2695 *ORDEN de 26 de enero de 1989 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana.*

Por Ordenes de 31 de enero de 1977 («Boletín Oficial del Estado» del 14 al 27 de julio), 31 de julio de 1979 («Boletín Oficial del Estado» de 29 y 30 de agosto), 17 de septiembre de 1981 («Boletín Oficial del Estado» de 14 de octubre) y 1 de diciembre de 1981 («Boletín Oficial del Estado» de 20 de enero de 1982), se establecieron diversos métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.

La situación motivada por nuestra entrada en la Comunidad Económica Europea hace necesario armonizar nuestra legislación con la correspondiente comunitaria, especialmente con lo dispuesto en la Directiva de la Comisión 79/1067/CEE, de 13 de noviembre («Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327, de 24 de diciembre), sobre métodos de análisis de determinados tipos de leche, parcial o totalmente deshidratada, destinados a la alimentación humana. Esta uniformidad de criterios bastaría por sí sola para conferir el carácter de básica a la presente norma.

Al mismo tiempo, la presente Orden pretende dar cumplimiento a las exigencias requeridas por el Tribunal Constitucional en el sentido de qué normas y qué preceptos concretos de las mismas reúnen aquellas características que las confieran el carácter de normas básicas.

En este sentido, «la determinación, con carácter general, de los requisitos sanitarios de las reglamentaciones técnico-sanitarias de los alimentos, servicios o productos, directa o indirectamente relacionados con el uso y consumo humanos» corresponde a la Administración del Estado, en virtud de lo dispuesto en el artículo 40.2 de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad («Boletín Oficial del Estado» del 29).

Por su parte, el artículo 4.°, 1, g), de la Ley 26/1984, de 19 de julio, General para la Defensa de los Consumidores y Usuarios («Boletín Oficial del Estado» del 24), establece como parte integrante de aquellas reglamentaciones técnico-sanitarias, entre otros extremos, «los métodos oficiales de análisis, toma de muestras, control de calidad e inspección», de los productos citados. Y el artículo 39.1 de la misma Ley establece, entre otras cosas, que «corresponderá a la Administración del Estado» «elaborar y aprobar ... las Reglamentaciones técnico-sanitarias...».

De estos preceptos, tomados conjuntamente, parece deducirse un apoyo legal suficiente para que el Estado regule los métodos oficiales de análisis otorgándoles el carácter de norma básica.

No obstante y con independencia de los citados preceptos con rango de ley formal, el conjunto de la jurisprudencia sentada por el propio Tribunal Constitucional relativa, entre otros extremos, a los principios de «unidad de mercado», «a las condiciones básicas que garanticen la igualdad de todos los españoles» y, en particular, en su «derecho a la salud» o a la «libre circulación de bienes en todo el territorio español», se considera que constituye un apoyo legal aún más firme, si se piensa que la sanción de unos métodos únicos y uniformes, que sirvan de pauta aplicable al análisis de los productos alimenticios y a los indirectamente relacionados con ellos por parte de todas las Administraciones Públicas, en todo el territorio nacional y que, al mismo tiempo, permita homologar los resultados obtenidos con el resto de los países comunitarios, debe reservarse al Estado como competencia exclusiva.

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Economía y Hacienda; de Industria y Energía; de Agricultura, Pesca y Alimentación, y de Sanidad y Consumo, previo informe preceptivo de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria y oídos los representantes de los sectores afectados,

Este Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, dispone:

Artículo 1.° Se aprueban como oficiales los métodos de análisis para determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana, que se citan en el anexo adjunto a la presente Orden.

Art. 2.° Cuando no existan métodos oficiales para determinados análisis y hasta tanto los mismos sean aprobados por el órgano competente y previamente informados favorablemente por la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, podrán ser utilizados los aprobados por los Organismos nacionales o internacionales de reconocida solvencia.

DISPOSICION ADICIONAL

Lo dispuesto en la presente Orden, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana, se considerará norma básica, en virtud de lo establecido en el artículo 149.1, primera y decimosexta, de la Constitución Española.

DISPOSICION DEROGATORIA

Quedan derogadas las disposiciones de igual o inferior rango que se opongan a la presente Orden y, en particular, los métodos coincidentes que figuran en las Ordenes de 31 de enero de 1977 («Boletín Oficial del Estado» del 14 al 27 de julio), 31 de julio de 1979 («Boletín Oficial del Estado» de 29 y 30 de agosto), 17 de septiembre de 1981 («Boletín Oficial del Estado» de 14 de octubre) y 1 de diciembre de 1981 («Boletín Oficial del Estado» de 20 de enero de 1982).

Madrid, 26 de enero de 1989.

ZAPATERO GOMEZ

Excmos. Sres. Ministros de Economía y Hacienda; de Industria y Energía; de Agricultura, Pesca y Alimentación, y de Sanidad y Consumo.

ANEXO

Métodos de análisis de determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana

INDICE

0. Preparación de la muestra para el análisis químico y consideraciones generales.
1. Extracto seco.
2. Humedad.
3. Materia grasa (método Rose-Gottlieb).
4. Materia grasa (método Rose-Gottlieb).
5. Sacarosa (método polarimétrico).
6. Acido láctico y lactatos.
7. Actividad de la Fosfatasa (método de Sanders y Sager, modificado).
8. Actividad de la Fosfatasa (método Aschaffenburg y Mullen).

0. Preparación de la muestra para el análisis químico y consideraciones generales

0.1 *Preparación de la muestra:*

0.1.1 Leche evaporada rica en grasa.
Leche evaporada entera o leche evaporada.
Leche evaporada semidesnatada o parcialmente desnatada.
Leche evaporada desnatada.

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

0.1.2 Leche condensada o leche entera condensada.
Leche condensada semidesnatada.
Leche condensada desnatada.

Botes:

Calentar el bote cerrado al baño María de 30 a 40 grados centígrados durante unos treinta minutos. Abrir el bote y mezclar cuidadosamente su contenido con una espátula o con una cuchara, efectuando movimientos ascendentes, descendentes y circulares, con el fin de obtener una íntima mezcla de las capas superiores e inferiores con el conjunto del contenido. Asegurarse de que los restos de leche adheridos al casco y al fondo del bote se han mezclado con la muestra. Siempre que sea posible, transvasar el contenido a un segundo recipiente dotado de un sistema de cierre estanco. Cerrar el recipiente y conservar en lugar fresco.

Tubos:

Cortar el fondo y transvasar el contenido a un recipiente dotado de cierre estanco. Después cortar el tubo en el sentido de su longitud, despegar todas las materias adheridas al interior del tubo y mezclarlas cuidadosamente con el resto del contenido. Conservar el recipiente en lugar fresco.

0.1.3 Leche en polvo rica en grasa o extragrasa.
Leche en polvo entera o leche entera en polvo.
Leche en polvo parcialmente desnatada o semidesnatada.
Leche en polvo desnatada o leche desnatada en polvo.

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

0.2 *Reactivos:*

Agua:

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

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

Productos químicos:

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

0.3 *Equipo:*

Lista de aparatos:

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

Balanza analítica:

El término «balanza analítica» hace referencia a una balanza capaz de pesar con precisión mínima de 0,1 miligramos.

0.4 *Expresión de los resultados:*

Cálculo del porcentaje:

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

Número de cifras significativas:

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

0.5 *Redacción del acta de la prueba:*

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

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

Método 1: Extracto seco

(Estufa)

1.1 *Principio:*

Se entiende por extracto seco de la leche evaporada, de la leche concentrada, o de la leche condensada, el extracto seco determinado por el método descrito a continuación.

Una cantidad conocida de la muestra se diluye con agua, luego se mezcla con arena y se deseca a una temperatura de 99 ± 1 grado centígrado. La masa obtenida tras desecación constituye la masa de extracto seco. El extracto seco se expresa en porcentaje de la masa de la muestra.

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

Leche evaporada rica en grasa.
Leche evaporada entera o leche evaporada.
Leche evaporada semidesnatada o parcialmente desnatada.
Leche evaporada desnatada.
Leche concentrada rica en materia grasa (no existe).
Leche concentrada entera o leche concentrada.
Leche concentrada semidesnatada.
Leche concentrada desnatada.
Leche condensada.
Leche condensada semidesnatada.
Leche condensada desnatada.

