

## REGLAMENTO (CEE) N° 4154/87 DE LA COMISIÓN

de 22 de diciembre de 1987

**por el que se definen los métodos de análisis y otras disposiciones de carácter técnico necesarios para la aplicación del Reglamento (CEE) n° 3033/80 del Consejo por el que se determina el régimen de intercambios aplicable a determinadas mercancías resultantes de la transformación**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS;

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento (CEE) n° 2658/87 del Consejo, de 23 de julio de 1987, relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común <sup>(1)</sup> modificado por el Reglamento (CEE) n° 3985/87 <sup>(2)</sup>, y en particular, su artículo 9,

Considerando que el Reglamento (CEE) n° 1061/69 de la Comisión <sup>(3)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 1822/86 <sup>(4)</sup>, define los métodos de análisis para la aplicación del Reglamento (CEE) n° 1059/69 del Consejo <sup>(5)</sup>; que el Reglamento (CEE) n° 1059/69 ha sido derogado y sustituido por el Reglamento (CEE) n° 3033/80 del Consejo <sup>(6)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 3743/87 <sup>(7)</sup>;

Considerando que, en lo que se refiere a las importaciones, las modalidades de aplicación del Reglamento (CEE) n° 3033/80 se establecen en el Reglamento (CEE) n° 3034/80 del Consejo, de 11 de noviembre de 1980, por el que se determinan las cantidades de productos de base que se consideran incluidas en la fabricación de mercancías reguladas por el Reglamento (CEE) n° 3033/80 y por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 950/68 relativo al arancel aduanero común <sup>(8)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 4091/87 <sup>(9)</sup>;

Considerando que con el fin de tener en cuenta la evolución científica y técnica de los métodos de análisis y continuar asegurando un tratamiento uniforme a la importación en la Comunidad de las mercancías a las cuales se aplica el Reglamento (CEE) n° 3033/80, procede derogar y sustituir el Reglamento (CEE) n° 1061/69;

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de nomenclatura,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

### Artículo 1

El presente Reglamento define los métodos de análisis comunitarios necesarios para la aplicación de los Reglamentos (CEE) n° 3033/80 (en lo que se refiere a las importaciones) y (CEE) n° 3034/80 o, en su defecto, la naturaleza de las operaciones analíticas que deberán efectuarse o el principio de un método que deberá aplicarse.

### Artículo 2

De acuerdo con las definiciones que se incluyen en el Anexo III del Reglamento (CEE) n° 3034/80 sobre el contenido en almidón/glucosa y el contenido en sacarosa/azúcar invertido/isoglucosa, y para la aplicación de los Anexos II y III de este mismo Reglamento, se utilizarán las fórmulas, procedimientos y métodos siguientes:

#### 1. Contenido en almidón/glucosa:

(expresado en almidón 100 %, producto seco, sobre la mercancía tal como se presenta)

- a)  $(Z - F) \times 0,9$ ,  
cuando el contenido en glucosa sea superior o igual al de fructosa,
- b)  $(Z - G) \times 0,9$ ,  
cuando el contenido en glucosa sea inferior al de fructosa,

donde:

Z = contenido en glucosa determinado por el método descrito en el Anexo I del presente Reglamento;

F = contenido en fructosa determinado por HPLC (cromatografía líquida de alta precisión);

G = contenido en glucosa determinado por HPLC.

En el caso del punto 1 letra a), si se declara la presencia de un hidrolizado de lactosa y/o se descubren cantidades de lactosa y de galactosa, un contenido en glucosa (determinado por HPLC), equivalente al de galactosa (determinado por HPLC) se deducirá del contenido de glucosa (Z) antes de efectuar cualquier cálculo.

<sup>(1)</sup> DO n° L 256 de 7. 9. 1987, p. 1.

<sup>(2)</sup> DO n° L 376 de 31. 12. 1987, p. 1.

<sup>(3)</sup> DO n° L 141 de 12. 6. 1969, p. 24.

<sup>(4)</sup> DO n° L 158 de 13. 6. 1986, p. 1.

<sup>(5)</sup> DO n° L 141 de 12. 6. 1969, p. 1.

