

I. Disposiciones generales

PRESIDENCIA DEL GOBIERNO

16116 *Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas, Cereales y Derivados, Productos Lácteos y Productos Derivados de la Uva, establecidos por Orden de 31 de enero de 1977. (Continuación.)*

8(b).2. Material y aparatos.

8(b).2.1. Cápsulas de porcelana blanca de aproximadamente 100 ml de capacidad.

8(b).3. Reactivos.

8(b).3.1. Solución 0,111 N (N/9) ó 0,1 N (N/10) de hidróxido sódico (NaOH) exento de carbonato.

8(b).3.2. Solución indicadora de fenoltaleína: Se disuelve un gramo de fenoltaleína en 110 ml de alcohol etílico (95 a 96 por ciento en volumen), se añade solución N/9 ó N/10 de hidróxido sódico, hasta que una gota dé una débil coloración rosa, y se completa hasta 200 ml con agua destilada.

8(b).3.3. Solución concentrada de acetato de rosanilina: Se disuelven 0,12 g de acetato de rosanilina en 50 ml de alcohol etílico (95 a 96 por 100 en volumen) que contenga 0,5 ml de ácido glacial y se completa hasta 100 ml con alcohol etílico.

8(b).3.4. Solución diluida de acetato de rosanilina: Se diluye un mililitro de solución concentrada de acetato de rosanilina hasta 500 ml con una mezcla, a partes iguales en volumen, de agua destilada y alcohol etílico (95 a 96 por 100 en volumen).

Las soluciones de acetato de rosanilina se conservan en la oscuridad en frascos herméticamente cerrados con tapones de caucho.

8(b).4. Procedimiento.

Se toman dos cápsulas de porcelana blanca de una capacidad aproximada de 100 ml, pesándose en cada una de ellas 1 g de leche en polvo. A una y otra cápsulas se añaden 10 ml de agua hirviente, se agita con la extremidad aplastada de una varilla de vidrio hasta obtener un líquido perfectamente homogéneo y se deja enfriar durante 10 minutos. A una de las cápsulas se le añade 1 ml de solución diluida de acetato de rosanilina y se mezcla. A la otra cápsula se le agrega 1 ml de solución de fenoltaleína y, gota a gota y agitando enérgicamente todo el tiempo, solución valorada de hidróxido sódico hasta obtener una coloración igual a la primera. El tiempo empleado en la valoración no ha de exceder de 20 segundos y ésta se ha de efectuar con una luz difusa.

8(b).5. Cálculo.

El número de mililitros consumidos de solución 0,111 N (N/9) representa la acidez, expresada en gramos, de ácido láctico por 100 g de leche en polvo.

Si se opera con solución 0,1 N (N/10), el número de mililitros multiplicado por 0,9 da el mismo porcentaje de acidez.

8(b).6. Referencia.

1. Instituto Nacional de Racionalización del Trabajo. Una norma española. 34.101.

9. SACAROSA

(Determinación polarimétrica en la leche condensada)

9.1. Principio.

Se entiende por contenido en sacarosa de la leche condensada el contenido en sacarosa no transformada, expresado en porcentaje en peso, determinado por el procedimiento expuesto a continuación, que corresponde al descrito en la norma FIL-35: 1968 de la Federación Internacional de Lechería.

Este método es aplicable a la leche condensada, entera o destanada, de composición normal, preparada a partir de leche y sacarosa únicamente que no contenga sacarosa transformada.

El método se basa en el principio de inversión de Clerget. Un tratamiento suave con un ácido hidroliza completamente la sacarosa. La lactosa y los otros azúcares prácticamente no se hidrolizan. La cantidad de sacarosa se deduce del cambio del poder rotatorio de la solución.

Se prepara un filtrado limpio de la muestra, sin mutarrotación debida la lactosa, por tratamiento de la solución con amoníaco seguido de neutralización y clarificación por adiciones sucesivas de soluciones de acetato de cinc y de ferrocianuro potásico.

En una parte del filtrado de sacarosa se hidroliza en las condiciones especiales que corresponden a este tipo de operación.

Partiendo de los poderes rotatorios del filtrado, antes y después de la inversión, se calcula la cantidad de sacarosa.

9.2. Material y aparatos.

9.2.1. Balanza analítica de sensibilidad: 10 ml como mínimo.

9.2.2. Vasos de precipitados de 100 ml en vidrio.

9.2.3. Matraces graduados, de 200 y 50 ml.

9.2.4. Pipetas de 40 ml.

9.2.5. Probetas graduadas de 25 ml.

9.2.6. Pipetas graduadas de 10 ml.

9.2.7. Embudos filtrantes de diámetro entre 8 y 10 cm y filtros (plegados) de 15 cm de diámetro.

9.2.8. Tubo de polarímetro de 2 cm de longitud, exactamente calibrado.

9.2.9. Polarímetro o sacarímetro.

9.2.9.1. Polarímetro con luz de sodio o con luz verde de mercurio (lámpara de vapor de mercurio con prisma o pantalla Wratten número 77 A), permitiendo lecturas con una precisión por lo menos igual a 0,05 grados de ángulo.

9.2.9.2. Sacarímetro con escala internacional de azúcar utilizando luz blanca que pasa a través de un filtro de 15 ml de una solución al 8 por 100 de dicromato potásico, o bien luz de sodio, y permitiendo la lectura con una precisión por lo menos igual a 0,1 grados de la escala sacarimétrica internacional.

9.2.10. Baño de agua a $60^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$.

9.3. Reactivos.

9.3.1. Solución de acetato de cinc, 2,0 N: Disolver 21,9 g de acetato de cinc cristalizado $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 3 ml de ácido acético glacial en agua destilada y completar hasta 100 ml.

9.3.2. Solución de ferrocianuro potásico, 1,0 N: Disolver 10,6 gramos de ferrocianuro potásico cristalizado $[\text{Fe}(\text{CN})_6] \text{K}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y completar hasta 100 ml.

9.3.3. Solución de ácido clorhídrico, $6,35 \pm 0,20 \text{ N}$ (20-22 por ciento).

9.3.4. Solución diluida de amoníaco, $2,0 \pm 0,2 \text{ N}$ (3,5 por 100).

9.3.5. Solución diluida de ácido acético, $2,0 \pm 0,2 \text{ N}$ (12 por ciento).

9.4. Procedimiento.

9.4.1. Preparación de la muestra.

Para muestras de productos recientemente preparados en los que no se pueda prever separación alguna apreciable de los componentes. Abrir el recipiente, introducir en él el producto adherido a la tapa y mediante movimientos de arriba abajo, con ayuda de una cuchara, conseguir que se mezclen íntimamente las capas superiores así como el contenido del fondo del recipiente. Trasvasar el contenido de un bote a un frasco provisto de tapón bien adaptado.

Para muestras de productos más antiguos y muestras en las que se pueda prever una separación de componentes, calentar en baño de agua, aproximadamente a 40°C , hasta que la muestra casi haya alcanzado esta temperatura, abrir el recipiente y operar de la misma manera que arriba. En el caso de un bote, trasvasar el contenido a un frasco, raspar el producto que se haya adherido a las paredes y continuar la mezcla hasta que toda la masa sea homogénea. Cerrar el frasco con una tapadera que se adapte perfectamente. Dejar enfriar.

9.4.2. Comprobación del método.—Proceder como en 9.4.3, utilizando una mezcla de 100 g de leche o 110 g de leche desnatada y de 18 g de sacarosa pura, que corresponde a 40 g de una leche concentrada conteniendo el 45 por 100 de sacarosa. Calcular la cantidad de sacarosa como en 9.5.1, utilizando en la fórmula I, para W, F y P, la cantidad de leche pesada y la riqueza en materia grasa y proteínas de esta leche, y en la fórmula II, para W, la cifra de 40. La media de los valores encontrados no debe diferir de dicho valor (45 por 100) en más del 0,1 por 100.

9.4.3. Determinación.—En un vaso de 100 ml pesar aproximadamente 40 g de la muestra bien mezclada con una aproximación de 10 mg, añadir 50 ml de agua destilada caliente (80°-90° C) y mezclar cuidadosamente. Trasvasar cuantitativamente la mezcla a un matraz aforado de 200 ml, enjuagar el vaso con cantidades sucesivas de agua destilada a 60° C hasta que el volumen total sea de 120 a 150 ml. Mezclar y enfriar a temperatura ambiente. Añadir 5 ml de la solución de amoníaco diluida. Mezclar de nuevo y dejar reposar durante 15 minutos. Neutralizar el amoníaco añadiendo una cantidad equivalente de la solución diluida de ácido acético. Determinar previamente la cantidad exacta de mililitros por valoración de la solución de amoníaco diluida empleando el azul de bromotimol como indicador. Mezclar. Añadir, mezclando suavemente por rotación del matraz inclinado, 12,5 ml de solución de acetato de cinc. De la misma forma que para la solución de acetato, añadir 12,5 ml de solución de ferrocianuro potásico. Poner el contenido del matraz a 20° C y añadir agua destilada (a 20° C) hasta alcanzar el enrase de 200 ml.

Hasta este momento todas las adiciones de agua o reactivos deberán haberse efectuado de tal manera que se haya evitado la formación de burbujas de aire y por esa misma razón todas las mezclas se habrán realizado por rotación de matraz y no por agitación violenta. Si se observa la presencia de burbujas de aire antes de alcanzar los 200 ml se pueden eliminar aplicando al matraz una bomba de vacío e imprimiéndole un movimiento de rotación. Tapar el matraz con un tapón seco y mezclar íntimamente sacudiendo con energía. Dejar reposar durante algunos minutos, filtrar a continuación por un papel filtro seco. Despreciar los primeros 25 ml del filtrado.

