

Fuente :Diario Oficial de la Federación

**NOM-131-SSA1-1995**

**NORMA OFICIAL MEXICANA, BIENES Y SERVICIOS. ALIMENTOS PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS Y NUTRIMENTALES.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3o. fracción XXII, 13, 194 fracción I, 197, 401 BIS, 401 BIS 1, 401 BIS 2 de la Ley General de Salud; 3o. fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, VI, VIII, XI y XIII; 41, 43, 47 fracción IV, 50 y 53 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2o. fracción III incisos b), c), h), k), o), 320, 486, 493, 707, 713, 718, 785, 974, y demás relativos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 21 fracción II del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

**CONSIDERANDO**

Que con fecha de 21 de agosto de 1995, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, La Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 1 de marzo de 1996, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha previa, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-131-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. ALIMENTOS PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS Y NUTRIMENTALES.**

**PREFACIO**

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

**SECRETARIA DE SALUD**

Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios  
Dirección General de Salud Reproductiva  
Dirección General de Insumos para la Salud

Laboratorio Nacional de Salud Pública

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA**

**INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"**

**SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL**

Dirección General de Política de Comercio Interior

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES PARA LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

Centro Interdisciplinario en Ciencias de la Salud

**PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR**

Dirección General de Investigación Tecnológica

**SISTEMA NACIONAL PARA EL DESARROLLO INTEGRAL DE LA FAMILIA (DIF)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Química

**COMPAÑIA NESTLE, S.A. DE C.V.**

**LABORATORIOS COLUMBIA, S.A. DE C.V.**

MEAD JOHNSON DE MEXICO, S.A. DE C.V.  
WYETH, S.A. DE C.V.  
PRODUCTOS GERBER, S.A. DE C.V.  
EVAPORADORA MEXICANA, S.A. DE C.V.

## INDICE

### PREFACIO

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. FORMULAS PARA LACTANTES Y FORMULAS DE CONTINUACION
6. ALIMENTOS ENVASADOS PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD
7. ALIMENTOS A BASE DE CEREALES PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD
8. MUESTREO
9. METODOS DE PRUEBA
10. ETIQUETADO
11. ENVASE, EMPAQUE Y EMBALAJE
12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
13. BIBLIOGRAFIA
14. OBSERVANCIA DE LA NORMA
15. VIGENCIA
16. APENDICES NORMATIVOS
  - Apéndice Normativo A
  - Apéndice Normativo B

### 1. Objetivo y campo de aplicación

**1.1** Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias y nutrimentales que deben cumplir las fórmulas para lactantes y fórmulas de continuación, los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad y los alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.

**1.2** Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas y morales que se dedican a su proceso o importación.

### 2. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

- NOM-008-SSA2-1993 Control de la nutrición, crecimiento, desarrollo del niño y del adolescente. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.
- NOM-051-SCFI-1994 Especificaciones generales de etiquetado para los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.
- NOM-086-SSA1-1994 Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.
- NOM-091-SSA1-1994 Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-109-SSA1-1994 Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.\*\*
- NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
- NOM-111-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-112-SSA1-1994 Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes Técnica del número más probable.
- NOM-114-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- NOM-115-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- NOM-117-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, hierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.
- NOM-120-SSA1-1994 Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

NOM-143-SSA1-1995 Bienes y servicios. Métodos de prueba microbiológica para alimentos. Determinación de coliformes fecales por la técnica del número más probable. (Presuntiva *Escherichia coli*) y determinación de *Listeria monocytogenes*.\*

NOM-130-SSA1-1995 Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.\*

NOM-000-SSA1-1995 Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.\*\*

\*\* Proyecto en proceso de expedición como Norma Oficial Mexicana.

\* Proyecto de Norma Oficial Mexicana en proceso de publicación.

### **3. Definiciones**

Para fines de esta Norma se entiende por:

**3.1** Ablactación, introducción de alimentos distintos a la leche.

**3.2** Aditivos para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación.

**3.3** Alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, productos elaborados con cereales adicionados o no de otros ingredientes, destinados a complementar el régimen nutrimental de lactantes y niños de corta edad, tales como: cereales adicionados de leche, harinas de cereal cocido, galletas, entre otros.

**3.4** Alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad, los que se utilizan durante el periodo normal de la ablactación de los lactantes o niños a la alimentación normal; están preparados para ser administrados directamente, o bien, deshidratados para ser reconstituidos mediante dilución en agua, leche o jugo.

**3.5** Buenas prácticas de fabricación, conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su uso.

**3.6** Cereales, granos comestibles, limpios y sanos pertenecientes a la familia de las gramíneas de un solo cotiledón, tales como: trigo, maíz, arroz, avena, cebada y centeno.

**3.7** Destete, suspensión de la lactancia al pecho.

**3.8** Envase primario, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.

**3.9** Envase secundario, aquel que contiene al primario.

**3.10** Esterilización comercial, tratamiento térmico aplicado al producto para la destrucción de todos los microorganismos viables de importancia en la salud pública y aquellos capaces de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución, sin la condición de refrigeración.

**3.11** Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica ya sea que esté impreso, marcado, grabado, en relieve, hueco, estarcido o adherido al empaque o envase del producto.

**3.12** Fecha de caducidad, fecha límite en que se considera que un producto preenvasado, almacenado en las condiciones sugeridas por el fabricante, reduce o elimina las características sanitarias que debe reunir para su consumo. Después de esta fecha, no debe comercializarse ni consumirse.

**3.13** Fórmula para lactantes, producto elaborado a base de leche de vaca o de otros mamíferos u otros componentes comestibles de origen animal, incluido el pescado o vegetal, que se consideren adecuados para la alimentación de los lactantes.

**3.14** Fórmula de continuación, producto elaborado con leche de vaca o de otros animales o con otros constituyentes de origen animal o vegetal, destinado a ser utilizado para complementar o suplir la leche materna en la dieta de ablactación para lactantes a partir del sexto mes cuando son alimentados con leche materna o a partir de los cuatro meses cuando son alimentados con fórmulas para lactantes o bien, cuando el peso del lactante sea mayor de 6 kg, así como para niños de corta edad.

**3.15** Inocuo, aquello que no hace o causa daño a la salud.

**3.16** Lactantes, los niños no mayores de doce meses de edad.

**3.17** Límite máximo, cantidad establecida de aditivos, microorganismos, materia extraña, plaguicidas, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides, que no se debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.

**3.18** Lote, cantidad de un producto elaborado en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad.

**3.19** Materia extraña, aquella sustancia, resto o desecho orgánico o no, que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, considerándose entre otros: excretas y pelos de cualquier especie, fragmentos de hueso e insectos, vidrio, metal, madera, plástico o piedras, que resultan perjudiciales para la salud.

**3.20** Metal pesado o metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de la dosis en que se ingieren así como de su acumulación en el organismo.

**3.21** Métodos de prueba, procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

**3.22** Niños de corta edad, los mayores de doce meses y hasta cuarenta y ocho meses de edad; incluye al lactante mayor: un año a un año once meses y al preescolar: de dos a cuatro años.

**3.23** Proceso, conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de productos.

**3.24** Productos deshidratados, los que son sometidos a deshidratación por medios físicos a fin de evitar su descomposición y son reconstituidos mediante dilución, de acuerdo a lo señalado en 3.4.

**3.25** Productos preparados para ser administrados directamente, los sometidos a tratamiento térmico antes o después de ser envasados en recipientes herméticamente cerrados, los cuales deben ser comercialmente estériles.

#### **4. Símbolos y abreviaturas**

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

A	absorbancia
As	arsénico
BPF	buenas prácticas de fabricación
°C	grados celsius
Ca	calcio
Cl	cloruro
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
Cu	cobre
Fe	fierro
g	gramo
h	hora
Hg	mercurio
I	iodo
REP	relación de eficiencia proteica
K	potasio
kcal	kilocalorías
kg	kilogramo
kJ	kilojoules
l	litro
L	levógiro
Mn	manganeso
Mg	magnesio
m	masa
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
mv	milivolt
M	molar
N	normal
Na	sodio
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NMP	número más probable
No.	número
P	fósforo

Pb	plomo
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
S.E.	sin especificar
T	transmitancia
UFC	unidades formadoras de colonias
U.I.	unidad internacional
µg	microgramo
µm	micrómetro
v/v	volumen a volumen
Zn	zinc
/	por
%	por ciento

Cuando en esta Norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

**5. Fórmulas para lactantes y fórmulas de continuación**

**5.1 Disposiciones sanitarias**

Las fórmulas para lactantes y fórmulas de continuación, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben sujetarse a las disposiciones señaladas en el apéndice normativo A.

