

II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

CONSEJO

DECISIÓN DEL CONSEJO

de 14 de noviembre de 1992

por la que se aprueban determinados métodos de análisis y de pruebas de la leche tratada térmicamente destinada al consumo humano directo

(92/608/CEE)

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 85/397/CEE del Consejo, de 5 de agosto de 1985, relativa a los problemas sanitarios y de policía sanitaria en los intercambios comunitarios de leche tratada térmicamente⁽¹⁾, y en particular el apartado 6 de su artículo 11,

Vista la propuesta de la Comisión,

Considerando que, de conformidad con el apartado 6 del artículo 11 de la Directiva 85/397/CEE, el Consejo establece las modalidades de los controles previstos en el apartado 2 del mismo artículo; que el objeto de estos controles, que deben llevar a cabo los centros bajo la supervisión, la responsabilidad y la vigilancia periódica del servicio oficial, consiste en garantizar el cumplimiento de los requisitos de la Directiva 85/397/CEE, especialmente los establecidos en el punto 3 de la letra A del artículo 3;

Considerando que el establecimiento de las modalidades de los controles comprende la fijación de los métodos necesarios para su puesta en práctica;

Considerando que es necesario fijar los métodos que permitan determinar el contenido en materia seca, materia grasa, materia seca no grasa, nitrógeno total y proteínas y la masa volumétrica de la leche tratada térmicamente destinada al consumo humano directo;

Considerando que, por razones técnicas, conviene adoptar en una primera etapa métodos de referencia en materia de análisis y de pruebas que garanticen el cumplimiento de las normas establecidas en el apartado 3 del punto A del artículo 3 de la Directiva 85/397/CE; que resulta especialmente importante seguir examinando las condiciones de utilización de los métodos de rutina, de análisis y de pruebas; que, en espera de los resultados de este examen, incumbe a las autoridades competentes velar por la utilización de métodos de rutina apropiados con el fin de cumplir las citadas normas;

Considerando que la determinación de dichos métodos comprende especialmente la determinación de los procedimientos para los análisis y la fijación de criterios de fidelidad que garanticen una interpretación uniforme de los resultados,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

Los métodos de referencia de análisis y de pruebas para la leche tratada térmicamente destinada al consumo humano directo serán los siguientes:

- determinación de la materia seca,
- determinación del contenido en materia grasa,
- determinación del contenido en materia seca no grasa,
- determinación del contenido total en nitrógeno,
- determinación del contenido en proteínas,
- determinación de la masa volumétrica.

⁽¹⁾ DO n° L 226 de 24. 8. 1985, p. 13; Directiva cuya última modificación la constituye la Directiva 89/662/CEE (DO n° L 395 de 30. 12. 1989, p. 13).

Artículo 2

La puesta en práctica de los métodos de referencia de análisis y de pruebas, la fijación de los criterios de fidelidad y la recogida de muestras deberán efectuarse de acuerdo con las normas fijadas en el Anexo I.

Artículo 3

En el Anexo II se describen los métodos mencionados en el artículo 1.

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 14 de noviembre de 1992.

Por el Consejo

El Presidente

J. GUMMER

ANEXO I

1. DISPOSICIONES GENERALES

1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se describen las disposiciones generales relativas a los reactivos, material, expresión de los resultados, precisión e informes del análisis. Las autoridades competentes de los Estados miembros y los laboratorios de control encargados de la toma de muestras y los análisis de la leche deberán respetar las disposiciones generales.

2. REACTIVOS

2.1. Agua

2.1.1. Siempre que se haga referencia al uso de agua para realizar soluciones, diluciones o enjuagues, se utilizará, salvo disposición en contrario, agua destilada, desionizada o desmineralizada de una pureza al menos equivalente.

2.1.2. Cuando se haga referencia a «solución» o «dilución» sin más indicaciones, se entenderá «solución en agua» o «dilución con agua».

2.2. Productos químicos

Salvo disposición contraria, todos los productos químicos que se utilicen serán de pureza analítica reconocida.

3. MATERIAL

3.1. Listas de material

En las listas de material para los diversos métodos de referencia sólo figuran los elementos de uso especializado y los elementos para una especificación determinada.

3.2. Balanza analítica

Por balanza analítica se entenderá una balanza capaz de pesar con una precisión de 0,1 mg.

4. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Resultados

Salvo indicación en contrario, el resultado que figure en el informe del análisis (6.) será la media aritmética de los resultados de dos pruebas que satisfagan el criterio de repetibilidad (5.1.1.) establecido para el método en cuestión. Si no se satisface el criterio de repetibilidad, la prueba deberá repetirse o su resultado quedará anulado.

4.2. Cálculo del porcentaje

El resultado se calculará en forma de porcentaje de masa de la muestra, salvo indicación contraria.

5. CRITERIOS DE PRECISIÓN: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

5.1. Los criterios de precisión para cada método se definen del modo siguiente:

5.1.1. *Repetibilidad (r)* es el valor por debajo del cual se sitúa la diferencia absoluta entre los resultados de dos análisis obtenidos con el mismo método, la misma muestra y bajo las mismas condiciones (el mismo analista, los mismos aparatos, el mismo laboratorio y en un breve intervalo de tiempo).

5.1.2. *Reproducibilidad (R)* es el valor por debajo del cual se sitúa la diferencia absoluta entre los resultados de dos análisis obtenidos con el mismo método, la misma muestra y bajo condiciones diferentes (analistas, aparatos, laboratorios y tiempos diferentes).

5.1.3. Salvo indicación en contrario, los valores de los criterios de repetibilidad y reproducibilidad para cada método concreto representan intervalos de confianza del 95 %, según la norma ISO 5725: 2ª edición 1986.

5.1.4. Los ensayos circulares y los estudios necesarios se organizarán y realizarán siguiendo las directrices internacionales.

6. INFORME DEL ANÁLISIS

El informe del análisis deberá indicar el método utilizado y los resultados obtenidos. Además, deberá incluir todos los detalles operativos que no estén previstos en el método de análisis o que sean detalles facultativos, así como toda circunstancia que haya podido influir en los resultados. El informe proporcionará toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

II. TOMA DE MUESTRAS DE LECHE TRATADA TÉRMICAMENTE

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este procedimiento describe el método de referencia de la toma de muestras de leche tratada térmicamente y el transporte y almacenamiento de las mismas.

2. GENERALIDADES

La toma de muestras de leche tratada térmicamente contenida en cisternas, etc., será llevada a cabo por un operario cualificado que haya recibido una formación adecuada.

Si se considera conveniente, las autoridades competentes o el laboratorio de análisis instruirán al personal encargado en las técnicas de muestreo, a fin de garantizar que la muestra sea representativa y conforme con la totalidad de la partida.

Si se considera conveniente, las autoridades competentes o el laboratorio de análisis instruirán al personal responsable en el etiquetado de la muestra con vistas a garantizar la identificación inequívoca de la misma.

3. MATERIAL DE MUESTREO

3.1. Generalidades

El material de muestreo será de acero inoxidable o de cualquier material apropiado, de resistencia suficiente y diseño que convenga al uso a que se destine (mezcla, muestreo, etc.). Los mezcladores y agitadores para la mezcla de líquidos en recipientes deberán tener una superficie suficiente para mezclar debidamente el producto, sin que ocasionen la aparición resistente, de longitud suficiente para poder obtener muestras en cualquier punto del recipiente. La capacidad del cacillo no podrá ser inferior a 50 ml.

Los recipientes de muestras, así como los dispositivos de cierre, serán de vidrio o de metales o plásticos adecuados.