9.4.3.1. Polarización directa.—Determinar la rotación óptica del filtrado a 20° ± 2° C.

9.4.3.2. Inversión.—Introducir con la pipeta en un matraz graduado de 50 ml, 40 ml del filtrado obtenido de la manera indicada antes. Añadir 6 ml de ácido clorhídrico 6,35 N. Poner el matraz en baño de agua a 60° C durante 15 minutos, sumergiéndolo hasta el nacimiento del cuello. Mezclar por rotación durante los 5 primeros minutos, al final de los cuales el contenido deberá haber alcanzado la temperatura del baño. Enfriar a 20° C y completar hasta 50 ml con agua destilada a 20° C, mezclar y dejar reposar 1 hora a esta temperatura.

9.4.3.3. Polarización después de inversión.—Determinar el poder rotatorio de la solución invertida a 20° ± 2° C (cuando la temperatura del líquido en el tubo de polarización difiera en más de 0,2° C de 20° C durante la medida, se debe aplicar la corrección de la temperatura indicada en el apartado 9.5.2).

9.5. Cálculo.

9.5.1. Riqueza en sacarosa.

$$I) v = \frac{W}{100} (1,08 E + 1,55 P)$$

$$II) S = \frac{D}{4} \frac{I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times W}$$

S = cantidad de sacarosa.

W = peso de la muestra expresado en gramos.

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

F = porcentaje de materia grasa de la muestra.

V = volumen en mililitros de la muestra diluida antes de filtrar.

D = lectura polarimétrica directa (polarización antes de la inversión).

I = lectura polarimétrica después de la inversión.

L = longitud en decímetros del tubo del polarímetro.

Q = factor de inversión cuyos valores se indican más adelante.

Pesando exactamente 40 g de leche condensada y utilizando un polarímetro con luz de sodio provisto de escala en grados de ángulo y un tubo de 2 cm de longitud, el contenido en sacarosa de las leches condensadas normales (C = 9) a 20° ± 0,1° C se puede calcular con ayuda de la siguiente fórmula:

$$S = (D - 5/4 I) (2,833 - 0,00612 \cdot F - 0,00878 P)$$

Si la medida de la polarización después de la inversión se efectúa a una temperatura diferente de 20° C, las cifras obtenidas se deben multiplicar por

$$II + 0,0037 (T - 20)$$

9.5.2. Calores del factor de inversión Q.—Las fórmulas siguientes dan valores precisos de Q para diversas clases de luz con correcciones, si es necesario, 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 filtro de dicromato y sacarímetro con escala sacarimétrica:

$$Q = 2,549 + 0,0017 (C - 9) - 0,0095 (T - 20)$$

En las fórmulas precedentes:

C = porcentaje de azúcares totales en la solución invertida, según la lectura polarimétrica.

T = temperatura de la solución invertida en la lectura del polarímetro.

El porcentaje de azúcares totales C en la solución invertida se puede calcular a partir de la lectura directa y de la variación después de la inversión según el método habitual, utilizando los valores usuales de rotación específica de sacarosa, de lactosa y de sacarosa invertida. La corrección 0,0006 (C-9), etcétera, no es exacta más que cuando C es aproximadamente 9; para leche concentrada normal esta corrección se puede despreciar, por ser C próximo a 9.

Variaciones en la temperatura de 20° C influyen escasamente en la lectura de la polarización directa. Por el contrario, diferencias de más de 0,2° C, en la lectura de polarización después de la inversión necesitan una corrección. La corrección -0,003 (T-20), etc., no es exacta más que para temperaturas comprendidas entre 18° C y 22° C.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o una inmediatamente después de otra por el mismo analista no debe ser mayor de 0,3 g de sacarosa para 100 g de leche condensada.

9.6. Referencia.

1. Norma Internacional FIL-IDF 35: 1966.

10. HUMEDAD (Leche en polvo)

10.1. Principio.

Se entiende por humedad de la leche en polvo el contenido en agua libre, es decir, la pérdida de peso, expresado en porcentaje en peso, determinado por el procedimiento expuesto a continuación, que corresponde al descrito en la norma FIL-26: 1964 de la Federación Internacional de Lechería.

Este método es aplicable a las leches en polvo, entera y desnatada.

El agua, contenida en la leche en polvo, se elimina por calentamiento de la muestra en una estufa de desecación, a una temperatura de 102° ± 2° C, hasta peso constante.

10.2. Material y aparatos.

10.2.1. Balanza analítica, de sensibilidad 0,1 mg como mínimo.

10.2.2. Cápsulas apropiadas, preferentemente en aluminio, níquel, acero inoxidable o vidrio. Las cápsulas deberán estar provistas de tapas que se adapten convenientemente, pero que se puedan quitar con facilidad. Las dimensiones más convenientes son: diámetro aproximado, 50 mm; profundidad aproximada, 25 mm.

10.2.3. Un desecador provisto de gel de sílice con indicador de humedad.

10.2.4. Una estufa de desecación bien ventilada, provista de termostato y regulada a 102° ± 2° C. Es importante que la temperatura sea uniforme en toda la estufa.

10.2.5. Frascos provistos de tapones herméticos para el mezclado de la leche en polvo.

10.3. Procedimiento.

10.3.1. Preparación de la muestra.—Transvasar toda la muestra de la leche en polvo a un frasco seco y tapado, de un volumen igual al doble, aproximadamente, del de la muestra, mezclar íntimamente por rotación y agitación (en el caso de que no se pueda obtener una homogeneización completa por este procedimiento, extraer, con objeto de realizar determinaciones paralelas, dos muestras en dos puntos, lo más distantes posible el uno del otro).

10.3.2. Determinación.—Colocar la cápsula destapada y la correspondiente tapa en la estufa de desecación durante 1 hora, a la temperatura de $102^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$. Colocar la tapa sobre la cápsula y pasarla de la estufa al desecador. A continuación enfriar a la temperatura ambiente y pesar. Introducir aproximadamente 1 g de leche en polvo en la cápsula, tapar la cápsula y pesar rápidamente con la mayor exactitud posible. Destapar la cápsula y colocarla con su tapa en la estufa a una temperatura de $102^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 2 horas. Volver a colocar la tapa, poner la cápsula en el desecador, dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar rápidamente con la mayor exactitud posible.

Calentar la cápsula abierta y su tapa a $102^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ en la estufa durante 1 hora suplementaria, volver a tapar y dejar enfriar en el desecador a temperatura ambiente; pesar de nuevo. Repetir la operación hasta que las pesadas sucesivas no difieran en más de 0,0005 g. La desecación se acaba aproximadamente en 2 horas.

10.4. Cálculo.

Calcular la humedad mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Humedad (cantidad de agua) \%} = \frac{M_1 - M_3}{M_3} \times 100$$

M_1 = la masa inicial, en gramos, de la cápsula y su tapa más la leche en polvo utilizada para el análisis.

M_2 = la masa final, en gramos, de la cápsula y su tapa más la leche en polvo.

M_3 = la masa, en gramos, de la leche en polvo utilizada para el análisis.

La diferencia entre dos determinaciones repetidas no debe sobrepasar el 0,06 por 100 de agua.

10.5. Referencia.

1. Norma Internacional FIL-IDF 26: 1964.

11. INDICE DE SOLUBILIDAD
(Leche en polvo)

11.1. Principio.

Se entiende por índice de solubilidad de la leche en polvo la cantidad de sedimento, expresada en volumen, determinada por el procedimiento expuesto a continuación, que corresponde al descrito en la norma UNE-34.101 del Instituto Nacional de Racionalización del Trabajo.

Este método es aplicable a la leche en polvo, entera o desnatada.

11.2. Material y aparatos.

11.2.1. Centrifuga con soportes para la colocación de los tubos centrifugos cónicos. La velocidad requerida varía, como a continuación se indica, con el diámetro.

Diámetro	Revoluciones por minuto	Diámetro	Revoluciones por minuto
250 milímetros ..	1.083	450 milímetros ..	807
300 milímetros ..	988	500 milímetros ..	766
350 milímetros ..	916	550 milímetros ..	730
400 milímetros ..	856	600 milímetros ..	700

El «diámetro» es la distancia entre los fondos internos de dos soportes opuestos, medida a través del centro de rotación de la cabeza de la centrifuga, estando los soportes extendidos horizontalmente.

11.2.2. Tubos de centrifuga cónicos, graduados como se indica a continuación:

- De 0 a 1,0 ml en divisiones de 0,1 ml.
- De 1,0 a 2,0 ml en divisiones de 0,2 ml.
- De 2,0 a 10,0 ml en divisiones de 0,5 ml.

De 10,0 a 20,0 ml en divisiones de 1,0 ml. y a 50 ml una marca que quede, por lo menos, a 13 mm del borde del tubo.

11.2.3. Mezclador eléctrico.

11.2.4. Tubo sifón de vidrio.

11.3. Procedimiento.

Se añaden 10 ó 13 g de la muestra, según se trate de leche desnatada o completa, respectivamente, a 100 ml de agua destilada, a la temperatura de 24°C , en el vaso especial del mezclador que seguidamente se pone en éste para agitar durante 90 segundos exactos. Si hay necesidad inmediata de volver a emplear el vaso del mezclador, puede verterse la solución total en un vaso de precipitación apropiado. Se deja reposar la solución hasta que la espuma se separe lo suficiente, para poder quitarla completamente con una cuchara. El período de reposo después de la mezcla no ha de exceder de 15 minutos.

Después de separada la espuma se mezcla completamente con una cuchara durante 5 segundos y, seguidamente, se llena un tubo cónico hasta la marca de 50 ml. Se centrifuga durante 5 minutos a las revoluciones por minuto requeridas, según la tabla del apartado 11.2.1. A continuación se sifona el líquido que sobrenada, hasta 2 ml del nivel del sedimento, teniendo cuidado de no remover éste. Se vierten en el tubo 25 ml de agua destilada a 24°C y se agita para dispersar el sedimento, desalojándole si fuera necesario con un alambre. Se llena con agua destilada, 24°C , hasta la marca de 50 ml, se invierte y se agita para la perfecta mezcla del contenido, y se centrifuga de nuevo durante 5 minutos a la velocidad requerida. Se mantiene el tubo en posición vertical, de modo que el nivel superior del sedimento quede a nivel del ojo; se refieren los mililitros de sedimento a la división de la escala más próxima. La lectura se efectúa fácilmente, cuando se observa el tubo, colocado delante de una luz fuerte.

