

**REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2018/150 DE LA COMISIÓN**  
**de 30 de enero de 2018**

**por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 en lo que se refiere a los métodos para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos que pueden optar a la intervención pública y a la ayuda para el almacenamiento privado**

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (UE) n.º 1306/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, sobre la financiación, gestión y seguimiento de la política agrícola común, por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n.º 352/78, (CE) n.º 165/94, (CE) n.º 2799/98, (CE) n.º 814/2000, (CE) n.º 1290/2005 y (CE) n.º 485/2008 del Consejo <sup>(1)</sup>, y en particular su artículo 62, apartado 2, letra i),

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento Delegado (UE) 2016/1238 de la Comisión <sup>(2)</sup> y el Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 de la Comisión <sup>(3)</sup> establecen las normas sobre intervención pública y ayuda para el almacenamiento privado. El Reglamento (CE) n.º 273/2008 de la Comisión <sup>(4)</sup> establece los métodos que deben aplicarse para evaluar si la leche y los productos lácteos cumplen los requisitos de admisibilidad establecidos en esos Reglamentos para la intervención pública y la ayuda para el almacenamiento privado.
- (2) Teniendo en cuenta la evolución técnica de la metodología empleada en el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos, deben efectuarse modificaciones importantes con el fin de simplificar y facilitar la actualización de las referencias a las normas ISO. En pro de la claridad y la eficiencia, y habida cuenta del alcance y el carácter técnico de las modificaciones de las disposiciones del Reglamento (CE) n.º 273/2008, procede incorporar las disposiciones pertinentes de dicho Reglamento en el Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240.
- (3) Con objeto de garantizar el cumplimiento uniforme de las nuevas normas y métodos en todos los Estados miembros, los laboratorios deben disponer de un espacio de tiempo suficiente para revisar los procedimientos y aplicar los métodos actualizados.
- (4) Procede, por tanto, modificar el Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 en consecuencia.
- (5) En pro de la seguridad jurídica, debe derogarse el Reglamento (CE) n.º 273/2008.
- (6) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de la Organización Común de Mercados Agrarios.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

El Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 queda modificado como sigue:

- 1) El artículo 4 se modifica como sigue:
  - a) el apartado 1 queda modificado como sigue:
    - i) la letra d) se sustituye por el texto siguiente:

«d) en el caso de la mantequilla: en el anexo IV, partes I y I bis, del presente Reglamento»;
    - ii) la letra e) se sustituye por el texto siguiente:

«e) en el caso de la leche desnatada en polvo: en el anexo V, partes I y I bis, del presente Reglamento»;

<sup>(1)</sup> DO L 347 de 20.12.2013, p. 549.

<sup>(2)</sup> Reglamento Delegado (UE) 2016/1238 de la Comisión, de 18 de mayo de 2016, que completa el Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que atañe a la intervención pública y la ayuda para el almacenamiento privado (DO L 206 de 30.7.2016, p. 15).

<sup>(3)</sup> Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 de la Comisión, de 18 de mayo de 2016, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que atañe a la intervención pública y a la ayuda para el almacenamiento privado (DO L 206 de 30.7.2016, p. 71).

<sup>(4)</sup> Reglamento (CE) n.º 273/2008 de la Comisión, de 5 de marzo de 2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n.º 1255/1999 del Consejo en lo que atañe a los métodos que deben utilizarse para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos (DO L 88 de 29.3.2008, p. 1).

b) el apartado 2 se sustituye por el texto siguiente:

«2. Los métodos utilizados para determinar la calidad de los cereales, la mantequilla y la leche desnatada en polvo que pueden optar a la intervención pública contemplados en los anexos I, IV y V, respectivamente, serán los establecidos en las últimas versiones de las normas europeas o internacionales pertinentes, según corresponda, vigentes al menos seis meses antes del primer día del período de intervención pública definido en el artículo 12 del Reglamento (UE) n.º 1308/2013.».

2) Se inserta el artículo 60 bis siguiente:

«Artículo 60 bis

**Disposición específica sobre los controles relativos a la intervención pública y a la ayuda para el almacenamiento privado de leche y productos lácteos**

1. La admisibilidad de la mantequilla, la leche desnatada en polvo y los quesos para recibir ayuda para el almacenamiento privado se establecerá de conformidad con los métodos establecidos en los anexos VI, VII y VIII, respectivamente.

Esos métodos se establecerán por referencia a las últimas versiones de las normas europeas o internacionales pertinentes, según corresponda, vigentes al menos seis meses antes del primer día del período de intervención pública definido en el artículo 12 del Reglamento (UE) n.º 1308/2013.

2. Los resultados de los controles efectuados aplicando los métodos establecidos en el presente Reglamento se evaluarán de acuerdo con el anexo IX.».

3) Los anexos quedan modificados con arreglo a lo dispuesto en el anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*

Queda derogado el Reglamento (CE) n.º 273/2008.

*Artículo 3*

El presente Reglamento entrará en vigor a los siete días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

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

Hecho en Bruselas, el 30 de enero de 2018.

*Por la Comisión*  
*El Presidente*  
Jean-Claude JUNCKER

## ANEXO

Los anexos del Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 se modifican como sigue:

1) El anexo IV queda modificado como sigue:

a) en la parte I, punto 2, el párrafo segundo se sustituye por el texto siguiente:

«Cada muestra debe evaluarse por separado. No se permite repetir la toma de muestra ni la evaluación.»;

b) se inserta la siguiente parte I bis:

«PARTE I bis

### Métodos de análisis de la mantequilla sin salar para la intervención pública

Parámetro	Método
Grasa <sup>(1)</sup>	ISO 17189 o ISO 3727 parte 3
Agua	ISO 3727 parte 1
Sólidos no grasos	ISO 3727 parte 2
Ácidos grasos	ISO 1740
Índice de peróxidos	ISO 3976
Grasa no láctea	ISO 17678
Características organolépticas	ISO 22935 partes 2 y 3 y tabla de valoración siguiente

<sup>(1)</sup> El método que se aplique deberá ser aprobado por el organismo pagador.

### Tabla de valoración

Aspecto		Consistencia		Olor y sabor	
Puntos	Comentarios	Puntos	Comentarios	Puntos	Comentarios
5	<i>Muy bueno</i> Tipo ideal Calidad sobresaliente (uniformemente seca)	5	<i>Muy buena</i> Tipo ideal Calidad sobresaliente (uniformemente untable)	5	<i>Muy buenos</i> Tipo ideal Calidad sobresaliente (olor absolutamente puro y agradable)
4	<i>Bueno</i> (sin defectos evidentes)	4	<i>Buena</i> (sin defectos evidentes)	4	<i>Bueno</i> (sin defectos evidentes)
1, 2 o 3	Cualquier defecto	1, 2 o 3	Cualquier defecto	1, 2 o 3	Cualquier defecto»

2) En el anexo V, se inserta la siguiente parte I bis:

«PARTE I bis

**Métodos de análisis de la leche desnatada en polvo para la intervención pública**

Parámetro	Método
Proteínas	ISO 8968 parte 1
Grasa	ISO 1736
Agua	ISO 5537
Acidez	ISO 6091
Lactatos	ISO 8069
Prueba de la fosfatasa	ISO 11816 parte 1
Índice de insolubilidad	ISO 8156
Partículas quemadas <sup>(1)</sup>	ADPI
Microorganismos	ISO 4833 parte 1
Suero de mantequilla	Apéndice I
Suero de cuajo <sup>(2)</sup>	Apéndices II y III
Suero ácido <sup>(3)</sup>	ISO 8069 o inspecciones sobre el terreno
Controles organolépticos <sup>(4)</sup>	ISO 22935 partes 2 y 3

<sup>(1)</sup> Los análisis de partículas quemadas podrán realizarse de forma sistemática. No obstante, esos análisis se llevarán a cabo siempre que no se realicen controles organolépticos.

<sup>(2)</sup> El método que se aplique deberá ser aprobado por el organismo pagador (uno o los dos métodos).

<sup>(3)</sup> El método que se aplique deberá ser aprobado por el organismo pagador.

<sup>(4)</sup> Los controles organolépticos se llevarán a cabo cuando se considere necesario tras la realización de análisis de riesgos aprobados por el organismo pagador.

## Apéndice I

**LECHE DESNATADA EN POLVO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFATIDILSERINA Y DE FOSFATIDILETANOLAMINA****Método: HPLC en fase inversa**

## 1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método describe un procedimiento de determinación del contenido de fosfatidilserina (FS) y fosfatidiletanolamina (FE) de la leche desnatada en polvo (LDP) y permite detectar en ella la presencia de sólidos de suero de mantequilla.

## 2. DEFINICIÓN

Contenido de FS + FE: porcentaje en de masa de la sustancia determinada mediante la aplicación del presente procedimiento. El resultado se expresa en miligramos de dipalmitoil-fosfatidiletanolamina- (DPFE) por 100 g de leche en polvo.

## 3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Extracción de los aminofosfolípidos, por medio de metanol, de la leche en polvo reconstituida. Determinación del contenido de FS y FE en forma de derivados de *o*-ftaldialdehído (OFA) mediante HPLC en fase inversa y detección por fluorescencia. Determinación del contenido de FS y FE en la muestra problema por referencia a una muestra patrón que contiene una cantidad conocida de DPEF.

## 4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza analítica reconocida. El agua utilizada debe ser agua destilada o de pureza al menos equivalente, salvo que se indique lo contrario.

4.1. **Material de referencia: DPEF de una pureza mínima del 99 %**

*Nota:* el material de referencia deberá almacenarse a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

4.2. **Reactivos para la preparación de la muestra patrón y de la muestra problema**4.2.1. *Metanol de grado HPLC*4.2.2. *Cloroformo de grado HPLC*4.2.3. *Monoclorhidrato de triptamina*4.3. **Reactivos para la obtención del derivado de *o*-ftaldialdehído**4.3.1. *Hidróxido de sodio, solución acuosa 12 M*4.3.2. *Ácido bórico, solución acuosa 0,4 M, ajustada a pH 10,0 por medio de hidróxido de sodio (4.3.1)*4.3.3. *2-Mercaptoetanol*4.3.4. **o*-Ftaldialdehído (OFA)*4.4. **Disolventes de elución de HPLC**4.4.1. *Los disolventes de elución deberán prepararse con reactivos de grado HPLC*4.4.2. *Agua de grado HPLC*4.4.3. *Metanol de pureza fluorimétrica comprobada*4.4.4. *Tetrahidrofurano*4.4.5. *Fosfato de sodio y dihidrógeno*4.4.6. *Acetato sódico*4.4.7. *Ácido acético*

## 5. INSTRUMENTAL

5.1. **Balanza analítica, capaz de pesar con una precisión de 1 mg y con una legibilidad de 0,1 mg.**

5.2. **Vasos de precipitados de 25 y 100 ml de capacidad**

5.3. **Pipetas que permitan medir entre 1 y 10 ml**

5.4. **Agitador magnético**

5.5. **Pipetas graduadas que permitan medir 0,2, 0,5 y 5 ml**

5.6. **Matraces aforados de 10, 50 y 100 ml de capacidad**

5.7. **Jeringas de 20 y 100 µl de capacidad**

5.8. **Baño ultrasónico**

5.9. **Centrifugadora que funcione a 27 000 g**

5.10. **Frascos de vidrio de unos 5 ml de capacidad**

5.11. **Probeta de 25 ml de capacidad**

5.12. **pH-metro, con una precisión de 0,1 unidades de pH**

5.13. **Equipo HPLC**

5.13.1. *Sistema de bombeo de gradiente capaz de funcionar a razón de 1,0 ml/min a 200 bar*

5.13.2. *Automuestreador con capacidad para formar derivados*

5.13.3. *Calentador de columna, capaz de mantenerla a 30 °C ± 1 °C*

5.13.4. *Detector de fluorescencia capaz de funcionar con una longitud de onda de excitación de 330 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm*

5.13.5. *Integrador o programa de tratamiento de datos capaz de medir el área de los picos*

5.13.6. *Columna de LiChrospher® — 100 (250 × 4,6 mm) o una columna equivalente rellena de octadecilsilano (C 18) con una granulometría de 5 µm*

## 6. MUESTREO

El muestreo deberá realizarse con arreglo a la norma ISO 707.