1.2 *Material y aparatos:*

1.2.1 Balanza analítica.

1.2.2 Cápsulas metálicas preferentemente de níquel, de aluminio o de acero inoxidable. Las cápsulas han de estar dotadas de tapas que se adapten perfectamente pero que puedan ser fácilmente levantadas. Las dimensiones más idóneas son: Diámetro, de 60 a 80 milímetros; profundidad, de unos 25 milímetros.

1.2.3 Estufas de desecación a presión atmosférica, bien ventiladas y controladas por termostato, con la temperatura regulada a 99 ± 1 grado centígrado. es muy importante que la temperatura del conjunto de la estufa sea uniforme.

1.2.4 Desecador, lleno de gel de sílice activado recientemente o de un desecante equivalente.

1.2.5 Varillas de vidrio, una de cuyas extremidades será plana y de una longitud similar a las dimensiones interiores de las cápsulas metálicas (1.2.2).

1.2.6 Baño de agua hirviendo.

1.3 *Reactivos:*

Arena de cuarzo o arena de mar (tamaño de los granos: 0,18-0,5 milímetros, tratada con ácido clorhídrico, pasada a través de un tamiz de 500 micras y retenida por un tamiz de 180 micras). Ha de corresponder al test de control que se indica a continuación:

Calentar unos 25 gramos de arena durante dos horas en la estufa (punto 1.2.3), tal como se indica en los puntos 1.4.1 a 1.4.3. Añadir 5 mililitros de agua, calentar de nuevo en la estufa durante dos horas, enfriar y volver a pesarlos. La diferencia entre las dos pesadas consecutivas no ha de ser superior a 0,5 miligramos.

Llegado el caso, tratar la arena durante tres días con ácido clorhídrico al 25 por 100; mezclar de vez en cuando. Lavarla con agua hasta que desaparezca la reacción ácida o hasta que el agua del lavado esté exenta del cloruro. Secarla a 160 grados centígrados y repetir el test tal como se indica anteriormente.

1.4 *Procedimiento:*

1.4.1 Colocar en la cápsula (punto 1.2.2) unos 25 gramos de arena (punto 1.3) y una varilla de vidrio (punto 1.2.5).

1.4.2 Calentar la cápsula, la tapa y el contenido –con la tapa levantada–, durante dos horas en la estufa (punto 1.2.3).

1.4.3 Colocar de nuevo la tapa en la cápsula y pasar ésta al desecador (punto 1.2.4). Dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar con una precisión mínima de 0,1 miligramos (M_0).

1.4.4 Inclinar la tapa, amontonando la arena en un lado de la cápsula. Introducir en el espacio libre que queda, aproximadamente, 1,5 gramos de la muestra si se trata de leche condensada y 3 gramos si se trata de leche evaporada y leche concentrada. Volver a colocar la tapa y pesar con una precisión mínima de 0,1 miligramos (M_1).

1.4.5 Retirar la tapa. Añadir 5 mililitros de agua y mezclar los líquidos con la varilla de vidrio (punto 1.2.5), luego la arena y la parte líquida. Dejar la varilla en la mezcla.

1.4.6 Colocar la cápsula en el baño de agua (punto 1.2.6) hasta que el agua se evapore (generalmente unos veinte minutos). Remover la mezcla de vez en cuando con la varilla para que la masa se airee bien y no se aglutine tras la desecación. Colocar la varilla en el interior de la cápsula.

1.4.7 Colocar la cápsula y la tapa durante una hora y treinta minutos en la estufa.

1.4.8 Volver a poner la tapa. Transferir la cápsula al desecador y dejarla enfriar hasta temperatura ambiente. Pesar con una precisión mínima de 0,1 miligramos.

1.4.9 Destapar la cápsula y calentarla, junto con su tapa, durante una hora en la estufa.

1.4.10 Repetir la operación del punto 1.4.8.

1.4.11 Repetir las operaciones descritas en los puntos 1.4.9 y 1.4.8, **hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 miligramos o que aumente la masa. En el punto 1.5 utilizar la pesada más baja (M_3).**

1.5 *Cálculos:*

El contenido en extracto seco, expresado en porcentaje de la masa de muestra, se indica según la fórmula:

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

en donde:

M_0 = masa, en gramos, de la cápsula, de su tapa, de la arena y de la varilla tras la operación del punto 1.4.3.

M_1 = masa, en gramos, de la tapa, de la cápsula, de la arena, de la varilla y de la muestra tras la operación del punto 1.4.4.

M_2 = masa, en gramos, de la tapa, de la cápsula, de la arena, de la varilla y de la muestra desecada, tras la operación del punto 1.4.11.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas, efectuadas simultánea o inmediatamente una después de otra por el mismo analista de la misma muestra y en las mismas condiciones, no ha de exceder 0,2 gramos de extracto seco por 100 gramos de producto.

1.5.1 Cálculo del contenido en extracto seco total y del contenido en extracto seco no graso en la leche.

El contenido en extracto seco lácteo de los distintos tipos de leche condensada viene dado por a – b, siendo:

a = el contenido en extracto seco total (obtenido según el método 1).
b = el contenido en sacarosa (obtenido según el método 5).

El contenido en extracto seco lácteo no graso de los distintos tipos de leche condensada viene dato por a – b – c, siendo:

a = el contenido en extracto seco total (obtenido según el método 1).
b = el contenido en sacarosa (obtenido según el método 5).
c = el contenido en materia grasa (obtenido según el método 3).

El contenido en extracto seco no graso de los distintos tipos de leche evaporada y concentrada viene dado por a - c, siendo:

a = el contenido en extracto seco total (obtenido según el método 1).
c = el contenido en materia grasa (obtenido según el método 3).

1.6 *Referencias:*

Primera Directiva de la Comisión de 13 de noviembre de 1979 (79/1067/CEE); «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327/29, de 24 de diciembre.

Método 2: Humedad

(Estufa)

2.1 *Principio:*

Se entiende por humedad la pérdida de masa durante el proceso de desecación determinado por el método descrito a continuación.

La masa residual de la muestra se determina tras desecación a presión atmosférica en una estufa a 102 ± 1 grados centígrados hasta obtención de una masa constante. La pérdida de masa se calcula en porcentaje de la masa de muestra.

Este método permite determinar la pérdida de masa durante el proceso de desecado de los tipos de leche citados a continuación:

Leche en polvo rica en grasas o extragrasa.
Leche en polvo entera o leche entera en polvo.
Leche en polvo parcialmente desnatada o semidesnatada.
Leche en polvo desnatada o leche desnatada en polvo.

2.2 *Material y aparatos:*

2.2.1 Balanza analítica.

2.2.2 Cápsulas, preferentemente de vidrio, de níquel, de aluminio o de acero inoxidable. Las cápsulas han de estar dotadas de tapas que se adapten perfectamente pero que puedan ser fácilmente levantadas. Las dimensiones más idóneas son: Diámetro, de 60 a 80 milímetros; profundidad, de unos 25 centímetros.

2.2.3 Estufa a presión atmosférica, bien ventilada y controlada por termostato, con la temperatura regulada a 102 ± 1 grado centígrado. Es muy importante que la temperatura del conjunto de la estufa sea uniforme.

2.2.4 Desecador, lleno con gel de sílice activado recientemente o de un desecante equivalente.

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

2.3 *Procedimiento:*

2.3.1 Quitar la tapa de la cápsula (punto 2.2.2) y colocar tapa y cápsula en la estufa (punto 2.2.3) durante una hora.

2.3.2 Volver a poner la tapa, transferir la cápsula al desecador (punto 2.2.4) y dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente; pesar con una precisión de 0,1 miligramos (M_0).

2.3.3 Colocar en la cápsula unos dos gramos de muestra de leche en polvo, poner la tapa sobre la cápsula y proceder rápidamente a pesar la cápsula equipada de su tapa con una precisión de 0,1 miligramos (M_1).

2.3.4 Retirar la tapa y colocar cápsula y tapa durante dos horas en la estufa.

2.3.5 Poner de nuevo la tapa, transferir la cápsula tapada al desecador y dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente; pesar rápidamente con una precisión de 0,1 miligramos.

