

REGLAMENTO (CE) N° 1459/98 DE LA COMISIÓN**de 8 de julio de 1998****por el que se establece un método de referencia para la determinación de la vainillina en la mantequilla concentrada, la mantequilla o la nata**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) n° 804/68 del Consejo, de 27 de junio de 1968, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 1587/96⁽²⁾, y, en particular, el apartado 6 de su artículo 6 y el apartado 3 de su artículo 12,

Considerando que el Reglamento (CE) n° 2571/97 de la Comisión, de 15 de diciembre de 1997, relativo a la venta de mantequilla a precio reducido y a la concesión de una ayuda para la nata, la mantequilla y la mantequilla concentrada destinadas a la fabricación de productos de pastelería, helados y otros productos alimenticios⁽³⁾, establece la adición de marcadores a la nata, la mantequilla y la mantequilla concentrada en determinadas circunstancias, con objeto de garantizar la correcta utilización final de esos productos;

Considerando que, dada la importancia que la adición de marcadores reviste para el adecuado funcionamiento del régimen y con objeto de garantizar que los agentes económicos que participan en él reciban un trato equitativo, es conveniente establecer métodos comunes para la determinación de los marcadores a que se hace referencia en el Reglamento (CE) n° 2571/97;

Considerando que resulta difícil establecer simultáneamente tales métodos de referencia para todos los marcadores; que el establecimiento de un método de referencia para la determinación de la vainillina en la mantequilla

concentrada, la mantequilla o la nata constituye un avance en la consecución de ese objetivo;

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

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El método de análisis que figura en el anexo será el método de referencia utilizado para la determinación de la vainillina en la mantequilla concentrada, la mantequilla o la nata, con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 2571/97.

Se considerará que la adición de marcadores a la mantequilla concentrada, la mantequilla o la nata se ha efectuado de conformidad con lo dispuesto en el artículo 6 del Reglamento (CE) n° 2571/97 cuando los resultados obtenidos se ajusten a lo indicado en el punto 8 del anexo.

Artículo 2

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

Será aplicable a partir del 1 de septiembre de 1998.

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

Hecho en Bruselas, el 8 de julio de 1998.

Por la Comisión

Franz FISCHLER

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.

⁽²⁾ DO L 206 de 16. 8. 1996, p. 21.

⁽³⁾ DO L 350 de 20. 12. 1997, p. 3.

ANEXO

Determinación del contenido de vainillina en la mantequilla concentrada, la mantequilla o la nata mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento1. *Objeto y ámbito de aplicación*

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

Es aplicable a las muestras remitidas en cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 2571/97.

2. *Principio*

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

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

3. *Aparatos*

Instrumental habitual de laboratorio y, en particular, el siguiente:

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

4. *Reactivos*

Todos los reactivos utilizados deberán ser de calidad pura para análisis.

- 4.1. Isopropanol
- 4.2. Etanol 96 % (v/v)
- 4.3. Acetonitrilo
- 4.4. Solución de extracción
Mezclar isopropanol (4.1), etanol (4.2) y acetonitrilo (4.3) en la proporción de 1:1:2 (V/V).
- 4.5. Vainillina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído)
 - 4.5.1. Solución madre de vainillina (= 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
En un matraz aforado de 100 ml pesar, con una precisión de 0,1 mg, unos 50 mg (CM mg) de vainillina (4.5), añadir 25 ml de la solución de extracción (4.4) y enrasar con agua.
 - 4.5.2. Solución patrón de vainillina (= 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
En un matraz aforado de 250 ml introducir con una pipeta 5,00 ml de la solución madre de vainillina (4.5.1) y enrasar con agua.
- 4.6. Metanol de calidad para HPLC.
- 4.7. Ácido acético glacial.
- 4.8. Agua de calidad para HPLC.
- 4.9. Fase móvil para la HPLC.
En un matraz aforado de 1 000 ml mezclar 300 ml de metanol (4.6), 500 ml aproximadamente de agua (4.8) y 20,0 ml de ácido acético (4.7) y enrasar con agua (4.8). Filtrar utilizando un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

5. *Procedimiento*

5.1. Preparación de la muestra problema

5.1.1. Mantequilla

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

5.1.2. Mantequilla concentrada

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

5.1.3. Nata

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

5.2. Preparación de la solución problema

Añadir unos 75 ml de la solución de extracción (4.4) a la muestra problema (5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3), remover o agitar enérgicamente durante 15 minutos aproximadamente y enrasar con la solución de extracción (4.4). Transferir unos 10 ml de esta solución a un tubo de ensayo provisto de un tapón. Colocar el tubo de ensayo en el congelador (3.1) y mantenerlo allí durante 30 minutos aproximadamente. Centrifugar la solución fría durante 5 minutos a 2 000 rpm aproximadamente y decantar de inmediato. Esperar a que la solución decantada alcance la temperatura ambiente. En un matraz aforado de 100 ml introducir con una pipeta 5,00 ml de la solución decantada y enrasar con agua. Filtrar una alícuota utilizando un microfiltro de membrana (3.3). El filtrado obtenido ya está listo para efectuar la determinación mediante HPLC.