## 7. PROCEDIMIENTO

7.1. **Preparación de la solución de patrón interno**

7.1.1. *Se pesan 30,0 ± 0,1 mg de monoclóhidrato de triptamina (4.2.3) en un matraz aforado de 100 ml (5.6) y se enrasa con metanol (4.2.1).*

7.1.2. *Se pasa con la pipeta (5.3) 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml (5.6) y se enrasa con metanol (4.2.1) con el fin de obtener una solución de triptamina 0,15 mM.*

7.2. **Preparación de la solución de muestra problema**

7.2.1. *Se pesa 1,000 ± 0,001 g de la muestra problema de LDP en un vaso de precipitados de 25 ml (5.2). Se añaden 10 ml de agua destilada a 40 °C ± 1 °C con una pipeta (5.3) y se agita con el agitador magnético (5.4) durante 30 minutos para disolver los grumos.*

7.2.2. *Se pasan con la pipeta (5.5) 0,2 ml de la leche reconstituida a un matraz aforado de 10 ml (5.6), se añaden 100 µl de solución de triptamina 0,15 mM (7.1) con una jeringa (5.7) y se enrasa con metanol (4.2.1). Se mezcla cuidadosamente por inversión y se somete a ultrasonidos (5.8) durante 15 minutos.*

7.2.3. *Se centrifuga (5.9) a 27 000 g durante 10 minutos y se recoge la solución sobrenadante en un frasco de vidrio (5.10).*

*Nota: la solución de muestra problema debe almacenarse a 4 °C hasta que se proceda al análisis por HPLC.*

**7.3. Preparación de la solución de patrón externo**

7.3.1. Se pesan 55,4 mg de DPEF (4.1) en un matraz aforado de 50 ml (5.6) y se añaden unos 25 ml de cloroformo (4.2.2) con una probeta (5.11). Se calienta el matraz con tapón a  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se mezcla a fondo hasta que se disuelva el DPEF. Se enfría el matraz hasta  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se enrasa con metanol (4.2.1) y se mezcla por inversión.

7.3.2. Se pasa con pipeta (5.3) 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml (5.6) y se enrasa con metanol (4.2.1). Se pasa con pipeta (5.3) 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml (5.6), se añaden con una jeringa (5.7) 100  $\mu\text{l}$  de solución de triptamina 0,15 mM (7.1) y se enrasa con metanol (4.2.1). Se mezcla por inversión.

Nota: la solución de la muestra de referencia debe almacenarse a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se proceda al análisis por HPLC.

**7.4. Preparación del reactivo de derivación**

Se pesan  $25,0 \pm 0,1$  mg de OFA (4.3.4) en un matraz aforado de 10 ml (5.6), se añaden con una pipeta graduada (5.5) 0,5 ml de metanol (4.2.1) y se mezcla bien hasta disolver el OFA. Se enrasa con la solución de ácido bórico (4.3.2) y se añaden 20  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol (4.3.3) con una jeringa (5.7).

Nota: el reactivo de derivación debe conservarse a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un frasco de vidrio topacio; permanece estable durante una semana.

**7.5. Determinación mediante HPLC****7.5.1. Disolventes de elución (4.4)**

Disolvente A: solución de fosfato de sodio y dihidrógeno 0,3 mM y de acetato de sodio 3 mM (ajustada a un pH de  $6,5 \pm 0,1$  por medio de ácido acético): metanol: tetrahidrofurano en una proporción de 558:440:2 (v/v/v)

Disolvente B: metanol

**7.5.2. Gradiente de elución preconizado:**

Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)	Caudal (ml/min)
Inicial	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: el gradiente de elución podrá requerir una ligera modificación con vistas a la obtención de la resolución indicada en la figura 1.

Temperatura de la columna:  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

7.5.3. *Volumen de inyección: 50 µl de reactivo de derivación y 50 µl de solución de la muestra*

7.5.4. *Equilibrado de la columna*

El sistema se pone en marcha a diario. Se llena la columna con disolvente B al 100 % durante 15 minutos y, a continuación, se regula la proporción a A:B = 40:60 y se equilibra a 1 ml/min durante 15 minutos. Se efectúa un ciclo en blanco inyectando metanol (4.2.1).

*Nota:* antes de su almacenamiento a largo plazo, lavar la columna con metanol y cloroformo en una proporción de 80: 20 (v/v) durante 30 minutos.

7.5.5. *Determinación del contenido de FS y FE de la muestra problema*

7.5.6. *Se efectúa la secuencia de análisis cromatográficos sin modificar el tiempo entre ciclos con el fin de obtener períodos de retención constantes. Se inyecta la solución de patrón externo (7.3) cada 5-10 soluciones de muestra problema a fin de calcular el factor de respuesta.*

*Nota:* la columna debe lavarse con disolvente B al 100 % (7.5.1) durante al menos 30 minutos cada 20-25 ciclos.

## 7.6. **Modo de integración**

7.6.1. *Pico del DPEF*

El DPEF se eluye en forma de un solo pico. Se determina el área del pico mediante la integración de valle a valle.

7.6.2. *Pico de la triptamina*

La triptamina se eluye en forma de un solo pico (figura 1). Se determina el área del pico mediante la integración de valle a valle.

7.6.3. *Grupos de picos de FS y FE*

En las condiciones descritas (figura 1), la FS se eluye en forma de dos picos principales parcialmente no resueltos precedidos de un pico menor. La FE se eluye en forma de tres picos parcialmente no resueltos. Hay que determinar la superficie total de cada grupo de picos estableciendo la línea de base tal como se indica en la figura 1.

## 8. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El contenido de FS y FE de la muestra problema se calculará como sigue:

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

siendo:

C el contenido de FS o FE (mg/100 g de leche en polvo) en la muestra problema

A<sub>1</sub> el área del pico de DPEF de la solución de muestra patrón (7.3)

A<sub>2</sub> el área del pico de FS o FE de la solución de muestra problema (7.2)

T<sub>1</sub> el área del pico de triptamina de la solución de muestra patrón (7.3)

T<sub>2</sub> el área del pico de triptamina de la solución de muestra problema (7.2).

## 9. EXACTITUD DEL MÉTODO

*Nota:* los valores relativos a la repetibilidad se han calculado de acuerdo con la norma internacional FIL (\*).

### 9.1. **Repetibilidad**

La desviación típica relativa de la repetibilidad, que expresa la variabilidad de los resultados de análisis independientes obtenidos por un mismo analista utilizando el mismo equipo en las mismas condiciones y con la misma muestra problema, durante un breve lapso de tiempo, no debe sobrepasar un 2 % en valor relativo. En caso de que se proceda a dos determinaciones en esas condiciones, la diferencia relativa entre ambos resultados no deberá sobrepasar el 6 % de la media aritmética de los resultados.

## 9.2. Reproducibilidad

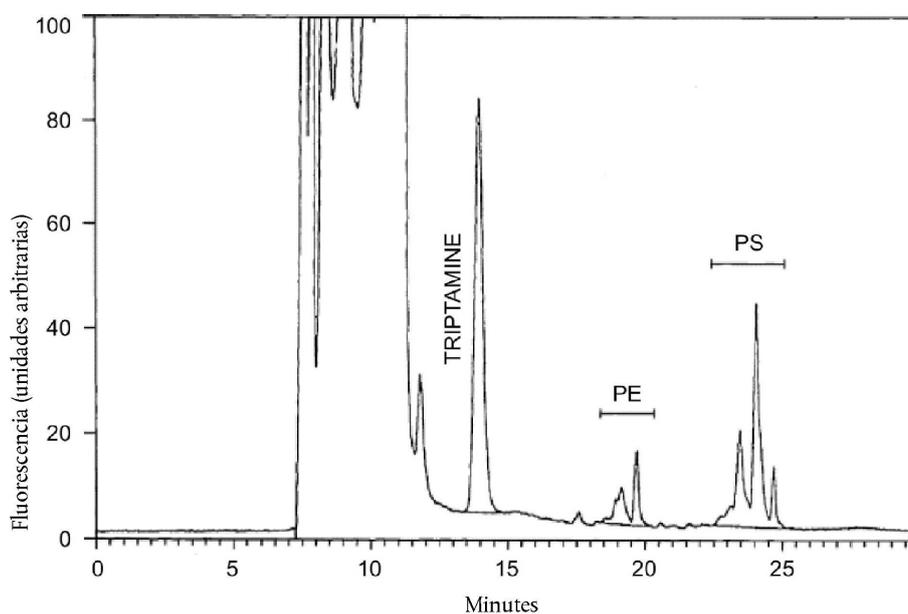
En caso de que se efectúen dos determinaciones por parte de analistas de distintos laboratorios, utilizando equipos distintos y en distintas condiciones para el análisis de la misma muestra problema, la diferencia relativa entre ambos resultados no deberá sobrepasar el 11 % de la media aritmética de los resultados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- 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

**Perfil de HPLC de los derivados OFA de la fosfatidilserina (FS) y de la fosfatidiletanolamina (FE) contenidos en el extracto metanólico de la leche desnatada en polvo reconstituida. Se indica el modo de integración de los picos de FS, FE y triptamina (patrón interno)**



## Apéndice II

**DETECCIÓN DE SUERO DE CUAJO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO DESTINADA AL ALMACENAMIENTO PÚBLICO MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LOS CASEINOMACROPÉPTIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)**

## 1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite detectar la presencia de suero de cuajo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante determinación de los caseinomacropéptidos (CMP).

## 2. REFERENCIA

Norma Internacional ISO 707: Leche y productos lácteos. Directrices para la toma de muestras.

## 3. DEFINICIÓN

El contenido en sólidos de suero de cuajo se define como el porcentaje en masa determinado por el contenido en caseinomacropéptidos mediante el procedimiento descrito.

## 4. PRINCIPIO

- Reconstitución de la leche desnatada en polvo, eliminación de las materias grasas y las proteínas con ácido tricloroacético, y centrifugación o filtración.
- Determinación de la cantidad de caseinomacropéptidos (CMP) presentes en el sobrenadante por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).
- Evaluación del resultado obtenido con las muestras en relación con muestras patrón constituidas por leche desnatada en polvo con o sin adición de un porcentaje conocido de suero de leche en polvo.

## 5. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza analítica reconocida. El agua utilizada debe ser agua destilada o un agua de pureza al menos equivalente.

5.1. **Solución de ácido tricloroacético**

Se disuelven 240 g de ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) en agua y se completa hasta 1 000 ml. La solución debe ser clara e incolora.

5.2. **Solución eluyente, pH 6,0**

Se disuelven 1,74 g de fosfato de hidrógeno y dipotasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37 g de fosfato de dihidrógeno y potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 21,41 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) en unos 700 ml de agua. Se ajusta, si es necesario, a pH 6,0 con ayuda de una solución de ácido fosfórico o de hidróxido de potasio.

Completar hasta 1 000 ml con agua y homogeneizar.