2.3.6 Destapar la cápsula y calentar, junto con su tapa, durante una hora en la estufa.

2.3.7 Repita la operación del punto 2.3.5.

2.3.8 Repetir las operaciones de los puntos 2.3.6 y 2.3.5 hasta que dos pesadas no difieran en más de 0,5 miligramos o aumente la masa. En el punto 2.4 utilizar la pesada más baja (M_2).

2.4 *Cálculos:*

Calcular la pérdida de masa de la muestra durante el proceso de desecación, expresada en porcentaje de la masa, utilizando la fórmula:

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

en donde:

M_0 = masa, en gramos, de la cápsula y de su tapa, tras la operación del punto 2.3.2.

M_1 = masa, en gramos, de la cápsula, de su tapa y de la muestra, tras la operación del punto 2.3.3.

M_2 = masa, en gramos, de la cápsula, de la tapa y de la muestra final, tras la operación del punto 2.3.5.

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

2.5 *Referencias:*

Primera Directiva de la Comisión de 13 de noviembre de 1979 (79/1067/CEE); «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327/29, de 24 de diciembre).

Método 3: Materia grasa

(Método Rose-Gottlieb)

3.1 *Principio:*

Se entiende por contenido en materia grasa de los distintos tipos de leche evaporada, leche concentrada o de leche condensada, al contenido en materia grasa determinado por el método descrito a continuación.

El contenido en materia grasa se determina por extracción de la materia grasa de una solución amoniacal-alcohólica de la muestra con ayuda de éter etílico y de éter de petróleo, evaporación de los disolventes, pesada de los residuos y cálculo en porcentaje de la muestra, según el método Rose-Gottlieb.

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

Leche evaporada rica en grasa.
Leche evaporada entera o leche evaporada.
Leche evaporada semidesnatada o parcialmente desnatada.
Leche evaporada desnatada.
Leche concentrada rica en materia grasa (no existe).
Leche concentrada entera o leche concentrada.
Leche concentrada semidesnatada.
Leche concentrada desnatada.
Leche condensada.
Leche condensada semidesnatada.
Leche condensada desnatada.

3.2 *Material y aparatos:*

3.2.1 Balanza analítica.

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

3.2.3 Matraces de fondo plano y pared delgada, de 150 a 250 mililitros de capacidad.

3.2.4 Estufa de desecación a presión atmosférica, bien ventilada, controlada por termostado (temperatura a 102 ± 1 grado centígrado).

3.2.5 Gránulos destinados a facilitar la ebullición, exentos de materia grasa, no porosos, no desmenuzables, como por ejemplo perlas de vidrio o trocitos de carburo de silicio (el empleo de estos gránulos es facultativo; ver al respecto el punto 3.4.2.1).

3.2.6 Sifón correspondiente a los tubos de extracción.

3.2.7 Centrífuga.

3.3 *Reactivos:*

Todos los reactivos han de conformarse con las condiciones requeridas en la prueba en blanco (punto 3.4.1). Llegado el caso, podrá destilarse de nuevo los reactivos en presencia de 1 gramo de grasa de mantequilla por 100 mililitros de disolvente.

3.3.1 Solución de amoniaco, aproximadamente 25 por 100 (m/m) de NH_3 (densidad a 20 grados centígrados, unos 0,91 gramos por mililitro).

3.3.2 Etanol a 96 ± 2 por 100 (v/v) o, en su ausencia, etanol desnaturalizado con metanol, etilmetilcetona o éter de petróleo.

3.3.3 Eter etílico, exento de peróxidos.

Nota 1: Para asegurarse de que el éter etílico está exento de peróxidos, añadir a 10 mililitros de éter etílico contenidos en una pequeña probeta con tapón, de vidrio, enjuagada previamente con un poco de éter etílico, 1 mililitro de una solución con un 10 por 100 de yoduro de potasio, recientemente preparada. Agitar y dejar reposar durante un minuto. No ha de aparecer coloración amarilla alguna en ninguna de las dos capas.

Nota 2: El éter etílico puede ser mantenido exento de peróxidos adicionando una hoja de cinc húmeda previamente sumergida durante un minuto en una solución ácida diluida de sulfato de cobre y posteriormente lavada con agua. Para un litro de éter etílico, utilizar unos 8.000 milímetros cuadrados de hoja de cinc, cortada en bandas suficientemente largas para llegar a la mitad del recipiente, como mínimo.

3.3.4 Eter de petróleo, de punto de ebullición entre 30 y 60 grados centígrados.

3.3.5 Mezcla de disolventes, preparada inmediatamente antes de su empleo y mediante la mezcla de igual volumen de éter etílico (punto 3.3.3) y de éter de petróleo (punto 3.3.4). (Se puede sustituir la mezcla de disolventes, siempre que sea indicado, por el éter etílico o por el éter de petróleo.)

3.4 *Procedimiento:*

3.4.1 Prueba en blanco:

Al tiempo que se efectúa la determinación de la materia grasa de la muestra, efectuar una prueba en blanco con 10 mililitros de agua utilizando el mismo tipo de aparato de extracción, los mismos reactivos en las mismas proporciones y el mismo procedimiento que el descrito a continuación, salvo el punto 3.4.2.2. Si el valor de la prueba en blanco es superior a 0,5 miligramos, habrá que comprobar la pureza de los reactivos y en el caso de que sean impuros habrán de ser purificados o sustituidos.

3.4.2 Determinación:

3.4.2.1 **Secar el matraz (punto 3.2.3) [después de haber depositado los gránulos (punto 3.2.5), para facilitar una ebullición moderada durante la evaporación de los disolventes] en la estufa (punto 3.2.4) durante una** media hora a una hora. Dejar enfriar el matraz hasta que adquiera la temperatura ambiente y pesar el matraz ya enfriado, con una precisión de 0,1 miligramos.

3.4.2.2 Agitar la muestra preparada de 5 gramos y pesar inmediatamente después con una precisión de 1 miligramo, directamente o por diferencia, 4 gramos de leche evaporada o de leche concentrada o 2 a 2,5 gramos de leche condensada en el tubo de extracción (punto 3.2.2). Añadir agua hasta un volumen de 10,5 mililitros y agitar suavemente calentando al mismo tiempo ligeramente (40 a 50 grados centígrados), hasta la total dispersión del producto. La muestra ha de estar totalmente dispersa, ya que en caso contrario habrá de repetir la determinación.

3.4.2.3 Añadir 1,5 mililitros de la solución de amoníaco (25 por 100) (punto 3.3.1) o un volumen correspondiente de una solución más concentrada y mezclar convenientemente.

3.4.2.4 Añadir 10 mililitros de etanol (punto 3.3.2) y mezclar los líquidos, suave pero totalmente, en el tubo de extracción. Enfriar convenientemente, si es necesario, el tubo bajo el agua corriente.

3.4.2.5 Añadir 25 mililitros de éter etílico (punto 3.3.3). Cerrar el tubo, agitar enérgicamente, moviendo varias veces, durante un minuto.

3.4.2.6 Retirar el tapón con precaución y añadir 25 mililitros de éter de petróleo (punto 3.3.4) utilizando los primeros mililitros para enjuagar el tapón y el interior del cuello del tubo y dejando que se deslicen los líquidos de enjuague al interior del aparato. Cerrar el tubo volviendo a colocar el tapón, agitar e invertir varias veces durante treinta segundos. Si no se prevé centrifugado durante la operación indicada en el punto 3.4.2.7, no agitar demasiado enérgicamente.

3.4.2.7 Dejar reposar el tubo hasta que la capa líquida superior quede transparente y se separe nítidamente de la fase acuosa. Se puede realizar también la separación con ayuda de una centrífuga adecuada (punto 3.2.7).

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

3.4.2.8 Retirar el tapón y enjuagarlo, así como el interior del cuello del tubo, con unos mililitros de mezcla de solventes (punto 3.3.5) y dejar que los líquidos del enjuague se deslicen al interior del aparato. Trasvasar con mucho cuidado, lo más completamente posible, la capa superior al matraz (punto 3.4.2.1) mediante decantación o con ayuda de un sifón (punto 3.2.6).

Nota: Si el trasvase no se realiza con ayuda de un sifón, puede ser necesario añadir un poco de agua para elevar el nivel de separación de las dos capas con el fin de facilitar la decantación.

