

REGLAMENTO (CEE) N° 2426/90 DE LA COMISIÓN

de 21 de agosto de 1990

por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 1725/79 relativo a las modalidades de concesión de las ayudas para la leche desnatada transformada en piensos compuestos y para la leche desnatada en polvo destinada a la alimentación de los terneros

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento (CEE) n° 804/68 del Consejo, de 27 de junio de 1968, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos⁽¹⁾, modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) n° 3879/89⁽²⁾, y, en particular, el apartado 3 de su artículo 10,

Considerando que en la letra a) del apartado 2 del artículo 1 del Reglamento (CEE) n° 1725/79 de la Comisión⁽³⁾, modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) n° 3368/88⁽⁴⁾ se estipula que, con arreglo al apartado 1 del artículo 1, la leche en polvo debe responder a las definiciones que figuran en el artículo 1 del Reglamento (CEE) n° 986/68 del Consejo⁽⁵⁾, modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) n° 1115/89⁽⁶⁾, sin haber sufrido ninguna adición previa;

Considerando que la incorporación fraudulenta de sólidos del suero a la leche desnatada que se emplea para la elaboración de la leche desnatada en polvo, o a la propia leche en polvo, es contraria a las disposiciones antedichas; que, no existiendo un método comunitario oficial para la detección de suero en polvo en la leche desnatada a la que se permite la adición de mazada en polvo, el Reglamento (CEE) n° 1725/79 no proporciona normas específicas para la detección de los sólidos del suero; que se ha desarrollado recientemente un método para detectar el suero lácteo; que es oportuno imponer este método en el marco del mencionado Reglamento;

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

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CEE) n° 1725/79 se modificará como sigue:

1. Se añadirá el siguiente texto al primer párrafo del apartado 3 del artículo 10:

« Cuando dichos controles tengan por objeto la leche desnatada en polvo, empleada en su estado natural o en forma de mezcla, la ausencia de suero lácteo en polvo se demostrará según el procedimiento expuesto en el Anexo IV. »
2. La letra j) del apartado 2 del punto A del Anexo I se sustituirá por el texto siguiente:

« j) otros y en particular el suero ácido, en la medida en que las autoridades nacionales requieran su detección. »
3. El Anexo del presente Reglamento pasará a constituir el Anexo IV del Reglamento (CEE) n° 1725/79.

Artículo 2

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

Será aplicable a partir del 1 de marzo de 1991.

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

Hecho en Bruselas, el 21 de agosto de 1990.

Por la Comisión

Ray MAC SHARRY

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO n° L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.

⁽²⁾ DO n° L 378 de 27. 12. 1989, p. 1.

⁽³⁾ DO n° L 199 de 7. 8. 1979, p. 1.

⁽⁴⁾ DO n° L 296 de 29. 10. 1988, p. 50.

⁽⁵⁾ DO n° L 169 de 18. 7. 1968, p. 4.

⁽⁶⁾ DO n° L 118 de 29. 4. 1989, p. 7.

ANEXO

« ANEXO IV

DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS DE SUERO DE QUESERÍA EN LA LECHE DESNATADA EN POLVO Y EN MEZCLAS CONFORME AL REGLAMENTO (CEE) N° 1725/79