**5.2 Especificaciones sanitarias**

**5.2.1 Las fórmulas para lactantes deben cumplir con las siguientes especificaciones:**

**5.2.1.1 Microbiológicas**

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Mesofílicos aerobios	2 500 UFC/g
<i>Salmonella spp</i> en 25g	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Coliformes totales	20 NMP/g
<i>Escherichia coli</i>	Negativo

**5.2.1.2 Contaminación por metales pesados o metaloides**

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
As	0,10
Hg	0,05
Pb	0,20

**5.2.1.3 Materia extraña**

Las fórmulas para lactantes deben estar exentas de materia extraña, que resulte perjudicial a la salud.

**5.2.1.4 Aditivos para alimentos**

En la elaboración de las fórmulas para lactantes se permite el uso de los siguientes aditivos, dentro de los límites que se señalan a continuación:

	Dosis máxima en 100 ml del producto listo para consumo agentes espesantes:
Goma guar	0,1 g en todos los tipos de fórmulas para lactantes.
Goma de algarrobo	0,1 g en todos los tipos de fórmulas para lactantes.
Dialmidón fosfato, mezclado	0,5 g solamente en las fórmulas para lactantes a base solo o de soya.
Dialmidón fosfato, acetilado, solo o mezclado	2,5 g solo o en combinación en fórmula para lactantes a base de proteína hidrolizada o aminoácidos solamente.
Carragenina	0,03 g solamente en fórmulas para lactantes normales y líquidas a base de leche y soya. 0,1 g solamente en fórmulas líquidas para lactantes a base de proteínas hidrolizadas o aminoácidos.
Emulsionantes:	
Lecitina	0,5 g en todos los tipos de fórmulas para lactantes.
Mono y diglicéridos	0,4 g en todos los tipos de fórmulas para lactantes.
Antioxidantes:	

Concentrado de varios tocoferoles	1 mg en todos los tipos de fórmulas para lactantes.
Palmitato de L-ascorbilo	1 mg en todos los tipos de fórmulas para lactantes.
Reguladores de pH	Cantidades en 100 g de producto, con respecto al peso seco.
Hidróxido de sodio, Carbonato ácido de sodio, Carbonato de sodio, Hidróxido de potasio, Carbonato ácido de potasio, Carbonato de potasio, Hidróxido de calcio, Citrato de sodio y Citrato de potasio.	Limitados por las BPF (dentro de los límites para Na y K establecidos en el punto 5.3.1.2 en todos los tipos de fórmulas para lactantes).
Acido L(+) láctico, cultivos productores de ácido L(+) láctico y ácido cítrico.	Limitados por las BPF en todos los tipos de fórmulas para lactantes.

**5.2.2 Fórmulas de continuación**

**5.2.2.1** Las fórmulas de continuación deben cumplir con las mismas especificaciones microbiológicas, de metales pesados y materia extraña establecidas para las fórmulas para lactantes.

**5.2.2.2** Aditivos para alimentos

En la elaboración de las fórmulas de continuación, se permite el uso de los siguientes aditivos, dentro de los límites que se señalan a continuación:

Agentes espesantes:	Dosis máxima en 100 ml del producto listo para consumo.
Goma guar	0,1 g
Goma de algarrobo	0,1 g
Dialmidón fosfato, solo o mezclado	0,5 g solamente en las fórmulas a base de soya.
Dialmidón fosfato, acetilado, solo o mezclado	0,5 g solamente en las fórmulas a base de soya.
Dialmidón fosfato, fosfatado, solo o mezclado	2,5 g en los productos a base de proteínas hidrolizadas o aminoácidos solamente.
Adipato de dialmidón acetilado, solo o mezclado	2,5 g en los productos a base de proteínas hidrolizadas o aminoácidos solamente.
Carragenina	0,03 g solos o mezclados en leche y en los productos a base de soya solamente. 0,1 g solo o mezclado en productos líquidos a base de proteínas hidrolizadas o aminoácidos solamente.
Pectinas	1 g
Emulsionantes:	
Lecitina	0,5 g
Mono y diglicéridos	0,4 g
Antioxidantes:	
Concentrado de varios tocoferoles, y alfa-tocoferol	3 mg solos o mezclados.
Palmitato de L-ascorbilo ácido L-ascórbico y sus sales de Na y Ca	5 mg solos o mezclados, expresados como ácido ascórbico.
Reguladores de pH:	
Hidróxido de sodio, Carbonato ácido de sodio, Carbonato de sodio, Hidróxido de potasio, Carbonato ácido de potasio, Carbonato de potasio, Hidróxido de calcio, Citrato de sodio, Citrato de potasio, Acido L(+) láctico, Cultivos productores de Acido L(+) láctico y Acido cítrico.	Limitados por las BPF (dentro de los límites para Na establecidos en el punto 5.3.2.6).
Aromas:	
Extractos naturales de fruta	BPF

Extractos de vainilla	BPF
Etilvainillina	5 mg
Vainillina	5 mg

**5.3 Especificaciones nutrimentales**

**5.3.1** Las fórmulas para lactantes deben contener los siguientes nutrimentos dentro de los límites mínimos y máximos que se señalan a continuación:

	Cantidad por cada 100 kcal	
	MINIMO	MAXIMO
<b>5.3.1.1 Vitaminas</b>		
Vitamina A	250 U.I. expresados	500 U.I. o 75 µg o 150 µg expresados en retinol en retinol
Vitamina D	40 U.I. o	80 U.I.
Acido ascórbico	8 mg	S.E.
Tiamina (B1)	40 µg	S.E.
Riboflavina (B2)	60 µg	S.E.
Nicotinamida	250 µg	S.E.
Piridoxina (B6)	35 µg	S.E.

Las fórmulas que contengan más de 1,8 g de proteínas por cada 100 kcal contendrán, como mínimo 15 µg de vitamina B6/g de proteína.

Acido fólico	4 µg	S.E.
Acido pantoténico	300 µg	S.E.
Cianocobalamina (B12)	0,15 µg	S.E.
Vitamina K	4 µg	S.E.
Biotina (H)	1,5 µg	S.E.
Vitamina E (alfa-Tocoferol)	0,7 U.I./g de ácido ácidos expresados en ningún caso utilizables	S.E. linoleico o por gramo de grasos poliinsaturados, ácido linoleico, pero en menos de 0,7 U.I. por 100 kcal

**5.3.1.2** **Minerales**

	MINIMO	MAXIMO
Na	20 mg	60 mg
K	80 mg	200 mg
Cl	55 mg	150 mg
Ca	50 mg	S.E.
P	25 mg	S.E.

La relación Ca:P no será menor de 1,2:1 ni mayor de 2:1.

Mg	6 mg	S.E.
Fe	0,15 mg	S.E.
Fe	1 mg	2 mg

Los productos que contengan como mínimo 1 mg de hierro por 100 kcal utilizables, se etiquetarán "Fórmula con hierro para lactantes".

I	5 µg	S.E.
Cu	60 µg	S.E.
Zn	0,5 mg	S.E.
Mn	0,5 µg	S.E.

**5.3.1.3** **Colina** 7 µg S.E.

**5.3.1.4** **Proteínas:** como mínimo 1,8 g/100 kcal utilizables de proteínas de calidad nutritiva equivalente a la de la caseína, o una cantidad mayor de otras proteínas en proporción a su valor biológico.

La calidad nutritiva de las proteínas deberá determinarse empleando el método de la Relación de Eficiencia Proteica (REP).

La REP de las proteínas no será inferior al 85% del de la caseína. La cantidad total de las proteínas no debe exceder de 4 g por 100 kcal utilizables.

Para mejorar la calidad nutritiva de las proteínas, pueden añadirse aminoácidos esenciales, únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, los cuales deben ser en su forma natural L.

	MINIMO	MAXIMO
<b>5.3.1.5</b> Acido linoleico (en forma de glicérido)	300 mg/kg	S.E.
<b>5.3.1.6</b> Grasas	3,3 g	6 g

**5.3.1.7** Podrán añadirse otros nutrimentos si son necesarios para que la fórmula sea adecuada como única fuente de nutrición del lactante. La utilidad de estos nutrimentos deberá demostrarse científicamente.

**5.3.2.** Las fórmulas de continuación deben contener los siguientes nutrimentos dentro de los límites mínimos y máximos que se señalan a continuación:

**5.3.2.1** Cuando se preparen de acuerdo con las instrucciones de empleo, 100 ml del producto listo para el consumo debe proporcionar no menos de 60 kcal (o 250 kJ) y no más de 85 kcal (o 355 kJ).