<sup>(6)</sup> DO n° L 323 de 29. 11. 1980, p. 1.

<sup>(7)</sup> DO n° L 352 de 15. 12. 1987, p. 29.

<sup>(8)</sup> DO n° L 323 de 29. 11. 1980, p. 7.

<sup>(9)</sup> DO n° L 382 de 31. 12. 1987, p. 27.

## 2. Contenido en sacarosaluzúcar invertido/isoglucosa:

(expresado en sacarosa, sobre la mercancía tal como se presenta)

- a)  $S + (2F) \times 0,95$ ,  
cuando el contenido en glucosa sea superior o igual al de fructosa,
- b)  $S + (G + F) \times 0,95$ ,  
cuando el contenido en glucosa sea inferior al de fructosa,

donde:

S = contenido en sacarosa determinado por HPLC (cromatografía líquida de alta precisión);

F = contenido en fructosa determinado por HPLC;

G = contenido en glucosa determinado por HPLC.

Si se declara la presencia de un hidrolizado de lactosa y/o se descubren cantidades de lactosa y de galactosa, un contenido en glucosa, equivalente al de galactosa (determinado por HPLC) se deducirá del contenido de glucosa (G) antes de efectuar cualquier cálculo.

## 3. Contenido en materias grasas de leche:

- a) Sin perjuicio de lo dispuesto en la letra b) del punto 2, el contenido en peso de materias grasas de leche de la mercancía tal como se presenta se determinará mediante la extracción con éter de petróleo tras hidrólisis con ácido clorhídrico.
- b) Si en la composición de la mercancía se declaran además de las materias grasas de leche, otras materias grasas distintas de las de leche se aplicará el procedimiento siguiente:
- El contenido en peso en (%) en materia grasa (total) de la mercancía tal como se presenta se determinará tal como se indica en la letra a).
  - El contenido en peso en % de ácido butírico de la materia grasa total se obtendrá mediante el método IUPAC nº 2310 (referencia: «Pure and applied Chemistry» nº 58 nº 10, pp. 1419 a 1428, de 1986).
  - El contenido en peso en % de materias grasas de leche de la mercancía tal como se presenta se calculará multiplicando el contenido en % de ácido butírico de la materia grasa total por el factor 27, el valor así obtenido por el contenido en peso en (%) de materia grasa total de la mercancía tal como se presenta y dividiendo el resultado por 100.

## 4. Contenido en proteínas de leche:

- a) Sin perjuicio de lo dispuesto en la letra b) de este punto, el contenido en proteínas de leche de la mercancía tal como se presenta se calculará multiplicando el contenido en nitrógeno (determinado por el método Kjeldahl) por el factor 6,38.
- b) Si en la composición de la mercancía se declaran además de las proteínas de leche, otros componen-

tes que contengan proteínas distintas de las proteínas de leche:

- El contenido en nitrógeno total (en porcentaje en peso) se determinará por el método Kjeldahl.
- El contenido en proteínas de leche se calculará tal como se indica en la letra a) restando del contenido en nitrógeno total (en porcentaje en peso) el contenido en nitrógeno correspondiente a las proteínas distintas de las de leche.

## Artículo 3

Para la aplicación del Anexo I del Reglamento (CEE) nº 3034/80 se utilizarán los métodos y/o procedimientos siguientes:

1. Para la clasificación de los productos incluidos en las subpartidas 0403 10 51 a 0403 10 59, 0403 10 91 a 0403 10 99, 0403 90 71 a 0403 90 79, 0403 90 91 y 0403 90 99 de la nomenclatura combinada, la determinación del contenido en peso de las materias grasas procedentes de leche se efectuará según el método descrito en el punto 3 del artículo 2.
2. Para la clasificación de los productos incluidos en las subpartidas 1704 10 11 a 1704 10 19 y 1905 20 10 a 1905 20 90 de la nomenclatura combinada, la determinación de la sacarosa, incluido el azúcar invertido calculado en sacarosa se efectuará según un método HPLC: Por azúcar invertido calculado en sacarosa se entenderá la suma aritmética de los contenidos en glucosa y fructosa en partes iguales multiplicado por 0,95.
3. Para la clasificación de los productos incluidos en las subpartidas 1806 10 10 a 1806 10 90 de la nomenclatura combinada, la determinación de la sacarosa/azúcar invertido/isoglucosa, se efectuará según las fórmulas, método y procedimientos que se mencionan en el punto 2 del artículo 2.
4. Para la clasificación de los productos incluidos en las subpartidas 3505 20 10 a 3505 20 90 de la nomenclatura combinada, la determinación del almidón o fécula, de dextrinas o de otros almidones o féculas modificadas se efectuará según el método que se indica en el Anexo II.
5. Para la clasificación de los productos incluidos en las subpartidas 3809 10 10 a 3809 10 90 de la nomenclatura combinada, la determinación de materias amiláceas se efectuará según el método que se indica en el Anexo II.
6. Para la clasificación de los productos incluidos en las subpartidas 1901 90 11 y 1901 90 19 de la nomenclatura combinada, la distinción entre las dos subpartidas se hará sobre la base de la determinación del extracto seco que se haya efectuado mediante secado a la temperatura de  $103 \pm 2$  °C hasta peso constante.
7. Para la clasificación de los productos en las subpartidas 1902 19 10 y 1902 19 90 de la nomenclatura combinada, la presencia de harinas y sémolas de trigo blando en las pastas alimenticias se averiguará según el método que se indica en el Anexo III.

8. El contenido en manitol y en D-glucitol (sorbitol) de las mercancías de las subpartidas 2905 44 11 a 2905 44 99 y 3823 60 11 a 3823 60 99, de la nomenclatura combinada se determinará según un método basado en la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

*Artículo 4*

1. Se establecerá un boletín de análisis.
2. El boletín de análisis deberá contener en particular:
  - todas las indicaciones relativas a la identificación de la muestra.
  - el método comunitario utilizado y la referencia exacta del texto legal correspondiente; o, en su caso la referencia a un método detallado que reseñe la naturaleza de las operaciones analíticas que deberán

efectuarse o el principio de un método que deberá aplicarse, indicados en el presente Reglamento;

- los elementos que puedan haber influido en los resultados;
- los resultados del análisis habida cuenta de su expresión en el método utilizado y de la expresión dictada las necesidades de los servicios aduaneros o de gestión que hayan solicitado el análisis.

*Artículo 5*

Queda derogado el Reglamento (CEE) n° 1061/69.

*Artículo 6*

El presente Reglamento entrará en vigor el 1 de enero de 1988.

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

Hecho en Bruselas, el 22 de diciembre de 1987.

*Por la Comisión*

COCKFIELD

*Vicepresidente*

## ANEXO I

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PESO DE ALMIDÓN, SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN INCLUIDA LA GLUCOSA****1. Objeto y ámbito de aplicación**

- a) El método permite determinar el contenido en peso de almidón o fécula, sus productos de degradación incluida la glucosa, abajo llamada «almidón».
- b) El contenido en peso de «almidón» es igual al valor E tal como se calcula en el punto 6.

**2. Principio**

La muestra se desagrega con hidróxido de sodio y se escinde el «almidón» en unidades de glucosa con amiloglucosidasa. La dosificación de la glucosa se efectúa por vía enzimática.

**3. Reactivos**

Se utilizará agua bidestilada.