*Nota:* la composición del eluyente se puede modificar para ajustarla al certificado de los patrones o a las recomendaciones del fabricante del material de relleno de la columna.

Antes de utilizarla, se filtra la solución eluyente a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

5.3. **Solución de lavado**

Se mezcla un volumen de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) con nueve volúmenes de agua. Antes de utilizarla, se filtra la mezcla a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

*Nota:* Puede utilizarse cualquier otra solución de lavado que tenga un efecto bactericida y que no altere la eficiencia de resolución de las columnas.

5.4. **Muestras patrón**

5.4.1. *Leche desnatada en polvo que responda a las exigencias del presente Reglamento, o sea [0].*

5.4.2. *La misma leche desnatada en polvo adulterada con un 5 % (m/m) de suero tipo cuajo en polvo de composición normal, o sea [5].*

6. INSTRUMENTAL
  - 6.1. **Balanza analítica**
  - 6.2. **Centrifugadora optativa que pueda alcanzar una aceleración de 2 200 g, provista de tubos de centrifuga con tapón o capucha, de unos 50 ml de capacidad**
  - 6.3. **Agitador mecánico**
  - 6.4. **Agitador magnético**
  - 6.5. **Embudos de vidrio de unos 7 cm de diámetro**
  - 6.6. **Filtros de papel de filtración media, de unos 12,5 cm de diámetro**
  - 6.7. **Dispositivo de filtración de vidrio provisto de membrana filtrante de 0,45 µm de diámetro de poro**
  - 6.8. **Pipetas graduadas que permitan medir 10 ml (ISO 648, clase A, o ISO R/835) o un sistema capaz de introducir 10,0 ml en 2 minutos**
  - 6.9. **Sistema capaz de introducir 20,0 ml de agua a unos 50 °C**
  - 6.10. **Baño María termostatzado a 25 ± 0,5 °C**
  - 6.11. **Equipo de HPLC que comprenda lo siguiente:**
    - 6.11.1. *Bomba*
    - 6.11.2. *Inyector, manual o automático, de 15 a 30 µl de capacidad*
    - 6.11.3. *Dos columnas en serie TSK 2 000-SW (30 cm de longitud, 0,75 cm de diámetro interior) o columnas equivalentes (por ejemplo, una sola TSK 2 000-SWxl, una sola Agilent Technologies Zorbax GF 250) y una precolumna (3 cm × 0,3 cm) rellena de I 125 o de un material de eficacia equivalente*
    - 6.11.4. *Horno de columna termostatzado a 35 ± 1 °C*
    - 6.11.5. *Detector por luz ultravioleta de longitud de onda variable, que permita efectuar mediciones de 205 nm de una sensibilidad de 0,008 Å*
    - 6.11.6. *Integrador que pueda integrar de valle a valle*

*Nota:* Se puede trabajar con columnas mantenidas a temperatura ambiente, pero su poder de resolución es ligeramente menor. En este caso, las variaciones de temperatura durante una misma serie de análisis deberán ser inferiores a ± 5 °C.
7. MUESTREO
  - 7.1. Las muestras se tomarán según el procedimiento establecido por la Norma Internacional ISO 707. No obstante, los Estados miembros podrán utilizar otro método de toma de muestras, siempre que se atenga a los principios de la norma antes citada.
  - 7.2. La muestra se debe conservar en condiciones que eviten cualquier deterioro o modificación de su composición.
8. PROCEDIMIENTO
  - 8.1. **Preparación de la muestra problema**

Se pasa la leche en polvo a un recipiente de capacidad aproximadamente doble del volumen de la leche en polvo, provisto de tapadera hermética al aire. Se cierra el recipiente inmediatamente. Se mezcla bien la leche en polvo invirtiendo varias veces el recipiente.
  - 8.2. **Porción analítica**

Se pesan 2,000 ± 0,001 g de la muestra problema y se pasan a un tubo de centrifuga (6.2) o a un matraz apropiado con tapón (50 ml).
  - 8.3. **Eliminación de la grasa y las proteínas**
    - 8.3.1. *Se añaden 20,0 ml de agua tibia (50 °C) a la porción analítica. Se disuelve el polvo agitando durante 5 minutos con ayuda del agitador mecánico (6.3). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja que se equilibre a 25 °C.*

8.3.2. Se añaden, en 2 minutos, 10,0 ml de la solución de ácido tricloroacético (5.1) a unos 25 °C, agitando enérgicamente con el agitador magnético (6.4). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja durante 60 minutos.

8.3.3. Se centrifuga (6.2) durante 10 minutos a 2 200 g, o se pasa a través de un filtro de papel (6.6), desechando los primeros 5 ml del filtrado.

#### 8.4. Determinación cromatográfica

8.4.1. Se inyectan de 15 a 30 µl, medidos con exactitud, de sobrenadante o de filtrado (8.3.3) en el aparato de HPLC (6.11) regulado a un caudal de 1,0 ml de solución eluyente (5.2) por minuto.

Nota 1. Puede utilizarse otro caudal, en función del diámetro interior de las columnas empleadas o de las instrucciones del fabricante de la columna.

Nota 2. En cada interrupción, enjuagar las columnas con agua. Nunca se debe dejar en ellas la solución eluyente (5.2).

Antes de toda interrupción superior a 24 horas, enjuagar las columnas con agua y después lavarlas con la solución (5.3) durante por lo menos 3 horas con un caudal de 0,2 ml por minuto.

8.4.2. Los resultados del análisis cromatográfico de la muestra problema [E] se obtienen en forma de un cromatograma en el que cada pico se identifica por su tiempo de retención RT, de la forma siguiente:

Pico II:	El segundo pico del cromatograma, con un RT de unos 12,5 minutos
Pico III:	El tercer pico del cromatograma, correspondiente a los CMP, con un RT de 15,5 minutos.

La calidad de las columnas elegidas puede influir mucho en los tiempos de retención de los diferentes picos.

El integrador (6.11.6) calcula automáticamente la superficie A de cada pico:

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

Con el fin de detectar las eventuales anomalías debidas ya sea a un mal funcionamiento del equipo o de las columnas, ya sea al origen y naturaleza de la muestra analizada, es fundamental observar el aspecto de cada cromatograma antes de pasar a la interpretación cuantitativa.

En caso de duda, ha de repetirse el análisis.

#### 8.5. Calibración

8.5.1. Se aplica exactamente a las muestras patrón (5.4) el procedimiento descrito desde el punto 8.2 al punto 8.4.2.

Deben utilizarse soluciones recién preparadas, pues los CMP se degradan en medio con tricloroacético al 8 %. La pérdida se estima en 0,2 % por hora a 30 °C.

8.5.2. Antes de proceder a la determinación cromatográfica de las muestras, se acondicionan las columnas mediante inyecciones repetidas de la solución (8.5.1) de la muestra patrón (5.4.2) hasta que la superficie y el tiempo de retención del pico correspondiente a los CMP sean constantes.

8.5.3. Se determinan los factores de respuesta R inyectando el mismo volumen de filtrados (8.5.1) utilizado para las muestras.

### 9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 9.1. Modo de cálculo y fórmulas

9.1.1. Cálculo de los factores de respuesta R:

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

siendo:

R<sub>II</sub> = los factores de respuesta de los picos II,

A<sub>II</sub> [0] = las áreas de los picos II de la muestra patrón [0] obtenidas en 8.5.3

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

siendo:

- $R_{III}$  = el factor de respuesta del pico III,  
 $A_{III}[0]$  y  $A_{III}[5]$  = Las áreas del pico III en las muestras patrón [0] y [5] respectivamente obtenidas en 8.5.3,  
 $W$  = la cantidad de suero presente en la muestra patrón [5], o sea 5.

9.1.2. *Cálculo del área relativa de los picos de la muestra [E]*

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

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

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

siendo:

- $S_{II}[E]$ ,  $S_{III}[E]$ ,  $S_{IV}[E]$  = las áreas relativas de los picos II, III y IV respectivamente en la muestra [E],  
 $A_{II}[E]$ ,  $A_{III}[E]$  = las áreas de los picos II y III respectivamente en la muestra [E] obtenidas en 8.4.2,  
 $R_{II}$ ,  $R_{III}$  = los factores de respuesta calculados en 9.1.1.

9.1.3. *Cálculo del tiempo de retención relativo del pico III de la muestra [E]:*

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

siendo:

- $RRT_{III}[E]$  = el tiempo de retención relativo del pico III de la muestra [E],  
 $RT_{III}[E]$  = el tiempo de retención del pico III de la muestra [E] obtenido en 8.4.2,  
 $RT_{III}[5]$  = el tiempo de retención del pico III de la muestra testigo [5] obtenido en el punto 8.5.3.

9.1.4. *Por la experimentación, se ha visto que existe una relación lineal entre el tiempo de retención relativo del pico III, es decir,  $RRT_{III}[E]$  y el porcentaje de suero en polvo añadido hasta el 10 %.*

- El  $RRT_{III}[E]$  es  $< 1,000$  si el contenido de suero es  $> 5\%$ .
- El  $RRT_{III}[E]$  es  $\geq 1,000$  si el contenido de suero es  $\leq 5\%$ .

La incertidumbre admitida para los valores de  $RRT_{III}$  es  $\pm 0,002$ .

Normalmente, el valor de  $RRT_{III}[0]$  es poco diferente de 1,034. Según el estado de las columnas, el valor puede aproximarse a 1,000, pero siempre será superior a esta cifra.

9.2. **Cálculo del porcentaje de suero de cuajo en polvo presente en la muestra:**

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

siendo:

- $W$  = el porcentaje (m/m) de suero de cuajo en la muestra [E];  
 $S_{III}[E]$  = el área relativa del pico III de la muestra problema [E] obtenida en 9.1.2;  
1,3 = el área media relativa del pico III expresada en gramos de suero de cuajo por 100 g determinada en leche desnatada en polvo no adulterada, de distintos orígenes; esta cifra se ha obtenido experimentalmente;  
 $S_{III}[0]$  = el área relativa del pico III que es igual a  $R_{III} \times A_{III}[0]$ ; estos valores se han obtenido en 9.1.1 y 8.5.3, respectivamente;  
 $(S_{III}[0] - 0,9)$  = la corrección que debe hacerse al área media relativa 1,3 cuando  $S_{III}[0]$  no es igual a 0,9; experimentalmente, el área media relativa del pico III de la muestra testigo [0] es 0,9.

### 9.3. Exactitud del método

#### 9.3.1. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o en un breve intervalo de tiempo por el mismo analista, empleando los mismos aparatos y la misma muestra, no debe exceder del 0,2 % (m/m).

#### 9.3.2. Reproducibilidad

La diferencia entre dos resultados particulares e independientes obtenidos en dos laboratorios diferentes, con la misma muestra, no debe exceder del 0,4 % (m/m).

### 9.4. Interpretación

9.4.1. Se acepta que no existe suero si el área relativa del pico III,  $S_{III} [E]$ , expresada en gramos de suero de cuajo por 100 g de producto, es  $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ ,

siendo

2,0	el valor máximo permitido para el área relativa del pico III teniendo en cuenta el área media relativa del pico III, es decir, 1,3, la incertidumbre debida a las variaciones en la composición de la leche desnatada en polvo y la reproducibilidad del método (9.3.2)
$(S_{III} [0] - 0,9)$	la corrección que debe hacerse cuando el área $S_{III} [0]$ es distinta de 0,9 (véase el punto 9.2).

9.4.2. Si el área relativa del pico III,  $S_{III} [E]$ , es  $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$  y el área relativa del pico II,  $S_{II} [E] \leq 160$ , se determina el contenido en suero de cuajo como se indica en el punto 9.2.

