379L1067

24. 12. 79 Diario Oficial de las Comunidades Europeas Nº L 327/29

PRIMERA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 13 de noviembre de 1979

sobre fijación de los métodos de análisis comunitarios para el control de determinados tipos de leche conservada parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana

(79/1067/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 76/118/CEE del Consejo, de 18 de diciembre de 1985, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre determinados tipos de leche conservada parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana [1], en particular, su artículo 11,

Considerando que el artículo 11 de la Directiva 76/118/CEE establece que la composición de determinados tipos de leche conservada parcial o totalmente deshidratada debe ser controlada por métodos de análisis comunitarios;

Considerando que se aconsejable adoptar una primera serie de métodos cuyo estudio ha sido concluido;

Considerando que las medidas establecidas en la presente Directiva se ajustan al dictamen emitido por el Comité permanente de productos alimenticios,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros tomarán todas las medidas oportunas par aquè los análisis necesarios para el control de los criterios que figuran en el Anexo I se lleven a cabo con arreglo a los métodos descritos en el Anexo II.

Artículo 2

En caso de que se indique la existencia de métodos alternativos para efectuar una misma determinación, el análisis de la muestra podrá realizarse mediante cualquiera de dichos métodos. En el acta de la prueba a que se refiere el Anexo II deberá señalarse el método empleado.

Artículo 3

Los Estados miembros aplicarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva en un plazo de dieciocho meses a partir de su notificación, e informará de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 13 de noviembre de 1979.

Por la Comisión

Étienne DAVIGNON

Miembro de la Comisión

---

[1] DO nº L 24 de 30. 1. 1976, p. 49.

ANEXO I

ÁMBITO DE APLICACIÓN DE LOS PRIMEROS MÉTODOS DE ANÁLISIS COMUNITARIOS DE APLICACIÓN EN LA DIRECTIVA SOBRE DETERMINADOS TIPOS DE LECHE CONSERVADA PARCIAL O TOTALMENTE DESHIDRATADA

I. **Disposiciones generales**

II. **Determinación de la cantidad de materia seca**

— leche evaporada rica en materia grasa [según el método 1 (Anexo II)]
— leche evaporada [según el método 1 (Anexo II)],
— leche semidesnatada evaporada [según el método 1 (Anexo II)],
— leche desnatada evaporada [según el método 1 (Anexo II)],
— leche condensada [según el método 1 (Anexo II)],
— leche semidesnatada condensada [según el método 1 (Anexo II)],
— leche desnatada condensada [según el método 1 (Anexo II)],

III. **Determinación del contenido en humedad**

— leche en polvo rica en materia grasa [según el método 2 (Anexo II)],
— leche en polvo [según el método 2 (Anexo II)],
— leche semidesnatada en polvo [según el método 2 (Anexo II)],
— leche desnatada en polvo [según el método 2 (Anexo II)].

IV. **Determinación de la materia grasa**

— leche evaporada rica en materia grasa [según el método 3 (Anexo II)],
— leche evaporada [según el método 3 (Anexo II)],
— leche semidesnatada evaporada [según el método 3 (Anexo II)],
— leche evaporada [según el método 3 (Anexo II)],
— leche condensada [según el método 3 (Anexo II)],
— leche semidesnatada condensada [según el método 3 (Anexo II)],
— leche desnatada condensada [según el método 3 (Anexo II)],
— leche en polvo rica en materia grasa [según el método 4 (Anexo II)],
— leche en polvo [según el método 4 (Anexo II)],
— leche semidesnatada en polvo [según el método 4 (Anexo II)],
— leche desnatada en polvo [según el método (Anexo II)].

V. **Determinación de la sacarosa**

— leche condensada [según el método 5 (Anexo II)],
— leche semidesnatada condensada [según el método 5 (Anexo II)],
— leche desnatada condensada [según el método 5 (Anexo II)].

VI. **Determinación del ácido láctico y de los lactatos**

— leche en polvo rica en materia grasa [según el método 6 (Anexo II)],
— leche en polvo [según el método 6 (Anexo II)],
— leche semidesnatada en polvo [según el método 6 (Anexo II)],
— leche desnatada en polvo [según el método 6 (Anexo II)].

VII. **Determinación de la actividad de la fosfatasa**

— leche en polvo rica en materia grasa [según el método 7 u 8 (Anexo II)],
— leche en polvo [según el método 7 u 8 (Anexo II)],
— leche semidesnatada en polvo [según el método 7 u 8 (Anexo II)],
— leche desnatada en polvo [según el método 7 u 8 (Anexo II)].

ANEXO II

MÉTODOS DE ANÁLISIS RELATIVOS A LA COMPOSICIÓN DE DETERMINADOS TIPOS DE LECHE CONSERVADA PARCIAL O TOTALMENTE DESHIDRATADA DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO

DISPOSICIONES GENERALES

1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO

1.1 **Leche evaporada rica en materia grasa**
Leche evaporada
Leche semidesnatada evaporada
Leche desnatada evaporada

Agitar el bote cerrado dándole la vuelta. Abrir el bote y trnsvasar la leche lentamente a un segundo recipiente que pueda cerrarse herméticamente, mezclándola mediante sucesivos transvases; asegúrese de que todos los restos de grasa y de leche adheridos al caso y al fondo del bote se han mezclado con la muestra. Cierre el recipiente. Si el contenido no apareciera homogéneo, póngalo a calentar al baño maría a 40 °C. Agitar vigorosamente cada 15 minutos. Dos horas más tarde, saque el recipiente del baño maría y deje que se enfríe a temperatura ambiente. Levante la tapa y mezcle cuidadosamente el contenido con la ayuda de una cuchara o de una espátula (si la grasa se ha desemulsionado, no es conveniente proceder al análisis de la muestra). Consérvese en lugar fresco.

1.2 **Leche condensada**
Leche semidesnatada condensada
Leche desnatada condensada

Botes:
Caliente el bote cerrado al baño maría de 30 a 40 °C durante unos 30 minutos. Abra el bote y mezcle cuidadosamente su contenido con una espátula o con una cuchara, efectuando movimientos ascendentes, descendentes y circulares, con el fin de obtener una íntima mezcla de las capas superiores e inferiores con el conjunto del contenido. Asegúrese de que los restos de leche adheridos al casco y al fondo del bote se han mezclado con la muestra. Siempre que sea posible, transvase el contenido a un segundo recipiente dotado de un sistema de cierre estanco. Cierre el recipiente y consérvelo en lugar fresco.

Tubos:
Corte el fondo y transvase el contenido a un recipiente dotado de un sistema de cierre estanco. Después corte el tubo en el sentido de su longitud, despegue todas las materias adheridas al interior del tubo y mézclelas cuidadosamente con el resto del contenido. Conserve el recipiente en lugar fresco.

1.3 **Leche en polvo rica en materia grasa**
Leche en polvo
Leche semidesnatada en polvo
Leche desnatada en polvo

Transvase la leche en polvo a un recipiente limpio y seco (con cierre estanco) con una capacidad equivalente al doble del volumen del polvo. Cierre inmediatamente el recipiente y mezcle íntimamente la leche en polvo agitándolo y dándole vueltas sucesivamente. Durante la preparación de la muestra se ha de evitar, siempre que sea posible, exponer la leche en polvo al aire atmosférico, para reducir al mínimo la absorción de agua.

2. REACTIVOS

2.1 **Agua**

2.1.1 Cuando se utilice el agua para soluciones, disoluciones o lavados, se ha de utilizar agua destilada, agua desmineralizada o agua de una pureza al menos equivalente.

2.1.2 Cuando utilicemos el término «solución» o «disolución» sin otra indicación, nos referiremos a solución en el agua o disolución en el agua.

2.2 **Productos químicos**

Todos los productos químicos utilizados han de ser de calidad analítica reconocida, salvo especificaciones especiales.

3. EQUIPO

3.1 **Lista de aparatos**

Las listas de aparatos sólo contienen los artículos de uso especializado y los artículos de especificación especial.

3.2 **Balanza analítica**

El término «balanza analítica» hace referencia a una balanza capaz de pesar con un aprecisión mínima de 0,1 mg.

4. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 **Cálculo del porcentaje**

Salvo especificación en contra, el resultado se calculará en porcentaje de la masa de la prueba analizada en el laboratorio.

4.2 **Número de cifras significativas**

Los resultados no contendrán un número de cifras significativas superior al justificado por la precisión del método de análisis utilizado.

5. REDACCIÓN DEL ACTA DE LA PRUEBA

En el acta de la prueba se indicará el método de análisis utilizado así como los resultados obtenidos. Además, ha de mencionar todos los detalles del procedimiento, no especificados en el método de análisis o facultativos, así como las condiciones susceptibles de haber influenciado el resultado obtenido.

El actta de la prueba deberá suministrar todas las informaciones necesarias para la identificación completa de la muestra.

MÉTODO 1: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN MATERIA SECA

(Cámara calefactora a 99 °C)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite determinar el contenido en materia seca de los siguientes tipos de leche:
— leche evaporada rica en materia grasa,
— leche evaporada,
— leche semidesnatada evaporada,
— leche desnatada evaporada,
— leche condensada,
— leche semidesnatada condensada,
— leche desnatada condensada.