- 3.1. Disolución de hidróxido de sodio 0,5 N (0,5 mol/l).
- 3.2. Ácido acético (glacial) al 96 %, como mínimo.
- 3.3. Disolución de la amiloglucosidasa:  
Inmediatamente antes de la utilización, se disuelven aproximadamente 10 mg de amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3) (6 U/mg) en 1 ml de agua (\*).
- 3.4. Tampón trietanolamina:  
Se disuelven 14,0 g de clorhidrato de trietanolamina cloruro de tris (2-hidroxiethyl) amonio y 0,25 g de sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) en 80 ml de agua; se le añadirán aproximadamente 5 ml de disolución de hidróxido de sodio 5 N (5 mol/l) y se ajustan a pH 7,6 mediante una disolución de hidróxido de sodio 1 N (1 mol/l). Se completa hasta 100 ml con agua bidestilada. Dicho tampón se conservará a + 4 °C durante 4 semanas, como mínimo.
- 3.5. Disolución de NADP (Nicotinamida Adenina Dinucleotida fosfato, sal disódica):  
Se disuelven 60 mg de NADP en 6 ml de agua. Esta disolución se conservará a + 4 °C durante 4 semanas, como mínimo.
- 3.6. Disolución de ATP (Adenosina-5'-trifosfato, sal disódica):  
Se disuelven 300 mg de ATP  $3H_2O$  y 300 mg de hidrogenocarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ) en 6 ml de agua. Esta disolución se conservará a + 4 °C durante 4 semanas, como mínimo.
- 3.7. Suspensión de HK/G6P-DH (Hexokinasa-EC 2.7.1.1) y de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49):  
Se ponen en suspensión 280 U de HK y 140 U de G6P-DH en 1 ml de disolución de sulfato de amonio (c = 3,2 mol/l). Esta suspensión se conservará a + 4 °C durante un año, como mínimo.

**4. Equipo**

- 4.1. Agitador magnético con baño maría a 60 °C.
- 4.2. Barrillas magnéticas.
- 4.3. Espectrofotómetro UV provisto de cubetas de 1 cm.
- 4.4. Pipetas para el análisis enzimático.

**5. Método operativo**

- 5.1. *Desagregación mediante hidróxido de sodio e hidrólisis enzimática del almidón:*
  - 5.1.1. Según el presunto contenido de «almidón», elijan las siguientes pesadas (el contenido en «almidón» no debería superar 0,4 g por pesada):

(\*) U es la unidad internacional de la actividad enzimática.

Presunto contenido de «almidón» del producto en 100 g	Pesada aproximativa (p) en g	Volumen del matraz aforado en ml	Factor de dilución hasta el litro (f)
> 70	0,35-0,4	500	2
20-70	máx 0,5	500	2
5-20	máx 1	250	4
< 5	máx 2	200	5

- 5.1.2. Se pesa (con una precisión de 0,1 mg) la muestra
- 5.1.3. Se añaden 50 ml de disolución de hidróxido de sodio 0,5 N (3.1) y se mantiene bajo agitación continua durante 30 minutos en el baño maría del agitador magnético (4.1) a 60 °C.
- 5.1.4. Se ajusta a pH 4,6 a 4,8 con algunos ml de ácido acético concentrado (3.2).
- 5.1.5. Se coloca en el baño maría del agitador magnético (4.1) a 60 °C, se añade 1,0 ml de la disolución de la enzima (3.3) y se deja reaccionar durante 30 minutos, bajo agitación.
- 5.1.6. Después de enfriar, se transvasa al mencionado matraz aforado (5.1.1) y se rellena hasta la marca con agua.
- 5.1.7. En caso necesario se filtra a través de un filtro plegado (véase más abajo observación 1).
- 5.2. *Dosificación de la glucosa:*
- 5.2.1. La disolución de ensayo debe contener de 100 a 1 000 mg de glucosa por litro, lo que corresponde a un  $\Delta E_{340}$  que se sitúa entre 0,1-1,0.
- La disolución de ensayo diluida en una proporción de 1 + 30 con el agua no debe presentar a 340 nm, una absorbancia superior a 0,4 (medida en comparación con el aire).
- 5.2.2. Se lleva el tampón (3.4) hasta la temperatura ambiente (20 °C).
- 5.2.3. La temperatura de la reacción y de la muestra deberá estar comprendida entre 20 y 25 °C.
- 5.2.4. Se mide la absorbancia a 340 nm en comparación con el aire (sin cubeta en el trayecto óptico de referencia).
- 5.2.5. Pipeteado según el esquema indicado a continuación:

Introducción en las cubetas	Referencia (ml)	Prueba (ml)
Tampón (reactivo 3.4)	1,00	1,00
NADP ( reactivo 3.5)	0,10	0,10
ATP (reactivo 3.6)	0,10	0,10
Disolución de prueba (5.1.6 o 7)	—	0,10
Agua bidestilada	2,00	1,90