**5.3.2.2** Proteínas por 100 kcal utilizables. Como mínimo 3,0 g/100 kcal utilizables de proteínas de calidad nutritiva equivalente a la de la caseína, o una cantidad mayor de otras proteínas en proporción a su valor biológico.

La calidad nutritiva de las proteínas debe evaluarse empleando el método del Relación de Eficiencia Proteica (REP).

La REP de las proteínas no debe ser inferior al 85% del de la caseína. La cantidad total de las proteínas no debe exceder de 5,5 g por 100 kcal utilizables.

Para mejorar la calidad nutritiva de las proteínas, pueden añadirse aminoácidos indispensables, únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, los cuales deben ser en su forma natural L.

	MINIMO	MAXIMO
<b>5.3.2.3</b> Acido linoleico (en forma de glicérido)	300 mg/100 kcal	S.E.
<b>5.3.2.4</b> Grasas	3 g/100 kcal	6 g/kcal
<b>5.3.2.5</b> Vitaminas	Cantidad por cada 100 kcal	
Vitamina A	250 U.I. o 75 µg expresados en retinol	750 U.I. o 225 µg expresados en retinol
Vitamina D	40 U.I. o 1 µg	120 U.I. o 3 µg
Acido ascórbico	8 mg	S.E.
Tiamina (B1)	40 µg	S.E.
Riboflavina (B2)	60 µg	S.E.
Nicotinamida	250 µg	S.E.
Piridoxina (B6)	45 µg	S.E.
Acido fólico	4 µg	S.E.
Acido pantoténico	300 µg	S.E.
Cianocobalamina (B12)	0,15 µg	S.E.
Vitamina K	4 µg	S.E.
Biotina (H)	1,5 µg	S.E.
Vitamina E (alfa-tocoferol)	0,7 U.I./g de ácido linoleico o por gramo de ácidos grasos poliinsaturados, expresados en ácido linoleico, pero en ningún caso menos de 0,7 U.I. por 100 kcal utilizables	S.E.

<b>5.3.2.6</b> Minerales:	MINIMO	MAXIMO
Na	20 mg	85 mg
K	80 mg	S.E.
Cl	55 mg	S.E.
Ca	90 mg	S.E.
P	60 mg	S.E.
Mg	6 mg	S.E.
Fe*	1 mg	2 mg
I	5 µg	S.E.
Zn	0,5 mg	S.E.

\* Debe ser utilizado preferentemente en su forma ferrosa.

**5.3.2.7** Además de las vitaminas y minerales señalados, pueden añadirse otros nutrimentos, cuando sean necesarios para asegurar que el producto sea idóneo para formar parte de un plan de alimentación mixta, destinado a ser utilizado a partir del sexto mes de edad. La utilidad de estos nutrimentos debe demostrarse científicamente.

5.3.2.8 Las concentraciones de sodio y potasio que derivan de los ingredientes vitamínicos y minerales deben ajustarse a los límites establecidos para el sodio y el potasio en el punto 5.3.2.6.

**6. Alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad**

**6.1 Clasificación**

Los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad por su proceso se clasifican en:

**6.1.1** Productos preparados para ser administrados directamente.

**6.1.2** Productos deshidratados.

**6.2 Disposiciones sanitarias**

En los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

**6.2.1** El agua que se utilice en el proceso de elaboración de los productos debe ser potable.

**6.2.2** Todos los ingredientes deben estar sanos, limpios y ser inocuos. Los ingredientes como: pescado, carne y aves de corral deben someterse a procesos de fabricación, los cuales aseguren la eliminación de trozos de hueso.

**6.2.3** Los ingredientes que intervengan en la elaboración de estos productos, así como el producto terminado, no deben tratarse con radiaciones ionizantes.

**6.3 Especificaciones sanitarias**

Los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad, deben cumplir con las siguientes especificaciones:

**6.3.1 Microbiológicas**

**6.3.1.1** Deben estar exentos de microorganismos patógenos.

**6.3.1.2** Los alimentos preparados comercialmente estériles, deben cumplir con las pruebas de esterilidad comercial señaladas a continuación.

PRODUCTOS	ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
pH > 4,6	Mesofílicos Aerobios	Negativo
	Mesofílicos Anaerobios	Negativo
	Termofílicos Aerobios	Negativo
	Termofílicos Anaerobios	Negativo
pH ≤ 4,6	Mesofílicos Anaerobios	Negativo
	Mesofílicos Aerobios	Negativo
	Termofílicos	Negativo*
	Mohos y Levaduras	Negativo

\* En algunos casos por probabilidad estadística, puede existir la presencia de esporas termofílicas en alimentos ácidos con pH por abajo de 4,6.

**6.3.1.3** Los alimentos deshidratados envasados deben cumplir con lo siguiente:

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Mesofílicos aerobios	2 500 UFC/g
<i>Salmonella spp</i> en 25 g	Ausente
Coliformes totales	20 NMP/g

**6.3.2** Los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad deben cumplir con las especificaciones de metales pesados y materia extraña establecidas para fórmulas para lactantes.

**6.3.3 Aditivos para alimentos**

En la elaboración de los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad, se permite el uso de los siguientes aditivos, dentro de los límites señalados a continuación:

Dosis máxima en 100 g de producto listo para consumo

**6.3.3.1 Emulsificantes:**

- Lecitina 0,5 g
- Mono y diglicéridos 0,15 g de grasa

**6.3.3.2** Reguladores del pH: BPF

Carbonato ácido de sodio o de potasio                      Dentro de los límites establecidos para el sodio en el punto 6.4.2.

Hidróxido de potasio o de sodio

Acido acético

**6.3.3.3 Antioxidantes:**

Tocoferoles solos o mezclados                      300 mg/kg de grasa

Palmitato de L-ascorbilo                      200 mg/kg de grasa

Acido L ascórbico y sus sales de sodio y potasio                      0,5 g/kg expresados como ácido ascórbico dentro de los límites establecidos para el sodio en el punto 6.4.2.

**6.3.3.4 Espesantes:**

Goma de algarrobo                      0,2 g

Dialmidón fosfato, Dialmidón                      6 g solos o mezclados

fosfato acetilado, Dialmidón fosfato

fosfatado, Dialmidón glicerol,

Dialmidón glicerol acetilado e

Hidroxipropil almidón

Pectina no amidada                      1 g solamente en alimentos a base de frutas envasados para lactantes en periodo de ablactación

**6.3.3.5 Aromas:**

Extracto de vainilla                      BPF

Etilvainillina                      7 mg

Vainillina                      7 mg

**6.4 Especificaciones nutrimentales**

Los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad deben sujetarse a lo siguiente:

**6.4.1** La adición de nutrimentos debe sujetarse a lo establecido en el Reglamento y en la NOM-086-SSA1-1994. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

**6.4.2** El contenido total de sodio no debe exceder de 200 mg/100 g de producto, calculado en relación con el producto preparado para el consumo de conformidad con las instrucciones de empleo, ni agregar sal (NaCl) a los productos de fruta y a los postres a base de fruta.

**6.4.3** Podrán añadirse aminoácidos indispensables (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, arginina e histidina), pero sólo en las cantidades necesarias al efecto. Sólo pueden utilizarse las formas naturales L de los aminoácidos.

**6.4.4** Los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad, deben tener la cantidad de fibra señalada a continuación:

**6.4.5**

ALIMENTO (a base de)	FIBRA % MAX.
Verduras y frutas	5,0
Sopas	1,0
Carnes	1,0
Postres	1,0
Alimentos con cereal	2,5
Jugos	1,0
Néctares	1,5

**7. Alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad**

**7.1 Especificaciones sanitarias**

Los alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad deben cumplir con las siguientes especificaciones:

**7.1.1 Microbiológicas**

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Mesofílicos aerobios	2 500 UFC/g
<i>Salmonella spp</i> en 25 g	Ausente
Coliformes totales	20 NMP/g

**7.1.2** Los alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad deben cumplir con las especificaciones de metales pesados y materia extraña establecidas para fórmulas para lactantes.

**7.1.3 Aditivos para alimentos**

En los alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad se permite el uso de los siguientes aditivos, dentro de los límites señalados a continuación:

**7.1.3.1 Emulsificantes: LIMITE MAXIMO**

- Lecitina 1,5 g \*
- Mono y diglicéridos de ácidos grasos 1,5 g \*

**7.1.3.2 Reguladores del pH:**

- Carbonato ácido de sodio BPF \*\*
- Carbonato ácido de potasio
- Carbonato ácido de calcio
- Acido L (+) láctico 1,5 g \*
- Acido cítrico 2,5 g \*

\* En 100 g de producto con respecto al peso en seco.

\*\* Dentro de los límites para sodio establecidos en este capítulo.