2. DEFINICIÓN

Materia seca de la leche evaporada o de la leche condensada: materia seca determinada por el método especificado.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Una cantidad conocida de la muestra se diluye con agua, luego se mezcla con arena y se deseca a una temperatura de 99 ± 1 °C. La masa obtenida tras desecación constituye la masa de materia seca. La materia seca se expresa en porcentaje de la masa de la muestra.

4. REACTIVOS

Arena de cuarzo o arena de mar (tamaño de los granos: 0,18—05 mm, tratada con ácido clorhídrico, pasada a través de un tamiz de 500 micras y retenida por un tamiz de 180 micras). Ha de corresponder al test de control que se indica a continuación:

Calentar unos 25 g de arena durante 2 horas en la cámara calefactora (punto 5.3), tal como se indica en los puntos 6.1 a 6.3. Añadir 5 ml. de agua, calentar de nuevo en la cámara calefactora durante 2 horas, enfriar y volver a pesarlos. La diferencia entre los dos pesajes no ha de ser superior a 0,5 mg.

Llegado el caso, tratar la arena durante 3 días con ácido clorhídrico al 25%; mezclar de vez en cuando. Lavarla con agua hasta que desaparezca la reacción ácida o hasta que el agua del lavado esté exenta de cloruro. Secarla a 160 °C y repetir el test tal como indicado anteriormente.

5. EQUIPO

5.1. Balanza analítica

5.2 Cápsulas metálicas, preferentemente de niquel, de aluminio o de acero inoxidable. Las cápsulas han de estar dotadas de tapaderas que se adapten perfectamente pero que puedan ser fácilmente levantadas. Las dimensiones más idóneas son: diámetro de 60 a 80 mm, profundidad de unos 25 mm.

5.3. Cámaras calefactoras de deseación a presión atmosférica, bien ventiladas y controladas por termostato, con la temperatura regulada a 99 ± 1 °C. Es muy importante que la temperatura del conjunto de la cámara calefactora sea uniforme.

5.4 Aparato desecador equipado de un indicador higrométrico, lleno de gel de sílice activado recientemente o de un desecante equivalente.

5.5 Cortas barritas de vidrio, una de cuyas extremidades será plana y de una longitud similar a las dimensiones interiores de las cápsulas metálicas (punto 5.2).

5.6 Baño de agua hirviendo.

6. MODO DE OPERACIÓN

6.1 Coloque en la cápsula (punto 5.2) unos 25 g. de arena (punto 4) y una corta barrita de vidrio (punto 5.5).

6.2 Caliente la cápsula, la tapadera y el contenido, con la tapadera levantada, durante 2 horas en la cámera calefactora (punto 5.3).

6.3 Coloque de nuevo la tapadera en la cápsula y pase ésta al aparato desecador (punto 5.4). Deje enfriar a temperatura ambiente y pese con una precisión mínima de 0,1 mg. (Mo).

6.4 Inclinando la tapadera, amontone la arena en un lado de la cápsula. Introduzca en el espacio libre que queda aproximadamente 1,5 g de la muestra si se trata de leche condensada azucarada y 3,0 g si se trata de leche condensada no azucarada. Vuelva a colocar la tapadera y pese con una precisión mínima de 0,1 mg (M_1).

6.5 Retire la tapadera, añada 5 ml de agua y mezcle los líquidos con la barrita de vidrio (punto 5.5), luego la arena y la parte líquida. Deje la barrita en la mezcla.

6.6 Coloque la cápsula en el baño de agua hirviendo (punto 5.6) hasta que el agua se evapore (generalmente unos 20 minutos). Remueva la mezcla de vez en cuando con la barrita para que la masa se airee bien y no se aglutine tras la desecación. Coloque la barrita en el interior de la cápsula.

6.7 Coloque la cápsula y la tapadera durante 1 h 30 en la cámara calefactora.

6.8 Vuelva a ponter la tapadera, transfiera la cápsula al aparato desecador y déjela que se enfríe allí hasta alcanzar la temperatura ambiente; pese con una precisión mínima de 0,1 mg.

6.9 Destapar la cápsula y calentarla, junto con su tapadera, durante 1 hora en la cámara calefactora.

6.10 Repita la operación del punto 6.8.

6.11 Repita las operaciones descritas en los puntos 6.9 y 6.8 hasta que entre dos pesajes sucesivos la diferencia no sea superior a 0,5 mg o que aumente la masa. En este último caso, emplee el pesaje con la masa más baja que se obtuvo en los cálculos (punto 7.1). Asegúrese de que el peso final anotado sea M_2g.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1 **Modo de cálculo**

El contenido en materia seca, expresado en porcentaje de la masa de muestra, se indica según la fórmula:

$$\frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

en donde:

M_0 = masa, en gramos, de la cápsula, de su tapadera y de la arena, tras la operación del punto 6.3.

M_1 = masa, en gramos, de la tapa, de la cápsula, de la arena y de la muestra tras la operación del punto 6.4.

M_2 = masa, en gramos, de la tapadera, de la cápsula, de la arena y de la muestra desecada, tras la operación del punto 6.11.

7.2 **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas, efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de otra según el mismo análisis de la misma muestra y en las mismas condiciones, no ha de exceder 0,2 g de materia seca por 100 g de producto.

8. CÁLCULO DEL CONTENIDO EN MATERIAS SÓLIDAS TOTALES Y DEL CONTENIDO EN MATERIAS SÓLIDAS NO GRASAS EN LA LECHE

8.1 El contenido en materia sólida total de los distintos tipos de leche condensada viene dado por:
— el contenido en materia seca total (obtenido según el método 1 (anexo II)),
— el contenido en sacarosa (obtenido según el método 5 (anexo II)).

8.2 El contenido en materia sólida no grasa de los distintos tipos de leche evaporada viene dado por:
— el contenido en materia seca total (obtenido según el método 1 (anexo II)),
— el contenido en sacarosa (obtenido según el método 5 (anexo II)),
— el contenido en materia grasa (obtenido según el método 3 (anexo II)).

8.3 El contenido en materia sólida no grasa de los distintos tipos de leche evaporada viene dado por:
— el contenido en materia seca total (obtenido según el método 1 (anexo II)),
— el contenido en materia grasa (obtenido según el método 3 (anexo II)).

MÉTODO 2: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN HUMEDAD

(Cámara calefactora a 102 °C)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite determinar la pérdida de masa durante el proceso de desecado de los tipos de leche citados a continuación:
— leche en polvo rica en materia grasa,
— leche en polvo,
— leche semidesnatada en polvo,
— leche desnatada en polvo.

2. DEFINICIÓN

Contenido en humedad: pérdida de masa durante el proceso de desecado determinado por el método especificado.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La masa residual de la parte de prueba se determina tras desecado a presión atmosférica en una cámara calefactora a 102 ± 1 °C hasta obtención de una masa constante. La pérdida de masa se calcula en porcentaje de la masa de muestra.

4. EQUIPO

4.4.1 Balanza analítica

4.2 Cápsulas, de preferencia de cristal, de niquel, de aluminio o de acero inoxidable. Las cápsulas han de estar dotadas de tapaderas que se adapten perfectamente pero que pueden ser fácilmente levantadas. Las dimensiones más idóneas son: diámetro de 60 a 80 mm, profundidad de unos 25 mm.

4.3 Cámara calefactora a presión atmosférica, bien ventiladas y controladas por termostato, con la temperatura regulada a 102 ± 1 °C. Es muy importante que la temperatura del conjunto de la cámara calefactora sea uniforme.

4.4 Aparato desecador equipado de un indicador higrométrico, lleno de gel de sílice activado recientemente o de un desecante equivalente.

5. MODO DE OPERACIÓN

5.1 Quite la tapadera de la cápsula (punto 4.2) y coloque tapadera y cápsula en la cámara calefactora (punto 4.3) durante 1 hora.

5.2 Vuelva a poner la tapadera, transfiera la cápsula al aparato desecador (punto 4.4) y deje que se enfríe allí hasta alcanzar la temperatura ambiente; pese con una precisión de 0,1 mg (M_0).

5.3 Coloque en la cápsula unos 2 g de muestra de leche seca, ponga la tapadera sobre la cápsula y proceda rápidamente pesar la cápsula equipada de su tapadera con una precisión de 0,1 mg (M_1).

5.4. Retire la tapadera y coloque cápsula y tapadera durante 2 horas en la cámara calefactora.

5.5 Ponga de nuevo la tapadera, transfiera la cápsula tapada al aparato desecador y deje que se enfríe allí hasta alcanzar la temperatura ambiente; pese rápidamente con una precisión de 0,1 mg.

5.6 Destape la cápsula y caliéntela, junto con su tapadera, durante 1 hora en la cámara calefactora.

5.7 Repita la operación del punto 5.5.

5.8 Repita las operaciones de los puntos 5.6 y 5.5 hasta que los sucesivos pesajes no difieran en más de 0,5 mg o que la masa aumente. En este última caso, emplee el pesaje con la masa más baja que obtuvo en los cálculos (punto 6.1). Asegúrese de que el peso final anotado sea M_2g.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1 **Modo de cálculo**

Calcule la pérdida de masa de la muestra durante el proceso de desecado, expresada en porcentaje de la masa, utilizando la fórmula:

$$\frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

en donde:

M_0 = masa, en gramos, de la cápsula y de su tapadera, tras la operación del punto 5.2.

M_1 = masa, en gramos, de la cápsula, de su tapadera y de la muestra, tras la operación del punto 5.3.

