo 0 % e all'1 % (pecora, capra) o con gli standard provvisori di laboratorio (bufala).

## 7.2. Stima densitometrica

Se disponibile, ricorrere alla densitometria (5.19) per la determinazione del rapporto tra le aree dei picchi delle  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -caseine vaccine sulle  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -caseine ovine, caprine e/o di bufala (cfr. figura 5). Confrontare questo valore con il rapporto di area dei picchi delle  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -caseine dello standard di riferimento all'1 % (pecora, capra) o dello standard provvisorio di laboratorio (bufala) analizzati sullo stesso gel.

*Nota:* Il metodo è soddisfacente nel caso di un chiaro segnale positivo per le  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -caseine vaccine nello standard di riferimento all'1 %, ma non nello standard di riferimento allo 0 %. In caso contrario, ottimizzare la procedura seguendo con estrema precisione i dettagli del metodo.

Un campione è considerato positivo se entrambe le  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -caseine vaccine, o i corrispondenti rapporti di area dei picchi, sono uguali o maggiori del livello dello standard di riferimento all'1 %.

## 8. BIBLIOGRAFIA

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 and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of  $\gamma_2$ -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).

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).

Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of  $\gamma$ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).

Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100  $\mu$ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

Figura 1

### Disegno schematico del foglio di copertura

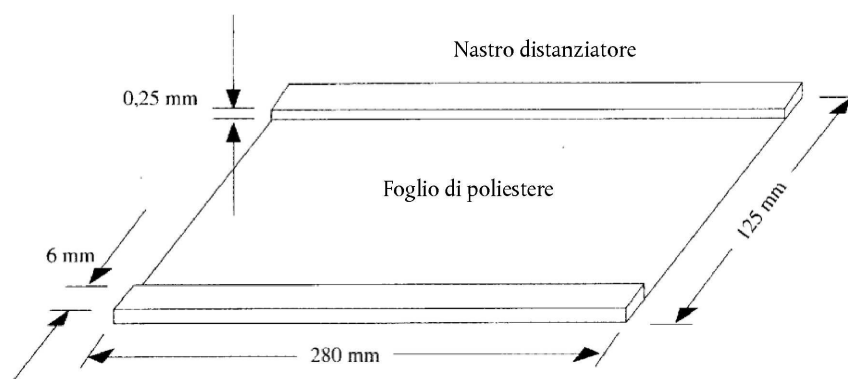


Figura 2

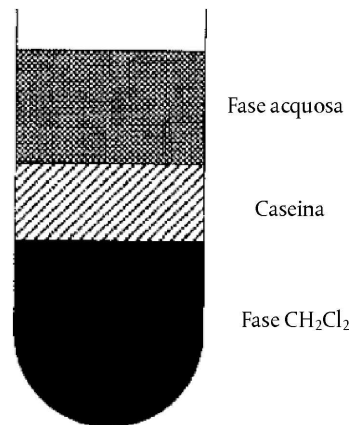
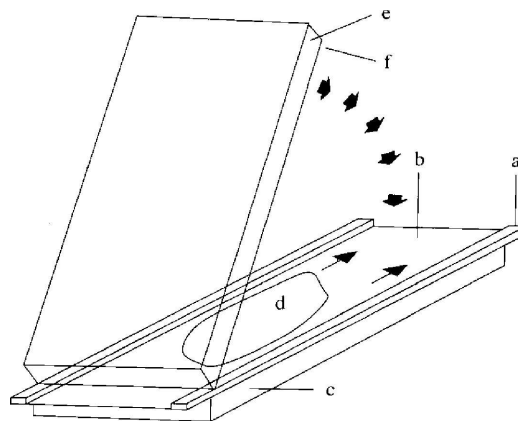
**Strato di caseina sospeso tra la fase acquosa e la fase organica dopo centrifugazione**