**7.1.3.3 Antioxidantes:**

- Concentrado de varios tocoferoles o  $\alpha$ -tocoferol 300 mg/kg de grasa, solos o mezclados.
- Palmitato de l-ascorbilo 200 mg/kg de grasa.
- Acido L-ascórbico y sus sales de sodio y potasio 50 mg expresados en ácido ascórbico.

**7.1.3.4 Saborizantes:**

- Extracto de vainilla BPF
- Etilvainillina y vainilla 7 mg/100 g de producto listo para consumo.

**7.2 Especificaciones nutrimentales**

**7.2.1** La adición de nutrimentos debe sujetarse a lo establecido en el Reglamento y en la NOM-086-SSA1-1994. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

**7.2.2** Cuando los alimentos a base de cereales deban prepararse con agua antes de ser consumidos deben contener un mínimo del 15% de proteínas en base seca. El REP no debe ser inferior al 70% de la calidad de la caseína.

**7.2.3** Las galletas de leche preparadas con uno o más productos de cereales molidos a los que se mezcla con leche antes de ser consumidos deben contener un mínimo de 10% m/m de proteínas de la leche.

**7.2.4** El contenido de sodio en el cereal seco y harinas de cereal no debe exceder de 100 mg/100 g del producto listo para ser consumido.

**7.2.5** El contenido de sodio en galletas no debe exceder de 300 mg/100 g del producto listo para ser consumido.

**7.2.6** El contenido de tiamina en los productos objeto de esta Norma no debe ser inferior a 100 µg/100 g del producto listo para ser consumido.

**7.2.7** El cacao se podrá adicionar únicamente en aquellos productos que se destinen a niños mayores de nueve meses de edad, en una cantidad que no exceda de 5% m/m en base seca.

**8. Muestreo**

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta Norma se sujeta a lo que establece la Ley General de Salud.

**9. Métodos de prueba**

Para la verificación de las especificaciones sanitarias y nutrimentales que se establecen en esta Norma se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Apartado de Referencias y en el apéndice normativo B.

Para la determinación de vitamina A y E aplicar el método establecido en el apéndice normativo de la NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

Para la determinación de grasa aplicar el método establecido en el apéndice normativo de la NOM-086-SSA1-1994. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

Para la determinación de vitaminas y minerales, aplicar los métodos señalados en el apéndice normativo C.

Para la comprobación de la esterilidad comercial, aplicar el método señalado en el apéndice normativo de la NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

Para la determinación de materia extraña aplicar el método establecido en el apéndice normativo de la NOM-000-SSA1-1995. Cereales y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.

Para la determinación de fibra aplicar el método establecido en el Manual de control físico-químicos de alimentos diversos. Métodos generales, publicados por la Secretaría de Salud.

## **10. Etiquetado**

La etiqueta de los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la NOM-051-SCFI-1994. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas, debe sujetarse a lo siguiente:

### **10.1 Fórmulas para lactantes**

**10.1.1** El producto debe denominarse conforme la clasificación señalada en el Reglamento, según corresponda o de cualquier otra manera que indique la naturaleza del alimento.

**10.1.2** Si el producto se destina a lactantes con necesidades especiales de nutrición se señalará claramente la necesidad especial para la que se va a emplear y la propiedad o propiedades dietéticas en que se basa.

**10.1.3** Si el producto contiene como mínimo 1 mg de hierro por 100 kcal utilizables, se debe denominar: "Fórmula con hierro para lactantes".

**10.1.4** Debe declararse el valor nutritivo del producto, como sigue:

**10.1.4.1** La cantidad de energía expresada en kcal y la cantidad en gramos de proteínas, carbohidratos y grasa por cada 100 kcal utilizables, por cada 100 g de producto, así como por ración de producto cuyo consumo se sugiere.

**10.1.4.2** La cantidad total de cada vitamina, mineral, de colina y de cualquier otro ingrediente que se refiere el punto 5.3.1 por cada 100 kcal utilizables o por cada 100 g del producto, o por ración del mismo cuyo consumo se sugiere.

**10.1.5** Indicar la fecha de caducidad señalando mes y año con letra o número y el número o clave del lote de fabricación.

**10.1.6** Identificación de lote. Cuando se emplee una fecha como código de lote, debe anteponerse la palabra "Lote".

**10.1.6.1** Si la identificación del lote es la misma que la fecha de caducidad, se deben anteponer las leyendas "Lote" y "Fecha de caducidad", o las abreviaturas correspondientes.

**10.1.7** Se darán instrucciones en la etiqueta o en el folleto que acompañe al producto sobre la manera de prepararlo y utilizarlo de modo que no induzca a desistir de la lactancia materna, así como sobre su conservación, antes y después de abrir el envase.

**10.1.8** Señalar que la fórmula para lactantes se consumirá exclusivamente bajo prescripción médica.

**10.1.9** Ostentar una leyenda donde se afirme la superioridad de la lactancia materna.

**10.1.10** Indicar claramente los procedimientos para la preparación adecuada de la fórmula, con el fin de prevenir daños a la salud.

**10.1.11** No ostentarán leyendas ni imágenes que las acrediten como idénticas y superiores a la leche materna.

**10.1.12** No utilizar términos como "humanizado", "maternizada" o similares.

**10.1.13** Señalar que se recomienda la alimentación complementaria de acuerdo a las instrucciones del médico.

### **10.2 Fórmulas de continuación**

**10.2.1** Debe indicarse la fecha de caducidad, señalando mes y año, con letra o número, así como el número o clave del lote de fabricación.

**10.2.2** Identificación del lote. Cuando se emplee una fecha como código de lote, debe anteponerse la palabra "Lote".

**10.2.2.1** Si la identificación del lote es la misma que la fecha de caducidad, se deben anteponer las leyendas "Lote" y "Fecha de caducidad", o las abreviaturas correspondientes.

**10.2.3** Deben contener una leyenda precautoria sobre las consecuencias de una preparación y uso impropio de la fórmula, tal como "La salud de su hijo depende de que siga cuidadosamente las instrucciones para la preparación y uso".

**10.2.4** Las fórmulas de continuación que no contengan leche ni ningún derivado lácteo deben incluir la leyenda: "Fórmula no láctea".

**10.2.5** La etiqueta de las fórmulas de continuación deben ostentar una leyenda donde se afirme la superioridad de la lactancia materna y señalar que la fórmula se consumirá por recomendación de un agente de salud.

**10.2.6** Se debe declarar el valor nutritivo del producto, como sigue:

**10.2.6.1** La cantidad de energía expresada en kcal por cada 100 g del producto, así como por ración del producto cuyo consumo se sugiere.

**10.2.6.2** La cantidad en g de proteínas, hidratos de carbono y grasas por cada 100 kcal utilizables, por cada 100 g del producto, así como por ración del producto cuyo consumo se sugiere.

**10.2.6.3** La cantidad total de cada vitamina, mineral y de cualquier otro ingrediente a que se refiere el apartado 5.3.2, por cada 100 kcal utilizables o por cada 100 g de producto o por una ración del mismo cuyo consumo se sugiere.

**10.2.7** Instrucciones sobre el modo de empleo.

**10.2.7.1** Debe contener instrucciones sobre la preparación en forma escrita y gráfica, así como del uso del alimento y sobre su almacenamiento y conservación después de abrir el envase, incluyendo una declaración que indique que el almacenamiento prolongado y temperaturas excesivas deben evitarse.

**10.2.7.2** Debe contener una declaración de que las fórmulas de continuación deben ser parte de una alimentación mixta que no deben ser introducidas antes del sexto mes de vida cuando la alimentación es con leche materna, ni antes de los cuatro meses cuando la alimentación es con fórmulas para lactantes o cuando el peso es menor o igual a 6 kg.

**10.3** Alimentos envasados

**10.3.1** La denominación del alimento debe ser la del ingrediente o los ingredientes más importantes o característicos.

**10.3.2** Debe declararse el valor nutritivo del producto, como sigue:

**10.3.2.1** La cantidad de energía expresada en kcal y, en su caso, la cantidad de proteínas, carbohidratos y grasas en g por cada 100 g del alimento o por porción.

**10.3.2.2** Indicar de manera independiente el porcentaje que se cubre de la ingesta diaria recomendada para lactantes y niños.

**10.3.3** Las instrucciones sobre su preparación y uso, así como su almacenamiento y conservación antes y después de abrir el envase.

**10.3.4** Cuando el producto contenga betabel o espinacas, la leyenda "PARA NIÑOS DE MAS DE DIECISEIS SEMANAS DE EDAD".

**10.3.5** La leyenda de seguridad que indique la forma de verificar que el cierre del envase no ha sido violado, tratándose de productos esterilizados comercialmente.