M_2 = masa, en gramos, de la cápsula, de la tapadera y de la muestra final, tras la operación del punto 5.5.

6.2 **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas, efectuadas simultáneamente o immediatamente una después de la otra según el mismo análisis de la misma muestra y en las mismas condiciones, no ha de exceder 0,1 g de agua por 100 g de producto.

MÉTODO 3: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN MATERIA GRASA (MÉTODO RÖSE-GOTTLIEB)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite determinar el contenido en materia grasa de los siguientes tipos de leche:

— leche evaporada rica en materia grasa,
— leche evaporada,
— leche semidesnatada evaporada,
— leche desnatada evaporada,
— leche condensada,
— leche semidesnatada condensada,
— leche desnatada condensada.

2. DEFINICIÓN

Contenido en materia grasa de los distintos tipos de leche evaporada o de leche condensada: el contenido en materia grasa determinado por el método especificado.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El contenido en materia grasa se determina por extracción de la materia grasa de una solución amoniacal-alcohólica de la muestra con ayuda de óxido dietílico y de éter de petróleo, evaporación de los disolventes, pesaje de los residuos y cálculo en procentaje de la muestra, según el método Röse-Gottlieb.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos han de conformarse con las condiciones requieridas en la prueba simulada (punto 6.1). Llegado el caso, podrá destilarse de nuevo los reactivos en presencia de 1 g de grasa de mantequilla por 100 ml de disolvente.

4.1 Solución de amoniaco, más o menos 25% (m/m) de NH_3 (densidad a 20 °C, unos 0,91 g/ml) o una solución más concentrada de una concentración conocida.

4.2 Etanol a 96 ± 2% (v/v) o, en su ausencia, etanol desnaturalizado con metanol, etilmetilcetona o éter de petróleo.

4.3 Óxido dietílico, exento de peróxidos.

Nota 1
Para asegurarse de que el óxido dietílico está exento de peróxidos, añadir a 10 ml de óxido contenidos en una pequeña probeta con tapón, de vidrio, enjuagada previamente con un poco de óxido dietílico 1 ml, de una solución con un 10% de yoduro de potasio, recientemente preparada. Agitar y dejar reposar durante 1 minuto. No ha de aparecer coloración amarilla alguna en ninguna de las dos capas.

Nota 2
El óxido dietílico puede ser mantenido exento de peróxidos adicionando una hoja de cinc húmeda previamente sumergida durante 1 minuto en una solución ácida diluida de sulfato de cobre y posteriormente lavada con agua. Para 1 litro de óxido dietílico, utilizar unos 8 000 mm^2 de hoja de cinc, cortada en bandas suficientemente largas para llegar a la mitad del recipiente como mínimo.

4.4 Éter de petróleo, destilante entre 30 y 60 °C.

4.5 Mezcla de disolventes, preparada inmediatamente antes de su empleo mediante la mezcla de igual volumen de óxido dietílico (punto 4.3) y de éter de petróleo (punto 4.4). (Se puede sustituir la mezcla de disolventes, siempre que sea indicado, por el óxido dietílico o por el éter de petróleo.).

5. EQUIPO

5.1 Balanza analítica

5.2 Tubos o frascos de extracción apropiados, dotados de tapones de vidrio esmerilado, o de otro tipo de cierre insensible a la acción de los disolventes empleados.

5.3 Frascos de fondo plano y pared delgada, de 150 a 250 ml de capacidad.

5.4. Cámara calefactora de desecado a presión atmosférica, bien ventilada, controlada por termostato (temperatura a 102 ± 1 °C).

5.5. Gránulos destinados a facilitar la ebullición, exentos de materia grasa, no porosos, no desmenuzables, como por ejemplo perlas de vidrio o trocitos de carburo de silicio (el empleo de estos gránulos es facultativo; ver al respecto el punto 6.2.1).

5.6. Sifón correspondiente a los tubos de extracción.

5.7. Centrifugadora.

6. MODO DE OPERACIÓN

6.1. **Prueba simulada**

Al tiempo que efectúa la determinación de la materia grasa de la muestra, efectué una prueba simulada con 10 ml de agua utilizando el mismo tipo de aparato de etracción, los mismos reactivos en las mismas proporciones y el mismo modo de operación que el descrito a continuaión, salvo el punto 6.2.2. Si el valor de la prueba simulada es superior a 0,5 mg, habrá que verificar los reactivos y el o los reactivos impuros habrán de ser purificados o sustituidos.

6.2. **Dosificación**

6.2.1. Seque el frasco (punto 5.3) (eventualmente después de haber depositado los materiales (punto 5.5) facilitando una ebullición moderada durante la evaporación de los disolventes) en la cámara calefactora (punto 5.4) durante una media hora a 1 hora. Deje enfriar el frasco hasta que adquiera la temperatura de la sala de las balanzas y pese el frasco ya enfriado, con una precisión de 0,1 mg.

6.2.2. Agite la muestra preparada de 5 g y pese inmediatamente después con una precisión de 1 mg, directamente o por diferencia, 4 g de leche evaporada o 2 a 2,5 g de leche condensada en el aparato de extracción (punto 5.2). Añada agua hasta un volumen de 10,5 ml y agite suavemente calentando al mismo tiempo ligeramente (40 a 50° C) hasta la total dispersión del producto. La muestra ha de estar totalmente dispersada ya que en caso contrario habrá que repetir la determinación.

6.2.3. Añada 1,5 ml de la solución de amoníaco (25%) (punto 4.1) o un volumen correspondiente de una solución más concentrada y mezclar convenientemente.

6.2.4. Añada 10 ml de etanol (punto 4.2) y mezcle los líquidos suavemente, pero totalmente, en el aparato de extracción que se mantuvo abierto.

6.2.5. Añada 25 ml de óxido dietílico (punto 4.3). Enfríe si necesario el aparato bajo el agua corriente. Cierre el aparato, agítelo enérgicamente y déle la vuelta en varias ocasiones durante 1 minuto.

6.2.6. Retire el tapón con precaución y añada 25 ml de éter de petróleo (punto 4.4) utilizando los primeros mililitros para enjuagar el tapon y el interior del cuello del aparato y dejando que se deslicen los líquidos de enjuague al interior del aparato. Cierre el aparato volviendo a colocar el tapón, agite y dé vueltas al aparato en varias ocasiones durante 30 segundos. Si no se prevé centrifugado durante la operación indicada en el punto 6.2.7, no lo agite demasiado enérgicamente.

6.2.7. Deje reposar el aparato hasta que la capa líquida superior se vuelva nítida y se separe claramente de la fase acuosa. Se puede realizar también la separación con ayuda de una centrifugadora adecuada. (punto 5.7)

Nota
Si se utiliza una centrifugadora cuyo motor no es trifásico, pueden producirse chispas y por ello habrá que estar atento para evitar una explosión o un incendio como consecuencia de la presencia de vapores de éter (en caso de ruptura de un tubo, por ejemplo).

6.2.8. Retire el tapón y enjuáguelo, así como el interior del cuello del aparato, con unos mililitros de la mezcla de disolventes (punto 4.5) y deje que los líquidos del enjuague se deslicen al interior del aparato. Transvase con mucho cuidado, lo más que pueda, la capa superior al frasco (punto 6.2.1) mediante decantación o con ayuda de un sifón (punto 5.6).

Nota
Si el transvase no se realiza con ayuda de un sifón, peude ser que necesitemos añadir un poco de agua para realzar la separación de las dos capas con el fin de facilitar la decantación.

6.2.9. Enjuague el interior y el exterior del cuello del aparato o la punta y la parte inferior del sifón con unos mililitros de la mezcla de disolventes. Deje que los líquidos del enjuague del exterior del aparato se deslicen al interior del frasco y que los del interior del cuello y del sifón se deslicen al interior del aparato de extracción.

6.2.10. Proceda a una segunda extracción repitiendo las operaciones descritas en los puntos 6.2.5 a 6.2.9 incluido, pero utilizando únicamente 15 ml de óxido dietílico y 15 ml de éter de petróleo.

6.2.11. Efectúe una tercera extracción procediendo tal como se indica en el punto 6.2.10, pero sin realizar el enjuague final (punto 6.2.9)

Nota
En el caso de la leche desnatada evaporada y de la leche desnatada condensada, no es necesario efectuar esta tercera extracción.

6.2.12. Elimine con cuidado por evaporación o destilación el máximo de disolvente (incluido el etanol). Si el frasco fuera de pequeña capacidad, habrá que eliminar un poco de disolvente de la manera anteriormente indicada tras cada extracción.

6.2.13. Cuando ya no exista olor alguno de disolvente, caliente el frasco, acostado, durante 1 hora, en la cámara calefactora.

6.2.14. Retire el frasco de la cámara calefactora, déjelo enfriar hasta que adquiera la temperatura de la sala de las balanzas y pese con precisión de 0,1 mg.

6.2.15. Repita las operaciones de los puntos 6.2.13 y 6.2.14 calentando por períodos de 30 a 60 minutos hasta que dos pesajes sucesivos sólo difieran en menos de 0,5 mg o que aumente la masa. En este último caso, emplee el pesaje más bajo que obtuvo en los cálculos (punto 7.1). Asegúrese de que el peso final anotado sea M_1g.

6.2.16. Añada 15 a 25 ml de éter de petróleo para verificar si la materia extraída es totalmente soluble. Caliente ligeramente y agite el disolvente mediante un movimiento circular hasta que se disuelva toda la materia grasa.