5.3. Calibrado

En un matraz aforado de 100 ml introducir con una pipeta 5,00 ml de la solución patrón de vainillina (4.5.2). Añadir 5,0 ml de la solución de extracción (4.4) y enrasar con agua. Esta solución contiene 0,5 µg/ml de vainillina.

5.4. Determinación mediante HPLC

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

6. Cálculo de los resultados

Calcular la superficie (o altura) media (AC) de los picos de vainillina asociados al conjunto de inyecciones efectuadas por duplicado con cada lote de soluciones problema (4 superficies en total).

Calcular el factor de respuesta (R):

$$R = AC/CM$$

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

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

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

siendo:

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

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

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

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

Nota:

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

7. Exactitud del método

7.1. Repetibilidad (r)

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

7.2. Reproducibilidad (R)

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

8. Tolerancia

- 8.1. Deben tomarse tres muestras del producto marcado para comprobar su homogeneidad.
- 8.2. Marcador obtenido a partir de vainilla o de vainillina sintética:
- 8.2.1. El índice de incorporación de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído es de 250 gramos por tonelada.
- 8.2.2. Si se toma en consideración la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD_{95}), la media de los análisis individuales realizados en cada una de las tres muestras tomadas para comprobar la homogeneidad no debe ser inferior a 236,0 mg/kg.
- 8.2.3. Además del criterio indicado en el punto 8.2.2, para comprobar la homogeneidad de la distribución del marcador se utilizará el resultado más bajo obtenido en el análisis del producto. A tal efecto, debe efectuarse una comparación con los límites siguientes:
- 221,5 mg/kg (95 % del índice de incorporación mínimo, teniendo en cuenta el CrD_{95} de la muestra simple),
 - 159,0 mg/kg (70 % del índice de incorporación mínimo, teniendo en cuenta el CrD_{95} de la muestra simple).

La concentración del marcador en la muestra que dé los resultados más bajos se utilizará junto con la interpolación entre 221,5 mg/kg y 159,0 mg/kg.

- 8.3. Marcador obtenido exclusivamente a partir de vainas de vainilla o de sus extractos integrales:
- 8.3.1. El índice de incorporación de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído es de 100 gramos por tonelada.
- 8.3.2. Si se toma en consideración la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD_{95}), la media de los análisis individuales realizados en cada una de las tres muestras tomadas para comprobar la homogeneidad no debe ser inferior a 86,0 mg/kg.
- 8.3.3. Además del criterio indicado en el punto 8.3.2, para comprobar la homogeneidad de la distribución del marcador se utilizará el resultado más bajo obtenido en el análisis del producto. A tal efecto, debe efectuarse una comparación con los límites siguientes:
- 79,0 mg/kg (95 % del índice de incorporación mínimo, teniendo en cuenta el CrD_{95} de la muestra simple);
 - 54,0 mg/kg (70 % del índice de incorporación mínimo, teniendo en cuenta el CrD_{95} de la muestra simple).

La concentración del marcador en la muestra que dé los resultados más bajos se utilizará junto con la interpolación entre 79,0 mg/kg y 54,0 mg/kg.

9. Notas

- 9.1. La repetibilidad (r) es el valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe, con una probabilidad determinada, la diferencia absoluta entre los resultados de dos ensayos individuales realizados con el mismo método e idéntico material de ensayo y en las mismas condiciones (los mismos aparatos y el mismo laboratorio, en un intervalo breve de tiempo); salvo si se indica lo contrario, la probabilidad es del 95 %.
- 9.2. La reproducibilidad (R) es el valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe, con una probabilidad determinada, la diferencia absoluta entre los resultados de dos ensayos individuales realizados con el mismo método e idéntico material de ensayo pero en condiciones diferentes (distintos analistas, distintos aparatos, distintos laboratorios o momentos distintos); salvo si se indica lo contrario, la probabilidad es del 95 %.
- 9.3. La recuperación de la vainillina añadida a un nivel de 250 mg/kg de «butteroil» oscila entre 97,0 y 103,8. El contenido medio hallado fue del 99,9 %, con una desviación típica del 2,7 %.
- 9.4. La solución patrón contiene un 5 % de la solución de extracción para compensar el ensanchamiento de los picos provocado por la presencia de un 5 % de solución de extracción de las muestras problema. Ello permite efectuar cuantificación a través de la altura de los picos.
- 9.5. El análisis se basa en una curva de calibrado lineal con una ordenada en el origen igual a cero. La linealidad debe ser comprobada, utilizando diluciones apropiadas de la solución patrón (4.5.2), la primera vez que se realice el análisis y, además, a intervalos regulares y cada vez que se altere o repare el equipo de HPLC.