1. **Ambito** : detección de la adición de sólidos de suero lácteo a :
 - a) leche desnatada en polvo según la definición del artículo 1 del Reglamento (CEE) n° 986/68 y
 - b) mezclas según la definición del apartado 3 del artículo 1 del Reglamento (CEE) n° 1725/79.
2. **Referencias** : norma internacional ISO 707
Leche y productos lácteos : — métodos de muestreo conforme a las directrices que figuran en la letra c) del apartado 2 del Anexo I del Reglamento (CEE) n° 625/78.
3. **Definición**
El contenido en sólidos de suero de quesería se define como el porcentaje en masa determinado por el procedimiento que se describe a continuación.
4. **Principio**
Determinación de la cantidad de glicomacropéptido A (GMP_A) conforme al Anexo V del Reglamento (CEE) n° 625/78. Las muestras que den resultado positivo se analizarán con vistas a la detección de glicomacropéptido A por el procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (procedimiento HPLC). El resultado se evaluará por comparación con muestras patrón constituidas por leche desnatada en polvo exenta o con adición de un porcentaje conocido de suero lácteo en polvo. Si se obtiene un resultado superior al 1 % (m/m), ello es prueba de la presencia de sólidos de suero.
5. **Reactivos**
Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida. El agua que se emplee será destilada, o de pureza al menos equivalente. El acetonitrilo deberá ser de calidad espectroscópica o adecuada para la HPLC.
Los reactivos necesarios para el procedimiento descrito en el Reglamento (CEE) n° 625/78 se describen en el Anexo V de dicho Reglamento.
Reactivos para HPLC con inversión de fase.
 - 5.1. *Solución de ácido tricloroacético*
Disolver 240 g de ácido tricloroacético (CCl₃COOH) en agua y completar hasta 1 000 ml.
 - 5.2. *Eluyentes A y B*
Eluyente A : 150 ml de acetonitrilo (CH₃CN), 20 ml de isopropanol (CH₃CHOHCH₃) y 1,00 ml de ácido trifluoroacético (TFA, CF₃COOH) se llevan con agua hasta 1 000 ml. Eluyente B : 550 ml de acetonitrilo, 20 ml de isopropanol y 1,00 ml de TFA se llevan con agua hasta 1 000 ml. Antes de utilizarla, filtra la solución de eluyente a través de una membrana filtrante con un diámetro de poro de 45 µm.
 - 5.3. *Conservación de la columna*
Tras los análisis, la columna se lava con el eluyente B (mediante un gradiente) y a continuación se llena de acetonitrilo (mediante un gradiente en 30 minutos). La columna se guarda en acetonitrilo.
 - 5.4. *Muestras patrón*
 - 5.4.1. Leche desnatada en polvo conforme a los requisitos del Reglamento (CEE) n° 625/78, es decir [0].
 - 5.4.2. La misma leche en polvo adulterada con un 5 % (m/m) del suero lácteo en polvo de composición media, es decir [5].
 - 5.4.3. La misma leche en polvo adulterada con un 50 % de suero lácteo en polvo de composición media, es decir [50] (*).
6. **Aparatos**
Los aparatos necesarios para el procedimiento descrito en el Reglamento (CEE) n° 625/78 se describen en el Anexo V de dicho Reglamento.
Aparatos para la HPLC con inversión de fase.

(*) El suero de quesería en polvo de composición media, así como la leche en polvo adulterada, pueden obtenerse de NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA, Ede.
No obstante, también pueden emplearse otros productos en polvo que den resultados equivalentes al de los productos NIZO.

- 6.1. Balanza analítica.
- 6.2. Centrifugadora capaz de alcanzar una fuerza centrífuga de 2 200 g, equipada con tubos para centrifugar tapados, de una capacidad de aproximadamente 50 ml.
- 6.3. Agitador mecánico con dispositivo para agitar a una temperatura de 50 °C.
- 6.4. Agitador magnético.
- 6.5. Embudos de vidrio de un diámetro de 7 cm aproximadamente.
- 6.6. Filtros de papel de filtración media, de aproximadamente 12,5 cm de diámetro.
- 6.7. Dispositivo de filtración de vidrio provisto de una membrana filtrante con un diámetro de poro de 0,45 µm.
- 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. Baño de agua con termostato regulado a $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. Equipo de HPLC, compuesto de:
 - 6.10.1. Sistema de bombeo de gradiente binario;
 - 6.10.2. Inyector manual o automático, con capacidad de 100 µl;
 - 6.10.3. Columna Dupont Protein Plus (25 × 0,46 cm de diámetro interior) o una columna equivalente de inversión de fase de poro grueso a base de sílice;
 - 6.10.4. Horno de columna con termostato regulado a 35 ± 1 °C;
 - 6.10.5. 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;
- 6.10.6. Integrador capaz de medir la altura de los picos.

Observación

Se puede trabajar con la columna a temperatura ambiente, con tal de que ésta no fluctúe en más de 1 °C; de no cumplirse esta condición, se produce una variación excesiva del tiempo de retención del GMP_A.

7. Muestreo

- 7.1. Norma internacional ISO 707 — Leche y productos lácteos — Métodos de muestreo conformes a las directrices que figuran en la letra c) del apartado 2 del Anexo I del Reglamento (CEE) nº 625/78.
- 7.2. La muestra se conservará en condiciones que eviten cualquier tipo de deterioro o de modificación en la composición.

8. Procedimiento

8.1. *Preparación de la muestra problema*

Transferir la leche en polvo a un recipiente de capacidad aproximadamente doble del volumen del polvo y que posea una tapadera hermética. Cerrar el recipiente inmediatamente. Mezclar bien la leche invirtiendo varias veces del recipiente.

8.2. *Porción de ensayo*

Pesar $2,000 \pm 0,001$ g de la muestra problema y transferirlos al 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. Añadir 20,0 g de agua tibia (50 °C) a la porción de ensayo. Disolver el polvo agitándolo durante 5 minutos, o 30 minutos en el caso de mazada ácida, empleando un agitador mecánico (6.3). Situar el tubo en un baño de agua (6.9) y mantenerlo hasta que se establezca a 25 °C.
- 8.3.2. Añadir 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). Mantener el tubo en reposo en un baño de agua (6.9) durante 60 minutos.
- 8.3.3. Centrifugar (6.2) durante 10 minutos a 2 200 g, o pasar a través de un filtro de papel (6.6), desechando los primeros 5 ml del filtrado.