3.4.2.9 Enjuagar el interior y el exterior del cuello del tubo o la punta y la parte inferior del sifón con unos mililitros de la mezcla de disolventes. Dejar que los líquidos del enjuague del exterior del tubo se deslicen al interior del matraz y que los del interior del cuello y del sifón se deslicen al interior del tubo de extracción.

3.4.2.10 Proceder a una segunda extracción repitiendo las operaciones descritas en los puntos 3.4.2.5 a 3.4.2.9, incluido, pero utilizando únicamente 15 mililitros de éter etílico y 15 mililitros de éter de petróleo.

3.4.2.11 Efectuar una tercera extracción procediendo tal como se indica en el punto 2.4.2.10, pero sin realizar el enjuague final (punto 3.4.2.9).

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

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

3.4.2.13 Cuando ya no exista olor alguno de disolvente, calentar el matraz inclinado, durante una hora, en la estufa.

3.4.2.14 Retirar el matraz de la estufa, dejar enfriar hasta que adquiera la temperatura ambiente y pesar con precisión de 0,1 miligramos.

3.4.2.15 Repetir las operaciones de los puntos 3.4.2.13 y 3.4.2.14 calentando a intervalos de treinta a sesenta minutos hasta que dos pesadas consecutivas no difieran en más de 0,5 miligramos o que aumente la masa. En el punto 3.5 utilizar la pesada tomando el valor más bajo (M_1).

3.4.2.16 Añadir de 15 a 25 mililitros de éter de petróleo para verificar si la materia extraída es totalmente soluble. Calentar ligeramente y agitar el disolvente mediante un movimiento circular hasta que se disuelva toda la materia grasa.

3.4.2.16.1 Si la materia extraída es totalmente soluble en éter de petróleo, la masa de materia grasa es la diferencia entre la pesada del punto 3.4.2.1 y la pesada del punto 3.4.2.15.

3.4.2.16.2 Si aparecieran materias insolubles o siempre en caso de duda, extraer completamente la materia grasa contenida en los matraces mediante repetidos lavados con éter de petróleo caliente, dejando que la materia no disuelta se deposite antes de cada decantación. Enjuagar tres veces el exterior del cuello del matraz. Calentar el matraz inclinado, durante una hora, en la estufa y dejar enfriar tal como se indicó anteriormente (punto 3.4.2.1) hasta que adquiera la temperatura ambiente; pesar con una precisión de 0,1 miligramos. La masa de la materia grasa es la diferencia entre la pesada del punto 3.4.2.15 y esta pesada final.

3.5 *Cálculos:*

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

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

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

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

en donde:

M_1 = masa, en gramos, del matraz M conteniendo la materia grasa tras la operación del punto 3.4.2.15.

M_2 = masa, en gramos, del matraz M tras la operación del punto 3.4.2.1 o, en caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 3.4.2.16.2.

B_1 = masa, en gramos, del matraz B de la prueba en blanco tras la operación del punto 3.4.2.15.

B_2 = masa, en gramos, del matraz B, tras la operación del punto 3.4.2.1 o, en el caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 3.4.2.16.2.

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

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

3.6 *Referencias:*

Primera Directiva de la Comisión de 13 de noviembre de 1979 (79/1067/CEE); «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327/29, de 24 de diciembre de 1979.

Método 4: Materia grasa

(Método Rose-Gottlieb)

4.1 *Principio:*

Se entiende por contenido en materia grasa de los distintos tipos de leche en polvo al contenido en materia grasa determinado por el método descrito a continuación.

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

Este método permite determinar el contenido en materia grasa de las siguientes leches:

Leche en polvo rica en grasa o extragrasa.
Leche en polvo entera o leche entera en polvo.
Leche en polvo parcialmente desnatada o semidesnatada.
Leche en polvo desnatada o leche desnatada en polvo.

4.2 *Material y aparatos:*

4.2.1 Balanza analítica.

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

4.2.3 Matraces de fondo plano y pared delgada, de 150 a 250 mililitros de capacidad.

4.2.4 Estufa de desecación a presión atmosférica, bien ventilada, controlada por termostato (temperatura a 102 ± 1 grado centígrado).

4.2.5 Gránulos destinados a facilitar la ebullición, exentos de materia grasa, no porosos, no desmenuzables, por ejemplo perlas de vidrio o trocitos de carburo de silicio (el empleo de estos gránulos es facultativo; ver al respecto el punto 4.4.2.1).

4.2.6 Baño de agua a 60-70 grados centígrados.

4.2.7 Sifón correspondiente a los tubos de extracción.

4.2.8 Centrífuga.

4.3 *Reactivos:*

Todos los reactivos han de conformarse con las condiciones requeridas en la prueba en blanco (punto 4.4.1). Llegado el caso, podrá destilarse de nuevo los reactivos en presencia de 1 g. de grasa de mantequilla por 100 ml. de disolvente.

4.3.1 Solución de amoníaco aproximadamente 25 por 100 (m/m) de NH_3 (densidad a 20° C, unos 0,91 g/ml) una solución más concentrada de una concentración conocida.

4.3.2 Etanol, a 96 ± 2 por 100 (v/v) o, en su ausencia, etanol desnaturalizado con metanol, etilmetilcetona o éter de petróleo.

4.3.3 Eter etílico, exento de peróxidos.

Nota 1. Para asegurarse de que el éter etílico está exento de peróxidos, añadir a 10 ml. de éter etílico contenidos en una pequeña probeta con tapón de vidrio, enjuagada previamente con un poco de éter etílico, 1 ml. de una solución con un 10 por 100 de yoduro de potasio, recientemente preparada. Agitar y dejar reposar durante 1 minuto. No ha de aparecer coloración amarilla alguna en ninguna de las dos capas.

Nota 2. El éter etílico puede ser mantenido exento de peróxidos adicionando una hoja de cinc húmeda previamente sumergida durante un minuto en una solución ácida diluida de sulfato de cobre y posteriormente lavada con agua. para 1 litro de éter etílico utilizar unos 8.000 mm^2 de hoja de cinc, cortada en bandas suficientemente largas para llegar a la mitad del recipiente como mínimo.

4.3.4 Eter de petróleo de punto de ebullición entre 30 y 60° C.

4.3.5 Mezcla de disolventes, preparada inmediatamente antes de su empleo, mediante la mezcla de igual volumen de éter etílico (punto 4.3.3) y de éter de petróleo (punto 4.3.4) (se puede de sustituir la mezcla de disolventes, siempre que sea indicado, por el éter etílico o por el éter de petróleo).

4.4 *Procedimiento:*

4.4.1 Prueba en blanco:

Al tiempo que se efectúa la determinación de la materia grasa de la muestra, efectuar una prueba en blanco con 10 ml. de agua utilizando el mismo tipo de tubo de extracción, los mismos reactivos en las mismas proporciones y el mismo procedimiento que el descrito a continuación, salvo el punto 4.4.2.2. Si el valor de la prueba en blanco es superior a 0,5 mg., hará que comprobar la pureza de los reactivos, en caso de que sean impuros habrán de ser purificados o sustituidos.

4.4.2 Determinación.

4.4.2.1 Secar el tubo (punto 4.2.3) después de haber depositado los gránulos (punto 4.2.5) para facilitar una ebullición moderada durante la evaporación de los disolventes en la estufa (punto 4.2.4) durante una media hora a una hora. Dejar enfriar el matraz hasta que adquiera la temperatura ambiente y pesar el matraz ya enfriado, con una precisión de 0,1 mg.

4.4.2.2 En el tubo de extracción (punto 4.2.2) pesar con una precisión de 1 mg., bien directamente bien por diferencia, aproximadamente 1 g. de leche en polvo o 1,5 g. de leche semidesnatada en polvo o de leche desnatada en polvo. Añadir 10 ml. de agua y agitar hasta la total dispersión de la leche (en algunas muestras habrá que proceder a calentarlas).

4.4.2.3 Añadir 1,5 ml. de la solución de amoníaco 25 por 100 (punto 4.3.1) o un volumen correspondiente de una solución más concentrada y calentar al baño de agua (4.2.6) durante quince minutos, de 60 a 70° C, agitando de vez en cuando. Posteriormente enfriarlo, por ejemplo mediante agua corriente.

4.4.2.4 Añadir 10 ml. de etanol (punto 4.3.2) y mezclar los líquidos suave, pero totalmente, en el tubo de extracción. Enfriar, convenientemente, si es necesario, el tubo bajo el agua corriente.