El material de muestreo (incluidos los recipientes y dispositivos de cierre) estará hecho de materiales que no aporten a la muestra modificaciones susceptibles de afectar posteriormente a los resultados de los análisis. Todas las superficies del material de muestreo y de los recipientes para muestras estarán limpias, secas, lisas y exentas de grietas; los ángulos serán redondeados.

4. TÉCNICA DE MUESTRO

4.1. Generalidades

Independientemente de los análisis que vayan a efectuarse, la leche se mezclará cuidadosamente antes del muestreo, ya sea de forma manual o mecánica.

La muestra se tomará inmediatamente después de la mezcla, mientras la leche esté aún en movimiento.

El volumen de la muestra responderá a las exigencias del análisis. Los recipientes de muestras tendrán la capacidad suficiente para que la muestra los llene casi completamente y se produzca una buena mezcla del contenido antes del análisis, evitando el batido durante el transporte.

4.2. Muestreo manual

4.2.1. *Muestreo de leche repartida en varios lotes*

Cuando la leche que deba someterse a muestreo se encuentre en más de un recipiente, se tomará una cantidad representativa de cada recipiente y se anotará la cantidad de leche a la que corresponda cada muestra. A menos que las muestras de cada recipiente deban analizarse por separado, se mezclarán fracciones de estas cantidades representativas de forma proporcional a la cantidad contenida en el recipiente del que se haya tomado cada muestra. Se tomarán una o más muestras de estas cantidades proporcionales después de la mezcla.

4.2.2. *Muestreo de grandes recipientes. Camiones cisterna, vagones cisterna y cisternas de almacenamiento*

4.2.2.1. Antes del muestreo, mezclar la leche utilizando un método apropiado.

Se recomienda el uso de la agitación mecánica para mezclar el contenido de grandes recipientes o de camiones cisterna, vagones cisterna y cisternas de almacenamiento (4.2.2.2.).

El grado de mezcla estará en función del tiempo durante el que se haya dejado reposar la leche. Un método de mezcla, aplicado en una circunstancia determinada, se considerará eficaz si es el adecuado para los fines del análisis previsto; el criterio de eficacia de la mezcla influye, en particular, sobre la similitud de los resultados analíticos de muestras tomadas en lugares diferentes de las partidas o a la salida de la cisterna a diferentes intervalos durante el vaciado. Se considerará que un método de mezcla de leche es eficaz si la diferencia entre el contenido de materia grasa de dos muestras tomadas en las condiciones descritas es inferior a 0,1%.

En los grandes recipientes provistos de una salida situada en su fondo las pequeñas cantidades de leche obtenidas en el lugar de vaciado pueden no ser representativas del contenido, incluso después de la mezcla. Es, por tanto, preferible, tomar las muestras de la boca del recipiente. Si las muestras se toman de la salida para el vaciado, se dejará pasar la cantidad de leche suficiente para garantizar que la muestra es representativa del contenido total.

- 4.2.2.2. La mezcla del contenido de grandes recipientes o de camiones cisterna, vagones cisterna y cisternas de almacenamiento podrá efectuarse:
- mediante un agitador mecánico con motor eléctrico incorporado a la cisterna;
 - mediante un propulsor o agitador con motor eléctrico situado en la boca, con el agitador dentro del líquido;
 - en el caso de camiones cisterna o vagones cisterna, haciendo circular la leche por medio de las bombas de descarga a través de la manga de trasvase, cuyo extremo se introducirá de nuevo en la boca de la cisterna;
 - mediante aire comprimido limpio que se habrá filtrado. En este caso, se utilizará una presión y un volumen de aire mínimos para evitar la aparición del olor rancio.

4.3. **Muestreo de leche tratada térmicamente destinada al consumo directo en envases para la venta al por menor**

Las muestras de leche tratada térmicamente destinada al consumo directo en envases para la venta al por menor estarán constituidas por los envases intactos y sin abrir. Es conveniente que las muestras se tomen directamente de la máquina empacadora o del local frigorífico del centro de tratamiento lo antes posible después de haberse efectuado la transformación, y, en el caso de la leche pasteurizada, el mismo día de la transformación.

De cada tipo de leche tratada térmicamente (pasteurizada, UHT y esterilizada) se extraerá el número de muestras necesario para efectuar los análisis previstos y se observarán las instrucciones dadas por el laboratorio de análisis u otra autoridad competente.

5. **IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA**

Se asignará a la muestra un código de identificación que permita distinguirla fácilmente, de acuerdo con las instrucciones del laboratorio de análisis o de la autoridad competente para asegurar la identidad de la muestra.

6. **CONSERVACIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS**

El laboratorio de análisis, en función del tipo de leche y del método de análisis que se vaya a aplicar, elaborará las instrucciones sobre las condiciones de conservación (química, por temperatura), transporte, almacenamiento y período de tiempo que deba transcurrir entre la toma de muestras y el análisis de la leche. Las instrucciones se establecerán de acuerdo con la autoridad nacional competente.

Las instrucciones incluirán lo siguiente:

- se adoptarán las precauciones necesarias para evitar la exposición a olores contaminantes y a la luz directa del sol durante el transporte y almacenamiento. Si los recipientes de muestras son transparentes, se almacenarán en un lugar oscuro.

ANEXO II

I. DETERMINACIÓN DE LA MATERIA SECA

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este procedimiento especifica el método de referencia para la determinación de sólidos totales de la leche.

2. DEFINICIÓN

Se entiende por contenido de sólidos totales el residuo, expresado en porcentaje en masa, obtenido después de efectuada la desecación por el procedimiento expuesto a continuación.

3. PRINCIPIO

Evaporación del agua de una porción de muestra en una estufa de desecación a una temperatura de 102 ± 2 °C.

4. APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

4.1. Balanza analítica

4.2. Desecador, provisto de un buen deshidratante (por ejemplo, gel de sílice recién desecado con indicador hidrométrico).

4.3. Estufa de desecación ventilada, que permita conseguir una temperatura constante de 102 ± 2 °C en la totalidad de su espacio útil.

4.4. Cápsulas planas de 20 a 25 mm de altura y de 50 a 75 mm de diámetro, de un material adecuado (por ejemplo, acero inoxidable, níquel o vidrio), provistas de tapas que ajusten adecuadamente y puedan quitarse con facilidad.

4.5. Baño de agua en ebullición

4.6. Homogeneizador

5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Llevar la muestra de leche a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C. Mezclar la muestra cuidadosamente para obtener una distribución homogénea de la materia grasa. Evitar la agitación violenta, que puede dar lugar a la aparición de espuma o al batido de la materia grasa. Si no se consigue dispersar la capa de nata, calentar la muestra lentamente a una temperatura comprendida entre 35 y 40 °C, y mezclar cuidadosamente incorporando la nata adherida al recipiente. Enfriar rápidamente la muestra a una temperatura entre 20 y 25 °C.

Si se desea, pueda utilizarse un homogeneizador para dispersar la materia grasa.

No pueden obtenerse resultados correctos si la muestra presenta materia grasa líquida no emulsionada o partículas blancas de forma irregular adheridas a las paredes del recipiente.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de la cápsula

Calentar la cápsula (4.4.) en la estufa (4.3.), colocando la tapa a su lado, a una temperatura de 102 ± 2 °C durante 30 minutos como mínimo. Cubrir la cápsula con la tapa y ponerla inmediatamente en el desecador (4.2.), dejarla enfriar a temperatura ambiente (es decir, durante al menos 30 minutos) y pesar con precisión de 0,1 mg.