6.2.16.1. Si la materia extraída es totalmente soluble en éter de petróleo, la masa de materia grasa es la diferencia entre el pesaje del punto 6.2.1 y el pesaje del punto 6.2.15.

6.2.16.2. Si aparecieran materias insolubles o siempre en caso de duda, extraiga completamente la materia grasa contenida en los frascos mediante repetidos lavados con éter de petróleo caliente, dejando que la materia no disuelta se deposite antes de cada decantación. Enjuague tres veces el exterior del cuello del frasco. Caliente el frasco, acostado, durante 1 hora en la cámara calefactora y déjelo que se enfríe tal como se indicó anteriormente (punto 6.2.1) hasta que adquiera la temperatura de la sala de las balanzas; pese con una precisión de 0,1 mg. La masa de la materia grasa es la diferencia entre el pesaje del punto 6.2.15 y este pesaje final.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. Modo de cálculo

La masa expresada en gramos de la materia grasa extraída viene dada por la siguiente fórmula:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

y el contenido en materia grasa de la muestra, expresado en porcentaje, por la fórmula:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

en donde:

M_1 = masa, en gramos, del frasco M conteniendo la materia grasa tras la operación del punto 6.2.15.

M_2 = masa, en gramos, del frasco M tras la operación del punto 6.2.1 o, en el caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 6.2.16.2.

B_1 = masa, en gramos, del frasco B de la prueba simulada tras la operación el punto 6.2.15.

B_2 = masa, en gramos, del frasco B, tras la operación del punto 6.2.1 o, en el caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 6.2.16.2.

S = masa, en gramos, de la toma de prueba utilizada.

7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de la otra por el mismo analista sobre la misma muestra y en las mismas condiciones, no ha de exceder 0,05 g de materia grasa por 100 g de producto.

MÉTODO 4: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN MATERIA GRASA (MÉTODO RÖSE-GOTTLIEB)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite determinar el contenido en materia grasa de las siguientes leches:
— leche en polvo rica en materia grasa,
— leche en polvo,
— leche semidesnatada en polvo,
— leche desnatada en polvo.

2. DEFINICIÓN

El contenido en materia grasa de los distintos tipos de leche en polvo es el contenido en materia grasa determinado por el método especificado.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El contenido en materia grasa se determina por extracción de la materia grasa de una solución amoniacal-alcohólica de la muestra con ayuda de óxido dietílico y de éter de petróleo, evaporación de los disolventes, pesaje de los residuos y cálculo en porcentaje de la masa de la muestra, según el principio del método de Röse-Gottlieb.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos han de conformarse con las condiciones requeridas en la prueba simulada (punto 6.1). Llegado el caso, podrá destilarse de nuevo los reactivos en presencia de 1 g de grasa de mantequilla por 100 ml de disolvente.

4.1 Solución de amoníaco, más o menos 25% (m/m) de NH_3 (densidad a 20 °C, unos 0,91 g/ml) una solución más concentrada de una concentración conocida.

4.2. Etanol, a 96 ± 2% (v/v) o, en su ausencia, etanol desnaturalizado con metanol, etilmetilcetona o éter de petróleo.

4.3. Óxido dietílico, exento de peróxidos.

Nota 1
Para asegurarse de que el óxido dietílico está exento de peróxidos, añadir a 10 ml de óxido contenidos en una pequeña probeta con tapón, de vidrio, enjuagada previamente con un poco de óxido dietílico, 1 ml de una solución con un 10% de yoduro de potasio, recientemente preparada. Agitar y dejar reposar durante 1 minuto. No ha de aparecer coloración amarilla alguna en ninguna de las dos capas.

Nota 2
El óxido dietílico puede, ser mantenido exento de peróxidos adicionando un ahoja de cinc húmeda previamente sumergida durante 1 minuto en una solución ácida diluida de sulfato de cobre y posteriormente lavada con agua. Para 1 litro de óxido dietílico, utilizar unos 8 000 mm^2 de hoja de cinc, cortada en bandas suficientemente largas para llegar a la mitad del recipiente como mínimo.

4.4. Éter de petróleo, destilante entre 30 y 60 °C.

4.5. Mezcla de disolventes, preparada inmediatamente antes de su empleo mediante la mezcla de igual volumen de óxido dietílico (punto 4.3) y de éter de petróleo (punto 4.4). (Se puede sustituir la mezcla de disolventes, siempre que sea indicado, por el óxido dietílico o por el éter de petróleo.)

5. EQUIPO

5.1. **Balanza analítica**

5.2. Tubos o frascos de extracción apropiados, dotados de tapones de vidrio esmerilado, o de otro tipo de cierre insensible a la acción de los disolventes empleados.

5.3. Frascos de fondo plano y pared delgada, de 150 a 250 ml de capacidad.

5.4. Cámara calefactora de desecado a presión atmosférica, bien ventilada, controlada por termostato (temperatura a 102 ± 1 °C).

5.5. Gránulos destinados a facilitar la ebullición, exentos de materia grasa, no porosos, no desmenuzables, como por ejemplo perlas de vidrio o trocitos de carburo de silicio (el empleo de estos gránulos es facultativo; ver al respecto el punto 6.2.1).

5.6. Baño de agua a 60—70 °C.

5.7. Sifón correspondiente a los tubos de extracción.

5.8. Centrifugadora.

6. MODO DE OPERACIÓN

6.1. **Prueba simulada**

Al tiempo que efectúa la determinación de la materia grasa de la muestra, efectúe una prueba simulada con 10 ml de agua utilizando el mismo tipo de aparato de extracción, los mismos reactivos en las mismas proporciones y el mismo modo de operación que el descrito a continuación, salvo el punto 6.2.2. Si el valor de la prueba simulada es superior a 0,5 mg, habrá que verificar los reactivos y el o los reactivos impuros habrán de ser purificados o sustituidos.

6.2. **Dosificación**

6.2.1. Seque el frasco (punto 5.3) (eventualmente después de haber depositado los materiales (punto 5.5). facilitando una ebullición moderada durante la evaporación de los disolventes) en la cámara calefactora (punto 5.4) durante una media hora a 1 hora. Deje enfriar el frasco hasta que adquiera la temperatura de la sala de las balanzas y pese el frasco ya enfriado, con una precisión de 0,1 mg.

6.2.2. En el aparato de extracción (punto 5.2) pese con una precisión de 1 mg, bien directamente, bien por diferencia, aproximadamente 1 g de leche en polvo o 1,5 g de leche semidesnatada en polvo o de leche desnatada en polvo. Añada 10 ml de agua y agite hasta la total dispersión de la leche (en algunas muestras habrá que proceder a calentarlas).

6.2.3. Añada 1,5 ml de la solución de amoníaco (25%) (punto 4.1) o un volumen correspondiente de una solución más concentrada y calentar al baño de agua (punto 5.6) durante 15 minutos, de 60 a 70 °C, agitando de vez en cuando. Posteriormente enfriarlo, por ejemplo mediante agua corriente.

6.2.4. Añada 10 ml de etanol (punto 4.2) y mezcle los líquidos suavemente, pero totalmente, en el aparato de extracción que se mantuvo abierto.

6.2.5. Añada 25 ml de óxido dietílico (punto 4.3). Enfríe, si necesario, el aparato bajo el agua corriente. Cierre el aparto, agítelo enérgicamente y déle la vuelta en varias ocasiones durante 1 minuto.

6.2.6. Retire el tapón con precaución y añada 25 ml de éter de petróleo (punto 4.4) utilizando los primeros mililitros para enjuagar el tapón y el interior del cuello del aparato y dejando que se deslicen los líquidos en enjuague al interior del aparato. Cierre el aparato volviendo a colocar el tapón, agite y dé vueltas al aparato en varias ocasiones durante 30 segundos. Si no se prevé centrifugado durante la operación indicada en el punto 6.2.7, no lo agite demasiado enérgicamente.

6.2.7. Deje reposar el aparato hasta que la capa líquida superior se vuelva nítida y se separe claramente de la fase acuosa. Se puede realizar también la separación con ayuda de una centrifugadora adecuada. (punto 5.7)

Nota
Si se utiliza una centrifugadora cuyo motor no es trifásico, pueden producirse chispas y por ello habrá que estar atento para evitar una explosión o un incendio como consecuencia de la presencia de vapores de éter (en caso de ruptura de un tubo, por ejemplo).

6.2.8. Retire el tapón y enjuáguelo, así como el interior del cuello del aparato, con unos mililitros de la mezcla de disolventes (punto 4.5) y deje que los líquidos del enjuague se deslicen al interior del aparato. Transvase con mucho cuidado, lo más que pueda, la capa superior al Frasco (punto 6.2.1) mediante decantación o con ayuda de un sifón (punto 5.6).

Nota
Si el transvase no se realiza con ayuda de un sifón, puede ser que necesitemos añadir un poco de agua para realzar la separación de las dos capas con el fin de facilitar la decantación.

6.2.9. Enjuague el interior y el exterior del cuello del aparato o la punta y la parte inferior del Sifon con unos mililitros de la mezcla de disolventes. Deje que los líquidos del enjuague del exterior del

aparato se deslicen al interior del frasco y que los del interior del cuello y del sifón se deslicen al interior del aparato de extracción.