4.4.2.5 Añadir 25 ml. de éter etílico (punto 4.3.3). Cerrar el tubo, agitar enérgicamente invirtiendo varias veces durante un minuto.

4.4.2.6 Retirar el tapón con precaución y añadir 25 ml. de éter de petróleo (punto 4.3.4) utilizando los primeros mililitros para enjuagar el tapón y el interior del cuello del tubo y dejando que se deslicen los líquidos de enjuague al interior del aparato. Cerrar el tubo volviendo a colocar el tapón, agitar e invertir varias veces durante treinta segundos. Si no se prevé centrifugado durante la operación indicada en el punto 4.4.2.7, no agitar demasiado enérgicamente.

4.4.2.7 Dejar reposar el tubo hasta que la capa líquida superior quede transparente y se separe nítidamente de la fase acuosa. Se puede realizar también la separación con ayuda de una centrífuga adecuada (punto 4.2.7).

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

4.4.2.8 Retirar el tapón y enjuagarlo, así como el interior del cuello del tubo con unos mililitros de la mezcla de disolventes (punto 4.3.5) y dejar que los líquidos del enjuague se deslicen al interior del tubo. Trasvasar con mucho cuidado, lo más completamente posible, la capa superior al matraz (punto 4.4.2.1) mediante decantación o con ayuda de un sifón (punto 4.2.6).

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

4.4.2.9 Enjuagar el interior y el exterior del cuello del tubo o la punta y la parte inferior del sifón con unos mililitros de la mezcla de disolventes. Dejar que los líquidos del enjuague del exterior del tubo se deslicen al interior del matraz y que los del interior del cuello y del sifón se deslicen al interior del tubo de extracción.

4.4.2.10 Proceder a una segunda extracción repitiendo las operaciones descritas en los puntos 4.4.2.5 a 4.4.2.9 incluído, pero utilizando únicamente 15 ml. de éter etílico y 15 ml. de éter de petróleo.

4.4.2.11 Efectuar una tercera extracción procediendo tal como se indica en el punto 4.4.2.10, pero sin realizar el enjuague final (punto 4.4.2.9).

Nota.–En el caso de leche desnatada en polvo no es necesario realizar la tercera extracción.

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

4.4.2.13 Cuando ya no exista olor alguno de disolvente, calentar el matraz, inclinado, durante una hora, en la estufa.

4.4.2.14 Retirar el matraz de la estufa, dejar enfriar hasta que adquiera la temperatura ambiente y pesar con precisión de 0,1 mg.

4.4.2.15 Repetir las operaciones de los puntos 4.4.2.13 y 4.4.2.14 calentado a intervalos de treinta a sesenta minutos hasta que dos pesadas no difieran en más de 0,5 mg. o que aumente la masa. En el punto 4.5 utilizar la pesada tomando el valor más bajo (M_1).

4.4.2.16 Añadir de 15 a 25 ml. de éter de petróleo para verificar si la materia extraída es totalmente soluble. Calentar ligeramente y agitar el disolvente mediante un movimiento circular hasta que se disuelva toda la materia grasa.

4.4.2.16.1 Si la materia extraída es totalmente soluble en éter de petróleo, la masa de materia grasa es la diferencia entre la pesada del punto 4.4.2.1 y la pesada del punto 4.4.2.15.

4.4.2.16.2 Si aparecieran materias insolubles o siempre en caso de duda, extraer completamente la materia grasa contenida en los matraces mediante repetidos lavados con éter de petróleo caliente, dejando que la materia no disuelta se deposite antes de cada decantación. Enjuague tres veces el exterior del cuello del matraz. Calentar el matraz, inclinado, durante una hora en la estufa y dejar enfriar tal como se indicó anteriormente (punto 4.4.2.1) hasta que adquiera la temperatura ambiente; pesar con una precisión de 0,1 mg. La masa de la materia grasa es la diferencia entre la pesada del punto 4.4.2.15 y esta pesada final.

4.5 *Cálculos:*

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

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

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

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

en donde:

M_1 = Masa, en gramos, del matraz M conteniendo la materia grasa tras la operación del punto 4.4.2.15.

M_2 = Masa, en gramos, del matraz M tras la operación del punto 4.4.2.1 o, en el caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 4.4.2.16.2.

B_1 = Masa, en gramos, del matraz B de la prueba en blanco tras la operación del punto 4.4.2.15.

B_2 = Masa, en gramos, del matraz B, tras la operación del punto 4.4.2.1 o, en el caso de que aparezcan materias insolubles o en caso de duda, tras la operación del punto 4.4.2.16.2.

S = Masa, en gramos, de la muestra utilizada.

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

4.6 *Referencias:*

Primera Directiva de la Comisión, de 13 de noviembre de 1979 (79/1067/CEE). «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327/29, de 24 de diciembre de 1979.

Método 5: Sacarosa (Método polarimétrico)

5.1 *Principio:*

El contenido en sacarosa de los distintos tipos de leche condensada es el determinado por el método que se describe a continuación.

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 restantes azúcares no son prácticamente hidrolizados. El contenido en sacarosa se deduce del cambio de poder rotatorio de la solución.

Para ellos se prepara un filtrado límpido de solución de muestra, sin mutarrotación debida a la lactosa, por tratamiento con amoníaco seguido de neutralización y posterior clarificación mediante adiciones consecutivas de soluciones de acetato de cinc y hexacianoferrato (II) de potasio.

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

Partiendo de los poderes rotatorios del líquido filtrado antes y después de la inversión, se calcula el contenido en sacarosa aplicando las fórmulas que se indican.

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

- Leche condensada o leche entera condensada.
- Leche condensada semidesnatada.
- Leche condensada desnatada.

Las muestras no han de contener azúcar invertido.

5.2 *Material y aparatos:*

5.2.1 Balanza analítica, sensibilidad 10 mg.

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

5.2.3 Polarímetro o sacarímetro.

5.2.3.1 Polarímetro con luz de sodio o luz verde de mercurio (lámpara de vapor de mercurio con prisma o pantalla Wraten especial, número 77 A), que permita lecturas con una precisión, como mínimo, igual a 0,05 grados de ángulo.

5.2.3.2 Sacarímetro con escala internacional, que utilice luz blanca que pasa a través de un filtro de 15 mm. de solución al 6 por 100 de dicromato de potasio o bien luz de sodio, y que permita la lectura con una precisión, como mínimo, igual a 0,1 grados de la escala sacarimétrica internacional.

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

5.3 *Reactivos:*

5.3.1 Solución de acetato de cinc 1 M:

Disolver 21,9 gramos de acetato de cinc cristalizado, [$Zn(C_2H_3O_2)_2.2H_2O$] y 3 mililitros de ácido acetico glacial en agua y completar hasta 100 mililitros.

5.3.2 Solución de hexacianoferrato (II) de potasio, 0,25 M: Disolver 10,6 gramos de hexacianoferrato (II) de potasio [$K_4(Fe(CN)_6).3H_2O$] en agua y completar hasta 100 mililitros.

5.3.3 Solución de ácido clorhídrico $6,35 \pm 0,20$ M (20 a 22 por 100) ó $5,0 \pm 0,2$ M (16 a 18 por 100).

5.3.4 Solución diluida de amoníaco $2,0 \pm 0,2$ M (3,5 por 100).

5.3.5 Solución diluida de ácido acético $2,0 \pm 0,2$ M (12 por 100).

5.3.6 Indicador azul de bromotimol, solución al 1 por 100 (m/v) en etanol.

5.4 *Procedimiento:*

5.4.1 Comprobación del método:

Para comprobar el método, los reactivos y los aparatos, realizar dos determinaciones aplicando el método descrito en 5.4.2 a mezclas de 100 gramos de leche y 18 gramos de sacarosa pura, o bien de 110 gramos de leche descremada y 18 gramos de sacarosa pura, equivalentes a 40 gramos de leche condensada conteniendo 45 por 100 de sacarosa. Calcular el contenido de sacarosa como se indica en el apartado 5.5, utilizando, en la fórmula 1, para M, F y P la cantidad de leche pesada y los porcentajes respectivos de materia grasa y proteínas de esta leche, y, en la fórmula 2, para M, la cifra de 40 gramos. La media de los dos resultados obtenidos no debe diferir del valor citado (45 por 100) en más de 0,2 por 100.