Se mezcla y al cabo de aproximadamente 3 min se mide la absorbancia de las disoluciones ( $E_1$ ). Se provoca la reacción añadiendo:

HK/G6P-DH ( reactivo 3.7)	0,02	0,02
---------------------------	------	------

Se mezcla, se espera que se termine la reacción (aproximadamente 15 minutos) y se mide la absorbancia de las disoluciones ( $E_2$ ). Se tienen en cuenta posibles reacciones secundarias. Si la reacción no se ha terminado después de 15 minutos se continúa leyendo las absorbancias cada 5 minutos hasta que el aumento de la absorbancia sea constante en 5 minutos y, a continuación, se extrapola la absorbancia al tiempo de la adición de la suspensión 3.7 (véase más abajo observación 2).

- 5.2.6. Para la referencia de la prueba, se calcula la diferencia de absorbancia  $E_2 - E_1$ . Se sustrae la diferencia de absorbancia de la referencia de la prueba (=  $\Delta E$ ):

$$\Delta E = \Delta E_{\text{prueba}} - \Delta E_{\text{referencia}}$$

A partir de esta diferencia, se obtiene el contenido en glucosa de la disolución de prueba:

*Contenido en glucosa, en g/l de disolución de prueba*

$$GI = \frac{3,22 \times 180,16}{6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta E_{340} = 0,921 \times \Delta E_{340}$$

[3,22: volumen de la solución para medir (ml); 1: trayectoria de la luz en el recipiente (cm); 0,1: volumen de la solución de la muestra (ml); Masa molecular de glucosa = 180,16]

5.2.7. Si la medida de la absorbancia a 340 nm no fuera posible, la medida podrá efectuarse a la longitud de onda de 365 nm o 334 nm. En este caso la cifra 6,3 de la fórmula G1 anterior se sustituirá por la cifra 3,5 o 6,18, respectivamente.

6. **Cálculo del contenido en «almidón» (E) o en «glucosa» (Z):**

a) Contenido en «almidón» (E) en g/100 g:

$$E = \frac{100 \times 0,9 \times \text{Glu}}{p \times f}$$

b) contenido en «glucosa» (Z) en g/100 g:

$$Z = \frac{100 \times \text{Glu}}{p \times f}$$

donde:

Glu = glucosa, en g/l (5.2.6);

f = factor de dilución (5.1.1);

p = pesada de la muestra, en g;

0,9 = factor de conversión de la glucosa en el almidón.

*Observaciones*

1. En caso de constatar que no se puede filtrar la solución según 5.1.7, el químico debe tomar las medidas apropiadas.
2. En caso de constatar una inhibición de las enzimas, se aconseja utilizar el método de «adiciones» utilizando almidón puro.

## ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN O FÉCULA, DEXTRINA U OTROS ALMIDONES Y FÉCULAS MODIFICADOS, CONTENIDOS EN LAS MERCANCÍAS DE LAS SUBPARTIDAS 3505 20 10 A 3505 20 90 DE LA NOMENCLATURA COMBINADA, ASÍ COMO EN MATERIAS AMILÁCEAS CONTENIDAS EN LAS MERCANCÍAS DE LAS SUBPARTIDAS 3809 10 10 A 3809 10 90 DE LA NOMENCLATURA COMBINADA

**I. Principio**

Por hidrólisis ácida, el almidón se transforma en azúcares reductores, que se valoran volumétricamente con licor de Fehling.

**II. Material y reactivos**

1. Matraz de 250 ml aproximadamente;
2. Matraz aforado de 200 ml;
3. Bureta graduada de 25 ml;
4. Ácido clorhídrico de densidad 1,19;
5. Disolución de potasa cáustica;
6. Carbón decolorante;
7. Licor de Fehling;
8. Disolución de azul de metileno al 1 %.

**III. Método operativo**

En un matraz de unos 250 ml, se introduce una muestra correspondiente a una cantidad de almidón aproximadamente de 1 gramo. Se añaden 100 ml de agua destilada y 2 ml de ácido clorhídrico. Se calienta hasta la ebullición a reflujo durante 3 horas.