6.2.10. Proceda a una segunda extracción repitiendo las operaciones descritas en los puntos 6.2.5 a 6.2.9 incluido, pero utilizando únicamente 15 ml de óxido dietílico y 15 ml de eater de petróleo.

6.2.11. Efectúe una tercera extracción procediendo tal como se indica en el punto 6.2.10, pero sin realizar el enjuague final (punto 6.2.9)

Nota
En el caso de polvos de leche desnatada, no es necesario realizar la tercera extracción.

6.2.12. Elimine con cuidado por evaporación o destilación el máximo de disolvente (incluido el etanol). Si el frasco fuera de pequeña capacidad, habrá que eliminar un poco de disolvente de la manera anteriormente indicada tras cada extracción.

6.2.13 Cuando ya no exista olor alguno de disolvente, caliente el frasco, acostado, durante 1 hora, en la cámara calefactora.

6.2.14. Retire el frasco de la cámara calefactora, déjelo enfriar hasta que adquiera la temperatura de la sala de las balanzas y pese con precisión de 0,1 mg.

6.2.15. Repita las operaciones de los puntos 6.2.13 y 6.2.14 calentando por períodos de 30 a 60 minutos hasta que dos pesajes sucesivos sólo difieran en menos de 0,5 mg o que aumente la masa. En este último caso emplee el pesaje más bajo que obtuvo en los cálculos (punto 7.1). M_1 es la masa obtenida en g.

6.2.16. Añada 15 a 25 ml de éter de petróleo para verificar si la materia extraída es totalmente soluble. Caliente ligeramente y agite el disolvente mediante un movimiento circular hasta que se disuelva toda la materia grasa.

6.2.16.1. Si la materia extraída es totalmente soluble en éter de petróleo, la masa de materia grasa es la diferencia entre el pesaje del punto 6.2.1 y el pesaje del punto 6.2.15.

6.2.16.2. Si aparecieran materias insolubles o siempre en caso de duda, extraiga completamente la materia grasa contenida en los frascos mediante repetidos lavados con éter de petróleo caliente, dejando que la materia no disuelta se deposite antes de cada decantación. Enjuague tres veces el exterior del cuello del frasco. Caliente el frasco, acostado, durante 1 hora en la cámara calefactora y déjelo que se enfríe tal como se indicó anteriormente (punto 6.2.1) hasta que adquiera la temperatura de la sala de las balanzas; pese con una precisión de 0,1 mg. La masa de la materia grasa es la diferencia entre el pesaje del punto 6.2.15 y este pesaje final.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. Modo de cálculo

La masa expresada en gramos de la materia grasa extraída viene dada por la siguiente fórmula:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

y el contenido en materia grasa de la muestra, expresado en porcentaje, por la fórmula:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

en donde:

M_1 = masa, en gramos, del frasco M conteniendo la materia grasa tras la operación del punto 6.2.15.

M_2 = masa, en gramos, del frasco M tras la operación del punto 6.2.1 o, en el caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 6.2.16.2.

B_1 = masa, en gramos, del frasco B de la prueba simulada tras la operación del punto 6.2.15.

B_2 = masa, en gramos, del frasco B, tras la operación del punto 6.2.1 o, en el caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 6.2.16.2.

S = masa, en gramos, de la toma de prueba utilizada.

7.2. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de los determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de la otra por el mismo analista sobre la misma muestra y en las mismas condiciones, no ha de exceder 0,2 g de materia grasa por 100 g de producto, salvo en el caso de la leche desnatada en polvo, en donde la diferencia no ha de exceder 0,1 g de materia grasa por 100 g de producto.

MÉTODO 4: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN SACAROSA (MÉTODO POLARIMÉTRICO)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite determinar el contenido en sacarosa de los siguientes tipos de leche:

— leche condensada,
— leche semidesnatada condensada,
— leche desnatada condensada.

Las muestras no han de contener azúcar modificado.

2. DEFINICIÓN

El contenido en sacarosa de los distintos tipos de leche condensada es el contenido en sacarosa determinado por el método especificado.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método se basa en el principio de la inversión de Clerget: un tratamiento suave mediante un ácido hidroliza completamente la sacarosa. La lactosa y los restantes azúcares no son prácticamente hidrolizados. El contenido en sacarosa se deduce del cambio del poder rotatorio de la solución.

Para ello se prepara un líquido filtrado de la muestra, sin mutarrotación debida a la lactosa, tratando la solución con amoniaco, mediante neutralización y purificación mediante sucesivas adiciones de soluciones de acetato de cinc y de hexaferrocianuro de potasio.

En una parte del líquido filtrado, la sacarosa se hidroliza en condiciones determinadas.

Partiendo de los poderes rotatorios del líquido filtrado antes y después de la inversión, se calcula el contenido en sacarosa mediante unas fórmulas.

4. REACTIVOS

4.1. Solución de acetato de cinc, M: disolver 21,9 g de acetato de cinc cristalizado Zn $(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$ y 3 ml de ácido acético glacial en agua y completar hasta 100 ml.

4.2. Solución de hexaferrocianuro (II) de potasio, 0,25 M: disolver 10,6 g de hexaferrocianuro (II) de potasio $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ en agua y completar hasta 100 ml.

4.3. Solución de ácido clorhídrico 6,35 ± 0,20 M (20 a 22%) o 5,0 ± 0,2 M (16 a 18%).

4.4. Solución diluida de amoníaco 2,0 ± 0,2 M (3,5%).

4.5. Solución diluida de ácido acético 2,0 ± 0,2 M (12%).

4.6. Indicador azul de bromotimol, solución al 1% (m/v) en el etanol.

5. EQUIPO

5.1. Balanza analítica, sensibilidad 10 mg.

5.2. Tubo de polarímetro de 2 dm de longitud, calibrado exactamente.

5.3. **Polarímetro o sacarímetro:**

a) Polarímetro de luz de sodio o de luz verde de mercurio (lámpara de vapor de mercurio con prisma o pantalla Wratten especial nº 77 A), que permita una lectura de una precisión como mínimo igual a 0,05 grados de ángulo.

b) Sacarímetro con escala internacional, que utilice la luz blanca que pasa a través de un filtro de 15 mm de solución con un 6% de bicromato de potasio o bien luz de sodio y que permita la lectura con una precisión como mínimo igual a 0,1 grados de la escala sacarímetrica internacional.

5.4. **Baño de agua a una temperatura de 60 ± 1 °C.**

6. MODO DE OPERACIÓN

6.1. **Control de método**

Con vistas a normalizar el método, los reactivos y los aparatos, se procederá a un control del método tal como indicamos a continuación mediante un doble análisis de una mezcla de 100 g de leche y 18 g de sacarosa pura o de 110 g de leche desnatada y 18 g de sacarosa pura que corresponden a 40 g de leche condensada que contenga un 45% de sacarosa. Cualcular el contenido en sacarosa con la ayuda de las fórmulas que se indican en el punto 7 utilizando la fórmula 1, para M, F, P, (la cantidad de leche pesada y el contenido en materia grasa y en proteínas de dicha leche) y, en la fórmula 2, para M, la cifra de 40 g. La media de los valores registrados ho ha de diferir de dicho valor (45%) en más de 0,2%.

6.2. **Dosificación**

6.2.1. En un recipiente cilíndrico de borde redondeado de vidrio y de 100 ml, pese exactamente, con un margen de error de 10 mg, unos 40 g de la muestra convenientemente mezclada. Añada 50 ml de agua caliente (80 a 90 °C) y mezcle cuidadosamente.

6.2.2. Transvase cuantitativamente la mezcla a un matraz graduado de 200 ml, enjuague el recipiente cilíndrico con sucesivas cantidades de agua a 60 °C, hasta que el volumen total sea de 120 a 150 ml. Mezcle y deje enfriar a temperatura ambiente.

6.2.3. Añada 5 ml de la solución de amoniaco diluida (punto 4.4). Mezcle de nuevo y deje reposar durante 15 minutos.

6.2.4. Neutralice el amoniaco añadiendo una cantidad equivalente de la solución diluida de ácido acético (punto 4.5). Determine previamente la cantidad exacta de ml mediante determinación de la graduación de la solución de amoniaco diluida utilizando el azúl de bromotimol como indicador (punto 4.6). Mezcle a continuación.

6.2.5 Añada, mezclando suavemente por rotación del matraz inclinado, 12,5 ml de solución de acetato de cinc (punto 4.1).

6.2.6. De la misma manera que para la solución de acetato, añada 12,5 ml de solución de hexaferrocianuro (II) de potasio (punto 4.2).

6.2.7. Caliente el contenido del matraz hasta 20 °C y añada agua (a 20 °C) hasta la línea graduada de 200 ml.

Nota

Hasta el momento, todas las adiciones de agua o de reactivos se realizarán evitando se formen burbujas y, por esta misma razón, todas las mezclas se efectuarán mediante rotación del matraz en vez de por agitación violenta. Si se constata la presencia de burbujas antes de llegar a la rayita de 200 ml, podemos eliminarlas conectando el matraz con una bomba de vacío e imprimiéndole un movimiento de rotación.

6.2.8. Tape el matraz con un tapón seco y mezcle íntimamente agitándolo enérgicamente.

6.2.9. Déjelo reposar durante unos minutos, luego fíltrelo a través de papel filtrante seco. Tire los 25 primeros ml del líquido filtrado.