9.4.3. Si el área relativa del pico III,  $S_{III} [E]$ , es  $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$  y el área relativa del pico II,  $S_{II} [E] \leq 160$ , se determina el contenido en proteínas totales (P %); se examinan luego los gráficos 1 y 2.

9.4.3.1. Los datos obtenidos tras el análisis de muestras de leches desnatadas en polvo no adulteradas, con alto contenido en proteínas totales, se reúnen en los gráficos 1 y 2.

La línea continua representa la regresión lineal, cuyos coeficientes se calculan mediante el método de los mínimos cuadrados.

La recta de trazo discontinuo determina el límite superior del área relativa del pico III, con una probabilidad de que no se sobrepasa en el 90 % de los casos.

Las ecuaciones de las rectas que aparecen con trazo discontinuo en los gráficos 1 y 2 son las siguientes:

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

respectivamente, siendo:

$S_{III}$  el área relativa del pico III calculada bien a partir del contenido en proteínas totales, bien a partir del área relativa del pico  $S_{II} [E]$ ,

P % el contenido en proteínas totales expresado en porcentaje ponderal,

$S_{II} [E]$  el área relativa de la muestra calculada en el punto 9.1.2.

Estas ecuaciones son equivalentes a la cifra 1,3 mencionada en el número 9.2.

La diferencia ( $T_1$  y  $T_2$ ) entre el área relativa  $S_{III} [E]$  hallada y el área relativa  $S_{III}$  viene dada por las relaciones siguientes:  $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P\% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$ ;  $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

9.4.3.2. Si  $T_1$  y/o  $T_2$  son iguales o inferiores a cero, no puede determinarse la presencia de suero de cuajo.

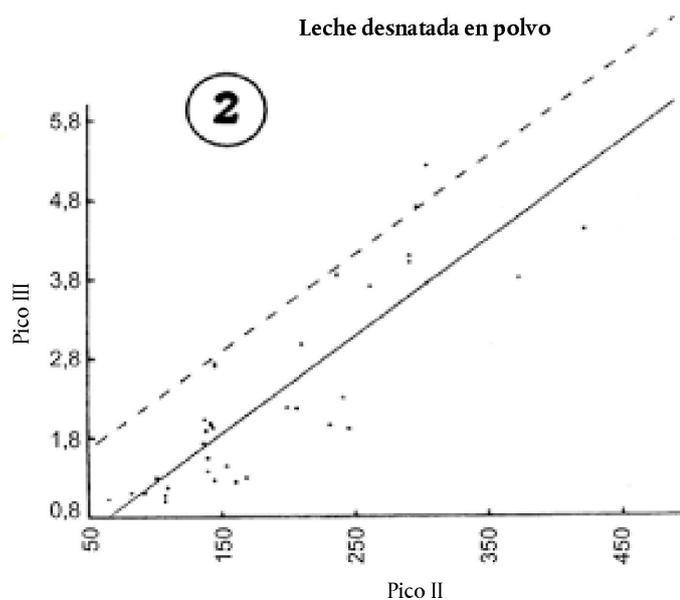
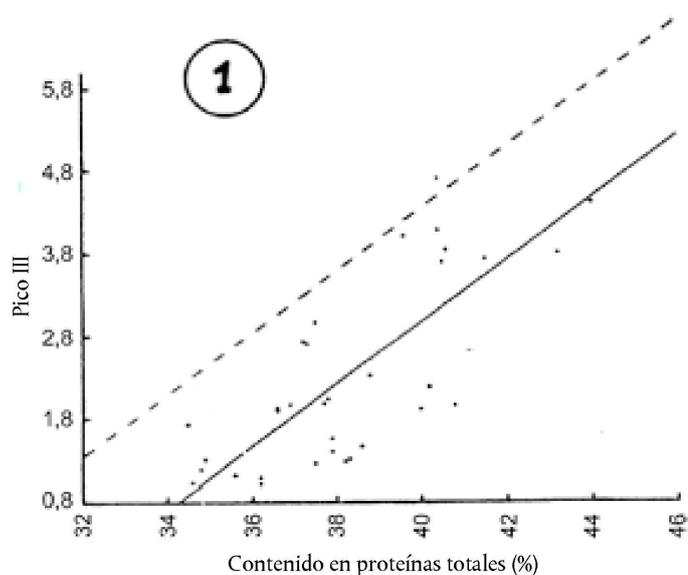
Si  $T_1$  y  $T_2$  son superiores a cero, hay presencia de suero de cuajo.

El contenido en suero de cuajo existente se calculará mediante la fórmula siguiente:  $W = T_2 + 0,91$

siendo:

0,91 la distancia sobre el eje vertical entre la línea de trazo continuo y la recta de trazo discontinuo.

#### Leche desnatada en polvo



## Apéndice III

**DETERMINACIÓN DE LOS SÓLIDOS DE SUERO DE CUAJO EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO**

1. OBJETO: DETECCIÓN DE LA ADICIÓN DE SÓLIDOS DE SUERO DE CUAJO A LA LECHE DESNATADA EN POLVO

2. REFERENCIAS: NORMA INTERNACIONAL ISO 707

3. DEFINICIÓN

El contenido en sólidos de suero de cuajo se define como el porcentaje en masa determinado por el contenido en caseinomacropéptido mediante el procedimiento descrito.

4. PRINCIPIO

Las muestras se analizan para detectar la presencia de caseinomacropéptido A por el procedimiento de cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (procedimiento HPLC). El resultado se evalúa por comparación con muestras patrón constituidas por leche desnatada en polvo con y sin un porcentaje conocido de suero en polvo. Un resultado superior al 1 % (m/m) indica la presencia de sólidos de suero de cuajo.

5. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de pureza analítica reconocida. El agua utilizada debe ser agua destilada o agua de pureza al menos equivalente. El acetonitrilo debe ser de calidad espectroscópica o adecuada para HPLC.

5.1. **Solución de ácido tricloroacético**

Se disuelven 240 g de ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) en agua y se completa hasta 1 000 ml. La solución debe ser clara e incolora.

5.2. **Eluyentes A y B**

Eluyente A: se introducen, en un matraz aforado de 1 000 ml, 150 ml de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 20 ml de isopropanol ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ) y 1,00 ml de ácido trifluoroacético (TFA,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ). Se enrasa con agua a 1 000 ml.

Eluyente B: se introducen, en un matraz aforado de 1 000 ml, 550 ml de acetonitrilo, 20 ml de isopropanol y 1,00 ml de TFA. Se enrasa con agua a 1 000 ml. Antes de utilizarla, se filtra la solución eluyente a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

5.3. **Conservación de la columna**

Tras los análisis, la columna se lava con el eluyente B (mediante un gradiente) y a continuación se lava con acetonitrilo (mediante un gradiente durante 30 minutos). La columna se conserva en acetonitrilo.

5.4. **Muestras patrón**

5.4.1. *Leche desnatada en polvo que se ajuste a los requisitos aplicables al almacenamiento público (es decir [0]).*

5.4.2. *La misma leche desnatada en polvo adulterada con 5 % (m/m) de suero tipo cuajo en polvo de composición normal, o sea [5].*

5.4.3. *La misma leche desnatada en polvo adulterada con 50 % (m/m) de suero tipo cuajo en polvo de composición normal, o sea [50].*

6. INSTRUMENTAL

6.1. **Balanza analítica**

6.2. **Centrifugadora optativa que pueda alcanzar una aceleración de 2 200 g, provista de tubos de centrífuga con tapón o capucha, de unos 50 ml de capacidad**

6.3. **Agitador mecánico**

6.4. **Agitador magnético**

6.5. **Embudos de vidrio de unos 7 cm de diámetro**

- 6.6. **Filtros de papel de filtración media, de unos 12,5 cm de diámetro**
- 6.7. **Dispositivo de filtración de vidrio provisto de membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro**
- 6.8. **Pipetas graduadas que permitan medir 10 ml (ISO 648, clase A, o ISO/R 835) o un sistema capaz de introducir 10,0 ml en 2 minutos**
- 6.9. **Sistema capaz de introducir 20,0 ml de agua a unos 50 °C**
- 6.10. **Baño María termostatzado a  $25 \pm 0,5$  °C**
- 6.11. **Equipo de HPLC que comprenda lo siguiente:**
  - 6.11.1. *Sistema de bombeo de gradiente binario*
  - 6.11.2. *Inyector, manual o automático, con capacidad de 100  $\mu\text{l}$*
  - 6.11.3. *Columna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (25 cm de longitud; 0,46 cm de diámetro interior) o una columna equivalente de fase inversa de poro grueso, a base de sílice*
  - 6.11.4. *Horno de columna termostatzado a  $35 \pm 1$  °C*
  - 6.11.5. *Detector de luz ultravioleta de longitud de onda variable, que permita tomar medidas a 210 nm (de ser necesario, puede utilizarse una longitud de onda mayor, hasta 220 nm), con una sensibilidad de 0,02 Å.*
  - 6.11.6. *Integrador que pueda efectuar la integración a una línea base común o de valle a valle*

*Nota:* se puede trabajar con la columna a temperatura ambiente, con tal de que esta no fluctúe en más de 1 °C; de no cumplirse esta condición, se produce una variación excesiva del tiempo de retención del  $\text{CMP}_A$ .

## 7. MUESTREO

- 7.1. **Las muestras se tomarán según el procedimiento establecido por la Norma Internacional ISO 707. No obstante, los Estados miembros podrán utilizar otro método de toma de muestras, siempre que se atenga a los principios de la norma antes citada.**
- 7.2. **La muestra se debe conservar en condiciones que eviten cualquier deterioro o modificación de su composición.**

## 8. PROCEDIMIENTO

### 8.1. Preparación de la muestra problema

Se pasa la leche en polvo a un recipiente de capacidad aproximadamente doble del volumen de la leche en polvo, provisto de tapadera hermética al aire. Se cierra el recipiente inmediatamente. Se mezcla bien la leche en polvo invirtiendo varias veces el recipiente.

### 8.2. Porción analítica

Se pesan  $2,00 \pm 0,001$  g de la muestra problema en un tubo de centrifuga (6.2) o en un matraz apropiado con tapón (50 ml).

*Nota:* si se trata de una mezcla, debe pesarse una cantidad de muestra problema tal que la porción de muestra desengrasada corresponda a 2,00 g.

### 8.3. Eliminación de la grasa y las proteínas

- 8.3.1. *Se añaden 20,0 ml de agua tibia (50 °C) a la porción analítica. Se disuelve el polvo agitando durante 5 minutos con ayuda del agitador mecánico (6.3). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja que se equilibre a 25 °C.*
- 8.3.2. *Se añaden en 2 minutos, de forma constante, 10,0 ml de solución de ácido tricloroacético a 25 °C (5.1) a la vez que se agita vigorosamente con el agitador magnético (6.4). Se coloca el tubo en el baño María (6.10) y se deja durante 60 minutos.*
- 8.3.3. *Se centrifuga (6.2) durante 10 minutos a 2 200 g, o se pasa a través de un filtro de papel (6.6), desechando los primeros 5 ml del filtrado.*

#### 8.4. Determinación cromatográfica

8.4.1. El método HPLC en fase inversa excluye la posibilidad de falsos positivos debidos a la presencia de suero de mantequilla ácida en polvo.