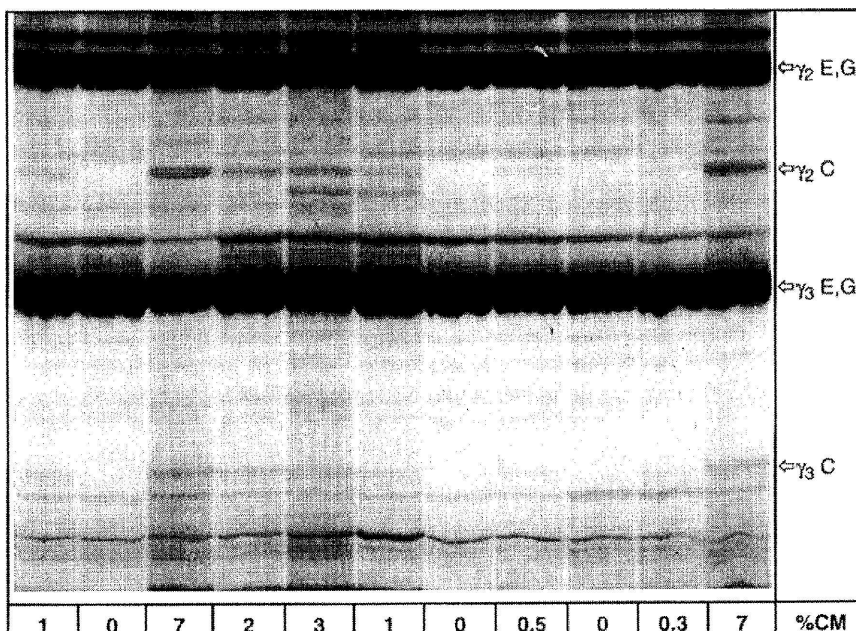
Figura 3

**Tecnica per la colata di gel poliacrilammide ultrasottile**

a = nastro distanziatore (0,25 mm); b = foglio di copertura (5.3); c, e = lastre di vetro (5.1); d = soluzione di gel (4.1.2); f = foglio di supporto del gel (5.2).

Figura 4a

Focalizzazione isoelettrica di caseine di formaggio di latte di pecora e capra contenente varie quantità di latte vaccino trattate con plasmina

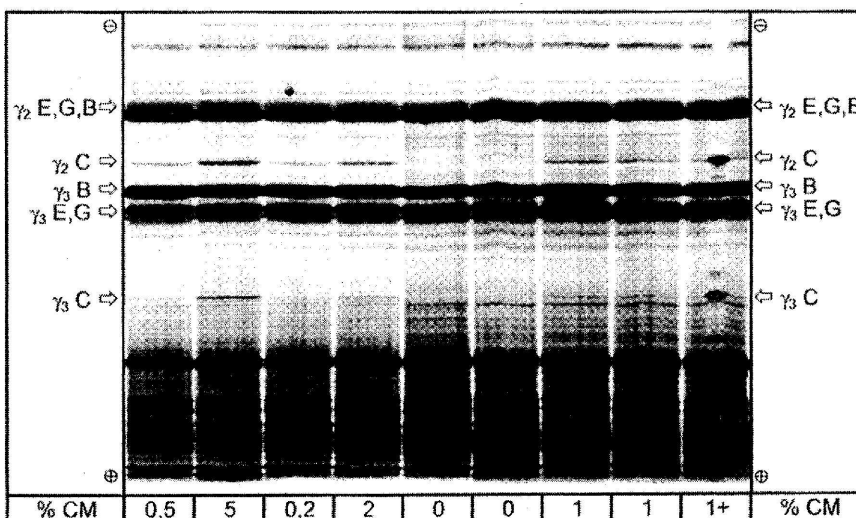


% CM = percentuali di latte vaccino, C = vacca, E = pecora, G = capra

È mostrata la metà superiore del gel IEF

Figura 4b

Focalizzazione isoelettrica di caseine, trattate con plasmina, di formaggio di miscele di latte di pecora, capra e bufala contenenti varie quantità di latte vaccino

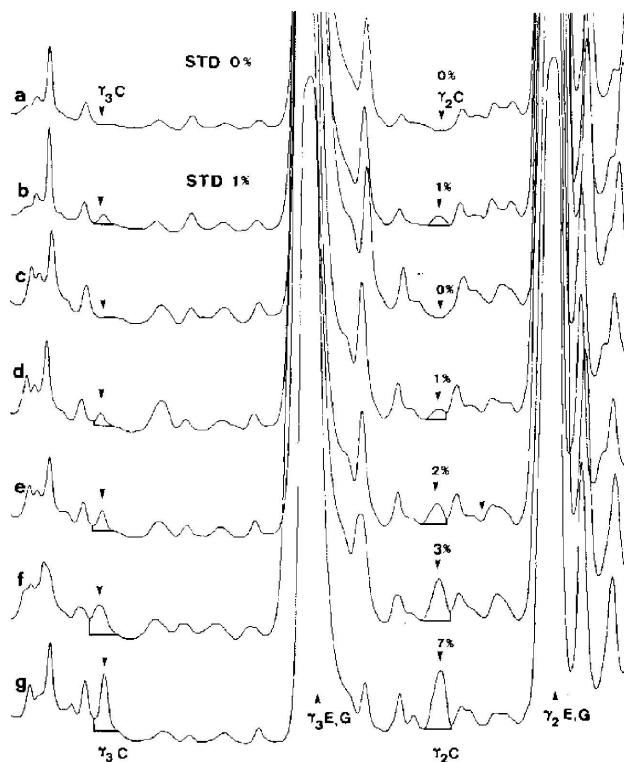


% CM = percentuali di latte vaccino; 1 + = campione contenente l'1 % di latte vaccino con aggiunta di caseina vaccina pura al centro della traccia; C = vacca, E = pecora, G = capra, B = bufala.

È mostrata la distanza totale di separazione del gel IEF.

Figura 5

**Sovrapposizione dei densitogrammi di standard (STD) e di campioni di formaggio prodotto con miscele di latte di pecora e capra dopo focalizzazione isoelettrica**



a,b = standard contenenti lo 0 e l'1 % di latte vaccino; c-g = campioni di formaggio contenenti lo 0, 1, 2, 3 e 7 % di latte vaccino. C = vacca, E = pecora, G = capra.