**10.3.6** Número de lote o clave de fabricación.

**10.4** Alimentos a base de cereales

**10.4.1** Contener instrucciones sobre la preparación en forma escrita o gráfica, así como la forma de conservación y almacenamiento.

**10.4.2** Indicar el número o clave del lote de producción.

**10.4.3** Debe declararse el valor nutritivo del producto como sigue:

**10.4.3.1** La cantidad de energía expresada en kcal y la cantidad en gramos de proteínas, carbohidratos y grasas por 100 g de alimento o porción.

**10.4.3.2** Indicar de manera independiente el porcentaje que se cubre de la ingesta diaria recomendada para lactantes y niños.

**10.4.3.3** Cuando el producto contenga proteína en menor cantidad o calidad, debe indicarse la leyenda "Utilicé leche pero no agua" para prepararlo o una indicación equivalente.

**10.4.3.4** Cuando el producto contenga más del 15% de proteína en base seca, en las instrucciones para prepararlo, debe indicarse que se puede utilizar agua, leche o jugo o una indicación equivalente.

**11. Envase, empaque y embalaje**

**11.1** Envase

Los productos objeto de esta Norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren sus características físicas, químicas y sensoriales.

**11.2** Empaque

Se deben usar envolturas de material resistente que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

**11.3** Embalaje

Se debe usar material resistente que ofrezca la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

**12. Concordancia con normas internacionales**

Esta Norma es parcialmente equivalente a las siguientes normas:

**12.1** FAO/OMS. 1994. Norma del Codex para Fórmula para lactantes. Codex Stan 72-19981.

**12.2** FAO/OMS. 1994. Norma de Codex para Alimentos envasados para lactantes y niños. Codex Stan 73-1991.

**12.3** FAO/OMS. 1994. Norma del Codex para Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños. Codex Stan 74-1981.

### **13. Bibliografía**

**13.1** Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

**13.2** Secretaría de Salud. 1991. Ley General de Salud. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

**13.3** Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

**13.4** Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

**13.5** Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-SCFI-008-1993. Sistema Internacional de Unidades de Medida. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

**13.6** Secretaría de Salud. NOM-008-SSA2-1993. Control de la Nutrición, Crecimiento y Desarrollo del Niño y del Adolescente. Criterios y Procedimientos para la Prestación del Servicio. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

**13.7** Bessman S.P. 1979. The Justification Theory The Essential Nature of the Non-Essential Aminoacids. *Nutr. Rev.* Vol. 37 p 209-220.

**13.8** Code of Federal Regulations. 1990. Food and Drugs. Parts 100 to 169. p 73-75.

**13.9** FAO/OMS. 1982. Norma del Codex para los Alimentos elaborados a base de Cereales para Niños de pecho y Niños de corta edad. Stan 74-1981. 1a. Ed. Roma, Italia.

**13.10** FAO/OMS. 1984. Suplemento 1. Normas del Codex para Alimentos para Regímenes Especiales incluidos Alimentos para Lactantes y Niños. Parte III. CAC/Vol IX 1a. Ed. Roma, Italia.

**13.11** FAO/OMS. 1994. Proyecto de Norma del Codex para Preparados Alimenticios Complementarios y en particular para Alimentos a base de Cereales para Niños de pecho y Niños de corta edad. CX/NFSDU 94/4. FAO/OMS. Roma, Italia.

**13.12** FAO/OMS. 1988. Suplemento 3 al volumen IX. Normas del Codex para Alimentos para Regímenes Especiales incluidos Alimentos para Lactantes y Niños y Relativo Código de Prácticas de Higiene. CAC/VOL IX. 1a. Ed. Roma, Italia.

**13.13** FDA. 1993. Guidance Document for Lead in Shellfish. Center for Food Safety and Applied Nutrition. p 26-34.

**13.14** Laidlaw S.P. and Kople J.D. 1987. Newer Concepts of the Indispensable Aminoacid. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 4, p 593-605.

**13.15** Mossel, D.A., y Moreno, G. 1982. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. p 193.

**13.16** Reglamentaciones Técnico-Sanitarias del Sector Alimentario. 1989. 1a. Ed. A. Madrid Vicentes. Madrid, España. p 206-209.

**13.17** Vanderzant C., Splittstoesser D.F. 1989. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. USA. p 1052-1053.

**13.18** Wilson E.D., Fisher K.H. y Fugua M.E. 1978. Fisiología Alimentación. 1a. Ed. Interamericana. Colombia. p 14-25.

### **14. Observancia de la Norma**

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

### **15. Vigencia**

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatorio el 2 de mayo de 1998.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 30 de octubre de 1997.- El Director General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.

## APENDICE NORMATIVO A

### A. DE LAS DISPOSICIONES SANITARIAS DE LAS FORMULAS PARA LACTANTES Y DE LAS FORMULAS DE CONTINUACION

**1.1** Las fórmulas para lactantes y fórmulas de continuación y las materias primas que se utilicen en su elaboración no deben ser tratados con radiaciones ionizantes. Asimismo, las materias primas no deben exceder los límites máximos residuales de plaguicidas establecidos en el Catálogo Oficial de Plaguicidas editado por CICOPLAFEST, ni contener cualquiera de los plaguicidas prohibidos en dicho catálogo.

**1.2** No contendrán residuos de hormonas, antibióticos y otros contaminantes o sustancias farmacológicamente activas.

**1.3** Se elaboran por medios físicos exclusivamente, para evitar su putrefacción y contaminación en todas las condiciones normales de manipulación, conservación y distribución.

**1.4** Las fórmulas de continuación y sus ingredientes no deben ser tratadas con radiaciones ionizantes.

**1.5** Requieren agua hervida y tibia para su preparación.

**1.6** El producto debe prepararse según las instrucciones del fabricante.

**1.7** Cuando el producto se prepare según las instrucciones de empleo, debe estar exento de grumos o partículas grandes o gruesas que impidan el suministro del mismo.

## APENDICE NORMATIVO B

### B. DE LOS METODOS DE PRUEBA

#### 1 Determinación de proteína cruda (Método Kjeldahl-Gunning)

##### 1.1 Fundamento

Las proteínas y demás materias orgánicas son oxidadas por el ácido sulfúrico y el nitrógeno orgánico de las proteínas se fija como sulfato de amonio; esta sal se hace reaccionar con una base fuerte para desprender amoniaco que se destila y se recibe en un ácido débil, en el cual se puede titular el amoniaco con un ácido fuerte. En este método de Kjeldahl-Gunning, se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

##### 1.2 Material

Matraz de Kjeldahl de 800 ml

Matraz Erlenmeyer de 500 ml

Bureta de 50 ml

Pipetas volumétricas de 5 ml

Probeta

Cuerpos de ebullición

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

Digestor-destilador de Kjeldahl

##### 1.3 Reactivos

Acido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O)

Granalla de zinc (malla 20)

Sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Acido bórico al 4% en agua (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)

Solución concentrada de hidróxido de sodio 1:1 m/v (NaOH)

Acido clorhídrico 0,1 N (HCl)

##### 1.3.1 Indicador de Wesslow

**1.3.1.1** Rojo de metilo al 0,2% en una mezcla de 60 ml de alcohol etílico y 40 ml de agua (CH<sub>3</sub>)NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N=NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH y H<sub>2</sub>O.

**1.3.1.2** Azul de metileno al 0,2 % en agua C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>SCl.Cl<sub>2</sub>Zn.H<sub>2</sub>O.

Mezclar dos partes de 1.3.1.1 y una parte de 1.3.1.2.

##### 1.4 Procedimiento

Medir con una pipeta volumétrica 5 ml de muestra en un matraz de Kjeldahl, agregar 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 ml de ácido sulfúrico y unos cuerpos de ebullición; colocar a baja temperatura, hasta que todo el material esté carbonizado y aumentar gradualmente la temperatura hasta que el contenido del matraz esté completamente claro, dejar por 30 minutos más.

Dejar enfriar y agregar 400 ml de agua destilada para disolver completamente el residuo del matraz; dejar enfriar, agregar 6-7 granallas de zinc, estratificando, y sin agitar, agregar 50 ml de solución de hidróxido de sodio. Conectar el matraz al destilador y recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, que contenga 50 ml de ácido bórico y unas gotas del indicador de Wesslow (la parte terminal del tubo del destilador debe estar dentro del ácido). Destilar hasta aproximadamente 300 ml. Retirar el matraz y titular con ácido clorhídrico 0,1 N.