Cuando se opere con leches en polvo parcialmente desnatadas, las cantidades que se han de añadir a los 100 ml de agua destilada son, según sus porcentajes grasos, las siguientes:

Hasta el 4 %	10,0 gramos
Desde el 4,1 al 9 %	10,5 gramos
Desde el 9,1 al 13 %	11,0 gramos
Desde el 13,1 al 17 %	11,5 gramos
Desde el 17,1 al 21 %	12,0 gramos
Desde el 21,1 al 24 %	12,5 gramos
Más del 24 %	13,0 gramos

11.4. Referencia.

1. Instituto Nacional de Racionalización del Trabajo. Una norma española. 34.101.

12. CALCIO

12.1. Principio.

Se entiende por contenido en calcio de la leche la cantidad total de calcio expresada en porcentaje en peso, determinada por el procedimiento expuesto a continuación, que corresponde a la norma FIL-36: 1966 de la Federación Internacional de Lechería.

Este método se aplica a todas las leches líquidas normales, así como a las leches reconstituidas por dilución o disolución de leches concentradas o de leches desecadas.

El calcio total se lleva a disolución por precipitación de las materias proteicas con ácido tricloroacético. El calcio contenido en el filtrado es precipitado bajo forma de oxalato cálcico, que se separa por centrifugación y se valora con permanganato potásico.

12.2. Material y aparatos.

12.2.1. Balanza analítica.

12.2.2. Matraz aforado de 50 ml.

12.2.3. Pipeta para leche de 20 ml.

12.2.4. Papel filtro sin cenizas para filtración lenta.

12.2.5. Centrifuga que pueda desarrollar un aceleración centrífuga de 1.400 g (g = aceleración de la gravedad).

12.2.6. Tubos de centrifuga cilindricos con fondo redondo de 30 ml, aproximadamente, marcados a 20 ml.

12.2.7. Pipetas de 2 y 5 ml.

12.2.8. Dispositivo de sifón por succión, provisto de un tubo capilar.

12.2.9. Baño de agua, a temperatura de ebullición.

12.2.10. Bureta graduada en 1/50 mm.

12.3. Reactivos.

- 12.3.1. Acido tricloroacético: solución acuosa al 20 por 100 (en peso por volumen).

12.3.2. Acido tricloroacético: solución acuosa al 12 por 100 (en peso por volumen).

12.3.3. Oxalato amónico: solución acuosa saturada en frío.

12.3.4. Rojo de metilo: solución al 0,05 por 100 (en peso por volumen) en alcohol etílico del 96 por 100 (en volumen por volumen).

12.3.5. Acido acético: solución acuosa al 20 por 100 (en volumen por volumen).

12.3.6. Amoníaco: solución acuosa obtenida mezclando volúmenes iguales de amoníaco al 25 por 100 (en peso por peso) y de agua destilada.

12.3.7. Amoníaco: solución acuosa obtenida diluyendo 2 mililitros de amoníaco al 25 por 100 (en peso por peso) hasta 100 ml, con agua destilada.

12.3.8. Acido sulfúrico: solución acuosa obtenida añadiendo 20 ml de ácido sulfúrico del 98 por 100 (en peso por peso) a 80 ml de agua destilada.

12.3.9. Permanganato potásico: solución acuosa titulada, 0,02 N.

Todos los reactivos deben ser puros para análisis.

12.4. Procedimiento.

12.4.1. Preparación de la muestra.—Antes del análisis, poner la muestra a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ y mezclar con cuidado. Si no se obtiene una dispersión homogénea de la materia grasa, calentar lentamente la muestra a 40°C , mezclar suavemente y enfriar a $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

12.4.2. Defecación de la muestra.—En un matraz aforado de 50 ml pesar exactamente alrededor de 20 g de leche, con una aproximación de 10 mg. Añadir poco a poco mientras se agita una solución acuosa de ácido tricloroacético al 20 por 100 y completar hasta 50 ml con este reactivo. Agitar fuertemente durante algunos segundos. Dejar reposar 30 minutos. Filtrar sobre papel filtro sin cenizas. El filtrado obtenido debe ser limpio.

12.4.3. Precipitación del calcio en forma de oxalato y separación del oxalato.—En un tubo de centrifuga cilíndrico de fondo redondo, introducir 5 ml del filtrado limpio; después 5 mililitros de ácido tricloroacético al 12 por 100, 2 ml de una solución acuosa saturada de amoníaco (12.3.6) hasta coloración amarillo pálido; después, algunas gotas de ácido acético al 20 por 100 hasta coloración rosa. Dejar reposar 4 horas a la temperatura ambiente.

Diluir hasta 20 ml con agua y centrifugar 10 minutos a 1.400 g ($g = \text{aceleración de la gravedad}$). Mediante un dispositivo de succión, decantar el líquido limpio que sobrenada. Lavar las paredes del tubo de centrifugación (sin remover el depósito de oxalato cálcico) con 5 ml de solución de amoníaco diluido (12.3.7). Centrifugar 5 minutos a 1.400 g. Decantar el líquido que sobrenada con el dispositivo de succión. Proceder a tres lavados sucesivos.

12.4.4. Valoración del oxalato.—Después de haber extraído con sifón el agua del último lavado, añadir 2 ml de solución acuosa de ácido sulfúrico y 5 ml de agua destilada sobre el precipitado de oxalato de calcio. Poner el tubo en baño de agua hirviendo, y cuando el oxalato esté completamente disuelto, valorar con solución de permanganato potásico 0,02 N, hasta coloración rosa persistente. La temperatura debe permanecer superior a los 60°C durante la valoración.

12.4.5. Ensayo en blanco.—Efectuar un ensayo en blanco con todos los reactivos, utilizando 20 ml de agua destilada en vez de leche.

12.5. Cálculo.

$$\text{Contenido en calcio } \% = 0,0004 \times (V-v) \times \frac{1,000}{P} \times K = 0,4 \times (V-v) \times \frac{K}{P}$$

V = volumen en ml de MnO_4K (0,02 N) gastados en la valoración de la muestra.

v = volumen en ml de MnO_4K (0,02 N) gastados en el ensayo blanco.

P = peso en gramos de la muestra inicial (alrededor de 20 g).

K = coeficiente de corrección del volumen del precipitado resultante de la precipitación tricloroacética.

Para leche entera (3,5 a 4,5 por 100 de materia grasa): $K = 0,972$.

Para leche con 3 por 100 de materia grasa: $K = 0,976$.

Para leche con 2 por 100 de materia grasa: $K = 0,980$.

Para leche con 1 por 100 de materia grasa: $K = 0,985$.

Para leche desnatada: $K = 0,989$.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o una inmediatamente después de otra por el mismo analista, no debe ser mayor de 0,002 g de calcio por 100 g de leche.

12.6. Referencia.

1. Norma Internacional FIL-IDF 36: 1966.

13. FOSFORO

13.1. Principio.

Se entiende por contenido en fósforo de la leche la cantidad total de fósforo expresada en porcentaje en peso, determinada por el procedimiento expuesto a continuación, que corresponde a la norma FIL-42: 1967 de la Federación Internacional de Lechería.

Este método se aplica a todas las leches líquidas normales, así como a las leches reconstituidas por dilución o disolución de las leches concentradas o de las leches desecadas.

Las materias orgánicas de la leche se destruyen por mineralización en seco (incineración). El fósforo se determina colorimétricamente, reduciendo el fosfomolibdato de amonio con diaminofenol (amidol) y midiendo la densidad óptica de la solución obtenida.

13.2. Material y aparatos.

13.2.1. Balanza analítica.

13.2.2. Cápsulas de platino o de cuarzo (de 55 mm de diámetro aproximadamente) provista de vidrio de reloj.

13.2.3. Baño de agua.

13.2.4. Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.

13.2.5. Matraces aforados, de 25 ml con tapones esmerilados, de 100 y de 1.000 ml.

13.2.6. Horno mufla.

13.2.7. Estufa a $105^\circ \pm 2^\circ \text{C}$.

13.2.8. Espectrofotocolorímetro.

13.3. Reactivos.

13.3.1. Acido clorhídrico (ClH) 1,0 N.

13.3.2. Acido perclórico (ClO_4H) al 65 por 100 (densidad, 1,81 gramos por ml a 20°C).

13.3.3. Solución de amidol: Disolver en agua destilada 1 gramo de amidol (diclorhidrato de 2,4 diaminofenol: $(\text{NH}_2)_2 \text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$. 2ClH) y 20 g de metabisulfito de sodio o piro-sulfito de sodio ($\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$). Completar hasta 100 ml en un matraz aforado con tapón esmerilado. Preparar cada día una solución nueva.

13.3.4. Solución de molibdato: Disolver en agua destilada 8,3 g de molibdato de amonio: $\text{Mo}_2\text{O}_7 \cdot (\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Completar hasta 100 ml.

13.3.5. Solución acuosa de fosfato monopotásico (a partir de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, desecado durante 2 horas a 105°C), que permite trazar una curva de diferencia para la determinación del fósforo: Pesar 4,393 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, disolver en agua destilada y completar hasta 1.000 ml (solución A). Diluir 10 ml de solución A hasta 1.000 ml (solución B). Un ml de solución B = 10 microgramos de P.

Todos los reactivos deben ser puros para análisis.