6.2.10. Polarización directa: determinar la rotación óptica del líquido filtrado a 20 ± 1 °C.

6.2.11. Inversión: pipetee, en un matraz graduado de 50 ml, 40 ml del líquido filtrado obtenido de la manera indicada anteriormente. Añada 6,0 ml de ácido clorhídrico 6,35 M o 7,6 ml de ácido clorhídrico 5,00 M (punto 4.3).

Coloque el matraz en un baño de agua a 60 °C durante 15 minutos, estando sumergido el matraz hasta donde empieza su cuello. Mezcle por rotación durante los 5 primeros minutos durante los

cuales el contenido deberá haber alcanzado la temperatura del baño. Enfríe hasta 20 °C y rellene con agua a 20 °C; mezcle y déjelo reposar durante 1 hora a esta temperatura.

6.2.12. *Polarización tras inversión*

Determinar el poder rotatorio de la solución intervertida a 20 ± 0,2 °C (cuando la temperatura T del líquido contenido en el tubo de polarización difiera en más de 0,2 °C durante la medición, se ha de aplicar la corrección de temperatura indicada en el punto 7.2).

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. **Modo de cálculo**

Calcule el contenido en sacarosa con ayuda de las siguientes fórmulas:

1. $V = \frac{M}{100}(1{,}08\ F + 1{,}55\ P)$

2. $S = \frac{D - 1{,}25\ I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times M}\ \%$

S = contenido en sacarosa

M = masa de la muestra expresada en g.

F = porcentaje de materia grasa de la muestra

P = porcentaje de proteínas (N × 6,38) de la muestra

V = volumen en ml en el que se diluye la muestra antes del proceso de filtrado

v = corrección expresada en ml para el volumen del precipitado formado durante el proceso de purificado

D = lectura polarimétrica directa (polarización antes de inversión)

I = lectura polarimétrica tras inversión

L = longitud en dm del tubo del polarímetro

Q = factor de inversión cuyos valores se indican a continuación.

Notas

a) Si pesamos exactamente 40 g de leche condensada y utilizamos un polarímetro de luz de sodio, con escala en grados de ángulo y un tubo de polarímetro de 2 dm de longitud a 20,0 ± 0,1 °C, podemos calcular el contenido en sacarosa de las leches condensadas normales (C = 9) mediante la siguiente fórmula:

$$S = (D - 1{,}25\ I)\ (2{,}833 - 0{,}00612\ F - 0{,}00878\ P)$$

b) Si efectuamos la medición de la polarización tras inversión a temperatura diferente de 20 °C, las cifras que obtengamos habrá que multiplicarlos por:

$$(1 + 0{,}0037\ (T - 20))$$

7.2. **Valores del factor de inversión Q**

Las fórmulas siguientes dan unos valores precisos de Q según las diversas fuentes de luz con correcciones, dado el caso, para la concentración y la temperatura:

Luz de sodio y polarímetro con escala en grados de ángulo:
$Q = 0{,}8825 + 0{,}0006\ (C - 9) - 0{,}0033\ (T - 20)$.

Luz verde de mercurio y polarímetro con escala en grados de ángulo:
$Q = 1{,}0392 + 0{,}0007\ (C - 9) - 0{,}0039\ (T - 20)$.

Luz blanca con pantalla de bicromato y sacarímetro con escala sacarimétrica internacional:
$Q = 2{,}549 + 0{,}0017\ (C - 9) - 0{,}0095\ (T - 20)$.

En las fórmulas anteriores:
C = porcentaje de azúcares totales en la solución intervertida, tras la lectura polarimétrica.
T = temperatura de la solución intervertida durante la lectura con el polarímetro.

Nota 1

El porcentaje de azúcares totales C en la solución intervertida puede calcularse a partir de la lectura directa y de la variación posterior a la inversión según el método habitual, utilizando los valores habituales de rotación específica de la sacarosa, de la lactosa y del azúcar intervertido.,

La corrección 0,0006 (C − 9) etc. sólo es exacta si C es aproximadamente igual a 9; dado que en el caso de la leche condensada normal C es aproximadamente 9, se puede despreciar esta corrección.

Nota 2

Las variaciones de temperatura de 1 °C respecto a 20 °C influencian ligeramente la lectura directa. En cambio, en caso de existir variaciones de más de 0,2 °C durante la lectura tras inversión, será necesario proceder a una corrección. La corrección $-0{,}0033\ (T-20)$, etc. sólo es exacta con temperaturas comprendidas entre 18 y 22 °C.

7.3. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de la otra por el mismo analista y sobre la misma muestra y en las mismas condiciones no será superior a 0,3 g de sacarosa por 100 gramos de leche condensada.

MÉTODO 6: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDO LÁCTICO Y EN LACTATOS

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite obtener el contenido en ácido láctico y en lactatos de los siguientes tipos de leche:

— leche en polvo rica en materia grasa,
— leche en polvo,
— leche parcialmente desnatada en polvo,
— leche desnatada en polvo,

2. DEFINICIÓN

Contenido en ácido láctico y en lactatos de los distintos tipos de leche en polvo: el contenido en ácido láctico y en lactatos determinado por el método especificado.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa, las proteínas y la lactosa se eliminan simultáneamente de una solución de la muestra mediante la adición de sulfato de cobre de hidróxido de calcio, y posterior filtrado.

El ácido láctico y los lactatos del líquido filtrado se transforman en acetaldehído por acción del ácido sulfúrico concentrado en presencia de sulfato de cobre (II).

El contenido en ácido láctico se determina por colorimetría utilizando p-hidroxidifenilo.

El contenido en ácido láctico y en lactatos se expresa en mg de ácido láctico por 100 g de materias sólidas no lipídicas.

4. REACTIVOS

4.1. Solución de sulfato de cobre (II): disuelva 250 g de sulfato de cobre (II) ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en agua y diluya a 1 000 ml.

4.2. Suspensión de hidróxido de calcio.

4.2.1. Triture 300 g de hidróxido de calcio [CA (OH) 2] en un mortero con agua, utilizando un total de 900 ml. La suspensión ha de estar recientemente preparada antes de proceder a su utilización.

4.2.2. Triture 300 g de hidróxido de calcio [Ca (OH) 2] en un mortero con agua, utilizando un total de 1 400 ml. La suspensión ha de estar preparada recientemente antes de procecer a su utilización.

4.3. Solución de ácido sulfúrico — sulfato de cobre (II): añada a 300 ml de ácido sulfúrico 95,5 = 97,0% (m/m) de H_2SO_4, 0,5 ml de la solución de sulfato de cobre (II) (punto 4.1).

4.4. Solución de p-hidroxidifenilo ($C_6H_5C_6H_4OH$): disuelva agitando y calentando ligeramente 0,75 g de p-hidroxidifenilo en 5 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio que contenga 5 g de NaOH por 100 ml. Diluya hasta 50 ml con agua en un frasco graduado. Conserve la solución en un frasco de vidrio ahumado, al abrigo de la luz y en lugar fresco. No utilice la solución si cambiara el color o enturbiara. El período máximo de conservación es de 72 horas.

4.5. Solución patrón de ácido láctico: disuelva un poco antes del empleo 0,1067 g de lactato de litio ($CH_3CHOHCOOLi$) en agua y diluya en 1 000 ml en un frasco graduado. Un ml de esta solución corresponde a 0,1 mg de ácido láctico.

4.6. Leche reconstituida patrón: analice previamente varias muestras de leche en polvo de alta calidad. Para la preparación de la curva de calibración, tome la muestra que tenga el menor contenido en ácido láctico, menos de 30 mg de ácido láctico por 100 g de materias sólidas no lipíidicas. Siga el modo de operación descrite en el punto 6.2.1 y en el 6.2.2 indicado a continuación.

5. EQUIPO

5.1. Balanza analítica.

5.2. Espectrofotómetro que permita la lectura de una longitud de onda de 570 nm.

5.3. Baño de agua a 30 ± 2 °C.

5.4. Mortero y maja.

5.5. Papel de filtro (Schleicher y Schull 595, Whatman 1 o similar).

5.6. Tubos de análisis pírex o similares (dimensiones 25 × 150 mm).

Nota
Todos los instrumentos de vidrio que se utilicen han de estar perfectamente limpios y ser utilizados sólo para esta determinación. Antes del lavado, enjuague los instrumentos de cristal que contienen el precipitado con ácido clorhídrico concentrado.

6. MODO DE OPERACIÓN

6.1. **Prueba simulada**

Efectúe una prueba simulada vertiendo 30 ml de agua en un tubo graduado de 50 ml y tratándolo tal como se indica en los puntos 6.2.4 a 6.2.11 incluído. Si los resultados de la prueba simulada respecto al agua sobrepasan el equivalente a 20 mg de ácido láctico por 100 g de materias sólidas no lipídicas, habrá que controlar los reactivos y sustituir el (o los) reactivo(s) impuro(s). Trate la prueba simulada simultáneamente con las muestras.

6.2. **Dosificación**

Nota: Evite la contaminación por impurezas, como por la saliva y la transpiración.

6.2.1. Determine el contenido en materias sólidas no lipídicas (a) de la muestra restando de 100 el contenido en materia grasa (según el método 4) y el contenido en humedad (según el método 2).

6.2.2. Pese $\frac{1\,000}{(a) - 10}$ g de la muestra con una precisión de 0,1 g. Añada esta cantidad de muestra a 100 ml de agua y mezcle cuidadosamente.