8.4.2. Antes de llevar a cabo el análisis por HPLC en fase inversa, deben optimizarse las condiciones de gradiente. Un tiempo de retención de  $26 \pm 2$  minutos para el  $CMP_A$  es óptimo para sistemas de gradiente con un volumen muerto de unos 6 ml (volumen desde el punto en que confluyen los disolventes hasta el volumen del circuito de inyección, incluido este último). Para los sistemas de gradiente con un volumen muerto inferior (por ejemplo, 2 ml) debe emplearse un tiempo de retención óptimo de 22 minutos.

Se toman soluciones de las muestras patrón (5.4) con y sin un 50 % de suero de cuajo.

Se inyectan 100 µl de sobrenadante o filtrado (8.3.3) en el aparato de HPLC, que deberá funcionar en las condiciones de gradiente de exploración que figuran en el cuadro 1.

Cuadro 1

#### Condiciones de gradiente de exploración para la optimización de la cromatografía

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% A	% B	Curva
Inicial	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	Lineal
32	1,0	10	90	Lineal
37	1,0	10	90	Lineal
42	1,0	90	10	Lineal

La situación del pico del  $CMP_A$  se obtendrá por comparación de los dos cromatogramas.

Mediante la fórmula indicada a continuación puede calcularse la composición inicial del disolvente que ha de utilizarse para el gradiente normal (véase 8.4.3)  $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 30 / 27$   $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 1,101$

Siendo:

$RT_{cmpA}$ : el tiempo de retención del  $CMP_A$  en el gradiente de exploración

10: el % B inicial del gradiente de exploración

2,5: % B en el punto medio menos % B en el punto inicial del gradiente normal

13,5: el tiempo correspondiente al punto medio del gradiente de exploración

26: el tiempo de retención requerido del  $CMP_A$

6: la proporción de las pendientes del gradiente de exploración y del normal

30: % B en el punto inicial menos % B a 27 minutos en el gradiente de exploración

27: tiempo de desarrollo del gradiente de exploración.

#### 8.4.3. Se toman soluciones de las muestras problema

Se inyectan 100 µl de sobrenadante o filtrado (8.3.3), medidos con exactitud, en el aparato de HPLC que funcionará con un caudal de 1,0 ml de solución de eluyente (5.2) por minuto.

La composición del eluyente al iniciarse el análisis se obtiene de 8.4.2. Normalmente suele estar cerca de A:B = 76:24 (5.2). Inmediatamente después de la inyección se inicia un gradiente lineal que da lugar, al cabo de 27 minutos, a un porcentaje de B superior en un 5 %. A continuación comienza un gradiente lineal por el cual la composición del eluyente alcanza el 90 % de B en 5 minutos. Esta composición se mantiene durante 5 minutos, transcurridos los cuales la composición se modifica mediante un gradiente lineal para alcanzar en 5 minutos la composición inicial. Dependiendo del volumen interno del sistema de bombeo, la siguiente inyección puede llevarse a cabo 15 minutos después de haberse alcanzado las condiciones iniciales.

*Nota 1.* El tiempo de retención del  $CMP_A$  debe ser de  $26 \pm 2$  minutos. Puede conseguirse variando las condiciones iniciales y finales del primer gradiente. Sin embargo, la diferencia de % B entre las condiciones iniciales y finales del primer gradiente se mantendrá en 5 % B.

*Nota 2.* Los eluyentes deben desgasificarse suficientemente y mantenerse desgasificados. Ello es esencial para que el sistema de bombeo por gradiente pueda funcionar correctamente. La desviación típica del tiempo de retención del pico del  $CMP_A$  debe ser inferior a 0,1 minutos ( $n = 10$ ).

*Nota 3.* Cada 5 muestras debe inyectarse la muestra de referencia [5] y emplearse para calcular un nuevo factor de respuesta R (9.1.1).

- 8.4.4. *Los resultados del análisis cromatográfico de la muestra problema (E) se obtienen en forma de cromatograma en el que el pico del  $CMP_A$  se identifica por su tiempo de retención de unos 26 minutos.*

El integrador (6.11.6) calcula automáticamente la altura H del pico del  $CMP_A$ . La situación de la línea de base debe comprobarse en cada cromatograma. Hay que repetir el análisis o la integración si la línea de base está situada incorrectamente.

*Nota:* si el pico del  $CMP_A$  está separado suficientemente de los otros picos, debe aplicarse la asignación de la línea de base valle a valle; en caso contrario, hay que trazar perpendiculares a una línea de base común, cuyo punto de inicio debe estar próximo al pico del  $CMP_A$  (por tanto, ¡no a  $t = 0$  min!). Para el patrón y las muestras hay que utilizar el mismo tipo de integración y comprobar, en el caso de una línea de base común, su coherencia en relación con las muestras y el patrón.

Con el fin de detectar las anomalías eventuales debidas ya sea a un mal funcionamiento del aparato o de la columna, ya sea al origen y naturaleza de la muestra analizada, es fundamental observar el aspecto de cada cromatograma antes de efectuar la interpretación cuantitativa. En caso de duda, ha de repetirse el análisis.

## 8.5. Calibración

- 8.5.1. *Aplicar a las muestras patrón (5.4.1 y 5.4.2) el procedimiento desde el punto 8.2 al 8.4.4, exactamente tal y como se describe. Hay que utilizar soluciones recién preparadas, pues los CMP se degradan en medio de ácido tricloroacético al 8 % a temperatura ambiente. A 4 °C, la solución permanece estable durante 24 horas. Cuando se realice una larga serie de análisis, es recomendable emplear una bandeja refrigerada para las muestras en el inyector automático.*

*Nota:* el punto 8.4.2 puede omitirse si el % B en las condiciones iniciales se conoce por análisis previos.

El cromatograma de la muestra patrón [5] debería ser análogo al representado en la figura 1. Aquí, el pico del  $CMP_A$  viene precedido por dos picos pequeños. Es imprescindible obtener una separación similar.

- 8.5.2. *Antes de proceder a la determinación cromatográfica de las muestras, se inyectan 100 µl de la muestra patrón sin suero de cuajo [0] (5.4.1).*

El cromatograma no debe presentar ningún pico al tiempo de retención del pico del  $CMP_A$ .

- 8.5.3. *Se determinan los factores de respuesta R inyectando el mismo volumen de filtrado (8.5.1) utilizado para las muestras.*

## 9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

### 9.1. Modo de cálculo y fórmulas

- 9.1.1. *Cálculo del factor de respuesta R:*

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

Siendo:

R = el factor de respuesta del pico del  $CMP_A$

H = la altura del pico del  $CMP_A$

W = la cantidad de suero de la muestra patrón [5].

## 9.2. Cálculo del porcentaje de suero de cuajo en polvo presente en la muestra

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

Siendo:

W(E) = el porcentaje (m/m) de suero de cuajo en la muestra (E)

R = el factor de respuesta del pico del CMP<sub>A</sub> (9.1.1)

H(E) = la altura del pico del CMP<sub>A</sub> de la muestra (E)

Si W(E) es superior al 1 % y la diferencia entre el tiempo de retención de la muestra y el de la muestra patrón [5] es inferior a 0,2 minutos, se confirma la presencia de sólidos de suero de cuajo.

## 9.3. Exactitud del método

### 9.3.1. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o en un breve intervalo de tiempo por el mismo analista, empleando los mismos aparatos y la misma muestra, no debe exceder del 0,2 % (m/m).

### 9.3.2. Reproducibilidad

No determinada.

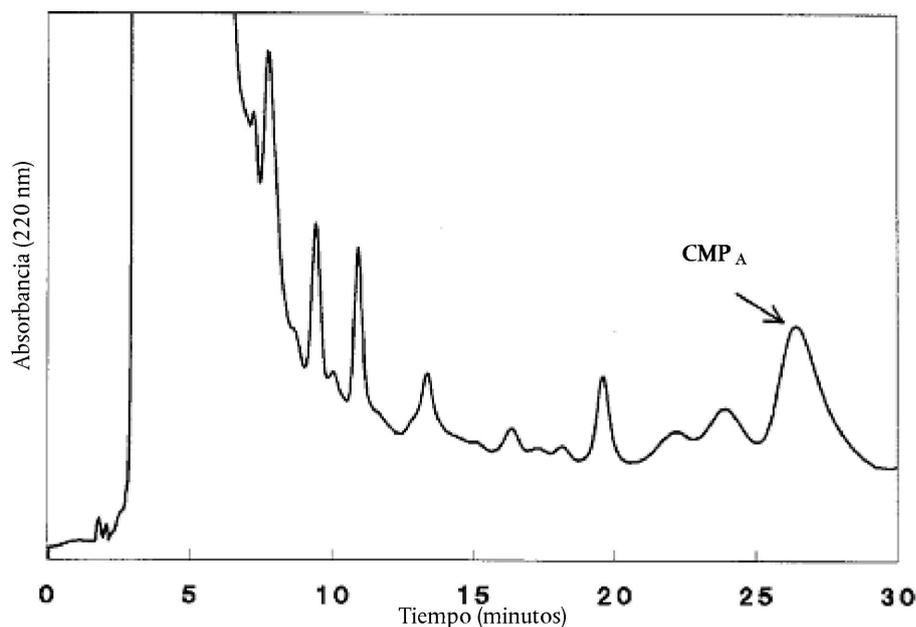
### 9.3.3. Linealidad

Entre 0 y 16 % de suero de cuajo, debe obtenerse una relación lineal con un coeficiente de correlación > 0,99.

## 9.4. Interpretación

El límite del 1 % incluye la incertidumbre debida a la reproducibilidad.

Figura 1  
Patrón Ni—4.6



(\*) Norma internacional FIL 135B/1991. Leche y productos lácteos. Características de precisión de los métodos analíticos. Resumen de método de análisis en colaboración.»

3) Se añaden los anexos siguientes:

«ANEXO VI

**Métodos de análisis de la mantequilla objeto de almacenamiento privado**

Parámetro	Método
Grasa <sup>(1)</sup>	ISO 17189 o ISO 3727 parte 3
Agua	ISO 3727 parte 1
Sólidos no grasos (excluida la sal)	ISO 3727 parte 2
Sal	ISO 15648

<sup>(1)</sup> El método que se aplique deberá ser aprobado por el organismo pagador.

ANEXO VII

**Métodos de análisis de la leche desnatada en polvo objeto de almacenamiento privado**

Parámetro	Método
Grasa	ISO 1736
Proteínas	ISO 8968 parte 1
Agua	ISO 5537

## ANEXO VIII

**Métodos de análisis de los quesos objeto de almacenamiento privado**

1. Para garantizar que el queso hecho exclusivamente de leche de oveja, de cabra o de búfala, o de una mezcla de estas leches, no contiene caseína de leche de vaca se utilizará el método de análisis establecido en el apéndice.

Se considera que hay presencia de caseína de leche de vaca si el contenido de caseína de leche de vaca de la muestra analizada es igual o superior al contenido de la muestra de referencia que contiene 1 % de leche de vaca, según se establece en el apéndice.

2. Podrán utilizarse otros métodos para detectar la caseína de leche de vaca en los quesos citados en el apartado 1, siempre que:
  - a) el límite de detección sea como máximo del 0,5 %, y
  - b) no haya falsos positivos, y
  - c) la caseína de leche de vaca siga siendo detectable con la sensibilidad exigida incluso tras largos períodos de maduración, como puede suceder en condiciones comerciales normales.

Si no se cumple alguna de las condiciones citadas, se utilizará el método establecido en el apéndice.

---

## Apéndice

**MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LECHE DE VACA Y DE CASEINATO DE LECHE DE VACA EN QUESOS DE LECHE DE OVEJA, LECHE DE CABRA O LECHE DE BÚFALA, O MEZCLAS DE LECHE DE OVEJA, CABRA Y BÚFALA**

## 1. OBJETO

Detección de leche de vaca y de caseinato de leche de vaca en quesos de leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o mezclas de leche de oveja, cabra y búfala, mediante isoelectroenfoque de  $\gamma$ -caseínas tras plasmínólisis.