13.4. Procedimiento.

13.4.1. Preparación de la muestra: Antes del análisis poner la muestra a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ y mezclar cuidadosamente. Si no se obtiene una dispersión homogénea de la materia grasa, calentar lentamente la muestra a 40°C , agitar suavemente y enfriar a $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

13.4.2. Ensayo en blanco: Efectuar un ensayo en blanco con todos los reactivos, operando como se prescribe en 13.4.3.3, pero reemplazando los 5 ml de la dilución por 5 ml de agua destilada.

13.4.3. Determinación.

13.4.3.1. Mineralización por vía seca: En una cápsula de platino o de cuarzo pesar exactamente alrededor de 10 g de leche con una aproximación de 10 mg. Evaporar, hasta sequedad, al baño de agua hirviendo. Después de la desecación completa, calcinar en la mufla a una temperatura comprendida entre 500°C y 550°C hasta la obtención de cenizas blancas.

13.4.3.2. Preparación de la solución de cenizas: Después de enfriar la cápsula, cubrirla con vidrio de reloj, disolver las cenizas en 2 ó 3 ml de ácido clorhídrico normal y diluir con agua destilada. Transvasar la solución de las cenizas a un matraz aforado de 100 ml, lavar el vidrio de reloj y la cápsula, recogiendo las aguas de lavado en el matraz. Completar hasta

100 ml con agua destilada, agitar y filtrar. Tomar 10 ml del filtrado, introducirlos en un matraz de 100 ml. Completar hasta 100 ml con agua destilada y agitar.

13.4.3.3. Determinación colorimétrica del fósforo: Tomar 5 mililitros de la dilución preparada en 13.4.3.2 e introducirlos en un matraz aforado de 25 ml.

Añadir sucesivamente 2 ml de ácido perclórico, 2 ml de la solución de amidol, 1 ml de la solución de molibdato de amonio. Completar hasta 25 ml con agua destilada y mezclar. Esperar 5 minutos y medir la densidad óptica utilizando cubeta de 1 cm en un espectrofotocolorímetro a 750 nanómetros. Buscar en la curva patrón la cantidad de fósforo contenida en el matraz de 25 ml, expresada en microgramos y correspondiente a la densidad óptica leída.

13.4.3.4. Determinación de la curva patrón: En cuatro matraces aforados de 25 ml introducir 3, 5, 7 y 10 ml de la solución E. Las cantidades así introducidas son iguales a 30, 50, 70 y 100 microgramos de fósforo. Proceder a continuación como en 13.4.3.3. Situar sobre una gráfica las densidades ópticas obtenidas en función de las cantidades de fósforo presentes en los matraces. Trazar la curva patrón (que es una recta).

13.5. Cálculo.

El contenido en fósforo de la leche expresada en g de fósforo por 100 g de leche viene dado por la fórmula siguiente:

$$\text{Fósforo \%} = \frac{m - m'}{50 M}$$

m = masa de fósforo, expresada en microgramos, obtenida según 13.4.3.4 y contenida en el matraz de 25 ml con la muestra de aproximadamente 50 mg de leche.

m' = masa de fósforo, expresada en microgramos, obtenida según 13.4.3.4 y contenida en el ensayo en blanco.

M = masa de leche, expresada en gramos, empleada para la mineralización.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o una inmediatamente después de otra por el mismo analista no debe ser mayor de 0,008 g de fósforo por 100 g de leche.

13.6. Referencia.

1. Norma Internacional FIL-IDF 42: 1967.

Mantequilla

1. INDICE DE ACIDEZ DE LA GRASA

1.1. Principio.

El índice de acidez de la materia grasa en la mantequilla es el número de mg de hidróxido de potasio que se necesita para neutralizar 1 g de materia grasa.

La materia grasa, después de separarla por fusión de la mantequilla, se disuelve en una mezcla de alcohol-éter, y luego se titula con una solución alcalina valorada.

1.2. Material y aparatos.

1.2.1. Balanza analítica.

1.2.2. Matraces erlenmeyer de 300 ml.

1.2.3. Bureta graduada contrastada en divisiones de 0,1 ml.

1.3. Reactivos.

Los reactivos que se utilicen deben ser de calidad pura para análisis.

1.3.1. Solución alcohólica de hidróxido de potasio, 0,1 N, valorada. Utilizar alcohol etílico absoluto.

1.3.2. Mezcla de volúmenes iguales de alcohol etílico de 95-96 por 100 (v/v) o de alcohol desnaturalizado con metanol y de éter dietílico, neutro a la fenoltaleína.

1.3.3. Solución neutra de fenoltaleína al 1 por 100 (m/v), en alcohol etílico desnaturalizado con metanol.

Nota.—Alcohol desnaturalizado con metanol: 100 alcohol absoluto y 5 metanol.

1.4. Procedimiento.

Para separar la materia grasa, fundir la muestra, dejarla reposar a 50°-60° 2 ó 3 horas, decantar y filtrar con papel de filtro seco. Filtrar nuevamente si el primer filtro no está claro. Utilizar la materia grasa fundida, clarificada, bien mezclada.

En un matraz erlenmeyer pesar con precisión de 1 miligramo 5-10 g de materia grasa. Añadir 50-100 ml de la mezcla de alcohol etílico y éter dietílico y disolver en esta mezcla la

materia grasa. Añadir 0,1 ml de la solución de fenoltaleína. Valorar con la solución alcalina hasta que aparezca una coloración rosa pálido que persista al menos 10 segundos.

1.5. Cálculo.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \cdot t \cdot 56,1}{A}$$

V = volumen, en ml, de la solución alcalina empleada.

t = normalidad de la solución alcalina.

A = masa, en gramos, de la porción ensayada.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas no debe ser mayor de 0,1 mg de hidróxido de potasio por 1 g de materia grasa.

1.6. Referencia.

1. Norma FIL-IDF - G A - 1-69.

2. INDICE DE REFRACCION DE LA GRASA

2.1. Principio.

El índice de refracción de la materia grasa en la mantequilla es la razón entre la velocidad de una luz de longitud de onda determinada (luz de sodio) en el aire y la velocidad de esta misma luz en la materia grasa de la mantequilla a 40° C.

Mediante un refractómetro apropiado se determina el índice de refracción de la materia grasa obtenida por fusión de la mantequilla.

2.2. Material y aparatos.

2.2.1. Refractómetro provisto de escala graduada en índices de refracción, que permita efectuar lecturas hasta la tercera cifra decimal y cuyos prismas pueden calentarse mediante un líquido circulante, regulándose la temperatura termostáticamente con una aproximación de $\pm 0,1^\circ \text{C}$.

2.2.2. Luz de sodio. Se puede utilizar también la luz blanca si el refractómetro tiene un dispositivo de compensación cromática.

2.3. Procedimiento.

Para separar la materia grasa, fundir la muestra y dejarla reposar 2 ó 3 horas a 50°-60° C; decantar y filtrar con papel de filtro seco. Filtrar nuevamente si el primer filtrado no está claro. Utilizar la materia grasa fundida, clarificada, bien mezclada sin agua.

Preparar y regular el refractómetro según el modo de empleo del aparato. Ajustar la temperatura del líquido circulante a $40^\circ \pm 0,1^\circ \text{C}$.

Colocar algunas gotas de materia grasa, preparada en la forma anteriormente descrita, entre los prismas del refractómetro, de manera que se llene por completo el espacio comprendido entre ellos. Dejar transcurrir algunos minutos para que la materia grasa alcance la temperatura de los prismas. Efectuar la lectura con cuatro cifras decimales. Corregir el índice de refracción obtenido añadiendo 0,000045 unidad de índice de acidez si este último (determinado según 1) es igual o superior a dos. Redondear la cuarta cifra decimal.

2.4. Cálculo.

La diferencia entre los resultados de determinaciones paralelas no debe ser mayor de 0,0002 de la unidad de índice de refracción.

2.5. Referencia.

1. F.A.O. - B-5 - 1967.

3. CLORURO SODICO

3.1. Principio.

Se entiende por contenido de sal (cloruro de sodio) de la mantequilla el porcentaje en masa de la sal (cloruro de sodio) determinado por el procedimiento que se describe a continuación.

Después de fundir la mantequilla añadiendo agua hirviendo, los cloruros de las mezclas se valoran con una solución de nitrato de plata, empleando cromato de potasio como indicador, según el procedimiento de Mohr, y se calcula el contenido de sal.

3.2. Material y aparatos.

3.2.1. Balanza analítica.

3.2.2. Matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad.

3.2.3. Bureta graduada y contrastada en divisiones de 0,1 mililitros.

3.3. Reactivos.

3.3.1. Solución valorada de nitrato de plata, 0,1 N.

3.3.2. Solución de cromato de potasio al 5 por 100 (m/v) en agua destilada.

3.4. Procedimiento.

Ablandar la muestra en un recipiente cerrado, calentándola en baño de agua a la temperatura más baja posible, con objeto de no romper la emulsión. Frecuentemente es adecuada una temperatura comprendida entre 23° y 28° C y en ningún caso la temperatura podrá exceder de 39° C. Agitar el recipiente que contiene la muestra a intervalos frecuentes durante el proceso de ablandamiento con objeto de que la muestra se mezcle homogéneamente. Sacar el recipiente del baño de agua y agitarlo vigorosamente a intervalos frecuentes hasta que la muestra se haya enfriado adquiriendo una consistencia espesa y cremosa. Esta operación puede realizarse con un agitador mecánico.

Efectuar una determinación en blanco, empleando los mismos reactivos, en las mismas cantidades y siguiendo el mismo procedimiento que se describe a continuación.

Pesar con una precisión de 10 mg, 5 mg de muestra e introduciría en un matraz erlenmeyer.

Añadir cuidadosamente 100 ml de agua destilada hirviendo. Dejar en reposo durante 5-10 minutos, agitando por rotación de cuando en cuando, mientras se enfría a una temperatura de 50-55° C (temperatura de valoración). Añadir 2 ml de solución de cromato de potasio. Mezclar agitando por rotación. Mientras se agita continuamente, valorar con la solución de nitrato de plata hasta que el cambio de color anaranjado pardo persista durante 30 segundos.