6.2.3. Pipetee 5 ml de la solución obtenida en un tubo graduado de 50 ml y diluya con agua hasta 30 ml.

6.2.4. Añada lentamente y agitando, 5 ml de la solución de sulfato de cobre (punto 4) y déjelo reposar durante 10 minutos.

6.2.5. Añada lentamente y agitando 5 ml de la suspensión de hidróxido de calcio (punto 4.2.1) o 10 ml de la suspensión de hidróxido (punto 4.2.2).

6.2.6. Diluya en 50 ml con agua, agite vigorosamente, déjelo reposar durante 10 minutos y fíltrelo. Tire las primeras gotas de líquido filtrado.

6.2.7. Pipetee 1 ml del líquido filtrado en un tubo de análisis (punto 5.6).

6.2.8. Añada al contenido del tubo, sirviéndose de una bureta o de una pipeta graduada, 6 ml de la solución de ácido sulfúrico y de sulfato de cobre (punto 4.3). Mézclelo.

6.2.9. Caliente en el baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Enfríe a la temperatura ambiente bajo agua corriente.

6.2.10. Añada 2 gotas de reactivo al p-hidroxidifenilo (punto 4.4) y agite vigorosamente para repartir uniformemente el reactivo en todo el líquido. Sumerja en todo en el baño de agua a 30 ± 2 °C y manténgalo allí durante 15 minutos agitando de vez en cuando.

6.2.11. Sumerja el tubo en el baño de agua hirviendo durante 90 segundos. Enfríelo a la temperatura ambiente bajo agua corriente.

6.2.12. Mida la densidad óptica con respecto a la prueba simulada (punto 6.1) tres horas más tarde, en la longitud de onda que se indica en el punto 5.2.

6.2.13. Si la densidad es superior a la del punto más alto de la curva de contraste, repita la prueba utilizando una dilución conveniente del líquido filtrado obtenido en el punto 6.2.6.

6.3. **Elaboración de la curva de contraste**

6.3.1. Pipetee 5 ml de la leche reconstituída (punto 4.6) en cinco cilindros graduados de 50 ml. Pipetee en estos tubos 0, 1, 2, 3 y 4 ml de la solución patrón (punto 4.5), de manera que se obtenga una gama de contraste correspondiente a 0, 20, 40, 60 y 80 mg de ácido láctico añadido por 100 g de materias sólidas no lipídicas de polvos de leche.

6.3.2. Diluya con agua hasta unos 30 ml y trátelo como se indica en los puntos 6.2.4 a 6.2.11 incluído.

6.3.3. Mida las densidades ópticas de los elementos de la gama del contraste (punto 6.3.1) con respecto a la prueba simulada (punto 6.1), en la longitud de onda que se indica en el punto 5.2. Translade dichas densidades ópticas a un diagrama en función de las cantidades de ácido láctico indicadas en el punto 6.3.1: 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg y 80 mg, por 100 g de materias sólidas no lipídicas. Trace la línea recta más adecuada que pase por los puntos y prepare la curva de contraste desplazando dicha línea paralelamente a ella misma de manera que pase por el origen.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. **Modo de cálculo**

Convierta la densidad óptica medida según el punto 6.2.12 o 6.2.13 en mg de ácido láctico por 100 g de materias sólidas no lipídicas de la muestra remitiéndose a la curva de contraste. Multiplique este resultado por el factor de disolución en el caso que el líquido filtrado hubiera sido diluído según el punto 6.2.13.

7.2. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una despueas de otra por el mismo analista y en las mismas condiciones sobre la misma muestra no podrá ser superior a 8 mg de ácido láctico por 100 gramos de materias sólidas no lipídicas en muestras con un contenido en acido lactico de hasta 80 mg. En valores superiores, dicha diferencia no podrá ser superior al 10% del valor más bajo.

MÉTODO 7: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA (MÉTODO DE SANDERS Y SAGER, MODIFICADO)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método permite determinar la actividad de la fosfatasa en los siguientes tipos de leche:
— leche en polvo rica en materia grasa,
— leche en polvo,
— leche semidesnatada en polvo,
— leche desnatada en polvo.

2. DEFINICIÓN

La actividad de la fosfatasa de la leche en polvo se mide por la cantidad de fosfatasa alcalina activa presente. Se expresa por la cantidad de fenol liberado en µg por ml de leche reconstituida, determinada por el procedimiento que se indica a continuación.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La actividad de la fosfatasa de la leche en polvo se determina por el poder de la fosfatasa de liberar el fenol del fenilfosfato disódico. La cantidad de fenol liberado en las condiciones prescritas se determina mediante una medición espectofotométrica de la coloración desarrollada gracias al reactivo de Gibbs.

4. REACTIVOS

4.1. **Solución A**

Tampón de borato y de hidróxido de bario: pH 10,6 ± 0,1 a 20 °C.

Disolver 25,0 g de hidróxido de bario [BA $(OH)_2 \cdot 8H_2O$] en agua y diluir hasta 500 ml.

Disolver 11,0 g de ácido bórico (H_3BO_3) en agua y diluir hasta 500 ml.

Calentar las dos soluciones a una temperatura de 50 °C y mezclar.

Agitar y enfriar la mezcla a la temperatura ambiente.

Ajustar el pH a 10,6 ± 0,1 con la solución de hidróxido de bario y filtrar.

Conservar la solución en un recipiente bien cerrado.

Antes de utilización, diluir la solución tampón con la misma cantidad de agua.

4.2. **Solución B**

Tampón para el desarrollo del color.

Disolver 6 g de metaborato de sodio ($NaBO_2$) (o 12,6 g de $NaBO_2 \cdot 4H_2O$) y 20 g de cloruro de sodio (NaCl) en agua y diluir hasta 1 000 ml.

4.3. **Solución C**

Substrato en solución tampón.

4.3.1. Disolver 0,5 g de fenilfosfato disódico ($Na_2C_6H_3PO_4 - 2H_2O$) en 4,5 ml de solución B (punto 4.2). Añadir dos gotas de solución E (punto 4.5) y dejar reposar durante 30 minutos. Extraer el color formado con 2,5 ml de alcohol butílico (punto 4.10). Si fuera necesario, repetir la extracción del color. Tras separación, tirar el alcohol butílico. Esta solución se puede conservar algunos días en un refrigerador. Desarrollar y extraer el color una vez más antes de su empleo:

4.3.2. Pipetear 1 ml de esta solución en un matraz graduado de 100 ml y añadir la solución A hasta la marca. Preparar el substrato en solución tampón inmediatamente antes de su empleo.

4.4. **Solución D**

Precipitante

Disolver 3,0 g de sulfato de cinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) y 0,6 g de sulfato de cobre II ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en agua hasta alcanzar 100 ml.

4.5. **Solución E**

Reactivo de Gibbs.

Disolver 0,040 g de dibromo-2,6 quinona cloro-1,4 ímido ($O \cdot C_6H_2Br_2 \cdot NCl$) en 10 ml de etanol a 96%. Conservar la solución en un frasco de vidrio ahumado en un refrigerador. Tirar este reactivo cuando cambie en color.

4.6. **Solución tampón de disolución de la coloración.**

Diluir 10 ml de la solución tampón B para el desarrollo del color (punto 4.2) con agua y completar hasta 100 ml.

4.7. **Solución de sulfato de cobre**

Disovler 0,05 g de sulfato de cobre (II) ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en agua y completar hasta 100 ml.

4.8. **Solución patrón de fenol**

Disolver 0,200 ± 0,001 g de fenol puro en agua y llegar hasta 100 ml en un matraz graduado. Esta solución se conserva durante algunos meses en refrigerador. Diluir 10 ml de esta solución con agua hasta llegar a 100 ml. Esta solución diluída contiene 200 µg de fenol por ml y se puede utilizar para la preparación de soluciones más diluidas.

4.9. Agua destilada, hervida.

4.10. Alcohol n-butílico.

5 EQUIPO

5.1. **Balanza analítica**

5.2. **Baño de agua mantenido por termostato a 37 ± 1 °C.**

5.3. **Espectrofotómetro que permita la lectura en longitud de onda de 610 nm.**

5.4. **Papel de filtro (Schleicher y Schull 597, Whatman 42 o similar).**

5.5. **Baño de agua hirviendo.**

5.6. **Hoja de aluminio.**

6. MODO DE OPERACIÓN

Precausiones a tomar

1. Evitar la exposición directa a la luz del sol.
2. Limpiar perfectamente todos los instrumentos de vidrio, tapones y materiales de transvase. Se recomienda enjuagarlos y hervirlos con agua o tratarlos al vapor.
3. Evitar el empleo de materias plásticas (tapones por ejemplo) que pudieran contener fenol.
4. Evitar cuidadosamente la presencia de saliva, dado que ésta contiene fosfatasa.

6.1. **Preparación de la muestra**

6.1.1. Disolver 10 g de la muestra, pesados con una precisión de 0,1 g, en 90 ml de agua. La temperatura de disolución de los polvos nunca será superior a 35 °C.

6.2. **Determinación**

6.2.1. Intruducir en cada uno de los dos tubos de análisis 1 ml de leche reconstituida preparada como se indica en el punto 6.1.1.

6.2.2. Calentar uno de los tubos en agua hirviendo durante 2 minutos. Cubrir el tubo y el baño de agua (punto 5.5) o, por ejemplo, un recipiente cilíndrico de borde redondeado, con una hoja de aluminio (punto 5.6) para que todo el tubo se caliente. Enfriar en agua fría a temperatura ambiente. Este tubo servirá para la prueba simulada. A partir de este punto, tratar los dos tubos de idéntica manera.