### 1.5 Cálculos

$$\text{g/l de Proteínas} = \frac{V \times N \times 0,014 \times 1000}{M} \times 6,38$$

En donde:

V = ml de ácido clorhídrico 0,1 N requeridos en la titulación

N = normalidad del ácido clorhídrico

M = ml de muestra

6,38 = factor para convertir nitrógeno a proteínas de la leche

**1.6** Según el método de Kjeldahl para determinar el contenido de nitrógeno total (N<sub>2</sub>) de la fórmula, seguido del cálculo del contenido de proteína cruda como sigue:

N<sub>2</sub> x factor = proteína cruda

Factores que deben usarse

Proteína de trigo 5,70

Proteína de soja 6,25

Proteína derivada de la leche 6,38

Proteínas mixtas:

Cuando el alimento contiene más de por ejemplo el 90% (peso seco) de proteína de trigo, soja o derivada de leche, el factor proteína debe ser 5,70; 6,25 y 6,38 respectivamente.

Cuando el alimento está constituido por una cantidad importante conocida (por ejemplo 80%) de peso seco de proteína de trigo, soja o derivada de leche, el factor para dicha proteína debe ser el factor apropiado según se indica arriba. Cuando la proteína remanente está constituida por una mezcla desconocida de estas proteínas, debe aplicarse el factor 6,25 a la cantidad remanente de proteína.

Cuando se conoce la cantidad de cada una de las proteínas de trigo, de soja o derivada de leche contenida en el alimento, el factor proteína empleado deberá ser el derivado proporcionalmente usando los factores arriba citados.

**1.7** Los resultados se expresan como g de proteína cruda por 100 g del alimento tal como se vende y por 100 kcal.

## 2. Determinación de vitamina D3 - HPLC

### 2.1 Fundamento

Saponificación alcalina de la muestra; extracción con éter de compuestos insaponificables; evaporación del éter; solución del residuo seco en hexano e inyección de una alícuota en columna preparativa de HPLC (fase normal, Sílice). Colección del eluato que contiene la fracción de vitamina D; evaporación de esta fracción a sequedad, disolución en la fase móvil de HPLC (Analítica, Acetonitrilo: Cloruro de metileno: Isopropanol), inyección en HPLC (fase reversa C18) y determinación de la vitamina D con el pico máximo a 264 nm por calibración del estándar externo.

### 2.2 Material

Instalación HPLC isocrática

Uno o dos registradores

Balanza analítica, con capacidad de 160 g, lectura 0,1 mg

Balanza de precisión, con capacidad de 1600 g, lectura 0,01 g

Estufa de laboratorio (para productos con almidón)

Baño de agua con agitadores magnéticos, 4 plazas

Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño

Matraces aforados, vidrio marrón, tapón de vidrio de 5, 50 y 100 ml

Matraz de fondo plano, cuello corto, vidrio marrón de 250 ml

Matraces, en forma de pera, vidrio marrón de 10 y 500 ml

Embudo de separación cónico, vidrio marrón, con llave de 500 ml

Embudo, vidrio marrón, diámetro 12 cm

Tapones huecos hexagonales, vidrio marrón

Refrigerante con macho y hembra, manguito 300 mm

Alargadera para introducción de gas

Filtro plisado mediano con diámetro de 18,5 cm

Pipeta aforada, con una marca de 2 ml  
Jeringuillas de 1 y 5 ml  
Aguja para jeringuillas  
Cilindro para gas comprimido, nitrógeno  
Monodetector para gas comprimido, N<sub>2</sub>  
Filtro de 0,45 µ de diámetro  
2 Columnas de 5 µ, 4,6 X 250  
Aparato de filtración  
Filtro 0,5 µ

### 2.3 Reactivos

Colecalciferol, vitamina D<sub>3</sub>, cristalizada para fines bioquímicos (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O)  
Hidróxido de potasio en lentejas para análisis (KOH)  
Alcohol etílico absoluto, para análisis (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)  
Hidroquinona (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>)  
Eter de petróleo para análisis intervalo de ebullición 40 -60°C  
Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH)<sub>2</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO)  
Diestasa (para productos de almidón)  
2-propanol (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH  
n-hexano CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>  
Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN)  
Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
Sulfato de sodio anhidro para análisis (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Nitrógeno (N<sub>2</sub>)  
Acido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)

#### 2.3.1 Fase móvil para HPLC preparativa, 2-propanol al 1% en n-hexano

Degasificar el n-hexano bajo presión reducida y pasar sobre un filtro. Mezclar 100 ml de diclorometano con 900 ml de acetonitrilo degasificado.

#### 2.3.2 Fase móvil para HPLC analítica

Degasificar 1 l de acetonitrilo bajo presión reducida y pasar a través de un filtro. Mezclar 100 ml de diclorometano con 890 ml de acetonitrilo degasificado y 10 ml de 2-propanol.

#### Nota:

La proporción diclorometano/acetonitrilo debe adaptarse de modo que la vitamina D<sub>3</sub> dé un tiempo de retención de aproximadamente 8-9 min. Sin embargo no debería rebasar 20:100.

#### 2.3.3 Fase móvil para lavar la columna preparativa, 2-propanol al 10% en n-hexano

Mezclar 100 ml de 2-propanol con 900 ml de n-hexano degasificado.

#### 2.3.4 Solución patrón de vitamina D<sub>3</sub> para HPLC preparativa

En un matraz aforado de 100 ml, pesar exactamente 50,0 mg de colecalciferol (D<sub>3</sub>) cristalizado, disolver en n-hexano y llevar al volumen con el mismo disolvente (= solución de 20,000 U.I./ml).

Diluir esta solución 1000 veces con el mismo disolvente para obtener una solución de 20 U.I./ml. Esta solución permanece estable de 3 a 4 semanas a +4 °C.

#### 2.3.5 Solución patrón de vitamina D<sub>3</sub> para HPLC analítica

Evaporar 2 ml de solución patrón de 20 U.I./ml (2.3.4) y tomar el residuo en 2 ml de fase móvil (2.3.2).

### 2.4 Procedimiento

**Notas:** la vitamina D<sub>3</sub> es sensible a la luz. Utilizar material de vidrio marrón o proteger el material corriente con papel aluminio.

Efectuar todas las evaporaciones de disolventes bajo presión reducida a una temperatura máxima de 40 °C. No se debe evaporar a sequedad. Romper el vacío introduciendo nitrógeno en el sistema. Evaporar los últimos ml mediante una corriente de nitrógeno.

Al final de la jornada, lavar la columna preparativa durante 15 min con 2-propanol al 10% en n-hexano (2.3.3) con un caudal de 2 ml/min.

#### 2.4.1 Toma de ensayo

Mezclar o moler la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Pesar, con una precisión de 10 mg, una toma de ensayo que contenga 20-40 U.I. de vitamina D<sub>3</sub>, lo que corresponde en general a 10 g.

##### 2.4.1.1 Productos con almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con 10% de su peso de diastasa. Añadir máximo 30 ml de agua destilada a 45-50 °C. Mezclar bien para obtener una suspensión homogénea. Eliminar el aire del matraz mediante nitrógeno, tapar y colocar el matraz durante 30 min en una estufa a 45°C.

#### 2.4.1.2 Productos sin almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con máximo 30 ml de agua destilada a 45-50°C.

#### 2.4.2 Saponificación

Añadir 7 g de hidróxido de potasio grado analítico en el matraz (2.4.1.1 o 2.4.1.2), y mezclar para disolver. A continuación añadir 60 ml de alcohol absoluto y 0,5 g de ácido ascórbico o hidroquinona.

Montar sobre el matraz una alargadera para introducción de un gas refrigerante. Introducir una ligera corriente de gas nitrógeno, y calentar durante 30 min a 70 °C en un baño de agua ebulliendo provisto de agitadores magnéticos.

**Nota:** Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

#### 2.4.3 Extracción del insaponificable

Una vez terminada la saponificación, enfriar el matraz a temperatura ambiente y transvasar la suspensión a un embudo de separación de 500 ml.

Enjuagar con máximo 30 ml de agua fría en 3 porciones de 10 ml que se añaden al contenido del embudo de separación. Evitar un exceso de agua, ya que favorece la formación de emulsiones.

En seguida enjuagar el matraz con 50 ml de éter de petróleo (rango de 40-60°C) en varias porciones que se añaden al embudo de separación. Extraer la vitamina D3 agitando ligeramente. Dejar separar las fases. Vaciar la fase acuosa a otro embudo de separación de 500 ml. Recojer la fase orgánica en un tercer embudo de separación de 500 ml.

Efectuar esta extracción 5 veces en total. Haciendo las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

Lavar la solución orgánica con porciones de 100 ml de agua adicionándola por las paredes del embudo, sin agitar, hasta que el agua de lavado ya no dé reacción coloreada con fenoltaleína. Después del último lavado, esperar al menos 15 min antes de vaciar la fase acuosa.

Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhídrido o en un papel separador de fases tipo 1 PS, y recojer el filtrado en un matraz en forma de pera de 500 ml, sin dejar secar el filtro. Y al final enjuagar el filtro con 50 ml de éter de petróleo.

Evaporar el disolvente bajo presión reducida en un rotavapor a 40 °C, y eliminar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

Transvasar el residuo cuantitativamente a un matraz aforado de 5 ml, mediante pequeñas porciones de fase móvil (2.3.1) llevar al volumen y filtrar la solución inmediatamente a través de un filtro de 0,45 µ de tamaño de poro y adecuado para solventes orgánicos, por ejemplo Acrodisc - CR o equivalente; recoger el filtrado en un matraz en forma de pera. El filtrado debe ser límpido.

La solución está lista para la cromatografía.

#### 2.4.4 Cromatografía preparativa

Condiciones:

Columna: Spherisorb Si, 5 mcm, 4,6 X 250 mm

Loop de inyección: 500 µl

Fase móvil: 1% 2-propanol en n-hexano (2.3.1)

Caudal: 1-3 ml/min (el tiempo de retención de la vitamina D3 debe ser de aproximadamente 5 min)

Detector: espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 264 nm (o eventualmente espectrofotómetro de longitud de onda fija a 254 nm, únicamente utilizable para la etapa preparativa), 0,05 AUFS para el patrón y 0,5 AUFS para el extracto de muestra

Registrador: 10 mm/min

Inyectar primero 500 µl de solución patrón de vitamina D3 (2.3.4) y determinar el tiempo de retención: debe ser aproximadamente 5 min. Inyectar a continuación la solución de la muestra obtenida bajo 2.4.3 y recoger la fracción que contiene la vitamina D3 en un matraz en forma de pera de 10 ml. Comenzando a recoger aproximadamente 1 min antes de la elución de la vitamina D3 y parar aproximadamente 1 min después de la elución de la vitamina D3.

#### 2.4.5 Cromatografía analítica

Evaporar a seco la fracción recogida bajo 2.4.4, mediante una ligera corriente de nitrógeno.

Enfriar el matraz a fin de evitar errores de volumen a una evaporación eventual de disolvente; luego tomar el residuo en 300 µl de fase móvil (2.3.2), agitar ligeramente para disolver bien el residuo.

Condiciones:

Columna:	Spherisorb ODS, 5 mcm, 4,6 X 250 mm
Loop de inyección:	100 µl
Fase móvil:	10% diclorometano, 89 % acetonitrilo y 1% de 2-propanol
Caudal:	2 ml/min
Detector:	espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 264 nm; 0,01 AUFS
Registrador:	10 mm/min

Injectar primero 100 µl de solución patrón (2.3.5) y determinar el tiempo de retención: debe ser aproximadamente 8-9 min (adaptar la proporción de diclorometano/acetonitrilo si es necesario). Luego inyectar 100 µl de la fracción obtenida bajo 2.4.4.

## 2.5 Cálculo, expresión e interpretación de los resultados

### 2.5.1 Evaluación

Identificar el pico de la vitamina D3 en el cromatograma de la muestra mediante el tiempo de retención definido por cromatografía de la solución patrón. Medir la altura de los picos obtenidos durante la cromatografía de la solución patrón y de la solución muestra.

El contenido en vitamina D3, expresado en Unidades Internacionales por 100 g de producto, es igual a:

$$\frac{h_p \times C \times V_0 \times V_2 \times 100}{h_s \times m \times V_1}$$

En donde:

m = toma de ensayo, en gramos

hP = altura del pico de la muestra, en mm

hS = altura del pico de la solución patrón, en mm

C = concentración de la solución patrón inyectada, en U.I./ml

V0 = volumen en el cual ha sido diluido el residuo antes de la cromatografía preparativa (2.4.3) (en general 5 ml = matraz aforado)

V1 = volumen del extracto inyectado en la columna preparativa (en general 0,500 ml=volumen del loop de inyección)

V2 = volumen en el cual ha sido diluida la fracción después de la cromatografía preparativa (en general 0,300 ml)

**Nota:** es superfluo un factor de corrección para la isomerización de la vitamina D3, en previtamina D3, ya que este fenómeno es despreciable en las condiciones de saponificación aplicadas.

### 2.5.2 Límite de detección de acuerdo a la sensibilidad del equipo.

Aproximadamente: 20 U.I./100 g

### 2.5.3 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio) en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media entre ambos resultados.

Cuando las vitaminas han sido añadidas por mezcla en seco, la repetibilidad está fuertemente influida por el grado de homogeneidad del producto.

## 3. Determinación de Vitamina B1 y B2 por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

### 3.1 Fundamento

La vitamina B1, es extraída de la muestra por hidrólisis ácida y oxidada a tiocromo, su contenido es determinado por HPLC en fase inversa con detección fluorométrica.

### 3.2 Reactivos y materiales

#### 3.2.1 Reactivos

Acido clorhídrico fumante, 37% para análisis (HCl)

Acetato de sodio trihidratado, para análisis.

(CH<sub>3</sub> . CO<sub>2</sub>Na . 3H<sub>2</sub>O)

Acido orto-fosfórico PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> . 3H<sub>2</sub>O)

Ferricianuro de potasio, para análisis Fe(CN)<sub>6</sub>K<sub>4</sub> . 3H<sub>2</sub>O

Hidróxido de sodio en lentejas, para análisis.

Monohidrato de tiamina (nitrato de tiamina, Vitamina B1 monohidratada), calidad alimentaria (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S)

Papaína soluble.

Amilasa  
Diastasa  
N,N - Dimetilformamida  $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$   
fosfato, ácido de-potasio, para análisis ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

### 3.2.2 Materiales

Matraces en forma de pera, 100 ml  
Tapones huecos hexagonales  
Matraces aforados, de vidrio de 1000, 100, 50 y 10 ml  
Embudos de vidrio de 100 mm de diámetro  
Matraces Erlenmeyer, de cuello estrecho, 250 ml  
Refrigerante, Allihn, manguito 300 mm  
Filtros plisados medianos 185 mm de diámetro  
Pipetas aforadas con una marca de 2, 3, 5 y 40 ml  
Pipetas graduadas hasta la punta de 1 ml: 0,005  
Probetas graduadas, en forma alta, de 50 ml: 0,5; 100 ml: 1,0  
1000 ml: 10,0

Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con papel aluminio.

### 3.2.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica, 162 g, lectura 0,1 mg  
Balanza de precisión electrónica, 2100 g, lectura 0,01 g  
Baño de agua en línea con soportes, 6 plazas.  
Estufa de laboratorio  
Jeringuilla para HPLC, de un 1 ml  
Aguja para jeringuilla  
Columna ODS o C 18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 X 4,6 mm; o equivalente  
Dispositivo de filtración sobre membrana  
Membrana para filtro

## 3.4 Preparación de soluciones

### 3.4.1 Solución de ácido clorhídrico

En un matraz aforado de 1000 ml que contenga aproximadamente 500 ml de agua destilada, añadir con cuidado 82 ml de ácido clorhídrico al 37% y llevar a volumen con agua destilada. Trabajar en campana de extracción.

### 3.4.2 Solución de acetato de sodio 2,5 M.

En un matraz aforado de 1000 ml disolver 340 g de acetato de sodio trihidratado en agua destilada y llevar a volumen.

### 3.4.3 Hidróxido de sodio, solución de 150 g/l

En un matraz aforado de 1000 ml, disolver 160 g de hidróxido de sodio en lentejas en agua destilada, llevar a volumen.

Conservar en un matraz provisto de un tapón de polietileno.

### 3.4.4 Solución de oxidación

#### 3.4.4.1 Solución de ferricianuro de potasio 1g/100ml

En un matraz aforado de 100 ml disolver, 1 g de ferricianuro de potasio en agua destilada y llevar a volumen.

#### 3.4.4.2 Solución a preparar justo antes del uso

En un matraz aforado de 50 ml, llevar a volumen 2 ml de solución 3.4.4.1 con solución 3.4.3.

## 3.5 Fase móvil para HPLC

### 3.5.1 Solución de fosfato ácido de-potasio, 10 mM pH 7,2.

En un vaso de 1000 ml pesar exactamente 2,28 g de fosfato de-potasio, disolver en aproximadamente 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 con ácido clorhídrico 1 N (3.4.1). Transvasar a un matraz aforado de 1000 ml y llevar a volumen con agua destilada. Degasificar bajo presión reducida y filtrar.