3.5. Cálculo.

El contenido de sal (expresado en porcentaje por masa de Na Cl) es:

$$\frac{5,85 t (v_1 - v_c)}{a}$$

t = normalidad de la solución de nitrato de plata.

v₁ = volumen, en ml, de solución de nitrato de plata, utilizados en la valoración.

v_c = volumen, en ml, de solución de nitrato de plata en el ensayo en blanco.

a = masa, en gramos, de la muestra utilizada.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas no deberá ser mayor de 0,02 g de cloruro de sodio por 100 g de producto.

3.6. Referencia.

1. Norma FIL-12A - 1969.

4. AGUA, EXTRACTO SECO MAGRO Y GRASA EN UNA SOLA MUESTRA

4.1. Principio.

Se define el contenido de agua en la mantequilla como la pérdida de masa, expresado como porcentaje, en masa, según se determina por el procedimiento descrito.

Se define el contenido de extracto seco magro en la mantequilla como el porcentaje, en masa, de sustancias, según se determina.

Se define el contenido de materia grasa en la mantequilla como el porcentaje, en masa, que se obtiene restando de 100 el contenido de agua y el del extracto seco magro.

El contenido de agua se determina gravimétricamente secando una cantidad conocida de mantequilla a 102° ± 2° C.

El contenido de extracto seco magro se determina gravimétricamente después de extraer con éter de petróleo la grasa de la mantequilla secada.

4.2. Material y aparatos.

4.2.1. Balanza analítica con una tolerancia de 0,1 mg.

4.2.2. Estufa de desecación bien ventilada y controlada con termostato, ajustada para que funcione a una temperatura de 102° ± 2° C.

4.2.3. Cápsulas metálicas, de porcelana o de vidrio, resistentes a la corrosión, que tengan por lo menos 25 mm de altura y 50 mm de diámetro.

4.2.4. Crisoles filtrantes de vidrio sintetizado (porosidad número 3) con matraces de filtración a la trompa.

4.2.5. Varilla con pieza final de material adecuado.

4.3. Reactivos.

Eter de petróleo con límites de ebullición entre 30° C y 60° C. Este reactivo no debe dejar ningún residuo por evaporación.

4.4. Procedimiento.

4.4.1. Preparación de la muestra.—Excepto cuando el mezclado no se considere necesario, la muestra debe mezclarse agitando con una varilla o con un agitador mecánico, lo más rápidamente posible, sin exceder de 1 minuto. La temperatura del mezclado deberá estar comprendida normalmente entre 23° C y 28° C, pero en ningún caso deberá exceder de 35° C. Antes de pesar, la muestra deberá ponerse siempre a la temperatura ambiente.

4.4.2. Determinación de agua.—Secar la cápsula en la estufa hasta masa constante. Dejar enfriar la cápsula en desecador hasta la temperatura ambiente (30-35 min.) y pesar. Pesar en la cápsula, de 5 a 10 g de la muestra de mantequilla. Mantener la cápsula en la estufa durante una hora, por lo menos. Dejar que se enfríe la cápsula en desecador a la temperatura ambiente (de 30-35 min.) y pesar. Repetir el secado a intervalos de media hora hasta masa constante (variación igual o inferior a 0,5 miligramos). Todas las pesadas se harán con una precisión de 0,1 miligramo. En el caso de que aumente la masa, se toma la masa mínima para el cálculo. No deben emplearse en esta determinación materiales absorbentes.

4.4.3. Determinación del extracto seco magro.—Secar el crisol de vidrio filtrante en la estufa hasta masa constante. Dejar enfriar el crisol a temperatura ambiente (30-35 min.) y pesar. Añadir de 10 a 15 ml de éter de petróleo caliente a la cápsula, que contiene el extracto seco procedente de la determinación de agua, de manera que se disuelva la grasa.

Separar la mayor cantidad posible del sedimento adherido a la cápsula utilizando una varilla y pasar cuantitativamente la solución sobre la punta de la varilla al crisol. Repetir las operaciones cinco veces. Lavar el sedimento que queda en el crisol con 25 ml de éter de petróleo caliente. Secar la cápsula y el crisol en la estufa durante 2 horas. Dejar que la cápsula y el crisol se enfríen a la temperatura ambiente (30-35 min.) y pesar. Repetir las operaciones durante periodos de 30 minutos a la temperatura de secado hasta que la masa no disminuya más. Todas las pesadas se harán con una precisión de 0,1 mg.

4.5. Cálculo.

4.5.1. Método de cálculo de contenido de agua.—Emplear la fórmula:

$$\text{agua \%} = \frac{M - n}{M} \times 100$$

Siendo:

M = masa, en gramos, de la muestra.

n = masa, en gramos, de la muestra después de secar.

4.5.2. Método de cálculo del extracto seco magro.—Emplear la fórmula

$$\text{Extracto seco magro} = \frac{(A_2 - A_1) + (B_2 - B_1) \times 100}{M}$$

Siendo:

A₁ = masa, en gramos, del crisol vacío.

A₂ = masa, en gramos, del crisol conteniendo sedimento.

B₁ = masa, en gramos, de la cápsula vacía.

B₂ = masa, en gramos, de la cápsula con sedimento residual.

M = masa, en gramos, de la muestra.

4.5.3. Método de cálculo del contenido de grasa.

$$\text{Grasa \%} = 100 - (E + S)$$

E = porcentaje, en masa, de agua (calculada en 4.5.1).

S = porcentaje, en masa, de extracto seco magro (calculado en 4.5.2).

Para la determinación del contenido de agua, la diferencia entre el resultado de determinaciones paralelas no deberá exceder de 0,1 g de agua para 100 g de mantequilla.

Para la determinación del contenido de extracto seco magro, la diferencia entre resultados de determinaciones paralelas no deberá exceder de 0,05 g de extracto seco magro para 100 g de mantequilla.

5. DETECCIÓN DE GRASA VEGETAL EN GRASA DE LECHE POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ESTEROLES

5.1. Principio.

Los digitónidos de esteroles se disuelven en una mezcla de formamida y dimetil formamida, y los esteroides liberados se extraen con pentano, y se separan por cromatografía de gases. Si se obtiene en el cromatograma un pico con el tiempo de retención del beta-sitosterol, se concluye la presencia de grasa vegetal en la muestra de grasa examinada.

5.2. Material y aparatos.

5.2.1. Cromatógrafo de gases, equipado de un detector de ionización de llama, con un inyector de plata o de vidrio con un sistema de inyección directa en la columna y con un registrador.

5.2.2. Columna de cromatografía de gases, de vidrio o de acero inoxidable, en forma de U o en espiral, de 1 ó 2 m de longitud, diámetro interior de 3-4 mm. Se recomienda el vidrio, pues algunos tipos de acero inoxidable dan resultados erróneos por alteración de los esteroides.

5.2.3. Microjeringa, capaz de proporcionar dosis de 5 ó 10 microlitros.

5.3. Reactivos.

5.3.1. Mezcla de volúmenes iguales de formamida y dimetil-formamida.

5.3.2. n-Pentano.

5.3.3. Relleno de la columna: fase estacionaria de goma de silicona (tipo metílico), estable hasta por lo menos 300° C que impregna en m² a 4 por 100, una tierra de diatomeas calcinada, lavada al ácido y silanizada, de granulometría 80/100 ó 100/120 de malla.

5.3.4. Solución para el ensayo de sensibilidad: 1 mg de colesterol de 1 ml de n-pentano, recientemente preparado a partir de la grasa de leche, como se describe en 5.4.2.

5.3.5. Solución para el ensayo de resolución de los picos: 0,9 mg de fitosterol de aceite de colza y 0,1 mg de colesterol en 1 ml de n-pentano. Los esteroides deben estar recientemente preparados según el procedimiento descrito en 5.4.2.

5.3.6. Solución para el ensayo de referencia: 1 mg de fitosterol de aceite de soja en 1 ml de n-pentano, recientemente preparado, según se describe en 5.4.2.

5.3.7. Gas portador, nitrógeno.

5.3.8. Hidrógeno.

5.3.9. Oxígeno o aire.

5.4. Procedimiento.

5.4.1. Preparación de la muestra.—Fundir aproximadamente 50 g de la muestra de mantequilla en una estufa corriente a temperatura inferior a 50° C hasta separación de las fases acuosa y grasa. Separar la capa grasa por decantación y clarificar la grasa en una estufa a una temperatura de aproximadamente 40° C filtrando sobre un papel de filtro seco y evitando que pase la fase acuosa sobre el filtro.

5.4.2. Preparación de esteroides.—Pesar en un matraz erlenmeyer de 500 ml, aproximadamente 15 g de materia grasa con una precisión de 0,1 g. Añadir 10 ml de la solución de hidróxido de potasio y 20 ml de etanol (95-96 por 100 v/v). Colocar sobre el matraz erlenmeyer el refrigerante de aire, calentar en baño de agua hirviendo, agitando por rotación, hasta que la solución se haga clara, y continuar la ebullición media hora más.

Añadir 60 ml de agua y luego 180 ml de etanol (95-96 por 100 (v/v) y llevar la temperatura a aproximadamente 40° C. Añadir 30 ml de la solución alcohólica de digitonina (1 por 100), agitar y dejar enfriar. Colocar el matraz en un refrigerante regulado a 5° C, aproximadamente, durante 12 horas o una noche.

Recoger el precipitado del digitónido de esteroles por filtración sobre un papel de filtro de velocidad media en un embudo Buchner (8 cm de diámetro). Lavar el precipitado con agua aproximadamente a 5° C, hasta que el filtrado no forme espuma, luego lavar una vez con 25-50 ml de etanol (95-96 por 100 v/v) y después una vez con 25-50 ml de éter dietílico.