6.2. Porción de muestra

A continuación, pesar en la cápsula preparada (6.1.) de 3 a 5 g de la muestra preparada (5.), con precisión de 0,1 mg.

6.3. Determinación

6.3.1. Desecar la cápsula previamente durante 30 minutos calentándola en el baño de agua en ebullición (4.5.).

- 6.3.2. Calentar la cápsula, colocando junto a ella su tapa, en la estufa (4.3.) a una temperatura de 102 ± 2 °C durante 2 horas. Cubrir la cápsula con la tapa y sacarla de la estufa.
- 6.3.3. Dejar en el desecador (4.2.) hasta alcanzar la temperatura ambiente (es decir, durante al menos 30 minutos) y pesar con precisión de 0,1 mg.
- 6.3.4. Calentar de nuevo la cápsula, colocando la tapa a su lado, durante 1 hora en la estufa. Dejar enfriar durante 30 minutos aproximadamente en el desecador y pesar con precisión de 0,1 mg.
- 6.3.5. Repetir las operaciones descritas en el apartado 6.3.4. hasta que la diferencia de masa entre dos pesadas consecutivas no sea mayor que 0,5 mg. Consignar la masa menor.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. Cálculo y fórmula

Calcular el extracto seco total como porcentaje en masa a partir de la fórmula:

$$T = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Siendo

T = extracto seco total en g por 100 g

m_0 = masa en gramos de la cápsula y la tapa (véase el apartado (6.1))

m_1 = masa en gramos de la cápsula, la tapa y la porción de muestra (véase el apartado 6.1.)

m_2 = masa en gramos de la cápsula, la tapa y la porción de muestra desecada (véase el apartado (6.3.5.))

El resultado obtenido se redondeará al 0,01 % (porcentaje en masa) inmediato.

7.2. Precisión

7.2.1. *Repetibilidad (r)*: 0,10 g de extracto seco total por 100 g de producto.

7.2.2. *Reproducibilidad (R)*: 0,20 g de extracto seco total por 100 g de producto.

II. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN MATERIA GRASA

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente procedimiento especifica el método de referencia para la determinación del contenido en materia grasa de la leche cruda, y de la leche entera, parcialmente desnatada y desnatada.

2. DEFINICIÓN

Se entiende por *contenido en materia grasa* el porcentaje en masa de las sustancias determinadas por el procedimiento expuesto a continuación.

3. PRINCIPIO

El contenido en materia grasa se determina por extracción de una solución alcohólica-amoniaca de una porción de muestra mediante éter dietílico y éter de petróleo, destilación o evaporación de los disolventes y pesada del residuo soluble en éter de petróleo. Este procedimiento se denomina método Röse-Gottlieb.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deberán ser de calidad pura para análisis y no deberán dejar un residuo apreciable cuando se utilicen en un ensayo en blanco.

Para comprobar la calidad de los reactivos, efectuar una determinación tal como se indica en el apartado 6.3. Utilizar como tara para la pesada un matraz, un vaso de precipitados o una cápsula metálica (5.8.) vacíos, preparados como se indica en el apartado 6.4. (de modo que se corrija la influencia de los cambios de las condiciones atmosféricas sobre el resultado de la pesada). Si el residuo, una vez corregido el cambio aparente de la masa de la tara supera los 2,5 mg, determinar por separado el residuo de los disolventes evaporando 100 ml de éter dietílico (4.4.) y 100 ml de éter de petróleo, respectivamente (4.5.). Utilizar asimismo una tara para la pesada. Si el residuo es mayor que 2,5 mg, limpiar el disolvente mediante destilación o sustituirlo.

4.1. *Solución de amoníaco*, de aproximadamente un 25 % (m/m) de NH_3 . Podrá utilizarse también una solución más concentrada (véanse los apartados 6.5.1. y A.1.5.1.).

- 4.2. **Etanol**, de al menos 94% en volumen. Podrá utilizarse etanol desnaturalizado con metanol siempre que se tenga la seguridad de que no influirá en el resultado de la determinación.
- 4.3. **Solución de rojo Congo o rojo de cresol**
Disolver 1 g de rojo Congo o rojo de cresol en agua y diluir a 100 ml.
Nota: Es facultativo el uso de esta solución, que permite ver con mayor claridad la interfase entre el disolvente y las capas acuosas (véase el apartado 6.5.2.). Pueden utilizarse otros indicadores coloreados acuosos siempre que no influyan en el resultado de la determinación.
- 4.4. **Eter dietílico**, exento de peróxidos, que no contenga más de 2 mg/kg de antioxidantes y cumpla los requisitos del ensayo en blanco (6.3.).
- 4.5. **Éter de petróleo**, con un punto de ebullición entre 30 y 60 °C.
- 4.6. **Disolvente mixto**, preparado poco antes de su utilización mezclando volúmenes iguales de éter dietílico (4.4.) y éter de petróleo (4.5.).

5. APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Advertencia: Dado que la determinación requiere el uso de disolventes volátiles inflamables, todos los aparatos eléctricos que se utilicen deberán ajustarse a la legislación relativa al uso de dichos disolventes.

Material ordinario de laboratorio, y en particular:

- 5.1. **Balanza analítica**
- 5.2. **Centrífuga**, que permita centrifugar los tubos o matraces de extracción de materia grasa (5.6.) a una velocidad de 500-600 revoluciones por minuto de modo que se produzca un campo gravitatorio de 80-90 g en el extremo exterior de los tubos o matraces.
Nota: El uso de la centrífuga es facultativo (6.5.5.).
- 5.3. **Aparatos de destilación o evaporación**, que permitan efectuar la destilación de los disolventes y el etanol de los matraces, o su evaporación de los vasos de precipitados y las cápsulas (véanse los apartados 6.5.12. y 6.5.15.) a una temperatura que no sobrepase los 100 °C.
- 5.4. **Estufa**, calentada eléctricamente, provista de uno o varios dispositivos de ventilación totalmente abiertos, controlada termostáticamente a una temperatura de 102 ± 2 °C en su espacio útil. La estufa debe estar provista de un termómetro adecuado.
- 5.5. **Baño de agua**, que se mantendrá a una temperatura de 35-40 °C.
- 5.6. **Matraces de extracción de materia grasa de tipo Mojonnier**
Nota: También pueden utilizarse tubos de extracción de materia grasa provistos de un sifón o un dispositivo de lavado, si bien en este caso es necesario aplicar un procedimiento distinto, que se especifica en el apéndice.
Los tubos o matraces de extracción irán provistos de tapones de vidrio esmerilado, de tapones de corcho de buena calidad u otros dispositivos de cierre inatacables por los disolventes que se utilicen. Los tapones de corcho se someterán a extracción con éter dietílico (4.4.), a continuación se introducirán durante 15 minutos como mínimo en agua a una temperatura de 60 °C o más y se dejarán enfriar en agua con objeto de que estén saturados cuando se utilicen.
- 5.7. **Gradilla**, para sujetar los matraces (o tubos) de extracción de materia grasa (véase el apartado (5.6.).
- 5.8. **Matraz de lavado**, adecuado para emplearlo con el disolvente mixto (4.6.). No se utilizarán matraces de lavado de plástico.
- 5.9. **Recipientes de recogida de materia grasa**, por ejemplo, matraces de ensayo (de fondo plano), matraces Erlenmeyer de una capacidad de 125-250 ml o cápsulas de metal. En caso de utilizar cápsulas de metal, serán, preferentemente, de acero inoxidable y de fondo plano, a ser posible estarán provistas de un pico, y tendrán un diámetro de 80 a 100 mm y una altura aproximada de 50 mm.
- 5.10. **Materiales para facilitar la ebullición**, exentos de materia grasa, de porcelana no porosa, trozos de carburo de silicio o perlas de vidrio (facultativo en el caso de cápsulas de metal).
- 5.11. **Probetas graduadas** de 5 y 25 ml de capacidad.
- 5.12. **Pipetas graduadas** de 10 ml de capacidad.
- 5.13. **Piuzas de metal apropiadas** para sujetar matraces, vasos de precipitado o cápsulas.