## 2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es adecuado para la detección sensible y específica de leche de vaca y de caseinato de leche de vaca, tanto crudo como con tratamiento térmico, en quesos frescos y madurados elaborados con leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o mezclas de leche de oveja, cabra y búfala. No es adecuado para la detección de la adulteración de leche y queso con concentrados de proteínas de suero de leche de bovino tratados térmicamente.

## 3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

3.1. **Aislamiento de caseínas de queso y patrones de referencia**3.2. **Disolución de las caseínas aisladas y ruptura con plasmina (EC.3.4.21.7)**3.3. **Isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmina en presencia de urea y tinción de las proteínas**3.4. **Evaluación de las manchas teñidas de  $\gamma_3$  y  $\gamma_2$ -caseína (prueba de la presencia de leche de vaca) comparando las manchas obtenidas de la muestra con las producidas en el mismo gel por los patrones de referencia que contienen 0 % y 1 % de leche de vaca**

## 4. REACTIVOS

A menos que se indique lo contrario, se utilizarán sustancias de grado analítico. Debe utilizarse agua bidestilada o de pureza equivalente.

*Nota:* los datos siguientes se refieren a geles de poliacrilamida con urea, preparados en el laboratorio, de unas dimensiones de 265 × 125 × 0,25 mm. Si se utilizan geles de otro tipo o dimensiones, es posible que deban modificarse las condiciones de separación.

***Isoelectroenfoque***4.1. **Reactivos para la obtención de los geles de poliacrilamida con urea**4.1.1. *Solución de gel madre*

Se disuelven:

4,85 g de acrilamida

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

48,05 g de urea

15,00 g de glicerol (87 % p/p),

en agua; se lleva a 100 ml y se guarda en un frasco de vidrio topacio en el frigorífico.

*Nota:* puede utilizarse una solución de acrilamida/BIS premezcladas, presente en el comercio, en vez de los pesos fijos indicados de las acrilamidas neurotóxicas. Si una solución de este tipo contiene un 30 % p/v de acrilamida y un 0,8 % p/v de BIS, deberá utilizarse para la formulación un volumen de 16,2 ml, en lugar de los pesos fijos. El plazo de validez de la solución madre es como máximo de 10 días; si su conductividad es superior a 5  $\mu$ S, debe desionizarse agitando con 2 g de amberlita MB-3 durante 30 minutos, y filtrarse después por una membrana de 0,45  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Solución de gel

Se prepara una solución de gel mezclando aditivos y anfólitos (\*) con la solución de gel madre (véase 4.1.1):

9,0 ml de solución madre

24 mg de  $\beta$ -alanina

500  $\mu$ l de anfólito pH 3,5-9,5

250  $\mu$ l de anfólito pH 5-7

250  $\mu$ l de anfólito pH 6-8

Se mezcla la solución de gel y se desgasifica durante dos o tres minutos en un baño de ultrasonidos o en vacío.

*Nota:* la solución de gel se prepara justo antes de verterla (véase 6.2).

#### 4.1.3. Soluciones catalizadoras

##### 4.1.3.1. N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Temed)

##### 4.1.3.2. Persulfato amónico al 40 % p/v (PER):

Se disuelven 800 mg de PER en agua y se completa hasta 2 ml.

*Nota:* debe utilizarse siempre una solución de PER recién preparada.

#### 4.2. Líquido de contacto

Queroseno o parafina líquida

#### 4.3. Solución anódica

Se disuelven 5,77 g de ácido fosfórico (85 % p/p) en agua y se diluye hasta 100 ml.

#### 4.4. Solución catódica

Se disuelven 2,00 g de hidróxido sódico en agua y se diluye hasta 100 ml con agua.

#### **Preparación de la muestra**

#### 4.5. Reactivos para el aislamiento de las proteínas

##### 4.5.1. Ácido acético diluido (25,0 ml de ácido acético glacial llevados a 100 ml con agua)

##### 4.5.2. Diclorometano

##### 4.5.3. Acetona

#### 4.6. Amortiguador de disolución de proteínas

Se disuelven:

5,75 g de glicerol (87 % p/p)

24,03 g de urea

250 mg de ditiotreititol

en agua y se completa hasta 50 ml.

*Nota:* se debe conservar en frigorífico durante un plazo máximo de una semana.

**4.7. Reactivos para la ruptura con plasmina de las caseínas****4.7.1. Amortiguador de carbonato amónico**

Se ajusta a pH 8 una solución de hidrogenocarbonato amónico 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml de agua) que contiene 0,05 mol/l de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 1,46 g/100 ml) con una solución de carbonato amónico 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml de agua) que contiene 0,05 mol/l de EDTA.

**4.7.2. Plasmina bovina (EC. 3.4.21.7), con una actividad mínima de 5 U/ml****4.7.3. Solución de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico para inhibición enzimática**

Se disuelven 2,624 g de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (ácido 6-amino-n-hexanoico) en 100 ml de etanol del 40 % (v/v).

**4.8. Patrones**

4.8.1. *En el Instituto de Medidas y Materiales de Referencia de la Comisión, B-2440 Geel, Bélgica, pueden conseguirse patrones de referencia certificados de una mezcla de leche desnatada cuajada de oveja y de cabra, con un 0 % y un 1 % de leche de vaca.*

4.8.2. *Preparación de patrones provisionales de laboratorio de leche cuajada de búfala con un 0 % y un 1 % de leche de vaca.*

Se prepara la leche desnatada mediante centrifugación de leche cruda de vaca o de búfala a granel a 37 °C a 2 500 g durante 20 minutos. Tras enfriar el tubo y su contenido rápidamente a 6-8 °C, se elimina completamente la capa grasa superior. Para la preparación del patrón del 1 %, se añaden 5,00 ml de leche desnatada de vaca a 495 ml de leche desnatada de búfala en un vaso de 1 litro y se ajusta el pH a 6,4 mediante adición de ácido láctico diluido (10 % p/v). Se ajusta la temperatura a 35 °C y se añaden 100  $\mu$ l de cuajo de ternero (actividad del cuajo 1:10 000, aprox. 3 000 U/ml), se agita durante 1 minuto y se deja el vaso en reposo, cubierto con lámina de aluminio, a 35 °C durante 1 hora, para que se pueda formar la cuajada. Una vez formada esta, se liofiliza toda la leche cuajada, sin que haya previamente homogeneización ni eliminación del suero. Tras la liofilización, se tritura bien para obtener un polvo homogéneo. Para la preparación del patrón del 0 %, se sigue el mismo procedimiento utilizando leche desnatada pura de búfala. Los patrones deben conservarse a - 20 °C.

*Nota:* es conveniente comprobar la pureza de la leche de búfala mediante isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmina antes de la preparación de los patrones.

**Reactivos de tinción de proteínas****4.9. Fijador**

Se disuelven 150 g de ácido tricloroacético en agua y se lleva a 1 000 ml.

**4.10. Solución decolorante**

Se diluyen 500 ml de metanol y 200 ml de ácido acético glacial hasta 2 000 ml con agua destilada.

*Nota:* la solución decolorante debe prepararse cada día; puede hacerse mezclando volúmenes iguales de soluciones madre de metanol del 50 % (v/v) y de ácido acético glacial del 20 % (v/v).

**4.11. Soluciones colorantes****4.11.1. Solución colorante (solución madre 1)**

Se disuelven 3,0 g de azul brillante Coomassie G 250 (C.I.42655) en 1 000 ml de metanol del 90 % (v/v) utilizando un agitador magnético (durante unos 45 minutos) y se filtra a través de dos filtros de pliegues de velocidad media.

**4.11.2. Solución colorante (solución madre 2)**

Se disuelven 5,0 g de sulfato de cobre pentahidratado en 1 000 ml de ácido acético del 20 % (v/v).

**4.11.3. Solución colorante (solución de trabajo)**

Se mezclan 125 ml de cada una de las soluciones madre (4.11.1, 4.11.2), justo antes de realizar la tinción.

*Nota:* la solución colorante solo debe utilizarse el mismo día en que se haya preparado.

5. EQUIPO
  - 5.1. **Placas de vidrio (265 × 125 × 4 mm); rodillo de caucho (15 cm de ancho); mesa de nivelación**
  - 5.2. **Hoja de soporte del gel (265 × 125 mm)**
  - 5.3. **Hoja de cobertura (280 × 125 mm). Se pega una tira de cinta adhesiva (280 × 6 × 0,25 mm) a cada uno de los bordes largos (véase la figura 1).**
  - 5.4. **Cámara de electroenfoque con placa de refrigeración (por ejemplo, 265 × 125 mm) con fuente de alimentación adecuada ( $\geq 2,5$  kV) o equipo automático de electroforesis**
  - 5.5. **Criostato de circulación, termostatzado a  $12 \pm 0,5$  °C**
  - 5.6. **Centrífuga, ajustable a 3 000 g**
  - 5.7. **Tiras de electrodos ( $\geq 265$  mm de longitud)**
  - 5.8. **Frascos de plástico para el goteo de las soluciones anódica y catódica**
  - 5.9. **Aplicadores de la muestra (10 × 5 mm, papel de filtro de escasa adsorción de proteínas o viscosa)**
  - 5.10. **Placas de cristal o acero inoxidable para teñir y decolorar (por ejemplo, bandejas de instrumentos de 280 × 150 mm)**
  - 5.12. **Homogeneizador de varilla ajustable (10 mm de diámetro del cilindro, velocidad entre 8 000 y 20 000 rpm)**
  - 5.13. **Agitador magnético**
  - 5.14. **Baño ultrasónico**
  - 5.15. **Soldador de películas**
  - 5.16. **Micropipetas de 25  $\mu$ l**
  - 5.17. **Concentrador a vacío o liofilizador**
  - 5.18. **Baño María termostatzado a 35 y  $40 \pm 1$  °C con agitador**
  - 5.19. **Equipo de densitometría capaz de medir a  $\lambda = 634$  nm**
6. PROCEDIMIENTO
  - 6.1. **Preparación de la muestra**
    - 6.1.1. *Aislamiento de las caseínas*

Se pesa la cantidad equivalente a 5 g de peso seco de queso o de patrón de referencia en un tubo de centrifuga de 100 ml, se añaden 60 ml de agua destilada y se homogeneiza con un homogeneizador de varilla (8 000-10 000 rpm). Se ajusta el pH a 4,6 con ácido acético diluido (4.5.1) y se centrifuga (5 minutos, 3 000 g). Se decantan la grasa y el suero, se homogeneiza el residuo a 20 000 rpm en 40 ml de agua destilada [con el pH ajustado a 4,5 con ácido acético diluido (4.5.1)], se añaden 20 ml de diclorometano (4.5.2), se homogeneiza de nuevo y se centrifuga (5 minutos, 3 000 g). Con una espátula se extrae la capa de caseína que se halla entre las fases acuosa y orgánica (véase la figura 2) y se decantan ambas fases. Se vuelve a homogeneizar la caseína en 40 ml de agua destilada (véase más arriba) y 20 ml de diclorometano (4.5.2), y se centrifuga. Se repite esta operación hasta que las dos fases de extracción sean incoloras (2 o 3 veces). Se homogeneiza el residuo de proteína con 50 ml de acetona (4.5.3) y se pasa a través de un filtro de papel de pliegues de velocidad media. Se lava dos veces el residuo que queda en el filtro con 25 ml de acetona cada vez, y se deja secar al aire o en corriente de nitrógeno; después se pulveriza bien en mortero.