Desecar el papel de filtro con el precipitado en un vidrio de reloj en estufa a 102° ± 2° C, durante 10 a 15 minutos. Separar el precipitado en forma de película, plegando en dos partes el papel de filtro.

Disolver en un pequeño tubo de ensayo, aproximadamente, 10 mg de digitónido de esteroles en 0,5 ml de una mezcla de volúmenes iguales de formamida y dimetil-formamida. Calentar ligeramente, si es necesario. Después enfriar, añadir 2,5 ml de n-pentano y agitar. Dejar reposar hasta que la separación entre las capas sea neta y usar la capa superior, que contiene los esteroides liberados, para el análisis cromatográfico.

5.4.3. Condiciones de la cromatografía de gases.—Temperatura de la columna: 220-250° C. Temperatura del sistema de inyección, si puede calentarse por separado: 20-40° C por encima de la temperatura de la columna. Gasto de nitrógeno: 30/60 ml/min. Desconectar el detector y equilibrar las columnas nuevas en estas condiciones durante 16-24 horas. Conectar el detector, encender la llama y regular el gasto de hidrógeno y oxígeno o aire para obtener una altura de llama y una sensibilidad adecuada. Poner en marcha el registrador y dejar que el papel se desenrolle a una velocidad adecuada, ajustar el cero y el atenuador. Si la línea de base es estable, el aparato está listo para usarse.

5.4.4. Ensayo de sensibilidad.—Inyectar 3 a 5 mcl de la solución para el ensayo de sensibilidad (5.3.4). Sólo aparecerá un pico de colesterol en el cromatograma (fig. 5.I). Ajustar el atenuador de modo que se utilice aproximadamente toda la escala del registrador.

5.4.5. Ensayo de resolución de los picos.—Inyectar 3 a 5 mcl de la solución para el ensayo de resolución de los picos (5.3.5). Aparecerán en el cromatograma los picos de colesterol, brasicosterol, camposteroles (fig. 5.II). Medir las distancias de retención (distancia desde el punto de inyección hasta el punto de altura máxima del pico) de los picos, d_{cb} para el colesterol, d_b para el brasicosterol, d_c para el camposteroles y el d_s para el beta-sitosterol y las anchuras de la base de los picos (dimensión de retención entre las intersecciones con la línea de base de las tangentes en los puntos de inflexión situados en la parte anterior y posterior del pico). W_{cb} para el colesterol y W_b para el brasicosterol. La resolución de los picos, expresada por la fórmula

$$PR = 2(d_b - d_{cb}) / (W_b + W_{cb})$$

debe ser por lo menos igual a 1.

Calcular los tiempos de retención relativos (colesterol 1,00) para el brasicosterol y el camposteroles.

5.4.6. Ensayo de referencia.—Inyectar 3 a 5 mcl de la solución para el ensayo de referencia (5.3.6). Los picos de camposteroles, estigmasterol y de beta-sitosterol deben aparecer sobre el cromatograma (fig. 5.III). Medir las distancias de retención de los picos, d_c para el camposteroles, d_{st} para el estigmasterol y d_s para el beta-sitosterol.

Calcular los tiempos de retención relativos, que son, aproximadamente:

Colesterol	1,00 (aproximadamente 15 min.)
Brasicosterol	1,13-1,15
Camposteroles	1,32-1,34
Estigmasterol	1,44-1,46
Beta-sitosterol	1,66-1,68

5.4.7. Análisis.—Inyectar 3 a 5 mcl de la solución a analizar y dar al botón del atenuador hasta obtener un factor de atenuación cuatro veces inferior (se obtiene generalmente en dos pases del botón). Registrar el cromatograma.

5.5. Cálculo.

Si en el cromatograma un pico tiene un tiempo de retención relativo igual al de beta-sitosterol y una altura que corresponde al menos a un 2 por 100 de la escala, se concluye la presencia de beta-sitosterol y la muestra de grasa examinada, a partir de la cual se han aislado los esteroides, se considera que contiene grasa vegetal. La presencia en el cromatograma de picos de otros fitosteroides, como el camposteroles o el estigmasterol, refuerza esta conclusión.

Por este método se puede demostrar la presencia de al menos un 0,5 por 100 de beta-sitosterol en la mezcla de esteroides. El límite de detección de la grasa vegetal en la grasa de leche no se puede indicar porque depende del contenido en beta-sitosterol de la grasa añadida, es decir, de la naturaleza de esta grasa o de la mezcla de grasas añadidas a la grasa de leche.

5.6. Referencia.

1. Norma Internacional FIL-IDF 54: 1970.

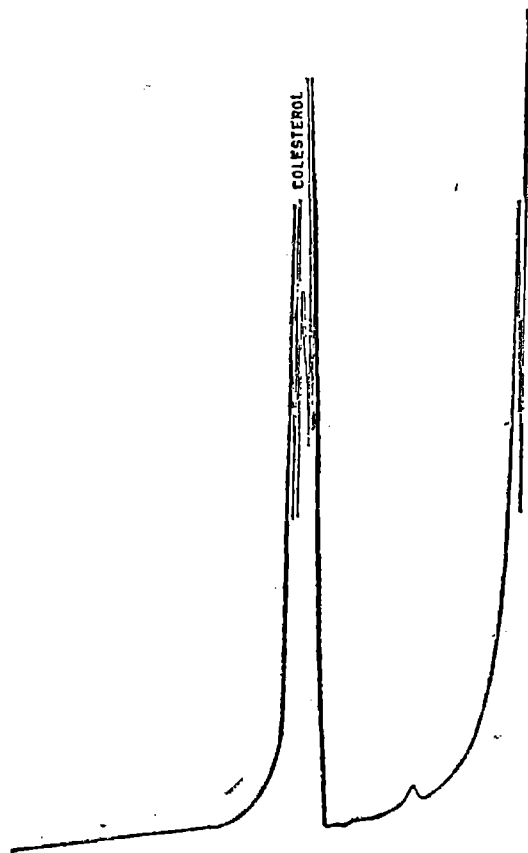


Figura 5.I.—Esteroles de la materia grasa de la leche

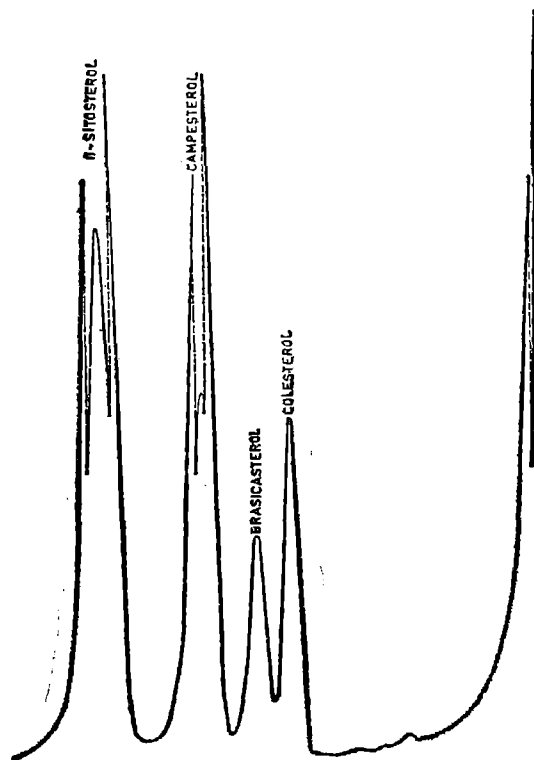


Figura 5.II.—Esteroles del aceite de colza adicionados de colesterol

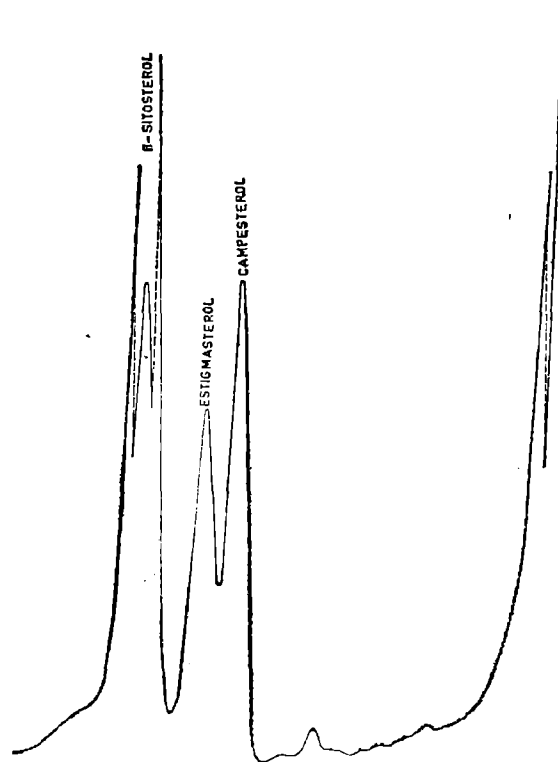


Figura 5.III.—Esteroles del aceite de soja

6. FOSFATASA RESIDUAL EN MANTEQUILLA

6.1. Principio.

El ensayo se basa en la acción del enzima fosfatasa sobre el sustrato fenil fosfato disódico, con liberación del fenol y fosfato. La cantidad de fenol liberada se determina por adición de un reactivo que da color azul en presencia de fenol.

Cantidades superiores a dos equivalentes de fenol en 0,5 g de mantequilla indican una pasterización insuficiente.

6.2. Material y aparatos.

- 6.2.1. Cuchillo o espátula de acero inoxidable.
- 6.2.2. Baño de agua a 37°-38° C.
- 6.2.3. Termómetro.
- 6.2.4. Pipetas de 1 ml.
- 6.2.5. Embudo de 5 cm de diámetro.
- 6.2.6. Papel Whatman núm. 42 o núm. 2.
- 6.2.7. Tubos graduados a 5 y 10 ml.
- 6.2.8. Fotómetro con filtro de transmitancia máxima a 610 nm.
- 6.2.9. Centrifuga.
- 6.2.10. Pera de goma para pipetar.