6. PROCEDIMIENTO

Nota: En el apéndice se describe el procedimiento alternativo con tubos de extracción de materia grasa provistos de un sifón o de dispositivos de lavado (véase la nota del apartado 5.6.).

6.1. Preparación de la muestra para ensayo

Ajustar la temperatura de la muestra de laboratorio a 35-40 °C aproximadamente, durante 5 minutos, utilizando un baño de agua si fuese necesario. Mezclar la muestra completamente pero con suavidad, invirtiendo varias veces el recipiente de ensayo sin dar lugar a la formación de espuma o al batido de la materia grasa; dejar enfriar a 20 °C aproximadamente.

6.2. Porción de muestra

Mezclar la muestra problema (6.1.) invirtiendo suavemente 3 o 4 veces el recipiente; inmediatamente pesar con una aproximación de 1 mg de 10 a 11 g de la muestra problema, directamente o por diferencia, en uno de los matraces de extracción (5.6.).

Se traspasará la mayor parte posible de la porción de muestra al bulbo inferior (pequeño) del matraz de extracción.

6.3. Ensayo en blanco

Efectuar un ensayo en blanco al mismo tiempo que la determinación, con 10-11 ml de agua en lugar de la porción de muestra y empleando el mismo procedimiento y reactivos.

El cambio de la masa aparente del matraz de recogida de materia grasa, corregida según el cambio aparente de la masa del matraz de control, no debe exceder de 2,5 mg.

6.4. Preparación del recipiente de recogida de materia grasa

Secar el recipiente (5.9.), junto con algún material (5.10.) que facilite una ebullición moderada durante la subsiguiente eliminación de los disolventes, en la estufa (5.4.) durante 1 hora. Dejar enfriar el recipiente (al abrigo del polvo, pero no en un desecador) a la temperatura ambiente del local donde se efectúe la pesada (dejar transcurrir al menos 1 hora si se trata de recipientes de vidrio, y media hora si son de metal). Procurar evitar los cambios de temperatura y utilizar pinzas para colocar el recipiente en la balanza; pesar con una aproximación de 0,1 mg.

6.5. Determinación

6.5.1. Añadir 2 ml de solución de amoníaco (4.1.) o un volumen equivalente de una solución más concentrada, mezclándola cuidadosamente con la porción de muestra contenida en el bulbo pequeño del matraz. Una vez añadido el amoníaco, efectuar inmediatamente la determinación.

6.5.2. Añadir 10 ml de etanol (4.2.) y mezclar lentamente pero de forma homogénea, haciendo que el contenido del matraz se desplace entre los dos bulbos; evitar que el líquido se aproxime demasiado al cuello del matraz. Si se desea, añadir dos gotas de solución de rojo Congo o rojo de cresol (4.3.).

6.5.3. Añadir 25 ml de éter dietílico (4.4.), cerrar el matraz con un corcho saturado de agua o un tapón humedecido en agua (véase el apartado 5.6.), agitarlo vigorosamente (pero no demasiado, a fin de evitar la formación de emulsiones permanentes) durante 1 minuto con el matraz en posición vertical y el bulbo pequeño hacia arriba. Trasvasar periódicamente el líquido desde el bulbo mayor al bulbo más pequeño. Si es necesario, enfriar el matraz en agua corriente, a continuación quitar cuidadosamente el corcho o tapón y enjuagar éste y el cuello del matraz con un poco de disolvente mixto (4.6.) utilizando un matraz de lavado (5.8.), de modo que los líquidos de los enjuagues caigan en el matraz.

6.5.4. Añadir 25 ml de éter de petróleo (4.5.), cerrar el matraz con el corcho o tapón que se habrá humedecido de nuevo (introduciéndolo en agua) y agitarlo suavemente durante 30 segundos como se indica en el apartado 6.5.3.

6.5.5. Centrifugar el matraz cerrado entre 1 y 5 minutos a una velocidad de 500 a 600 revoluciones por minuto (5.2.). Si no se dispone de una centrífuga (véase la nota al apartado 5.2.), dejar reposar el matraz cerrado en la gradilla (5.7.) durante al menos 30 minutos, hasta que la capa flotante esté limpiada y claramente separada de la fase acuosa. Si es necesario, enfriar el matraz en agua corriente.

6.5.6. Quitar el corcho o tapon cuidadosamente y enjuagarlo, así como el interior del cuello del aparato, con un poco de disolvente mixto (4.6.), de modo que los líquidos de los enjuagues penetren en el aparato.

Se la interfase se halla por debajo de la base del cuello del matraz, elevarla ligeramente por encima de este nivel añadiendo lentamente un poco de agua por un lado del matraz con objeto de facilitar la decantación del disolvente.

6.5.7. Sostener el matraz de extracción por el bulbo pequeño y decantar cuidadosamente toda la capa flotante posible en el recipiente de recogida de materia grasa preparado (véase el apartado 6.4.), que contendrá, si en un matraz, materiales para facilitar la ebullición (5.10.) (facultativo en el caso de cápsulas de metal); se evitará la decantación de la fase acuosa.

6.5.8. Enjuagar el exterior del cuello del matraz de extracción con un poco de disolvente mixto (4.6.); recoger los líquidos de los enjuagues en el recipiente de recogida de materia grasa, procurando que el disolvente mixto no se derrame por la parte exterior del matraz de extracción.

Si se desea, la totalidad o una parte del disolvente puede eliminarse del recipiente mediante destilación o evaporación, tal como se describe en el apartado 6.5.12.