8.4. *Determinación cromatográfica*

- 8.4.1. Realizar el análisis por HPLC tal como se especifica en el Anexo V del Reglamento (CEE) nº 625/78. Si el resultado es negativo, se concluye que la muestra no contiene una cantidad detectable de sólidos de suero lácteo. En caso de resultado positivo debe aplicarse el procedimiento de HPLC en fase inversa descrito más abajo. La presencia de mazada ácida en polvo puede dar lugar a falsos resultados positivos, posibilidad que queda excluida gracias al método de HPLC con inversión de fase.

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

Tomar soluciones de las muestras patrón (5.4) con y sin un 50 % de suero lácteo.

Injectar 100 μ l 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 la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de gradiente de exploración para la optimización de la cromatografía

Tiempo (en minutos)	Flujo (en ml/minutos)	% A	% B	Curva
Inicial	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

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

La composición inicial del solvente que deberá emplearse para el gradiente normal (apartado 8.4.3) se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\% B = 10 - 2,5 + [13,5 + (RT_{gmpA} - 26)/6] \cdot 30/27$$

$$\% B = 7,5 + [13,5 + (RT_{gmpA} - 26)/6] \cdot 1,11$$

siendo

RT_{gmpA}: el tiempo de retención del GMP_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 GMP_A

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

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

27: tiempo de recorrido del gradiente de exploración.

- 8.4.3. Tomar soluciones de las muestras problema

Injectar 100 μ l de sobrenadante o filtrado (8.3.3), medidos con precisión, en el aparato HPLC que deberá estar funcionando a 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 se sitúa próxima a 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.

Observaciones

1. El tiempo de retención del glicomacropéptido debe ser de unos 26 minutos \pm 2 minutos, lo cual puede conseguirse haciendo variar las condiciones iniciales y finales del primer gradiente. Sin embargo, la diferencia de % B entre las condiciones iniciales y finales del primer gradiente debe mantenerse en 5 % B.
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 de los GMP debe ser inferior a 0,1 minutos ($n = 10$).
3. Cada 5 muestras debe inyectarse la muestra testigo [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 un cromatograma en el que el pico de los GMP se identifica por su tiempo de retención de 26 minutos aproximadamente.

El integrador (6.10.6) calcula automáticamente la altura máxima H del pico de los GMP. La situación de la línea de base deberá comprobarse en cada cromatograma y se repetirá el análisis o la integración si esta línea no estaba situada correctamente.

Con el fin de detectar las anomalías eventuales debidas ya sea a un mal funcionamiento del aparato o de las columnas, ya sea por el origen y naturaleza de la muestra analizada, es necesario observar el aspecto de cada cromatograma antes de efectuar una interpretación cuantitativa. En caso de duda, repetir el análisis.

8.5. *Calibrado*

- 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. Utilizar soluciones recién preparadas, pues los GMP se degradan en medio 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.

Observación

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 GMP_A viene precedido por dos picos pequeños. Es imprescindible obtener una separación similar.

- 8.5.2. Antes de proceder a una determinación cromatográfica de las muestras, inyectar 100 µl de la muestra patrón sin suero [0] (5.4.1). El cromatograma no debe presentar un pico en el tiempo de retención del GMP_A.
- 8.5.3. Determinar los factores de respuesta R inyectando el mismo volumen de filtrados (8.5.1) que el utilizado para las muestras.

9. **Expresión de los resultados**

9.1. *Método de cálculo y fórmulas*

- 9.1.1. Cálculo del factor de respuesta R :

$$\text{pico GMP: } R = W/H$$

siendo

R = el factor de respuesta del pico de los GMP

H = la altura del pico de los GMP

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

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

$$W[E] = R \times H[E]$$

siendo

W[E] = el porcentaje (m/m) de suero lácteo en la muestra [E]

R = el factor de respuesta del pico de los GMP (9.1.1)

H[E] = la altura del pico de los GMP 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 concluye la presencia de sólidos de suero lácteo.

9.3. *Precisión 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 el 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproducibilidad

No se ha determinado aún.

9.3.3. Linealidad

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

9.4. Interpretación

- 9.4.1. Se concluye la presencia de suero si el resultado obtenido en 9.2 es superior al 1 % m/m y el tiempo de retención del pico de los GMP difiere del tiempo correspondiente a la muestra patrón [5] en menos de 0,2 minutos. El límite del 1 % se establece de conformidad con lo dispuesto en los puntos 9.2 y 9.4.1 del Anexo V del Reglamento (CEE) n° 625/78.