6.3. Reactivos.

6.3.1. Tampón hidróxido-borato de bario: Disolver 18 g de BA (OH)₂BH₂O y 8 B de H₃BO₃ en agua y diluir a 1 litro con agua.

6.3.2. Tampón de desarrollo de color: PH 9,8 ± 0,15 a 25° C. Disolver 8,0 g de metaborato sódico (NaBO₂) y 20 g de NA Cl en agua y diluir a 1 litro con agua.

6.3.3. Tampón de dilución de color: Diluir 100 ml de tampón de desarrollo de color a 1 litro de agua.

6.3.4. Sustrato tampón: Disolver 0,10 g de fenil fosfato disódico cristalino libre de fenol en 100 ml de tampón hidróxido-borato de bario (6.3.1) (los cristales de Na₂C₆H₅PO₄ deben guardarse en congelador o en desecador). Si Na₂C₆H₅PO₄ no está libre de fenol, purificarlo como sigue: Disolver 0,5 g con 4,5 ml de agua, añadir 0,5 ml de tampón hidróxido-borato de bario (6.3.1) y dos gotas del reactivo BQC (6.3.5) y dejar reposar 30 minutos. Extraer el color con 2,5 ml de alcohol butílico (6.3.7) y dejar reposar hasta que el alcohol se separe. Retirar el alcohol con un cuentagotas y desecharlo. Diluir 1,0 ml de la solución acuosa a 100 ml de tampón hidróxido-borato de bario (6.3.1). Calentar la solución a 85° C 2 minutos, tapar inmediatamente y conservar en refrigerador. La solución es estable un año si las porciones son recogidas con mínima exposición a la atmósfera.

6.3.5. Solución BQC (2,6-dibromoquinona cloroimida) o reac-

tivo de Gibbs: Disolver 40 mg BQC en polvo en 100 ml de alcohol absoluto o metanol y pasarlo a un frasco cuentagotas oscuro. El reactivo permanece estable por lo menos un mes, si se guarda en congelador; no usarlo después de que empiece a ponerse pardo. Guardar BQC en polvo en congelador o en desecador (nota: ha habido explosiones del reactivo BQC guardado en botellas en la estantería de reactivos). Comprobar los nuevos lotes de BQC antes de usarlo, preparando una curva patrón con fenol y comparando la curva obtenida con la de BQC que se sabe es satisfactorio. Repetir la prueba al menos semestralmente.

6.3.6. Solución de sulfato de cobre para los patrones: Disolver 0,05 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua y diluir a 100 ml.

6.3.7. Alcohol butílico: Usar alcohol butílico normal, punto de ebullición 116-118° C. Para ajustar el pH, mezclar 1 litro con 50 ml de tampón de desarrollo de color. Guardar en recipiente con tapón de vidrio.

6.3.8. Solución patrón de fenol:

6.3.8.1. Solución madre: Pesar exactamente 1.000 g de fenol puro, llevarlo a un matraz aforado de 1 litro, diluirlo con agua hasta 1 litro y mezclar (1 ml = 1 mg de fenol). La solución es estable varios meses en refrigerador.

6.3.8.2. Patrones de trabajo: Diluir 10,0 ml de la solución madre con agua hasta 1 litro y mezclar (1 ml = 10/ug 0,00001 g o 10 unidades de fenol). Usar esta solución patrón para preparar soluciones patrón más diluidas; p. e., diluir 5, 10, 30, 50 ml con agua hasta 100 ml para preparar soluciones patrón, que contenga 0,5; 1,0; 3,0 y 5,0 mg o unidades de fenol ml, respectivamente. Guardar estas soluciones patrón en refrigerador no más de una semana.

Análogamente preparar, a partir de la solución madre (6.3.8.1), soluciones patrón que contengan 20, 30 y 40 unidades/ml.

Medir las cantidades adecuadas de las soluciones patrón de trabajo en una serie de tubos (preferiblemente graduados a 5,0 y 10,0 ml) para conseguir un intervalo adecuado de patrones, según se necesite, que contengan 0 (control o prueba en blanco), 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 y 40,0 unidades. Para aumentar el brillo de las soluciones azules y mejorar la estabilidad de los patrones, añadir 1,0 ml de solución de CuSO_4 (6.3.6) a cada tubo. Luego añadir 5,0 ml de tampón de solución de color (6.3.3) y diluir con agua hasta 10,0 ml, añadir 4 gotas (0,08 ml) de la solución BQC (6.3.5) con agua hasta 10,0 ml, añadir 4 gotas (0,08 ml) de la solución BQC (6.3.5), mezclar y dejar desarrollar el color azul 30 minutos a temperatura ambiente.

Leer las intensidades de color en el fotómetro con filtro de 610 nm, restar el valor de la prueba en blanco del color de cada patrón de fenol y preparar la curva patrón (debe ser una línea recta).

Si los patrones han de usarse para comparación visual, guardar en refrigerador. Preparar semanalmente una serie nueva.

6.4. Procedimiento.

Tomar la muestra por debajo de la superficie con cuchillo y espátula limpios y proceder como sigue:

Pesar 1,0 g de muestra (preferiblemente por duplicado) sobre un pedazo de papel encerado de aproximadamente 1 pulgada cuadrada e introducir el papel con la muestra dentro del tubo. Análogamente, pesar otra muestra y colocarla en un tubo como control o patrón.

Calentar el patrón aproximadamente 1 minuto a 85-90° en vaso de agua hirviendo (cubierto así el tubo entero se calienta a 85-90°) y se enfría a temperatura ambiente. A partir de este momento, tratar en la misma forma el patrón y el problema.

Añadir 10,0 ml de sustrato patrón (6.3.4). Tapar el tubo y mezclar. Inmediatamente después de añadir el sustrato, incubarlo 1 hora en baño de agua a 37-38°, mezclando o agitando el contenido de cuando en cuando.

Calentar en vaso de agua hirviendo casi 1 minuto, calentando hasta 85-90° (utilizar termómetro en otro tubo del mismo tamaño y forma que contenga el mismo volumen de líquido) y enfriar a temperatura ambiente en recipiente de agua fría.

Pipetar en 1 ml de solución de $\text{Zn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de 6,0 g/100 ml y mezclar por completo (el pH de la mezcla debe ser de 9,0-9,1).

Filtrar (se recomienda embudo de 5 cm y papel Whatman número 42 o núm. 2) y recoger 5,0 ml de filtrado en el tubo, preferentemente graduado a 5,0 y 10,0 ml.

Añadir 5,0 ml de tampón de desarrollo de color (6.3.2). El pH de la mezcla ha de ser 9,3-9,4.

Añadir 4 gotas de la solución BQC (6.3.5) y dejar 30 minutos a temperatura ambiente para desarrollo de color (para detectar

únicamente la pasteurización, añadir solamente 2 gotas de solución BQC).

Determinar la intensidad del color azul por uno de los siguientes métodos:

a) Con fotómetro.—Leer intensidades de color de soluciones en blanco y problema (utilizando filtro con transmitancia máxima a aproximadamente 610 nm, restar la lectura de la prueba en blanco de la del problema, y expresar el resultado en equivalentes fenol mediante referencias a la curva patrón obtenida con las correspondientes soluciones (6.3.8.2). Generalmente es innecesaria la extracción con alcohol butílico cuando se utiliza el fotómetro; si se hace la extracción con alcohol butílico como en (b), centrifugar la muestra 5 minutos para romper la emulsión y separar el agua suspendida en la capa de alcohol (para esta finalidad puede adaptarse una centrifuga Babcock haciendo adaptadores especiales para tubos en la forma siguiente: Cortar una sección de 1/4" de grueso de un tapón de goma de diámetro adecuado, que ajuste en el fondo del vaso de centrifugación. Pegar dos tapones de corcho de diámetro adecuado, perforar en el centro un orificio de dimensiones adecuadas para alojar un tubo ajustadamente e introducir la sección doble de corcho en el vaso. Después de centrifugar, quitar casi todo el alcohol butílico con pipeta provista de pera de goma en el extremo superior. Filtrar dentro de la cubeta del fotómetro y leer con filtro cuyo máximo de transmitancias es aproximadamente de 650 m/m).

b) Con patrones visuales.—Con muestras que producen más de 5 unidades, comparar colores en tubos con los de patrones de fenol en solución acuosa (6.3.8.2). Para cuantificar resultados en los casos dudosos (p. ej., problemas que producen 0,5-5 unidades de color) extraer con alcohol butílico (6.3.7). Añadir 5,0 ml de alcohol (6.3.7) e invertir el tubo lentamente varias veces; centrifugar como en (a) si es necesario incrementar la transparencia de la capa de alcohol, y comparar el color azul con los colores de los patrones de fenol (6.3.8.2), análogamente tratados.

En los problemas que se consideren muy positivos durante el desarrollo de color (p. ej., 20 unidades), en los que 4 gotas de solución BQC (6.3.5) pueden ser insuficientes para combinar con todo el fenol, pipetar proporción adecuada de contenidos dentro de otro tubo, diluir hasta 10,0 ml con tampón de dilución de color (6.3.3), y añadir 2 gotas adicionales de solución BQC (6.3.5). Con cada problema diluir y tratar la prueba en blanco análogamente. Si la prueba sobre la muestra diluida es todavía muy fuertemente positiva, diluir de nuevo en la misma forma hasta que el color final esté dentro del intervalo de los patrones visuales o de la curva patrón del fotómetro. Dejar 30 minutos para el desarrollo de color después de la última adición de la solución de BQC (6.3.5) antes de hacer la lectura final. Para corregir lecturas por dilución, multiplicar por 2 para dilución 5 + 5, por 10 para dilución 1 + 9 y por 50 dilución 1 + 9 seguida de dilución 2 + 8, etc.