- 6.5.9. Añadir 5 ml de etanol (4.2.) al contenido del matraz de extracción y utilizar el etanol para enjuagar la parte interior del cuello del matraz; proceder a efectuar la mezcla, según el procedimiento del apartado 6.5.2.
- 6.5.10. Proceder a una segunda extracción repitiendo las operaciones descritas en los apartados 6.5.3. a 6.5.8. inclusive, pero utilizando solo 15 ml de éter dietílico (4.4.) y 15 ml de éter de petróleo (4.5.); utilizar el éter dietílico para enjuagar la parte interior del cuello del matraz de extracción. Si es necesario, elevar la interfase hasta alcanzar la mitad del cuerpo del matraz, con objeto de que la decantación final del disolvente sea lo más completa posible.
- 6.5.11. Efectuar una tercera extracción repitiendo de nuevo las operaciones descritas en los apartados 6.5.3. a 6.5.8., inclusive, pero utilizando solo 15 ml de éter dietílico (4.4.) y 15 ml de éter de petróleo (4.5.); utilizar el éter dietílico para enjuagar la parte interior del cuello del matraz de extracción. Si es necesario, elevar la interfase hasta alcanzar la mitad del cuello del matraz, con objeto de que la decantación final del disolvente sea lo más completa posible.
Podrá omitirse la tercera extracción en el caso de la leche desnatada.
- 6.5.12. Eliminar la mayor cantidad posible de disolventes (incluido el etanol) mediante destilación, si se hallan en un matraz, o mediante evaporación (véase el apartado 5.3.) si se hallan en un vaso de precipitados o en una capsula; antes de comenzar la destilación, enjuagar la parte interior del cuello del matraz con un poco de disolvente mixto (4.6.).
- 6.5.13. Calentar el recipiente de recogida de materia grasa (colocar el matraz tumbado para permitir que escape el vapor del disolvente) en la estufa (5.4.). Sacar de la estufa el recipiente de recogida de materia grasa, dejar enfriar (al abrigo del polvo pero no en un desecador) a la temperatura ambiente del local donde se efectúe la pesada (dejar transcurrir al menos 1 hora si se trata de recipientes de vidrio y media hora como mínimo si se trata de capsulas de metal); pesar con una aproximación de 0,1 mg.
No frotar el recipiente inmediatamente antes de la pesada. Colocar el recipiente en la balanza haciendo uso de las pinzas y evitar especialmente los cambios de temperatura.
- 6.5.14. Repetir las operaciones descritas en el apartado 6.5.13. hasta que la masa del recipiente de recogida de materia grasa aumente o disminuya 0,5 mg o menos en dos pesadas sucesivas. Registrar la masa menor obtenida como la masa del recipiente de recogida de materia grasa y de la materia extraída.
- 6.5.15. Añadir 25 ml de éter de petróleo al recipiente de recogida de materia grasa con objeto de comprobar si la materia extraída es totalmente soluble. Calentar suavemente y remover el disolvente hasta que toda la materia grasa esté disuelta.
Si la materia extraída es totalmente soluble en el éter de petróleo, considerar la masa de la materia grasa como la diferencia entre la masa final del recipiente con la materia extraída (véase el apartado (6.5.14.)) y su masa inicial (véase el apartado 6.4.).
- 6.5.16. Si la materia extraída no es totalmente soluble en el éter de petróleo, o en caso de duda, extraer completamente la materia grasa del recipiente mediante lavados repetidos con éter de petróleo caliente.
Dejar que se deposite todo residuo de materia insoluble y decantar cuidadosamente el éter de petróleo sin eliminar estos residuos. Repetir la operación tres veces, utilizando el éter de petróleo para enjuagar la parte interior del cuello del recipiente.
Por último, enjuagar la parte superior externa del recipiente con disolvente mixto, evitando que este se derrame por el exterior del recipiente. Eliminar el vapor de éter de petróleo del recipiente, calentando este durante 1 hora en la estufa; dejar enfriar y pesar, de acuerdo con el procedimiento descrito en los apartados 6.5.13. y 6.5.14.
La masa de la materia grasa será la diferencia entre la masa determinada según el procedimiento del apartado 6.5.14. y la masa final.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. Cálculo y fórmula

Calcular el contenido en materia grasa, expresado en porcentaje en masa, del siguiente modo:

$$F = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100$$

Siendo:

F = contenido en materia grasa

m_0 = masa en gramos de la porción de muestra (6.2.)

m_1 = masa en gramos del recipiente de recogida de materia grasa y de la materia extraída determinada según el apartado 6.5.14.

m_2 = masa en gramos del recipiente preparado de recogida de materia grasa, o, en el caso de materias insolubles, del recipiente de recogida de materia grasa y del residuo insoluble determinada según el apartado 6.5.16.

m_3 = masa en gramos del recipiente de recogida de materia grasa utilizado en el ensayo en blanco (6.3.) y de toda materia extraída determinada según el apartado 6.5.14.

m_4 = masa en gramos del recipiente de recogida de materia grasa preparado (véase el apartado 6.4.) utilizado en el ensayo en blanco (6.3.) o, en el caso de materias insolubles, del recipiente de recogida de materia grasa y del residuo insoluble determinada según el apartado 6.5.16.

Redondear el resultado a 0,01 %.

- 7.2. **Precisión**
- 7.2.1. *Repetibilidad (r)*
- leche entera y parcialmente desnatada: 0,02 g de materia grasa por 100 g de producto,
 - leche desnatada: 0,01 g de materia grasa por 100 g de producto.
- 7.2.2. *Reproducibilidad (R)*
- leche entera: 0,04 g de materia grasa por 100 g de producto,
 - leche parcialmente desnatada: 0,03 g de materia grasa por 100 g de producto,
 - leche desnatada: 0,025 g de materia grasa por 100 g de producto.

III. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN MATERIA SECA NO GRASA TOTAL

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este procedimiento especifica el método de referencia para la determinación del contenido en materia seca no grasa total de la leche tratada térmicamente.

2. DEFINICIÓN Y CÁLCULO

El contenido en materia seca no grasa total se expresa en porcentaje en masa. El contenido en materia seca no grasa total es igual al contenido de la materia seca (véase el capítulo I) menos el contenido en materia grasa (véase el capítulo II).

IV. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL EN NITRÓGENO DE LA LECHE

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este procedimiento especifica el método de referencia para la determinación del contenido de nitrógeno total de la leche cruda y de la leche entera, parcialmente desnatada y desnatada.

2. DEFINICIÓN

Se entiende por contenido de nitrógeno total de la leche el contenido de nitrógeno, expresado en porcentaje en masa, determinado mediante el método Kjeldahl que se especifica a continuación.

3. PRINCIPIO

Una cantidad pesada de la muestra de leche se digiere con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de sulfato de potasio y sulfato de cobre (II) como catalizador, con objeto de transformar el nitrógeno de los compuestos orgánicos en sulfato de amonio. El amoníaco se libera por la adición de solución de hidróxido de sodio, se destila y se absorbe en una solución de ácido bórico. A continuación se valora con una solución ácida.

4. REACTIVOS

- 4.1. **Sulfato potásico** (K_2SO_4)
- 4.2. **Solución de sulfato de cobre.** Disolver en agua 5,0 g de sulfato de cobre (II) pentahidrato ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) y diluirlo a 100 ml (a 20 °C) en un matraz aforado.
- 4.3. **Ácido sulfúrico,** de al menos 98,0% (m/m), H_2SO_4 .
- 4.4. **Solución de hidróxido de sodio,** al 47% (m/m) 704 g NaOH/l (20 °C).
- Nota:* Puede utilizarse una solución de hidróxido de sodio menos concentrada, por ejemplo, al 40% (m/m), 572 g/l, a 20 °C, o al 30% (m/m), 399 g/l, a 20 °C.
- 4.5. **Solución de ácido bórico.** Disolver 40 g de ácido bórico (H_3BO_3) en un litro de agua caliente, dejar enfriar y almacenar en una botella de vidrio de borosilicato.
- 4.6. **Indicador.** Disolver 0,01 g de rojo de metilo, 0,02 g de azul de bromotimol y 0,06 g de verde de bromocresol en 100 ml de etanol. Almacenar la solución dentro de una botella marrón cerrada en un lugar fresco y al abrigo de la luz.
- 4.7. **Solución volumétrica patrón de ácido**
 c ($\frac{1}{2} H_2SO_4$) o c (HCl) = 0,1 mol/l valorada con precisión de 0,0001 mol/l.

- 4.8. Sacarosa libre de nitrógeno
- 4.9. Sal amónica pura, como oxalato amónico $\text{NH}_4^+\text{C}_2\text{O}_4$, H_2O o sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 4.10. Triptófano ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), fenacetina ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{CH}_2\text{CONH}_2$) o mono o di-clohidrato de lisina ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ o $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$).
- Nota: La pureza de los reactivos citados en los apartados 4.9. y 4.10. debe ser de una calidad superior a la «analítica». Debe utilizarse una solución de sal amónica certificada (4.9.), si se dispone de ella.

5. APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Material ordinario de laboratorio, y en particular:

- 5.1. Matraces de Kjeldahl de 500 ml de capacidad.
- 5.2. Materiales para facilitar la ebullición, por ejemplo, perlas de vidrio de aproximadamente 5 mm de diámetro, granulos de Hengar o piedra pómez.
- 5.3. Bureta o pipeta automática para dispensar 1,0 ml.
- 5.4. Probetas graduadas de vidrio, de 50, 100 y 250 ml de capacidad.
- 5.5. Digestor, (5.1.) que permita mantenerlos en posición inclinada (aproximadamente a 45 °C), con un sistema de calentamiento eléctrico o quemadores de gas que no afecten más que a la parte del matraz ocupada por el líquido, y con un sistema de extracción de humos.
- 5.6. Aparato de destilación de vidrio de borosilicato, al que se pueda acoplar un matraz de Kjeldahl (5.1.), formado por una trampa de líquidos adecuada conectada a un buen condensador, que tendrá un tubo interior recto y un tubo de salida conectado a su parte inferior; los tubos de conexión y el tapon o tapones ajustarán bien y serán preferentemente de goma de neopreno.
- 5.7. Pipeta o pipeta automática para dispensar 0,10 ml.
- 5.8. Matraces cónicos de 500 ml de capacidad, graduados a 200 ml.
- 5.9. Bureta de 50 ml de capacidad, graduada a 0,1 ml con un margen de error $\pm 0,05$ ml.
- 5.10. Lupas para la lectura de la bureta (5.9.).
- 5.11. pH metro
- 5.12. Bureta automática

6. PROCEDIMIENTO

- 6.1. Introducir en el matraz Kjeldahl (5.1.) material para facilitar la ebullición (5.2.) (por ejemplo, 3 perlas de vidrio), 15 g de sulfato de potasio (4.1.), 1,0 ml de solución de sulfato de cobre (4.2.), 5 g aproximadamente de la muestra de leche (pesados con precisión de 0,001 g) y 25 ml de ácido sulfúrico (4.3.). Utilizar el ácido para hacer penetrar en el matraz los restos de solución de sulfato de cobre, sulfato de potasio o leche que hayan quedado en el cuello del mismo y mezclar cuidadosamente su contenido.

Nota: Dado que durante la ebullición la materia orgánica consume ácido sulfúrico, utilizar para la digestión 30 ml de H_2SO_4 (4.3.), en lugar de 25 ml si la leche contiene más de un 5,0% (m/m) de materia grasa. Proceder del mismo modo en el ensayo en blanco.

- 6.2. Calentar los matraces Kjeldahl en el equipo de digestión (5.5.), inicialmente con mucha suavidad, con objeto de que toda la espuma negra permanezca dentro del bulbo. Cuando haya cesado la formación inicial de espuma y aparezcan abundantes vapores blancos, calentar intensamente (los vapores ácidos se condensan a mitad del cuello del matraz) hasta que no queden partículas negras y el producto presente un color verde azulado transparente. A continuación, calentar suavemente durante 1 hora y media como mínimo. Tener en cuenta los siguientes requisitos:

- El tiempo necesario para que el producto adquiera transparencia no deberá ser superior a 1 hora y el tiempo total de digestión no será inferior a 2 horas y media. Si se necesita más de 1 hora para alcanzar la transparencia, se incrementará proporcionalmente el tiempo total de digestión.
- El sulfato de potasio añadido favorece la digestión al incrementar la temperatura de ebullición de la mezcla. Si al final del periodo de digestión el volumen residual de H_2SO_4 es aproximadamente inferior a 15 ml, puede haberse producido una pérdida de nitrógeno debido a un calentamiento excesivo. Si el calentamiento se realiza con gas, calentar el matraz en una placa de material refractario, provista de una abertura circular de un diámetro tal que la llama directa sólo alcance la parte del matraz que contenga los líquidos (véase 5.5.).

- c) Si entran partículas negras en el cuello del matraz y el reflujo ácido no las desliza dentro del bulbo durante los primeros momentos del periodo de ebullición intensa (lo que puede facilitarse girando el matraz), dejar que el matraz se enfríe lo suficiente y lavar las partículas con un poco de agua. Acto seguido, continuar la digestión siguiendo el procedimiento antes descrito.
- 6.3. Cuando se hayan enfriado los matraces Kjeldahl, añadir a cada uno de ellos 300 ml de agua (véase la nota) de manera que se lave cuidadosamente el cuello del matraz; mezclar completamente el contenido, asegurándose de que se disuelvan los cristales que se hayan separado. Añadir algún material para facilitar la ebullición (5.2.), a fin de lograr que esta sea uniforme. Añadir 70 ml de solución de hidróxido de sodio (4.4.) a cada uno de los matraces (véase la nota), vertiendo suavemente la solución por el cuello del matraz inclinado con objeto de formar una capa en el fondo del bulbo; no humedecer la parte superior del cuello con solución de hidróxido de sodio.
- Nota: Es necesario que el volumen conjunto de agua y de solución de hidróxido de sodio sea de 370 ml para que puedan recogerse 150 ml aproximadamente de destilado antes de que comience la ebullición intermitente («ebullición a saltos») (6.4.).
- En caso de añadir un mayor volumen equivalente de una solución de hidróxido de sodio de concentración inferior al añadido. Por ejemplo, si se añaden 85 ml de solución de hidróxido de sodio al 40% (m/m) o 125 ml de la misma solución al 30% (m/m), el volumen de agua añadido será, respectivamente, de 285 ml o 245 ml.
- 6.4. Conectar inmediatamente los matraces Kjeldahl a un aparato de destilación (5.6.). Asegurarse de que el extremo del tubo de salida del condensador se ha introducido en un matraz cónico (5.8.) que contendrá 50 ml de solución de ácido bórico (4.5.) a la que se habrá añadido 0,20 ml (5 o 6 gotas) del indicador (4.6.). Agitar el contenido de los matraces Kjeldahl para lograr una buena mezcla y a continuación empezar a calentar suavemente para evitar la excesiva formación de espuma. Cuando se hayan recogido de 100 a 125 ml de destilado, bajar los matraces cónicos hasta que el extremo del tubo de salida del condensador se halle a 40 mm aproximadamente por encima de la marca de 200 ml. Proseguir la destilación hasta el momento en que se inicie la ebullición irregular («a saltos») y entonces interrumpir de inmediato el calentamiento. Desconectar los matraces Kjeldahl y enjuagar con un poco de agua el extremo de los tubos de salida de los condensadores, recogiendo a continuación en el matraz cónico los líquidos de enjuague. Tener en cuenta los siguientes requisitos:
- a) La velocidad de destilación será tal que permita recoger 150 ml de destilado, aproximadamente, cuando comience la ebullición intermitente («a saltos»), de modo que el contenido de cada uno de los matraces cónicos sea de unos 200 ml.
- b) La eficacia de los condensadores será tal que la temperatura del contenido de cada uno de los matraces cónicos durante la destilación no sobrepase los 25 °C.
- 6.5. Valorar mediante un pH metro y, si se desea, una bureta automática, cada destilado con solución volumétrica patrón (4.7.) hasta que el pH sea $4,6 \pm 0,1$. La adición de un indicador ayuda a comprobar si la valoración se realiza correctamente. Efectuar la lectura de las buretas, con precisión de 0,01 ml, con ayuda de una lupa (5.10.). Evitar errores de paralaje.
- La valoración puede efectuarse con un único indicador. Valorar hasta que el color del destilado corresponda al de una solución recién preparada a partir de 150 ml de agua a la que se han añadido 50 ml de la solución de ácido bórico y 0,20 ml del indicador contenidos en un matraz de Erlenmeyer (5.8.).
- 6.6. Realizar un ensayo en blanco de conformidad con los apartados 6.1. a 6.5., inclusive, aplicando el procedimiento descrito, pero utilizando en lugar de leche 5 ml de agua destilada a la que se añadirá alrededor de 0,1 g de sacarosa (4.8.).
- Nota: Para valorar el destilado del ensayo en blanco sólo se necesita una pequeña cantidad de solución volumétrica patrón (4.7.).
- 6.7. Comprobar regularmente la precisión del procedimiento efectuando 2 ensayos de recuperación de conformidad con el método descrito en los apartados 6.1. a 6.5., inclusive.
- 6.7.1. Comprobar, mediante el uso de una porción de muestra formada por 0,15 g de oxalato o sulfato amónico (4.9.) pesado con una aproximación de 0,001 g y 0,1 g de sacarosa (4.8.), que no se producen pérdidas de nitrógeno a causa de un calentamiento excesivo de fugas mecánicas durante la destilación.
- El porcentaje de nitrógeno recuperado oscilará entre 99,0 y 100,0%.
- La obtención de resultados superiores o inferiores será indicio de que existen errores de procedimiento o una concentración inexacta de la solución patrón (4.7.).
- 6.7.2. Comprobar, utilizando una porción de muestra de 0,20 g de triptófano puro, 0,35 g de fenacetina o 0,20 g de clorhidrato de lisina (4.10.), que el procedimiento de digestión es suficiente para liberar todo el nitrógeno proteico. Todas las pesadas se efectuarán con una aproximación de 0,001 g. Deberá recuperarse como mínimo el 98-99% del nitrógeno.