Nota: la caseína aislada seca debe conservarse a  $-20$  °C.

- 6.1.2. *Ruptura de las  $\beta$ -caseínas con plasmina para intensificar las  $\gamma$ -caseínas*

Se suspenden 25 mg de caseínas aisladas (6.1.1) en 0,5 ml de solución amortiguadora de carbonato amónico (4.7.1) y se homogeneiza durante 20 minutos, por ejemplo con ultrasonidos. Se calienta a 40 °C y se añaden 10  $\mu$ l de plasmina (4.7.2), se mezcla y se incuba durante una hora a 40 °C sin dejar de agitar. Para inhibir la enzima se añaden 20  $\mu$ l de solución de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (4.7.3) y se añaden después 200 mg de urea sólida y 2 mg de ditiotreitól.

Nota: para obtener mayor simetría en las bandas de caseína enfocada, es conveniente liofilizar la solución tras añadir el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico y disolver después el residuo en 0,5 ml de solución amortiguadora de disolución de proteínas (4.6).

## 6.2. Preparación de los geles de poliacrilamida con urea

Con ayuda de unas cuantas gotas de agua, se extiende la hoja de soporte del gel (5.2) sobre una placa de vidrio (5.1), y se elimina el exceso de agua con toallas o pañuelos de papel. Se extiende la hoja de cobertura (5.3) con espaciadores (0,25 mm) sobre otra placa de vidrio de la misma forma. Se coloca la placa horizontalmente sobre una mesa de nivelación.

Se añaden 10 µl de Temed (4.1.3.1) a la solución de gel preparada y desgasificada (4.1.2), se agita y se añaden 10 µl de solución de PER (4.1.3.2), se mezcla bien y se vierte de inmediato y uniformemente en el centro de la hoja de cobertura. Se coloca un extremo de la placa de soporte del gel (con la cara de la hoja hacia abajo) sobre la placa de la hoja de cobertura y se baja lentamente de manera que se forme una película de gel entre las hojas, extendiéndose de forma regular y sin burbujas (figura 3). Con una fina espátula se hace bajar cuidadosa y completamente la placa de soporte del gel y se colocan otras tres placas de vidrio encima para que actúen de peso. Una vez completada la polimerización (alrededor de 60 minutos), se extrae el gel polimerizado sobre la hoja de soporte del gel junto con la hoja de cobertura, dando golpecitos en las placas de vidrio. Se limpia cuidadosamente el revés de la hoja de soporte para eliminar los residuos de gel y la urea. Se suelda el "emparedado de gel" para formar un tubo de película, y se guarda en frigorífico (durante 6 semanas como máximo).

*Nota:* la hoja de cobertura con los espaciadores puede volver a utilizarse. El gel de poliacrilamida puede cortarse en trozos más pequeños, lo que es recomendable cuando hay pocas muestras o si se utiliza un equipo automático de electroforesis (dos geles de 4,5 × 5 cm).

## 6.3. Isoelectroenfoque

Se gradúa el termostato de refrigeración a 12 °C. Se frota el revés de la hoja de soporte del gel con queroseno y después se dejan caer unas cuantas gotas de queroseno (4.2) sobre el centro del bloque de refrigeración. Se extiende encima el "emparedado de gel", con la cara del soporte hacia abajo, con cuidado para evitar la formación de burbujas. Se enjuga el exceso de queroseno y se quita la hoja de cobertura. Se empapan las tiras de los electrodos con las soluciones electródicas (4.3 y 4.4), se cortan para ajustarlas a la longitud del gel y se colocan en los lugares previstos (a 9,5 cm de distancia de los electrodos).

### Condiciones del isoelectroenfoque:

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

Etapa	Tiempo (min)	Tensión (V)	Intensidad de corriente (mA)	Potencia (W)	Voltios-hora (Vh)
1. Pre-enfoque	30	máxima 2 500	máxima 15	constante 4	aprox. 300
2. Enfoque de la muestra <sup>(1)</sup>	60	máxima 2 500	máxima 15	constante 4	aprox. 1 000
3. Enfoque final	60	máxima 2 500	máxima 5	máxima 20	aprox. 3 000
	40	máxima 2 500	máxima 6	máxima 20	aprox. 3 000
	30	máxima 2 500	máxima 7	máxima 25	aprox. 3 000

<sup>(1)</sup> Aplicación de la muestra: tras el pre-enfoque (etapa 1), se pipetea en los aplicadores de muestras (10 × 5 mm) 18 µl de la muestra y de las soluciones patrón, se ponen sobre el gel a intervalos de 1 mm entre sí y a 5 mm longitudinalmente respecto al ánodo, y se presiona levemente. Se efectúa el enfoque en las condiciones citadas, retirando con cuidado los aplicadores de muestra tras 60 minutos de enfoque de la muestra.

*Nota:* si se modifica el espesor o la anchura de los geles, habrá que ajustar convenientemente los valores de intensidad y potencia (por ejemplo, habrá que duplicar los valores de intensidad de corriente eléctrica y de potencia si se utiliza un gel de 265 × 125 × 0,5 mm).

- 6.3.2. *Ejemplo de programa de tensión para un equipo automático de electroforesis (2 geles de 5,0 × 4,5 cm), cuyos electrodos sin tiras se aplican directamente al gel*

Etapa	Tensión	Intensidad de corriente	Potencia	Temperatura	Voltios-hora
1. Pre-enfoque	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Enfoque de la muestra	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Enfoque	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Enfoque	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

El aplicador de muestra se coloca en la etapa 2 a 0 Vh.

El aplicador de muestra se retira en la etapa 2 a 30 Vh.

#### 6.4. **Tinción de las proteínas**

##### 6.4.1. *Fijación de las proteínas*

Se retiran las tiras de los electrodos inmediatamente después de cortar la corriente y se pone el gel inmediatamente en un recipiente de tinción/decoloración con 200 ml de fijador (4.9); se deja durante 15 minutos, agitando continuamente.

##### 6.4.2. *Lavado y tinción de la placa de gel*

Se escurre totalmente el fijador y se lava la placa de gel dos veces durante 30 segundos cada vez con 100 ml de solución decolorante (4.10). Se retira la solución decolorante y se llena el recipiente con 250 ml de solución colorante (4.11.3); se tiñe durante 45 minutos con agitación suave.

##### 6.4.3. *Decoloración de la placa de gel*

Se retira la solución colorante, se lava la placa de gel dos veces con 100 ml de solución decolorante (4.10) cada vez; después se agita durante 15 minutos con 200 ml de solución decolorante y se repite la etapa de decoloración al menos 2 o 3 veces hasta que el fondo se vea claro e incoloro. A continuación, se enjuaga la placa de gel con agua destilada (2 × 2 minutos) y se deja secar al aire (de 2 a 3 horas) o con un secador de pelo (de 10 a 15 minutos).

*Nota 1:* la fijación, el lavado, la tinción y la decoloración se deben realizar a 20 °C. No deben emplearse temperaturas elevadas.

*Nota 2:* si se prefiere utilizar una tinción de plata (por ejemplo, Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Código n.º 17-1150-01), de mayor sensibilidad, las muestras de caseína tratadas con plasmina deben diluirse a 5 mg/ml.

## 7. EVALUACIÓN

La evaluación se realiza comparando las manchas de proteínas de la muestra desconocida con los patrones de referencia en el mismo gel. La detección de leche de vaca en quesos de leche de oveja, leche de cabra y leche de búfala o sus mezclas se realiza por medio de las  $\gamma_3$ - y  $\gamma_2$ -caseínas, cuyos puntos isoeléctricos se sitúan entre los pH 6,5 y 7,5 (figuras 4a, 4b y 5). El límite de detección es inferior al 0,5 %.

### 7.1. **Estimación visual**

Para la evaluación visual de la cantidad de leche de vaca es conveniente ajustar las concentraciones de las muestras y patrones para obtener el mismo nivel de intensidad de las  $\gamma_2$ - y  $\gamma_3$ -caseínas de oveja, cabra y búfala (véase " $\gamma_2$  E,G,B" y " $\gamma_3$  E,G,B", en las figuras 4a, 4b y 5). A continuación podrá evaluarse directamente la cantidad de leche de vaca (menor, igual o mayor que el 1 %) en la muestra desconocida comparando la intensidad de las  $\gamma_3$ - y  $\gamma_2$ -caseínas de vaca (véase " $\gamma_3$  C" y " $\gamma_2$  C" en las figuras 4a, 4b y 5) con las de los patrones de referencia del 0 % y el 1 % (oveja, cabra) o con los patrones provisionales de laboratorio (búfala).

## 7.2. Estimación densitométrica

Cuando sea posible, se aplica la densitometría (5.19) para determinar la relación de las áreas de los picos de las  $\gamma_2$ - y  $\gamma_3$ -caseínas de vaca con respecto a las de oveja, cabra y búfala (véase la figura 5). Este valor se compara con la relación de las áreas de los picos de las  $\gamma_2$ - y  $\gamma_3$ -caseínas del patrón de referencia del 1 % (oveja, cabra) o del patrón provisional de laboratorio (búfala) analizados en el mismo gel.

*Nota:* el método funciona satisfactoriamente si se encuentra una señal positiva clara de las dos caseínas de vaca ( $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ ) en el patrón de referencia del 1 % pero no en el del 0 %. En caso contrario, deberá optimizarse el procedimiento respetando los detalles del método con precisión.

Una muestra se considerará positiva cuando las dos caseínas de vaca ( $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ ) o las relaciones de las áreas de los picos correspondientes sean iguales o superiores al nivel del patrón de referencia del 1 %.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

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". En: "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

### Esquema de la hoja de cobertura

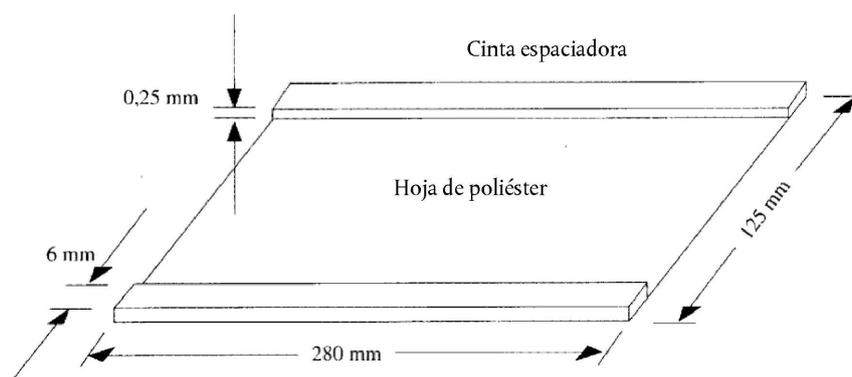


Figura 2

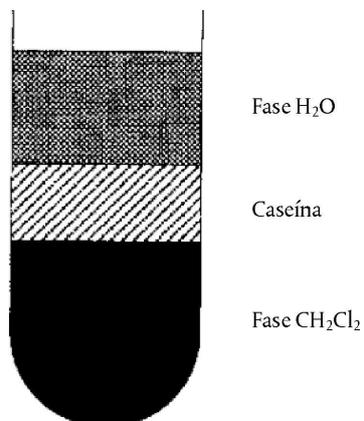
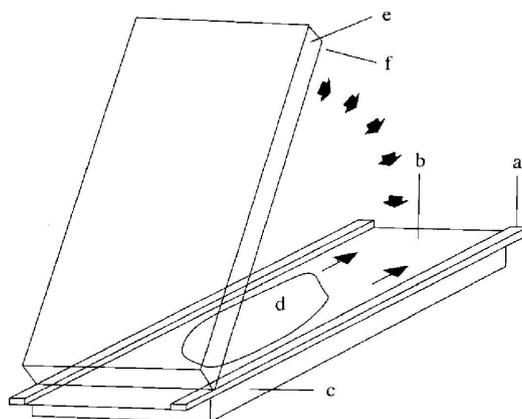
**Capa de caseína flotando entre las fases acuosa y orgánica tras la centrifugación**