5.4.2 Determinación:

En un vaso de vidrio, pesar exactamente, con aproximación de 10 miligramos, unos 40 gramos de la muestra convenientemente mezclada. Añadir 50 mililitros de agua caliente (80 a 90°C) y mezclar cuidadosamente.

Trasvasar cuantitativamente la mezcla a un matraz aforado de 200 mililitros, enjuagar el vaso con sucesivas cantidades de agua a 60°C hasta que el volumen total sea de 120 a 150 mililitros. Mezclar y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Añadir 5 mililitros de la solución de amoníaco diluida (5.3.4). Mezclar de nuevo y dejar reposar durante quince minutos.

Neutralizar el amoníaco añadiendo una cantidad equivalente de la solución diluida de ácido acetico (5.3.5). Determinar previamente el volumen exacto necesario mediante valoración de la solución de amoníaco diluida utilizando azul de bromotimol como indicador (5.3.6). Mezclar a continuación.

Añadir, mezclando suavemente por rotación del matraz inclinado, 12,5 mililitros de solución de acetato de cinc (5.3.1).

De la misma manera que para la solución de acetato, añadir 12,5 mililitros de solución de hexacianoferrato (II) de potasio (5.3.2).

Llevar el contenido del matraz a 20°C y añadir agua (a 20°C) hasta el enrase.

Hasta este momento, todas las adiciones de agua o de reactivos deberán haberse realizado evitando que se formen burbujas y, por esta razón, todas las mezclas se habrán efectuado mediante rotación del matraz en vez de por agitación violenta. Si se observa la presencia de burbujas antes de enrasar a 200 mililitros, pueden ser eliminadas conectando el matraz con una bomba de vacío e imprimiéndole un movimiento de rotación.

Tapar el matraz con un tapón seco y mezclar íntimamente por agitación intensa.

Dejar reposar durante unos minutos, y a continuación filtrar a través del papel de filtro seco. Desechar los 25 primeros mililitros del líquido filtrado.

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

5.4.2.2 Inversión: Pipetear en un matraz aforado de 50 mililitros, 40 mililitros del líquido filtrado obtenido de la manera indicada anteriormente. Añadir 6,0 mililitros de ácido clorhídrico 6,35 M ó 7,6 mililitros de ácido clorhídrico 5,00 M.

Colocar el matraz en un baño de agua a 60°C durante quince minutos, estando sumergido el matraz hasta el nacimiento del cuello. Mezclar por rotación durante los cinco primeros minutos, durante los cuales el contenido deberá haber alcanzado la temperatura del baño. Enfriar hasta 20°C y enrasar con agua a 20°C; mezclar y dejar reposar durante una hora a esta temperatura.

5.4.2.3 Polarización tras la inversión.

Determinar el poder rotatorio de la solución invertida a $20 \pm 0,2$°C (cuando la temperatura T del líquido contenido en el tubo de polarización difiera de 20°C en más de 0,2°C durante la medición, se ha de aplicar la corrección de temperatura indicada en los puntos 5.5.1 y 5.5.2.

5.5 *Cálculos:*

5.5.1 Contenido en sacarosa:

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

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

$$2-S = \frac{D-1{,}25\ I}{Q} \times \frac{V-v}{V} \times \frac{V}{L \times M} \text{ por } 100$$

Siendo:

S = Contenido en sacarosa.
M = Masa de la muestra expresada en gramos.
F = Porcentaje de materia grasa de la muestra.
P = Porcentaje de proteínas (N×6,38) de la muestra.
V = Volumen en mililitros de la solución de la muestra antes de la filtración.
v = Corrección expresada en mililitros para el volumen del precipitado formado durante el proceso de clasificación.
D = Lectura polarimétrica directa (polarización antes de inversión).
I = Lectura polarimétrica tras la inversión.
L = Longitud en decímetros del tubo del polarímetro.
Q = Factor de inversión cuyos valores se indican a continuación.

Si se pesan exactamente 40 gramos de leche condensada y se utiliza un polarímetro de luz de sodio, con escala en grados de ángulo y un tubo de polarímetro de 2 decímetros de longitud a $20,0 \pm 0,1$°C, se puede calcular el contenido en sacarosa de las leches condensadas normales (C=9) mediante la siguiente fórmula:

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

Si se efectúa la medición de la polarización tras inversión a temperatura diferente de 20°C, los valores que se obtengan habrán de multiplicarse por:

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

5.5.2 Valores del factor de inversión Q:

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

Luz de sodio y polarímetro con escala en grados de ángulo:

$$Q = 0{,}8825 + 0{,}0006\ (C-9) - 0{,}0033\ (T-20)$$

Luz verde de mercurio y polarímetro con escala en grados de ángulo:

$$Q = 1{,}0392 + 0{,}0007\ (C-9) - 0{,}0039\ (T-20)$$

Luz blanca con filtro de dicromato y sacarímetro con escala sacarimétrica internacional:

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

En las fórmulas anteriores:

C = Porcentaje de azúcares totales en la solución invertida según la lectura polarimétrica.
T = Temperatura de la solución invertida durante la lectura en el polarímetro.

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

La corrección 0,006 (C–9) etc., sólo es exacta si C es aproximadamente igual a 9; dado que en el caso de la leche condensada normal C es aproximadamente 9, se puede despreciar esta corrección.

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

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

5.6 *Referencia:*

Primera Directiva de la Comisión de 13 de noviembre de 1979 (79/1067/CEE), «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número 327/29, de 24 de diciembre de 1979.

Método 6: Acido láctico y lactatos

6.1 *Principio:*

Se define como contenido en ácido láctico y lactatos de los distintos tipos de leche en polvo, el contenido en ácido láctico y lactatos determinado por el método especificado.

El método se basa en que previa eliminación de la materia grasa, las proteínas y la lactosa, el ácido láctico y los lactatos se transforman en acetaldehído que se determina colorimétricamente a 570 nm por reacción con p-hidroxidifenilo.

Aplicable a la determinación de ácido láctico y lactatos en los siguientes tipos de leche:

- Leche en polvo rica en grasa o extragrasa.
- Leche en polvo entera o leche entera en polvo.
- Leche en polvo parcialmente desnatada o semidesnatada.
- Leche en polvo desnatada o leche desnatada en polvo.

6.2 *Material y aparatos:*

6.2.1 Espectrofotómetro que permita la lectura a 570 nm.
6.2.2 Material de uso normal en laboratorios.

6.3 *Reactivos:*

6.3.1 Solución de sulfato de cobre.

Disolver 250 g de sulfato de cobre (II) pentahidrato ($CuSO_45H_2O$) en agua y diluir a 1.000 ml.

6.3.2 Suspensión de hidróxido de calcio.

Triturar 300 g de hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$ en un mortero con agua utilizando un total de 900 ml. La suspensión se debe preparar poco antes de su utilización.

6.3.3 Solución de ácido sulfúrico-sulfato de cobre.

Añadir 0,5 ml de solución (6.3.1) a 300 ml de ácido sulfúrico de concentración 95,5-97 por 100.

6.3.4 Solución de p-hidroxidifenilo.

Disolver agitando y calentando ligeramente 0,75 g de p-hidroxidifenilo ($C_6H_5C_6H_4OH$) en 5 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5 por 100. Diluir con agua hasta 50 ml en un matraz aforado. Conservar la solución en un frasco de vidrio topacio, al abrigo de la luz y en lugar fresco. No utilizar la solución si cambia el color o se enturbia. El período máximo de conservación es de setenta y dos horas.

6.3.5 Solución patrón.

Disolver poco antes de su empleo 0,1067 g de lactato de litio (CH_3 CHOH COOLi) en agua, y diluir hasta 1.000 ml. 1 ml de esta solución corresponde a 0.1 mg de ácido láctico.

6.3.6 Leche reconstruída patrón. Analizar previamente varias muestras de leche en polvo de alta calidad. Para la preparación de la curva de calibrado tomar la muestra que tenga menor contenido en ácido láctico (menos de 30 mg de ácido láctico por 100 g de materia seca desgrasada en cualquier caso). Seguir el procedimiento descrito en 6.4.2.