7. NORMAS DE SEGURIDAD

Las personas que utilicen ácido sulfúrico concentrado e hidróxido de sodio y manipulen matraces Kjeldahl deberán llevar siempre una bata de laboratorio, gafas protectoras y guantes resistentes al ácido.

Durante la destilación deberán vigilarse continuamente los matraces Kjeldahl. Dado el peligro potencial que entraña, deberá interrumpirse inmediatamente la destilación si es demasiado fuerte la ebullición «a saltos» del contenido de los matraces. Si se produce un corte de energía que dure más de 2 o 3 minutos, bajar el matraz de recogida de modo que la boquilla de destilación quede fuera del líquido.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. Cálculo y fórmula

Calcular el contenido de nitrógeno (W_N), expresado en gramos de nitrógeno por 100 g de producto, mediante la fórmula:

$$W_N = \frac{1,40 (V - V_0) c}{m}$$

Siendo:

W_N = contenido de nitrógeno

V = volumen en mililitros de la solución volumétrica patrón de ácido utilizada en la determinación

V_0 = volumen en mililitros de la solución volumétrica patrón de ácido utilizada en el ensayo en blanco

c = concentración de la solución volumétrica patrón de ácido (4.7.) expresada en moles por litro

m = masa en gramos de la porción de muestra

Redondear el resultado con una aproximación de 0,001 g por 100 g.

8.2. Precisión

8.2.1. *Repetibilidad (r)*: 0,007 g por 100 g.

8.2.2. *Reproducibilidad (R)*: 0,015 g por 100 g.

9. PROCEDIMIENTOS MODIFICADOS

9.1. Utilizar, en lugar del equipo de digestión y de los matraces Kjeldahl descritos en los apartados 5.5. y 5.1., un equipo de digestión en bloque provisto de matraces cilíndricos. En este caso, para detectar los problemas que puedan surgir, deberá comprobarse cada punto por separado (véase el apartado 6.7.).

9.2. Utilizar la destilación al vapor en lugar del calentamiento directo de los matraces (6.4.). Si el equipo no admite agua destilada, asegurarse de que el agua empleada no contenga sustancias volátiles ácidas o alcalinas.

9.3. Podrá utilizarse una porción de muestra de 1 g de leche (semi-macro Kjeldahl) en lugar de una porción de 5 g (6.1.), siempre que:

— Se reduzcan en la misma proporción ($1/5$) las cantidades de los reactivos utilizados para la mineralización (6.1.): H_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, K_2SO_4 .

— El tiempo total de digestión (6.2.) quede reducido a 75 minutos.

— Se reduzca en la misma proporción ($1/5$) la cantidad de solución de hidróxido de sodio (6.3.).

— Se emplee una solución patrón ácida (4.7.) de concentración inferior (0,02-0,03 mol/l).

Nota: Solo se admitirá la utilización de uno o más de estos procedimientos alternativos si el valor de la repetibilidad (8.2.1.) y los resultados de los 2 análisis de precisión (6.7.) se ajustan a los requisitos de este método.

V. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL EN PROTEÍNAS

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente procedimiento describe el método de referencia para la determinación del contenido de proteínas de la leche tratada termicamente (véase el punto 3) de la letra A del artículo 3 de la Directiva 85/397/CEE).

2. DEFINICIÓN

Se entiende por *contenido de proteínas* el valor obtenido al multiplicar por un factor adecuado (véase el apartado 3.) el contenido de nitrógeno total, expresado en porcentaje en masa, determinado por el método expuesto en el capítulo IV.

3. CÁLCULO

El contenido de proteínas de la leche, expresado en porcentaje en masa, es igual al $6,38 \times$ contenido de N total de la leche en %.

VI. DETERMINACIÓN DE LA MASA VOLÚMICA**1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACION**

El presente procedimiento describe el método de referencia para la determinación de la masa específica a 20 °C de la leche cruda y de la leche entera, parcialmente desnatada y desnatada.

2. DEFINICIÓN

El peso específico de la leche es la razón existente entre la masa de un volumen determinado de leche a 20 °C y la masa del mismo volumen de agua a 20 °C.

3. PRINCIPIO

El peso específico a 20 °C se determina mediante un hidrómetro.

4. APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

4.1. Hidrómetro

El hidrómetro de peso específico es un instrumento que consiste en un flotador de vidrio más ancho y pesado en su extremo inferior. A su extremo superior está fijado un tubo cilíndrico de vidrio orientado coaxialmente al flotador; el extremo superior del tubo está cerrado.

El flotador contiene la carga (plomo, mercurio, etc.) destinada a ajustar la masa del hidrómetro. El tubo está provisto de una escala graduada de 1,025 a 1,035 g/ml.

El hidrómetro debe comprobarse utilizando el método picnométrico con un picnómetro de aproximadamente 100 ml de capacidad provisto de un termómetro de precisión.

4.2. Tubos (de vidrio o de acero inoxidable).

Dimensiones mínimas:

— diámetro interno: 35 mm aproximadamente,

— altura interna: 225 mm aproximadamente.

4.3. Baño de agua regulado a una temperatura de $20 \pm 0,1$ °C.**4.4. Baño de agua regulado a una temperatura de 40 ± 2 °C.****4.5. Termómetro graduado a 0,5 °C.****5. PROCEDIMIENTO**

5.1. Mezclar la muestra de leche mediante inversión a fin de dispersar la materia grasa y colocar la muestra en un baño de agua (4.4.). Elevar la temperatura de la muestra a 40 °C y mantenerla durante 5 minutos. Mezclar completamente la muestra invirtiéndola cuidadosamente para garantizar que la materia grasa se halle homogéneamente distribuida. Enfriar a 20 °C en un segundo baño de agua (4.3.).