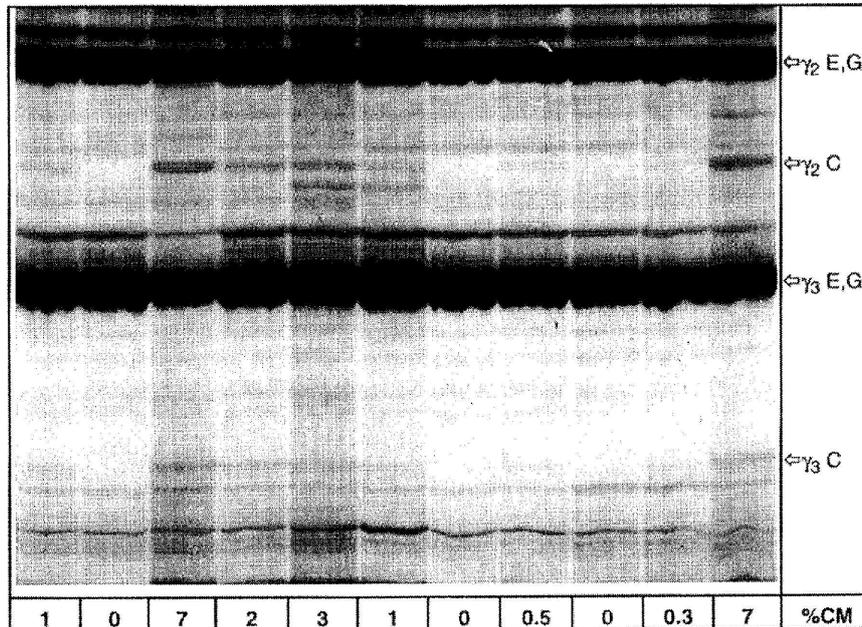
Figura 3

**Técnica de inclinación para moldear geles ultrafinos de poliacrilamida**

a = cinta espaciadora (0,25 mm); b = hoja de cobertura (5.3); c, e = placas de vidrio (5.1); d = solución de gel (4.1.2); f = hoja de soporte de gel (5.2)

Figura 4a

Isoelectroenfoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con leche de oveja y cabra con cantidades diferentes de leche de vaca

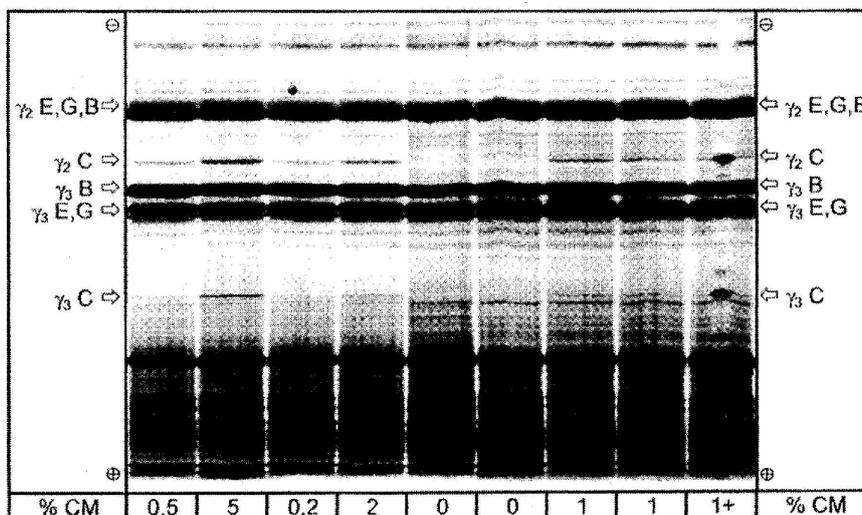


% CM = porcentaje de leche de vaca, C = vaca, E = oveja, G = cabra

Se muestra la mitad superior del gel de IEF.

Figura 4b

Isoelectroenfoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con mezclas de leche de oveja, cabra y búfala con cantidades diferentes de leche de vaca

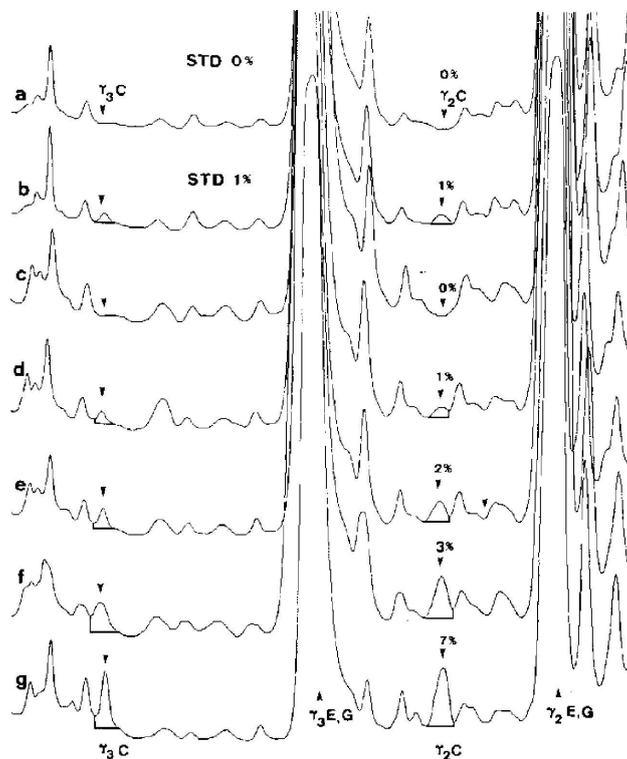


% CM = porcentaje de leche de vaca; 1 + = muestra que contiene un 1 % de leche de vaca en la que se ha inyectado caseína pura de vaca a mitad del recorrido; C = vaca, E = oveja, G = cabra, B = búfala.

Se muestra la distancia de separación total del gel de IEF.

Figura 5

Superposición de densitogramas de patrones (STD) y muestras de quesos elaborados con una mezcla de leche de oveja y cabra tras el isoelectroenfoco



a, b = patrones con 0 % y 1 % de leche de vaca; c-g = muestras de quesos con 0, 1, 2, 3 y 7 % de leche de vaca; C = vaca, E = oveja, G = cabra.

La mitad superior del gel de IEF se leyó a  $\lambda = 634$  nm.

## ANEXO IX

**Evaluación de los análisis****1. Garantía de calidad**

Los análisis los realizarán laboratorios designados de conformidad con el artículo 12 del Reglamento (CE) n.º 882/2004 (\*\*) o que designen las autoridades competentes del Estado miembro.

**2. Muestreo y controversias sobre los resultados de los análisis**

1. El muestreo se efectuará de acuerdo con la normativa aplicable al producto estudiado. En caso de que no se prevean expresamente disposiciones sobre muestreo, se utilizarán las disposiciones establecidas en la norma ISO 707: Leche y productos lácteos. Directrices para la toma de muestras.
2. Los informes de laboratorio de los resultados de los análisis deberán incluir suficiente información para que se pueda hacer una evaluación de dichos resultados según el apéndice.
3. Para los análisis exigidos por la normativa de la Unión se tomarán muestras por duplicado.
4. En caso de controversia sobre los resultados, el organismo pagador hará que se repita el análisis necesario del producto de que se trate, debiendo correr con los costes la parte perdedora.

El análisis antes mencionado se efectuará siempre que se disponga de duplicados sellados de las muestras del producto que hayan sido conservados de forma adecuada por la autoridad competente. El fabricante enviará una solicitud al organismo pagador para realizar el análisis en el plazo de siete días laborables a partir de la notificación de los resultados del primer análisis. El análisis deberá realizarlo el organismo pagador en el plazo de veintiún días laborables a partir de la recepción de la solicitud.

5. El resultado derivado del recurso será el definitivo.
  6. Si el fabricante puede demostrar, en el plazo de cinco días laborables desde la fecha del muestreo, que este no se había efectuado de forma correcta, se repetirá el muestreo siempre que sea posible. Si no puede repetirse el muestreo, se aceptará el envío.
-

## Apéndice

**Evaluación del cumplimiento de un envío respecto al límite legal****1. Principio**

Cuando la normativa aplicable al régimen de intervención pública y al almacenamiento privado establezca procedimientos de muestreo detallados, deberán seguirse esos procedimientos. En todos los demás casos se utilizará una muestra formada por al menos tres unidades de muestra tomadas aleatoriamente del envío objeto de control. Podrá prepararse una muestra compuesta. El resultado obtenido se comparará con los límites legales calculando un intervalo de confianza del 95 % como dos veces la desviación típica, dependiendo la desviación típica correspondiente de si: 1) el método está validado mediante colaboración internacional con valores de  $\sigma_r$  y  $\sigma_R$ , o si 2) se ha calculado la reproducibilidad interna en caso de validación dentro del propio laboratorio. Este intervalo de confianza se iguala entonces a la incertidumbre de la medición del resultado.

**2. El método está validado mediante colaboración internacional**

En este caso, se han establecido la desviación típica de la repetibilidad  $\sigma_r$  y la desviación típica de la reproducibilidad  $\sigma_R$  y el laboratorio puede demostrar el cumplimiento con las características de funcionamiento del método validado.

Se calcula la media aritmética  $\bar{x}$  de las  $n$  mediciones repetidas.

Se calcula la incertidumbre ampliada ( $k = 2$ ) de  $\bar{x}$  del modo siguiente:

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

Si el resultado final  $x$  de la medición se calcula utilizando una fórmula del tipo  $x = y_1 + y_2$ ,  $x = y_1 - y_2$ ,  $x = y_1 \cdot y_2$  o  $x = y_1/y_2$  deberán seguirse los métodos normales para combinar desviaciones típicas en tales casos.

Se considera que el envío no se ajusta al límite superior legal UL si

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

en caso contrario, se considera que sí cumple el UL.

Se considera que el envío no se ajusta al límite inferior legal LL si

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

en caso contrario, se considera que sí cumple el LL.

**3. Validación en el propio laboratorio con cálculo de la desviación típica de la reproducibilidad interna**

En caso de que se utilicen métodos no especificados en el presente Reglamento y no se hayan establecido medidas de la precisión, deberá efectuarse una validación en el propio laboratorio. En las fórmulas para calcular la incertidumbre ampliada  $U$  se utilizarán la desviación típica de la repetibilidad interna  $s_{ir}$  y la desviación típica de la reproducibilidad interna  $s_R$  en lugar de  $\sigma_r$  y  $\sigma_R$ , respectivamente.

En el punto 1 figuran las normas que deben seguirse para determinar la conformidad con el límite legal. Sin embargo, si se considera que el envío no cumple el límite legal, habrá que repetir las mediciones con el método especificado en el presente Reglamento, y el resultado se evaluará según lo indicado en el punto 1.

(\*) Se ha visto que los productos Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) y Resolyte® pH 5-7 y pH 6-8 (BDH, Merck) son muy adecuados para conseguir la separación necesaria de las  $\gamma$ -caseínas.

(\*\*) Reglamento (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales, DO L 165 de 30.4.2004.».