6.4 *Procedimiento:*

6.4.1 Prueba en blanco.

Efectuar una prueba en blanco con 30 ml de agua destilada como muestra y siguiendo el procedimiento descrito en 6.4.2. Si el resultado de la prueba en blanco frente a agua sobrepasa el equivalente de 20 mg de ácido láctico por 100 g de materia seca desgrasada, será necesario comprobar los reactivos y sustituir los que se encuentren alterados. Llevar a cabo la prueba en blanco al mismo tiempo que el análisis de las muestras.

6.4.2 Determinación.

6.4.2.1 Determinar el porcentaje de materia seca desgrasada de la muestra (a) y pesar 1.000 g/a-10 con precisión de 0,1 g. Añadir esta cantidad de muestra a 100 ml de agua y mezclar cuidadosamente.

6.4.2.2 Pipetear 5 ml de la solución obtenida a un matraz aforado de 50 ml y diluir con agua hasta 30 ml aproximadamente. Añadir lentamente y agitando 5 ml de la solución de sulfato de cobre (6.3.1) y dejar reposar diez minutos. Añadir lentamente y agitando 5 ml de la suspensión de hidróxido de calcio (6.3.2) y diluir a 50 ml con agua. Agitar vigorosamente, dejar reposar diez minutos y filtrar, desechando las primeras gotas del filtrado.

6.4.2.3 Pipetear 1 ml del filtrado a un tubo de ensayo. Añadir 6 ml de la solución de ácido sulfúrico-sulfato de cobre (6.3.3) y mezclar. Calentar en baño de agua hirviendo durante cinco minutos y enfriar hasta temperatura ambiente bajo corriente de agua. Añadir dos gotas de reactivo de p-hidroxidifenilo (6.3.4) y agitar vigorosamente. Sumergir el tubo en baño de agua a 30 ± 2 °C y mantenerlo durante quince minutos agitando de vez en cuando. Sumergir el tubo en baño de agua hirviendo durante noventa segundos y enfriar hasta temperatura ambiente bajo corriente de agua.

6.4.2.4 Medir la absorbancia a 570 nm con relación a la prueba en blanco durante las tres horas siguientes. Si la absorbancia es superior a la del punto más alto de la curba de calibrado, repetir la prueba utilizando una dilución adecuada del filtrado obtenido en (6.4.2.2).

6.4.3 Curva de calibrado.

6.4.3.1 Pipetear 5 ml de la lecha reconstituida (6.3.6) en cinco matrices aforados de 50 ml. Añadir a cada uno de los matraces 0, 1, 2, 3 y 4 ml de la solución patrón de lactato (6.3.5) correspondientes a 0, 20, 40, 60 y 80 mg de ácido láctico añadido por 100 g de materia seca desgrasada de leche en polvo. Diluir con agua hasta unos 30 ml y proceder según lo establecido en los apartados 6.4.2.2 y 6.4.2.4.

6.4.3.2 Medir la absorbancia a 570 nm con relación a la prueba en blanco.

6.4.3.3 Llevar las absorbancias a un diagrama en función de las cantidades añadidas de ácido láctico, es decir, 0, 20, 40, 60 y 80 mg, por 100 g de materia seca desgrasada. Ajustar la recta más adecuada y preparar la curva de calibrado desplazando dicha recta paralela a sí misma de manera que pase por el origen.

6.5 *Cálculos:*

A partir de la curva de calibrado, de la absorbancia medida en 6.4.2.4 y de la dilución efectuada en 6.4.2.4, calcular la concentración de ácido láctico expresada en mg de ácido láctico por 100 g de materia seca desgrasada.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de la otra por el mismo analista sobre la misma muestra, no podrá ser superior a 8 mg de ácido láctico por 100 g de materia seca desgrasada, en muestras con un contenido en ácido láctico de hasta 80 mg. Para valores superiores, dicha diferencia no podrá ser superior al 10 por 100 del valor más bajo.

6.6 *Referencia:*

Primera Directiva de la Comisión de 13 de noviembre de 1979 (79/1.067/CEE), «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327/29, de 24 de diciembre.

Método 7: Actividad de la fosfatasa (Método de Sanders y Sager, modificado)

7.1 *Principio:*

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

La actividad de la fosfatasa de la leche en polvo se determina por el poder de la fosfatasa de liberar el fenol de fenilfosfato disódico. Se mide la cantidad de fenol liberado en las condiciones prescritas, por la medida espectrofotométrica de la coloración, desarrollada con el reactivo de Gibbs.

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

- Leche en polvo rica en grasa o extragrasa.
- Leche en polvo entera o leche entera en polvo.
- Leche en polvo parcialmente desnatada o semidesnatada.
- Leche en polvo desnatada o leche desnatada en polvo.

7.2 *Material y aparatos:*

7.2.1 Balanza analítica.
7.2.2 Baño de agua con termostato a 37 °C ± 1 °C.
7.2.3 Espectrofotómetro que permita la lectura a longitud de onda de 610 nm.
7.2.4 Papel de filtro (Shcleicher y Schull 597, Whatman 42 o similar).
7.2.5 Baño de agua hirviendo.
7.2.6 Hoja de aluminio.

7.3 *Reactivos:*

7.3.1 Solución A.

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

Disolver 25 g de hidróxido de bario ($Ba(OH)_2.8H_2O$) en agua y diluir hasta 500 ml.

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

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

Agitar y enfriar la mezcla a temperatura ambiente.

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

Conservar la solución en recipiente bien cerrado. Antes de su uso, diluir la solución tampón con la misma cantidad de agua.

7.3.2 Solución B.

Tampón para el desarrollo del color.

Disolver 6 g de metaborato de sodio ($NaBO_2$) (o 12,6 g de $NaBO_2.4H_2O$) y 20 g de cloruro de sodio (NaCl) en agua y diluir hasta 1.000 ml.

7.3.3 Solución C.

Sustrato tamponado.

7.3.3.1 Disolver 0,5 de fenilfosfato disódico ($Na_2C_6H_3PO_4.H_2O$) en 4,5 ml de solución B (7.3.2). Añadir dos gotas de solución E (7.3.5) y dejar reposar durante 30 minutos. Extraer el color formado con 2,5 ml de alcohol butílico (7.3.10). Si fuese necesario, repetir la extracción del color. Tras separación, tirar el alcohol butílico. Esta solución puede conservarse algunos días en refrigerador. Desarrollar y extraer el color, una vez más, antes de su empleo.

7.3.3.2 Pipetear 1 ml de esta solución en un matraz aforado de 100 ml y añadir la solución A (7.3.1) hasta el enrase. Preparar el sustrato tamponado inmediatamente antes de su uso.

7.3.4 Solución D.

Precipitarse.

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

7.3.5 Solución E.

Reactivo de Gibbs.

Disolver 0,040 g de dibromo-2,6 quinona cloro-1,4 imida ($O.C_6H_2Br_2.NCl$) en 10 ml de etanol de 96 por 100. Conservar la solución en frasco de topacio en refrigerador. Desechar el reactivo cuando cambie de color.

7.3.6 Tampón de dilución de la coloración.

Diluir 10 ml de solución tampón B para desarrollo del color (7.3.2) con agua y completar hasta 100 ml.

7.3.7 Solución de sulfato de cobre.

Disolver 0,05 g de sulfato de cobre (II) ($CuSO_4.5H_2O$) en agua y completar a 100 ml.

7.3.8 Solución patrón de fenol.

Disolver 0,200 ± 0,001 g de fenol puro en agua y llevar a 100 ml en matraz aforado. Esta solución puede conservarse durante algunos meses en refrigerador. Diluir 10 ml de esta solución hasta 100 ml con agua. Esta solución diluida contiene 200 microgramos de fenol por ml y puede utilizarse para preparar soluciones más diluidas.

7.3.9 Agua destilada, hervida.
7.3.10 Alcohol n-butílico.

7.4 *Procedimiento:*

7.4.1 Precauciones a tomar.

7.4.1.1 Evitar la exposición directa a la luz del sol.

7.4.1.2 Limpiar perfectamente todo el material de vidrio, tapones y material de trasvase. Se recomienda enjuagarlos y hervirlos con agua o tratarlos por vapor.