Se trasvasa el contenido del matraz, así como el producto del enjuagado a un matraz aforado de 200 ml y se añade la disolución de potasa cáustica hasta reacción ligeramente ácida. Se lleva con agua destilada a 200 ml y se filtra el total con un poco de carbón decolorante.

Acto seguido, se vierte la disolución en una bureta graduada y se reducen 10 ml de licor de Fehling por el método siguiente:

En un matraz de fondo plano de aproximadamente 250 ml, se vierten 10 ml de licor de Fehling (5 ml de disolución A y 5 ml de disolución B). Se agita hasta obtener una solución clara, después se añaden 40 ml de agua destilada, así como una pequeña cantidad de cuarzo o de piedra pómez.

Se coloca el matraz sobre una placa de amianto de forma cuadrada perforada en su centro con una abertura circular de 6 cm de diámetro, aproximadamente, que descansa sobre una tela metálica. Se calienta el matraz de manera que el líquido comience a hervir al cabo de 2 minutos aproximadamente.

Con una bureta, se añaden al líquido hirviendo, cantidades sucesivas de la disolución azucarada hasta que el color azul del licor de Fehling sea apenas perceptible: se añaden entonces, como indicador, 2 o 3 gotas de la disolución de azul de metileno y después se completa la valoración añadiendo gota a gota una nueva cantidad de disolución azucarada hasta que desaparezca el color azul del indicador.

Para mayor precisión, se repite la valoración en las mismas condiciones añadiendo, sin embargo, de una sola vez, la casi totalidad de la solución azucarada necesaria para la reducción del licor de Fehling. En esta segunda valoración, la reducción del licor de Fehling deberá hacerse en un período de 3 minutos.

Continuar la ebullición durante exactamente 2 minutos. Efectuar la valoración añadiendo gota a gota durante el tercer minuto hasta que desaparezca el color azul del indicador.

El porcentaje en peso de almidón de la muestra se determinará por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{almidón \%} = \frac{T \times 200 \times 100}{n \times p} \times 0,95$$

en la cual:

T : representa la cantidad en gramos de dextrosa anhidra correspondiente a 10 ml de licor de Fehling (5 ml de disolución A + 5 ml de disolución B). Este valor es de 0,04945 g de dextrosa anhidra cuando la solución A contenga 17,636 g de cobre por litro;

- n : representa el número de ml de la solución azucarada utilizada para la valoración;  
p : representa el peso de la muestra de ensayo;  
0,95 : representa la relación de conversión de la dextrosa anhidra en almidón.

#### IV. Preparación del licor de Fehling

Disolución A: En un matraz aforado, se disuelven en agua destilada 69,278 g de sulfato de cobre cristalizado puro para análisis ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) exento de hierro y se completa la disolución con agua destilada hasta un volumen de un litro. La concentración exacta de esta disolución deberá comprobarse por medio de una determinación cuantitativa del cobre.

Disolución B: En un matraz aforado se disuelven en agua destilada 100 g de hidróxido de sodio y 346 g de tartrato doble de sodio y de potasio (sal de Seignette) y se completa la disolución con agua destilada hasta un volumen de un litro.

Las dos disoluciones A y B deberán mezclarse en volúmenes iguales, inmediatamente antes de la utilización. Si se trabaja en las condiciones indicadas en III, 10 ml de licor de Fehling (5 ml de disolución A + 5 ml de disolución B) serán reducidos completamente por 0,04945 g de dextrosa anhidra.

## ANEXO III

## DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE HARINA O DE SÉMOLA DE TRIGO BLANDO EN LAS PASTAS ALIMENTICIAS

(por el método Young y Gilles, modificado por Bernaerts y Gruner)

## I. Principio

Utilizando un disolvente no polar, se preparará un extracto de la muestra de las pastas alimenticias. Este extracto se someterá a cromatografía en capa fina de gel de sílice, de manera que se separen, en forma de bandas, los esteroides presentes en las diferentes fracciones.

Según el número de bandas intensas reveladas, se podrá determinar si el producto examinado se ha fabricado, bien exclusivamente a partir de trigo duro o de trigo blando, o bien a partir de una mezcla de estos dos productos. Es igualmente posible determinar si se han añadido huevos a estas primeras materias.