È stata analizzata la metà superiore del gel IEF a  $\lambda = 634$  nm.

## ALLEGATO IX

**Valutazione delle analisi****1. Assicurazione qualità**

Le analisi sono eseguite da laboratori designati a norma dell'articolo 12 del regolamento (CE) n. 882/2004 (\*\*) o designati dalle autorità competenti dello Stato membro.

**2. Campionamento e contestazione dei risultati analitici**

1. Si procede al campionamento in conformità alla normativa pertinente per il prodotto trattato. Se non sono espressamente previste disposizioni in materia di campionamento, si applicano le disposizioni della norma ISO 707: Latte e prodotti lattiero-caseari — Metodi di campionamento.
2. Nella relazione di laboratorio sui risultati dell'analisi figurano gli elementi atti a consentire una valutazione dei risultati conformemente all'appendice.
3. Per l'esecuzione delle analisi previste dalla normativa dell'Unione si procede al prelievo di campioni in doppio.
4. In caso di controversia sui risultati, l'organismo pagatore sottopone nuovamente il prodotto in questione alle analisi necessarie e le relative spese sono a carico della parte soccombente.

Le suddette analisi sono effettuate a condizione che siano disponibili campioni del prodotto prelevati in doppio, sigillati e conservati in modo appropriato presso l'autorità competente. Il fabbricante presenta all'organismo pagatore la richiesta di effettuare l'analisi entro 7 giorni lavorativi dalla comunicazione dei risultati della prima analisi. L'analisi è realizzata entro 21 giorni lavorativi dal ricevimento della richiesta.

5. Il risultato di questa analisi è definitivo.
  6. Se entro cinque giorni lavorativi dal campionamento il fabbricante dimostra che la procedura di campionamento non è stata correttamente eseguita, occorre, se possibile, ripetere il campionamento. Se non è possibile procedere a un nuovo campionamento, la partita è accettata.
-

## Appendice

**Valutazione del rispetto dei limiti regolamentari di una data partita****1. Principio**

Se la normativa in materia di intervento pubblico e di ammasso privato prevede procedure dettagliate di campionamento, si osservano tali procedure. Negli altri casi si utilizza un campione, composto di almeno 3 unità di campione, prelevato casualmente dalla partita presentata al controllo. Si può preparare un campione composito. Il risultato ottenuto si raffronta con i limiti regolamentari calcolando un intervallo di fiducia del 95 % pari al doppio della deviazione standard, dove la deviazione standard dipende da queste due ipotesi: 1) se il metodo è validato nell'ambito della cooperazione internazionale con valori definiti di  $\sigma_r$  e  $\sigma_R$  oppure 2) in caso di validazione interna, se è stato calcolato un valore di riproducibilità interna. L'intervallo di fiducia viene quindi comparato con l'incertezza di misurazione del risultato.

**2. Metodo convalidato nell'ambito della collaborazione internazionale**

In questo caso sono state stabilite la deviazione standard di ripetibilità  $\sigma_r$  e la deviazione standard di riproducibilità  $\sigma_R$  e il laboratorio è in grado di dimostrare l'osservanza delle caratteristiche di esecuzione del metodo validato.

Calcolare la media aritmetica  $\bar{x}$  del numero  $n$  di misurazioni ripetute.

Calcolare l'incertezza ampliata ( $k = 2$ )  $\bar{x}$  di come segue:

$$U = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n} \sigma_r^2}$$

Se il risultato finale  $x$  della misurazione è calcolato utilizzando una formula del tipo  $x = y_1 + y_2$ ,  $x = y_1 - y_2$ ,  $x = y_1 \cdot y_2$  o  $x = y_1/y_2$  si seguono le procedure di combinazione delle deviazioni standard abituali in tali casi.

Si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare superiore UL se

$$\bar{x} - U > UL;$$

altrimenti si ritiene che la partita rispetti il limite superiore UL.

Si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare inferiore LL se

$$\bar{x} + U < LL;$$

altrimenti si ritiene che la partita rispetti il limite inferiore LL.

**3. Validazione interna mediante calcolo della deviazione standard di riproducibilità interna**

Se si utilizzano metodi non previsti dal presente regolamento e se non sono state stabilite le misure della precisione è necessario procedere ad una validazione all'interno del laboratorio. Nella formula di calcolo dell'incertezza ampliata  $U$ , anziché  $\sigma_r$  e rispettivamente  $\sigma_R$ , occorre utilizzare la deviazione standard di ripetibilità interna  $s_r$  e la deviazione standard di riproducibilità interna  $s_{iR}$ .

Le norme da seguire per determinare la conformità con il limite di legge sono quelle indicate al punto 1. Tuttavia, se si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare occorre ripetere le misurazioni utilizzando il metodo specificato nel presente regolamento e il risultato deve essere valutato conformemente al punto 1.

(\*) Per ottenere la separazione richiesta delle  $\gamma$ -caseine, si sono dimostrati particolarmente validi i prodotti Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) e Resolyte® pH 5-7 e pH 6-8 (BDH, Merck).

(\*\*) Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1).»