6.2.3. Añadir 10 ml de la solución C (punto 4.3.2). Mezclar y colocar los tubos en el baño da agua a 37 °C (punto 5.2).

6.2.4. Incubar durante 60 minutos en el baño de agua, agitando de vez en cuando.

6.2.5. Inmediatamente después, meter los tubos en el baño de agua hirviendo y calentar durante 2 minutos, enfriar a temperatura ambiente en agua fría.

6.2.6. Añadir 1 ml de la solución D (punto 4.4), mezclar y filtrar en un papel de filtro seco; tirar los primeros líquidos filtrados hasta obtener un líquido nítido.

6.2.7. Introducir 5 ml de cada líquido filtrado en tubos de análisis, añadir 5 ml de solución B (punto 4.2) y 0,1 ml de solución E (punto 4.5). Mezclar.

6.2.8. Dejar que se precise el calor a temperatura ambiente y al abrigo de la luz solar durante 30 minutos.

6.2.9. Medir la densidad óptica de la solución de la muestra con respecto a la de la prueba simulada en la longitud de onda indicada en el punto 5.3.

6.2.10. Repetir la determinación si la densidad óptica de la solución es superior a la de la solución patrón en 20 µg de fenol preparada según el punto 7.

Si dicho límite es sobrepasado, diluir un volumen conveniente de leche reconstituída, según el punto 6.1.1, con un volumen adecuado de esta leche cuidadosamente hervida, como se indica en el punto 6.2.2, para inactivar la fosfatasa presente.

7. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CONTRASTE

7.1. Pipetear en cuatro matraces de 100 ml, 1, 3, 5 y 10 ml de la solución patrón diluida según el punto 4.8 y completar hasta la marca con agua; estas soluciones contienen respectivamente 2, 6, 10 y 20 µg de fenol por ml.

7.2. Pipetear 1 ml de cada solución indicadora (punto 7.1) en los tubos de análisis para obtener una serie de muestras conteniendo 0 (valor cero), 2, 6, 10 y 20 µg de fenol. La simulación se obtiene pipeteando 1 ml de agua.

7.3. Pipetear sucesivamente en cada tubo de análisis 1 ml de la solución de sulfato de cobre (punto 4.7), 5 ml de solución tampón coloreada (punto 4.6), 3 ml de agua y 0,1 ml de la solución E (punto 4.5); mezclar.

7.4. Dejar reposar los tubos de análisis a temperatura ambiente y al abrigo de la luz solar directa durante 30 minutos.

7.5. Medir la densidad óptica del contenido de los tubos con respecto al valor cero, en la longitud de onda indicada en el punto 5.3.

7.6. Establecer la curva de contraste anotando los valores de las densidades ópticas en función de las cantidades de fenol en µg tal como están indicadas en el punto 7.2.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. **Modo de cálculo**

8.1.1. Convertir la cifra obtenida en el punto 6.2.9 en µg de fenol, basándose en la curva de contraste.

8.1.2. Calcular la actividad de la fosfatasa expresada en µg de fenol por ml de leche reconstituida según la fórmula siguiente:

$$\text{actividad de la fosfatasa} = 2{,}4 \times P$$

en donde P = cantidad de fenól en µg tras el punto 8.1.1.

8.1.3. Si hubiera sido necesario diluir como se indicó en el punto 6.2.10, multiplíquese el resultado obtenido en el punto 8.1.2 por el factor de disolución.

8.2. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de otra por el mismo analista sobre la misma muestra y en las mismas condiciones, no podrá ser superior a 2 µg de fenol liberado por ml de leche reconstituida.

MÉTODO 8: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA (MÉTODO ASCHAFFENBURG Y MULLEN)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método permite determinar la actividad de la fosfatasa en los siguientes tipos de leche:

— leche en polvo rica en materia grasa,
— leche en polvo,
— leche semidesnatada en polvo,
— leche desnatada en polvo.

2. DEFINICIÓN

La actividad de la fosfatasa de la leche deshidratada se mide por la cantidad de fosfatasa alcalina activa presente en el producto. Se expresa en cantidad de p-nitrofenol liberado en µg por ml de leche reconstituida, determinada por el procedimiento que se explica a continuación.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La muestra de leche reconstiuida se diluye en substrato en solución tampón (pH 10,2) y se incuba durante 2 horas a una temperatura de 37 °C. Toda cantidad de fosfatasa alcalina presente en la

muestra liberará, en semejantes condiciones, p-nitrofenol derivado del p-nitrofenilfosfato disódico, el p-nitrofenol liberado se mide mediante comparación directa con cristales de color patrones en un calorímetro simple de luz reflejada.

4. REACTIVOS

4.1. **Solución tampón de carbonato de sodio y de bicarbonato de sodio.**

Disolver 3,5 g de carbonato de sodio anhidro y 1,5 g de bicarbonato de sodio en auga y diluir hasta 1 000 ml en un matraz graduado.

4.2. **Substrato en solución tampón**

Disolver 1,5 g de p-nitrofenilfosfato disódico en la solución tampón de carbonato de sodio y de bicarbonato de sodio (punto 4.1) y diluir hasta 1 000 ml en un matraz graduado.

Esta solución se mantiene estable durante un mes en el refrigerador ($\leq$ 4 °C) pero habrá que efectuar antes un test de control de color en las soluciones conservadas de esta forma (ver punto 6, nota 3).

4.3. **Precipitantes.**

4.3.1. Sulfato de cinc.

Disolver 30,0 g de sulfato de cinc ($ZnSO_4$) en agua y completar hasta 100 ml en un matraz graduado.

4.3.2. Hexacianoferrato (II) de potasio en solución.

Disolver 17,2 g de hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) en agua y completar hasta 100 ml en un matraz graduado.

5. EQUIPO

5.1. **Balanza analítica.**

5.2. **Baño de agua a 37 ° $\pm$ 1 °C, controlado por termostato.**

5.3. Comparador colorimétrico, con disco especial conteniendo cristales de color patrones calibrados en µg de p-nitrofenol por ml de leche y dos células de 25 mm cada una.

6. MODO DE OPERACIÓN

Precauciones a observar

1. Tras su utilización, vaciar los tubos, enjuagarlos con agua, lavarlos con agua caliente con un detergente alcalino, enjuagarlos cuidadosamente luego con agua del grifo caliente y clara. Finalmente, enjuagarlos con agua; secarlos antes de su empleo.

   Las pipetas han de enjuagarse a fondo con agua del grifo clara y fría inmediatamente después de su utilización; enjuagarlas con agua y secarlas antes de su empleo.

2. Los tapones de los tubos de análisis han de ser enjuagados cuidadosamente con agua del grifo caliente inmediatamente después de su utilización; posteriormente hay que hervirlos en agua durante 2 minutos.

3. El substrato en solución tampón (punto 4.2) se puede conservar estable durante 1 mes, como mínimo, en el refrigerador a una temperatura de $\leq$ 4 °C. Toda inestabilidad se traduce por una formación de un color amarillo. Dado que la prueba siempre se le con respecto a un control del producto hervido que contiene el mismo substrato en solución tampón, se recomienda se utilice únicamente este substrato cuando el color indique un exceso de 10 µg, efectuándose la lectura en una célula de 25 mm en el colorímetro y utilizando agua destilada en la otra célula de 25 mm.

4. Utilizar una pipeta para cada muestra y evitar la contaminación por la saliva.

5. Evitar en todo momento la exposición directa a la luz solar.

6.1. **Preparación de la muestra**

Disolver 10 g de polvos en 90 ml de agua. La temperatura de disolución no ha de exceder los 35 °C.

6.2. **Determinación**

6.2.1. Pipetear 15 ml del substrato en solución tampón (punto 4.2) en un tubo de análisis limpio y seco, luego 2 ml de la muestra de leche reconstituida (punto 6.1) a analizar. Cerrar el tubo con una tapón, mezclar dando vueltas al tubo y colocarlo en un baño de agua a 37 °C (punto 5.2).

6.2.2. Colocar simultáneamente en el baño de agua un tubo de control conteniendo 15 ml de substrato en solución tampón y 2 ml de muestra de leche reconstituida hervida del mismo tipo que la del análisis.

6.2.3. Sacar los dos tubos del baño de agua al cabo de 2 horas, añadir 0,5 ml de precipitante de sulfato de cinc (punto 4.3.1), poner de nuevo el tapón, agitar vigorosamente y dejar reposar durante 3 minutes. Añadir 0,5 ml de precipitante de hexaferrocianuro (II) de potasio (punto 4.3.2); mezclar intimamente y filtrar en papel plegado (punto 5.4); recoger el líquido filtrado nítido en el tubo de análisis limpio.

6.2.4. Transvasar el líquido filtrado a una célula de 25 mm y comparar con respecto al líquido filtrado de la muestra de control hervida en el colorímetro, utilizando el disco especial (punto 5.3).

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. **Modo de cálculo**

La lectura directa obtenida según el punto 6.2.4 se expresa en µg de p-nitrofenol por ml de muestra o por ml de muestra de leche reconstituida.

7.2. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de otra por el mismo analista sobre la misma muestra y en las mismas condiciones, ha de ser inferior a 2 µg de p-nitrofenol liberado por ml de leche reconstituida.