6.5. Cálculo.

Cuando se utilice 1,0 g de mantequilla y se añadan 11,0 ml de líquido, multiplicar el valor de la lectura por 1,1 para convertir el resultado en equivalentes de fenol/0,5 g de mantequilla (valores mayores de 2 equivalentes/0,5 g de mantequilla indican pasteurización insuficiente).

6.6. Referencia.

1. A. O. A. C. Official Methods of Analysis, 11.ª Ed. (1970).

7. INDICES DE ACIDOS GRASOS VOLATILES SOLUBLES E INSOLUBLES

7.1. Principio.

El índice de ácidos grasos volátiles solubles (índice de Reichert o Reichert-Meissl-Mellny) es el número de ml de una solución acuosa de álcali 0,1 N, requerido para neutralizar los ácidos grasos volátiles solubles en agua de 5 g de grasa en las condiciones que se especifican.

El índice de ácidos grasos volátiles insolubles (índice de Poulenske) es el número de ml de solución acuosa de álcali 0,1 N, requerido para neutralizar los ácidos grasos volátiles insolubles en agua, obtenidos en 5 g de grasa, en las condiciones especificadas en el método.

Después de saponificar la grasa con una solución de hidróxido sódico en glicerina, la solución jabonosa se diluye con agua y se acidifica con ácido sulfúrico. Los ácidos grasos volátiles se destilan y los ácidos grasos insolubles se separan de los solubles por filtración. La solución acuosa de ácidos solubles y la solución etanólica de ácidos insolubles se valoran separadamente con una solución de álcali normalizada.

El método es empírico porque sólo determina una parte de estos ácidos. Por tanto, las especificaciones referentes al procedimiento y aparatos se deben seguir rigurosamente para obtener resultados exactos y reproducibles.

7.2. Material y aparatos (figura 7.I).

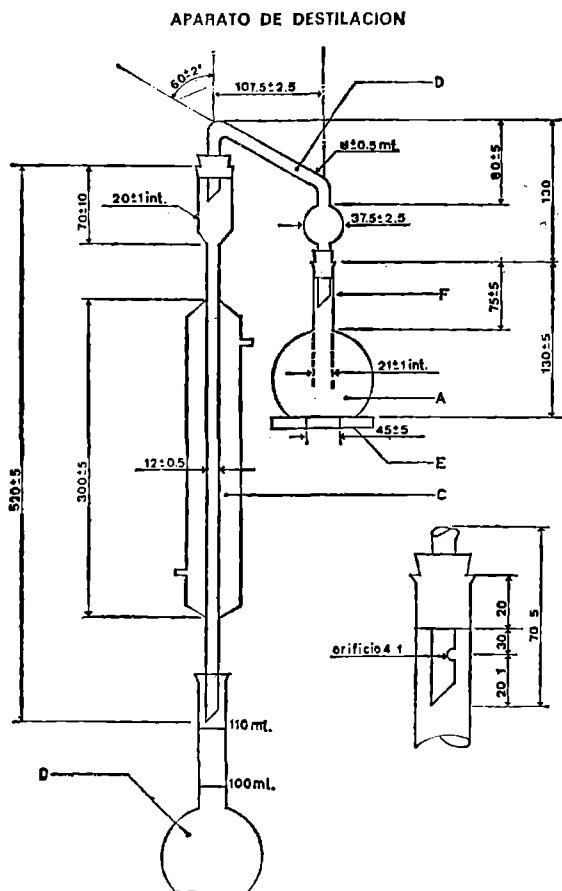


Figura 7.I.—Determinación de los índices de Reichert y de Polenske

7.2.1. Matraz de fondo plano de vidrio al borosilicato de 300 ml de capacidad (A).

7.2.2. Cabeza de destilación (E).

7.2.3. Refrigerante (C).

7.2.4. Receptor, que consiste en un matraz aforado con las rayas circulares de aforo a 100 y 110 ml (D).

7.2.5. Lámina de asbesto de 120 mm de diámetro, 6 mm de espesor con una abertura central circular de 40 a 50 mm de diámetro, para sostener el matraz durante el calentamiento (E).

7.2.6. Piedra pómez triturada que pasa a través de un tamiz de malla circular de 1,44 mm.

En la figura se representan las dimensiones en mm y el montaje del aparato de destilación; para las conexiones se puede utilizar tapones de caucho, neoprano o silicona, o juntas de vidrio esmerilado «estandar» 24/40.

7.3. Reactivos.

7.3.1. Glicerina (d = 1,26; 98 por 100 p/p).

7.3.2. Solución acuosa de hidróxido sódico (44 por 100 p/p), conservada en botella protegida del dióxido de carbono. Usar la porción limpia libre de precipitado de carbonatos.

7.3.3. Agua destilada, hervida durante 15 minutos, para eliminar el dióxido de carbono.

7.3.4. Solución de ácido sulfúrico 1 N.

7.3.5. Solución acuosa de hidróxido sódico o potásico 0,1 N, exactamente normalizada.

7.3.6. Solución indicadora de fenolftaleína (1 por 100 en etanol de 95-98 por 100).

7.3.7. Etanol (95-98 por 100 v/v) neutro a la fenolftaleína. El agua usada debe ser destilada o de una pureza por lo menos equivalente.

7.4. Procedimiento.

7.4.1. Preparación de la muestra: Como en 5.4.1.

7.4.2. Determinación del índice de ácidos grasos volátiles solubles: Pesar 5 g con aproximación de 0,01 g de grasa en el matraz A. Añadir 20 g (18 ml) de glicerina y 2 ml de solución de hidróxido sódico (44 por 100). Para añadir la solución de hidróxido sódico, usar una bureta protegida de la entrada de dióxido de carbono y limpiar la punta de la bureta desechando las primeras gotas. Calentar el matraz a fuego directo, evitando sobrecalentar y agitando continuamente, hasta que el líquido no forme espuma y se vuelva límpido. Dejar enfriar el matraz hasta 90° C. Añadir 90 ml de agua destilada recientemente hervida a la misma temperatura aproximadamente y mezclar. El líquido debe quedar límpido. Añadir de 0,6 a 0,7 g de piedra pómez y después 50 ml de solución de ácido sulfúrico 1 N. Conectar inmediatamente el matraz al aparato de destilación y calentarlo ligeramente hasta que los ácidos grasos libres formen una capa superficial limpia. Empezar a calentar y regular la llama de modo que se recojan en el matraz aforado 110 ml de destilado en 19-21 minutos, tomando como principio del período de destilación el momento en que se forma la primera gota de el refrigerante. Regular el flujo de agua del refrigerante de modo que se mantenga la temperatura del agua que sale del refrigerante a 20° ± 1° C.

Cuando se hayan recogido exactamente 110 ml de destilado, quitar el mechero inmediatamente y sustituir el matraz aforado por un pequeño vaso. Mezclar el contenido del matraz aforado agitando suavemente y sumergir el matraz en un baño de agua a 20° ± 1° C durante 10-15 minutos, estando la señal de 110 ml del matraz aforado por debajo del nivel del agua del baño. Agitar el matraz de cuando en cuando. Tapar el matraz y mezclar invirtiéndolo 4 ó 5 veces sin agitar. Filtrar los 110 ml de destilado por un papel filtro seco de velocidad media (diámetro 80-90 mm), que se ajusta cómodamente en un embudo. El filtrado debe ser límpido (el filtro debe ser de tales dimensiones, que un volumen de 15 ml lo llene completamente). Pipetar 100 ml de filtrado y pasarlos a un matraz erlenmeyer de 300 ml, añadir 0,5 ml de la solución indicadora de fenolftaleína y valorar con la solución acuosa de álcali «estandar» 0,1 N hasta un color rosa persistente durante 0,5-1 minuto.

7.4.3. Ensayo en blanco: Hacer un ensayo en blanco sin grasa y en lugar de saponificar a fuego directo calentar en baño de agua hirviendo durante 15 minutos.

No se requerirán para la valoración más de 0,5 ml de la solución de álcali normalizada. En otro caso, se deben preparar nuevas soluciones del reactivo.

7.4.4. Determinación del índice de ácidos grasos volátiles insolubles (Polenske): Lavar el filtro con tres porciones sucesivas de 15 ml de agua destilada a la temperatura de 20° ± 1° C, habiendo pasado previamente cada una a través del refrigerante del vaso pequeño y del matraz aforado. Poner el embudo y el filtro en el cuello de un matraz cónico, limpio y seco, de 200 ml de capacidad. Disolver los ácidos grasos insolubles repitiendo los lavados, usando ahora porciones de 15 ml de etanol (95-98 por 100 v/v). Valorar con la solución acuosa de álcali normalizada (0,1 N) el conjunto de los lavados con etanol usando 0,5 ml de solución indicadora de fenolftaleína, hasta un color rosa persistente durante 0,5-1 minuto.

7.5. Cálculo.

7.5.1. Índice de ácidos grasos volátiles solubles (índice de Reichert).

$$\text{Índice de Reichert} = 11 \cdot t \cdot (V_1 - b)$$

Siendo:

V_1 = volumen en mililitros de la solución normalizada (0,1 N) de álcali, utilizados en la valoración de la muestra.

b = volumen en mililitros de la solución normalizada (0,1 N) de álcali, utilizados en el ensayo en blanco.

t = normalidad exacta de la solución normalizada (0,1 N) de álcali.

Redondear el resultado a la primera cifra decimal.

7.5.2. Índice de ácidos grasos volátiles insolubles (índice de Polenske).

$$\text{Índice de Polenske} = 10 \cdot t \cdot V_2$$

Siendo:

V_2 = volumen en mililitros de la solución normalizada (0,1 N) de álcali utilizada en la valoración de la muestra.

t = normalidad exacta de la solución normalizada (0,1 N) de álcali.

Redondear el resultado a la primera cifra decimal.

(Continuará)