5.2. Mezclar completamente la muestra invirtiéndola cuidadosamente. Verter la leche en el tubo (4.2.), que se mantendrá inclinado para evitar la formación de espuma o burbujas. Introducir en el tubo una cantidad suficiente de la muestra de leche de modo que se derrame un poco al introducir el hidrómetro (4.1.). Introducir el hidrómetro suavemente en la leche y dejar flotar libremente cuando alcance su posición de equilibrio. El tubo se colocará en posición vertical. El hidrómetro se situará en medio de la columna de líquido y no deberá tocar las paredes del tubo.

5.3. Cuando el hidrómetro alcance la posición de equilibrio, leer la graduación en la parte superior del menisco.

5.4. Inmediatamente después de haber leído el hidrómetro, introducir el termómetro (4.5.) en la muestra y leer la temperatura con precisión de 0,5 °C.

La temperatura deberá ser igual a $20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

6. CORRECCIÓN DE LA TEMPERATURA

6.1. Si la temperatura de la muestra de leche no es de 20 °C exactamente cuando se efectúe la medición de su masa específica, se corregirá el resultado obtenido sumando a la masa específica determinada 0,0002 por cada grado Celsius por encima de 20 °C o restando 0,0002 por cada grado Celsius por debajo de 20 °C. Esta corrección sólo será válida si la temperatura de la muestra de leche no difiere más de 5 °C de 20 °C.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El método de cálculo y la masa específica de la fórmula de la muestra se expresa en g/ml de leche desnatada a 20 °C con arreglo a la siguiente fórmula:

$$\frac{1\,000 \cdot mv - MG \cdot mv}{1\,000 - \frac{MG \cdot mv}{0,92}} = \frac{0,92 \, mv (1\,000 - MG)}{920 - MG \cdot mv}$$

Siendo:

mv = la masa específica de la muestra leída por el hidrómetro (5.4.) en g/l

MG = contenido en grasa de la muestra en g/l

0,92 = densidad de la grasa

8. PRECISION

8.1. **Repetibilidad (r):** 0,0003 g/ml

8.2. **Reproducibilidad (R):** 0,0015 g/ml

Apéndice

(del Anexo II)

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO CON UTILIZACIÓN DE TUBOS DE EXTRACCIÓN DE MATERIA GRASA PROVISTOS DE UN SIFÓN O UN DISPOSITIVO DE LAVADO**A.1. PROCEDIMIENTO****A.1.1. Preparación de la muestra problema**

Véase el apartado 6.1.

A.1.2. Porción de muestra

Proceder según lo indicado en el apartado 6.2, pero utilizando tubos de extracción de materia grasa (véase el apartado 5.6.). Se hará llegar la mayor parte posible de la porción de muestra al fondo del tubo de extracción.

A.1.3. Ensayo en blanco

Véase el apartado 6.3.

A.1.4. Preparación del recipiente de recogida de materia grasa

Véase el apartado 6.4.

A.1.5. Determinación

A.1.5.1. Añadir 2 ml de la solución de amoníaco (4.1.) o un volumen equivalente de una solución más concentrada y mezclar cuidadosamente con la porción de muestra tratada previamente situada en el fondo del tubo. Efectuar la determinación inmediatamente después de la adición del amoníaco.

A.1.5.2. Añadir 10 ml de etanol (4.2.) y mezclar suavemente, pero de modo homogéneo, en el fondo del tubo. *Si se desea*, añadir 2 gotas de solución de rojo Congo o rojo de cresol (4.3.).

A.1.5.3. Añadir 25 ml de éter dietílico (4.4.), cerrar el tubo con un corcho saturado de agua o un tapón humedecido en agua (véase el apartado 5.6.), agitar el tubo vigorosamente, pero no en exceso (con objeto de evitar la formación de emulsiones permanentes, invirtiéndolo varias veces durante 1 minuto. Si es necesario enfriar el tubo en agua corriente. A continuación, quitar cuidadosamente el corcho o tapón y enjuagar éste y el cuello del tubo con un poco de disolvente mixto (4.6.) utilizando un matraz de lavado (5.8.), de modo que los líquidos de los enjuagues penetren el tubo.

A.1.5.4. Añadir 25 ml de éter de petróleo (4.5.), cerrar el tubo con el corcho o tapón (que se habrá humedecido de nuevo introduciéndolo en agua) y agitar el tubo suavemente durante 30 segundos tal como se describe en el apartado A.1.5.3.

A.1.5.5. Centrifugar el tubo cerrado de 1 a 5 minutos a una velocidad de 500 a 600 revoluciones por minuto (5.2.). Si no se dispone de una centrifuga (véase la nota al apartado 5.2.), dejar el tubo cerrado en reposo en la gradilla (5.7.) durante al menos 30 minutos, hasta que la capa flotante esté completamente límpida y claramente separada de la fase acuosa. Si es necesario, enfriar el tubo en agua corriente.

A.1.5.6. Quitar cuidadosamente el corcho o tapón y enjuagarlo, así como también al cuello del tubo, utilizando un poco de disolvente mixto, de forma que los líquidos de los enjuagues penetren en el tubo.

A.1.5.7. Acoplar un sifón o dispositivo de lavado al tubo y empujar el brazo interior largo del dispositivo hasta que la entrada se halle 3 mm. aproximadamente, por encima de la interfase entre las capas. El brazo interior del dispositivo será paralelo al eje del tubo de extracción.

Transferir cuidadosamente la capa flotante desde el tubo al recipiente de recogida de materia grasa preparado (véase 6.4.), que contendrá material particular facilitar la ebullición (5.10.) si se trata de matraces (facultativo si se trata de cápsulas de metal); se evitará transferir la fase acuosa. Enjuagar la salida del dispositivo con un poco de disolvente mixto, recogiendo los líquidos de los enjuagues en el recipiente de recogida de materia grasa.

A.1.5.8. Aflojar el dispositivo acoplado el cuello del tubo, levantar ligeramente el dispositivo y enjuagar la parte inferior de su brazo interior largo utilizando un poco de disolvente mixto. Bajar e introducir de nuevo el dispositivo y trasvasar los líquidos de los enjuagues al recipiente de recogida de materia grasa.

Enjuagar la salida del dispositivo utilizando un poco de disolvente mixto y recoger los líquidos de los enjuagues en el recipiente. Si se desea, podrá eliminarse la totalidad o una parte del disolvente contenido en el recipiente mediante destilación o evaporación, como se indica en el apartado 6.5.12.

- A.1.5.9. Aflojar de nuevo el dispositivo aplicado al cuello, levantarlo ligeramente y añadir 5 ml de etanol al contenido del tubo, utilizando el etanol para enjuagar el brazo interior largo del dispositivo; mezclar como se indica en el apartado A.1.5.2.
- A.1.5.10. Proceder a una *segunda extracción*, repitiendo las operaciones descritas en los apartados A.1.5.3 a A.1.5.8., pero utilizando únicamente 15 ml de éter dietílico (4.4.) y 15 ml de éter de petróleo (4.5.). Utilizar el éter dietílico para enjuagar el brazo interior largo del dispositivo cuando éste se retire del tubo después de efectuar la extracción anterior.
- A.5.11. Proceder a una *tercera extracción* repitiendo el procedimiento descrito en los apartados A.1.5.3. a A.1.5.8., utilizando 15 ml de éter dietílico y 15 ml de éter de petróleo; enjuagar el brazo interior largo del dispositivo como se indica en el apartado A.1.5.10.
- Podrá omitirse la tercera extracción en el caso de la leche desnatada
- A.1.5.12. Proceder como se indica en los apartados 6.5.12. a 6.5.16.
-