## II. Material y reactivos

1. Homogeneizador o triturador que permita obtener un producto que pase a través de un tamiz normalizado con una abertura de mallas de 0,2 mm.
2. Tamiz normalizado con una abertura de mallas de 0,2 mm;
3. Evaporador a presión reducida con baño maría;
4. Placa de vidrio, hoja de aluminio u otro soporte apropiado de 20 cm × 20 cm recubierto de una capa fina de gel de sílice. Si se prepara uno mismo la capa fina, se utilizará gel de sílice mezclado aproximadamente con 13 % de yeso y se aplicará sobre la placa de vidrio en capa de 0,25 mm con un instrumento adecuado y siguiendo las instrucciones del fabricante.
5. Micropipeta que permita medir 20 microlitros.
6. Cubeta con tapa adecuada para revelar cromatogramas.
7. Atomizador.
8. Éter de petróleo con punto de ebullición comprendido entre 40 y 60 °C redestilado antes de emplearlo.
9. Éter etílico anhídrido p. a.
10. Tetracloruro de carbono para cromatografía redestilado antes de emplearlo.
11. Ácido fosfomolibdico p. a.
12. Alcohol etílico 94°.

## III. Método operativo

Se muelen unos veinte gramos de la muestra de manera que pasen en su totalidad a través del tamiz. Se introduce la muestra molida en un matraz Erlenmeyer y se recubre con 150 ml de éter de petróleo. Se deja a la temperatura ambiente hasta el día siguiente. Se agita de vez en cuando.

Se filtra después en el embudo Büchner provisto de una capa de adyuvante de la filtración o sobre filtro plegado. La solución límpida obtenida se trasvasa, poco a poco, a un matraz tarado de 100 ml. Se evapora el disolvente a presión reducida calentando el matraz al baño maría a 40—50 °C. Después de la evaporación del disolvente, se sigue calentando a presión reducida durante 10 minutos.

Después de enfriar el matraz, se determina el peso del extracto. Se diluye el extracto en éter etílico a razón de 1 ml de éter etílico por 60 mg de extracto.

Se activan las capas finas calentándolas a 130 °C durante 3 horas. Se deja enfriar en un desecador que contenga gel de sílice. Las placas que no se vayan a utilizar inmediatamente se conservarán en el mismo desecador.

Se aplican sobre una capa, preferentemente recién activada, 20 microlitros de la solución límpida en forma de una banda de ancho constante de 3 cm de larga formada por gotitas yuxtapuestas y se deja evaporar el disolvente.

Se desarrolla el cromatograma a la temperatura ambiente con el tetracloruro de carbono utilizando una cubeta cromatográfica recubierta en las paredes de papel filtro empapado de disolvente. Después de una hora aproximadamente, el disolvente habrá alcanzado una altura de 18 cm. Se quita la placa y se deja evaporar el disolvente al aire. Se desarrolla por segunda vez el cromatograma con el fin de separar mejor las bandas y se deja evaporar de nuevo el disolvente al aire.

Se atomiza la capa fina de gel de sílice con una disolución de 20 % de ácido fosfomolibdico en alcohol etílico. El color de la capa debe ser uniformemente amarillo. Se revelan las bandas manteniendo la placa atomizada durante 5 minutos a 110 °C.

#### IV. Interpretación del cromatograma

Si el cromatograma presenta una sola banda principal intensa con un Rf de aproximadamente 0,4—0,5, el trigo utilizado para la fabricación de la pasta alimenticia es trigo duro. Si, por el contrario, aparecen dos bandas principales, de igual intensidad, la materia prima utilizada es trigo blando. Las mezclas de trigo duro y de trigo blando pueden apreciarse valorando la intensidad relativa de las dos bandas.

Si se observa la presencia de tres bandas (dos bandas a la altura de las bandas principales del trigo blando, más una banda intermedia), hay adición de huevos a la pasta. En este caso, la materia prima utilizada es trigo duro, si la banda superior es menos intensa que la banda intermedia. Al contrario, si la banda superior es más intensa que la intermedia, la primera materia utilizada es trigo blando.