7.4.1.3 Evitar el empleo de material plástico (tapones por ejemplo que pudieran contener fenol).

7.4.1.4 Evitar cuidadosamente todo indicio de saliva, puesto que ésta contiene fosfatasa.

7.4.2 Preparación de la muestra.

7.4.2.1 Disolver 10 g de la muestra, pesados con precisión de 0,1 g en 90 ml de agua. La temperatura de disolución del polvo no debe sobrepasar los 35 °C.

7.4.3 Determinación.

7.4.3.1 Introducir en cada uno de los dos tubos de ensayo 1 ml de leche reconstituida preparada según se indica en 7.4.2.1.

7.4.3.2 Calentar uno de los tubos en agua hirviendo durante dos minutos. Cubrir el tubo y el baño de agua (7.2.5) o, por ejemplo, un vaso de precipitados, con una hoja de aluminio (7.2.6) para que se caliente todo el tubo. Enfriar en agua fría a temperatura ambiente. Este tubo servirá para la prueba en blanco. A partir de este punto, tratar los dos tubos de idéntica manera.

7.4.3.3 Añadir 10 ml de la solución C (7.3.3). Mezclar y colocar los tubos en el baño de agua (7.2.2) a 37 °C.

7.4.3.4 Incubar durante sesenta minutos en el baño de agua, agitando de vez en cuando.

7.4.3.5 Inmediatamente después introducir los dos tubos en el baño de agua hirviendo y calentar durante dos minutos, y enfriar a temperatura ambiente con agua fría.

7.4.3.6 Añadir 1 ml de la solución D (7.3.4), mezclar y filtrar con papel de filtro seco; tirar las primeras porciones del filtrado hasta obtener un líquido nítido.

7.4.3.7 Introducir 5 ml de cada filtrado en tubos de ensayo, agregar 5 ml de solución B (7.3.2) y 0,1 ml de solución E (7.3.5). Mezclar.

7.4.3.8 Dejar que se desarrolle el color a temperatura ambiente y al abrigo de la luz solar durante treinta minutos.

7.4.3.9 Mediar la absorbancia de la solución de la muestra por referencia a la prueba en blanco a 610 nm.

7.4.3.10 Repetir la determinación si la absorbancia de la solución es superior a la de la solución patrón de 20 microgramos de fenol preparada según el punto (7.5).

Si dicho límite es sobrepasado, diluir un volumen conveniente de leche reconstituida, según 7.4.2.1, con un volumen apropiado de esta misma leche cuidadosamente hervida, como se indica en 7.4.3.2, para inactivar la fosfatasa presente.

7.5 *Preparación de la curva patrón:*

7.5.1 Pipetear en cuatro matraces de 100 ml, 1, 3, 5 y 10 ml de la solución patrón diluida según 7.3.8 y completar hasta enrase con agua; estas soluciones contienen respectivamente 2, 6, 10 y 20 microgramos de fenol por ml.

7.5.2 Pipetear 1 ml de cada solución testigo (7.5.1) en tubos de ensayo para obtener una serie de muestras conteniendo 0 (valor cero), 2, 6, 10 y 20 microgramos de fenol. El banco se obtiene pipeteando 1 ml de agua.

7.5.3 Pipetear sucesivamente en cada tubo de ensayo 1 ml de la solución de sulfato de cobre (7.3.7), 5 ml de solución tampón coloreada (7.3.6), 3 ml de agua, y 0,1 ml de la solución E (7.3.5); mezclar.

7.5.4 Dejar reposar los tubos de ensayo a temperatura ambiente y al abrigo de la luz solar directa durante treinta minutos.

7.5.5 Medir la absorbancia del contenido de los tubos por referencia al valor cero, a 610 nm.

7.5.6 Establecer la curva patrón anotando los valores de las absorbancias en función de las cantidades de fenol en microgramos, tal como se ha indicado en 7.5.2.

7.6 *Cálculos:*

Convertir la cifra obtenida en 7.4.3.9 en microgramos de fenol con referencia a la curva patrón (P).

Calcular la actividad de la fosfatasa expresada en microgramos de fenol por ml de leche reconstituida, según la fórmula siguiente:

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

Si hubiera sido necesario diluir según 7.4.3.10, multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de la otra, por el

mismo analista y sobre la misma muestra, y en las mismas condiciones, no debe exceder de 2 microgramos de fenol liberado por ml de leche reconstituida.

7.7 *Referencias:*

Primera Directiva de la Comisión de 13 de noviembre de 1979 (79/1.067/CEE), «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327/29, de 24 de diciembre.

Método 8: Actividad de la fosfatasa (Método Aschaffenburg y Mullen)

8.1 *Principio:*

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

La muestra de leche reconstituida se diluye en substrato en solución tampón (pH 10,2) y se incuba durante dos horas a una temperatura de 37 °C. Toda cantidad de fosfatasa alcalina presente en la muestra liberada, en semejantes condiciones, p-nitrofenol derivado del p-nitrofenilfosfato disódico. El p-nitrofenol liberado se mide mediante comparación directa con cristales de color patrones en un colorímetro simple de luz reflejada.

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

- Leche en polvo rica en grasa o extragrasa.
- Leche en polvo entera o leche entera en polvo.
- Leche en polvo parcialmente desnatada o semidesnatada.
- Leche en polvo desnatada o leche desnatada en polvo.

8.2 *Material y aparatos:*

8.2.1 Balanza analítica.

8.2.2 Baño de agua a 37 °C ± 1 °C, controlado por termostato.

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

8.3 *Reactivos:*

8.3.1 Solución tampón de carbonato de sodio y de bicarbonato de sodio.

Disolver 3,5 g de carbonato de sodio anhidro y 1,5 g de bicarbonato de sodio en agua y diluir hasta 1.000 ml en un matraz aforado.

8.3.2 Substrato en solución tampón.

Disolver 1,5 g de p-nitrofenilfosfato disódico en la solución tampón de carbonato de sodio y de bicarbonato de sodio (8.3.1) y diluir hasta 1.000 ml en matraz aforado.

Esta solución se mantiene estable durante un mes en el refrigerador ($\leq$4 °C) pero habrá que efectuar antes un test de control de color en las soluciones conservadas de esta forma (8.4.1.3).

8.3.3 Precipitantes.

8.3.3.1 Sulfato de cinc.

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

8.3.3.2 Haxacianoferrato (II) de potasio en solución.

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

8.4 *Procedimiento:*

8.4.1 Precauciones a observar.

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

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

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

8.4.1.3 El substrato en solución tampón (8.4.2) se puede conservar estable durante un mes, como mínimo, en el refrigerador a una temperatura de $\leq$ 4°C. Toda inestabilidad se traduce por formación de un color amarillo. Dado que la prueba siempre se lee con respecto a un control del producto hervido que contiene el mismo substrato en solución tampón, se recomienda no utilizar este substrato cuando el color indique un exceso de 10 microgramos, efectuándose la lectura en una célula de 25 mm en el colorímetro y utilizando agua destilada en la otra célula de 25 mm.

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

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

8.4.2 Preparación de la muestra.

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

8.4.3 Determinación.

8.4.3.1 Pipetear 15 ml de substrato en solución tampón (8.3.2) en un tubo de análisis limpio y seco, luego 2 ml de la muestra de leche reconstituida (8.4.2) a analizar. Cerrar el tubo con un tapón, mezclar dando vueltas al tubo y colocarlo en baño de agua a 37 °C (8.2.2).

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

8.4.3.3 Sacar los dos tubos del baño de agua al cabo de dos horas, añadir 0,5 ml de precipitante de sulfato de cinc (8.3.3.1) poner de nuevo el tapón, agitar vigorosamente y dejar reposar durante tres minutos. Añadir 0,5 ml de precipitante de hexaferrocianuro (II) de potasio (8.3.3.2); mezclar por completo y filtrar en papel plegado (8.4.2); recoger el líquido filtrado nítido en el tubo de análisis limpio.

8.4.3.4 Transvasar el líquido filtrado a una célula de 25 mm y comparar con respecto al líquido filtrado de la muestra de control hervida en el colorímetro, utilizando el disco especial (8.3.2).

8.5 *Cálculos:*

La lectura directa obtenida según el punto (8.4.3.4) se expresa en microgramos de p-nitrofenol por ml de muestra o por ml de muestra de leche reconstituida.

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

8.6 *Referencias:*

Primera Directiva de la Comisión de 13 de noviembre de 1979 (79/1.067/CEE), «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 327/29, de 24 de diciembre.