### 3.5.2 Solución de dimetilformamida al 15% en fosfato ácido de potasio.

En un matraz aforado de 1000 ml agregar 150 ml de dimetilformamida y llevar a volumen con solución 3.5.1

## 3.6 Solución patrón de vitamina B1

### 3.6.1 Solución concentrada

En un matraz aforado de 50 ml de vidrio, pesar exactamente 50,0 mg de monohidrato de tiamina y disolver en agua destilada. Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 1 N (3.4.1) y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 mg/ml.

**3.6.2 Soluciones diluidas**

En un matraz aforado de 50 ml, agregar mediante una pipeta, 5 ml de solución 3.6.1 y llevar a volumen con agua destilada. Luego verter mediante una pipeta, 5 ml de esta solución (100 µg/ml) en un matraz aforado de 50 ml y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución contiene 10 µg/ml.

Verter, mediante una pipeta, 5 ml de esta solución en un matraz aforado de 50 ml y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 µg/ml.

**3.6.3** Preparar de la misma manera solución concentrada de riboflavina y de manera subsecuente las soluciones diluidas. No es necesario utilizar matraces de vidrio.

**3.6.4 Solución patrón oxidada para HPLC**

Mediante una pipeta, verter 5 ml de solución 3.6.2 en un matraz aforado de 10 ml de vidrio. Añadir 3 ml de solución de ferricianuro de potasio básico (3.4.4.2). Agitar durante 2 minutos, añadir 0,45 ml de ácido fosfórico concentrado, mezclar, enfriar y llevar a volumen con agua destilada. Cromatografiar esta solución inmediatamente.

**3.7 Procedimiento**

La vitamina B1 no es sensible a la luz; en cambio el producto oxidado, el tiocromo, sí lo es. Durante la etapa de oxidación, utilizar material de vidrio actínico, o material de vidrio corriente protegido con papel aluminio.

**3.7.1 Toma de ensayo**

Homogeneizar toda la muestra, mezclando o moliendo y pesar con una aproximación de 10 mg, una toma de ensayo de 5 g.

Para la determinación de vitamina B2 adicionar 0,5 g de amilasa y 0,25 g de papaína, independientemente de si el producto contiene almidón o no.

**3.7.1.1 Productos con almidón**

En un matraz en forma de pera de 100 ml de vidrio con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con 0,5 g de diastasa y 0,25 g de papaína. Añadir máximo 15 ml de agua destilada de 45 - 50 °C. Mezclar bien, a fin de obtener una suspensión homogénea. Tapar el matraz y colocarlo durante 30 min en una estufa a 40 °C. Añadir a continuación 30 ml de agua destilada de 45 - 50 °C.

**3.7.1.2 Productos sin almidón, inclusive polvos para bebidas que contengan cacao**

En un matraz en forma de pera de 100 ml de vidrio con cuello esmerilado mezclar la toma de ensayo con 45 ml de agua destilada de 45 - 50 °C. Mezclar bien, a fin de obtener una suspensión homogénea.

**3.7.2 Hidrólisis**

**3.7.2.1 Productos con o sin almidón, excepto polvos para bebidas que contengan cacao**

Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 1 N al matraz (3.7.1.1 o 3.7.1.2). Mezclar bien, calentar durante 30 min bajo el reflujo en un baño de agua ebulviendo. Al cabo de 15 min, agitar el matraz para deshacer los aglomerados.

Enfriar y añadir 5 ml de acetato de sodio 2,5 M (3.4.2). Mezclar bien. Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar a través de un filtro plisado. La solución está lista para la oxidación.

**3.7.2.2 Polvos para bebidas que contengan cacao**

Proceder según 3.7.2.1 hasta el enfriamiento después de la hidrólisis. Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar a través de un filtro plisado. Luego verter, mediante una pipeta, 40 ml de filtrado en un matraz aforado de 50 ml (procedimiento especial para bebidas que contienen cacao por tener polifenoles que interfieren en la reacción de B1). Añadir 5 ml de acetato de sodio 2,5 M (3.4.2) y llevar a volumen con agua destilada.

La solución está lista para la oxidación

**3.7.3 Oxidación**

En un matraz aforado de 10 ml de vidrio verter, mediante una pipeta, 5 ml de solución (3.7.2.1 o 3.7.2.2). Añadir 3 ml de solución de ferricianuro de potasio básico (3.4.4.2). Agitar durante 2 minutos. Añadir 0,45 ml de ácido fosfórico concentrado, mezclar, enfriar y llevar a volumen con agua destilada. Cromatografiar esta solución inmediatamente.

**3.7.4 HPLC**

Condiciones

Columna: ODS o C 18, 5 µm; 250 X 4,6 mm o equivalente

Loop de inyección: 50 µl

Fase móvil: ver punto 3.5.2

Caudal: 1,5 ml/min  
 \*Detector: espectrofluorímetro, excitación: 368 nm  
 emisión: 440 nm

Registrador: 10 mm/min  
 \*Para la determinación de vitamina B2 se inyecta directamente del filtrado y se modifica la siguiente condición:  
 Detector: espectrofluorímetro; excitación: 450 nm  
 emisión: 530 nm

Inyectar primero 50 µl de solución patrón oxidada (3.6.4) y determinar el tiempo de retención: debe ser de aproximadamente 5 - 6 min. A continuación inyectar 50 µl de la solución obtenida 3.7.3

### 3.8 Cálculo, expresión e interpretación de los resultados

#### 3.8.1 Evaluación

Identificar el pico del tiocromo o de la riboflavina en el cromatograma de la toma de ensayo mediante el tiempo de retención definido por cromatografía de la solución patrón. Medir la altura de los picos obtenidos al cromatografiar la toma de ensayo y la solución patrón.

El contenido de vitamina B1, expresado en mg por 100 g de producto, es igual a:

$$\frac{hp \cdot C \cdot V \cdot 100}{hs \cdot m \cdot 1000}$$

En donde:

m = masa de la toma de ensayo, en g

hp = altura del pico del extracto, en mm

hs = altura del pico de la solución patrón, en mm

C = concentración de la solución patrón, en µg/ml

V = volumen, en mililitros, en el cual se ha diluido el extracto antes del análisis por HPLC (250 para polvos para bebidas que contengan aromas, 200 para los demás productos)

#### 3.8.2 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio) en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media entre ambos resultados.

## 4. Determinación de Niacina. Método microbiológico

### 4.1 Fundamento

Este método permite cuantificar concentraciones desconocidas de niacina utilizando *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de niacina. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio libre de niacina y el crecimiento celular se cuantifica turbidimétricamente. Por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

### 4.2 Reactivos y materiales

#### 4.2.1 Reactivos

Acido nicotínico para fines bioquímicos

Acido clorhídrico fumante 37% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

#### 4.2.2 Materiales

Micropipeta

Vasos de precipitados

Pipetas volumétricas

Matraces Erlenmeyer

Matraces volumétricos

Tubos de ensaye

### 4.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a 35°C ± 1°C

Espectrofotómetro

Centrífuga

### 4.4 Cepa y medios de cultivo

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Leche descremada en polvo grado reactivo

Caldo micro inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli

Medio de prueba para niacina

**4.4.1** Medio de mantenimiento de la cepa

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a 4° C.

**4.4.2** Mantenimiento de la cepa

Inocular por punción *Lactobacillus plantarum* en profundidad en el medio 4.4.1 cada cuatro semanas, efectuar un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido 4.4.3. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C.

**4.4.3** Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**4.5** Preparación de soluciones

**4.5.1** Solución fisiológica

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**4.5.2** Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 1 N

Bajo una campana de extracción diluir 82 ml de ácido clorhídrico al 37% llevándolos a un volumen de 1000 ml con agua destilada. Para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

**4.5.3** Solución de Hidróxido de sodio 60 g/100 ml

Disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo agua del grifo. Completar a 500 ml en una probeta graduada. Conservar en un frasco con tapón de polietileno o de goma.

**4.5.4** Solución de Hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

**4.5.5** Solución patrón

Justo antes del uso, pesar exactamente 50,0 mg de ácido nicotínico; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml.

**4.6** Procedimiento

**4.6.1** Desarrollo del microorganismo

Un día antes subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum .

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis h antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

**4.6.2** Preparación de la toma de ensayo

En un matraz Erlenmeyer de 150 ml, pesar de 1 a 3 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 200 µg de vitamina, añadir 50 ml de solución de ácido clorhídrico 1N en pequeñas cantidades pasando el matraz Erlenmeyer bajo el grifo de agua caliente después de cada adición.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el autoclave durante 15 min a 120°C. Enfriar.

Ajustar el pH a 4,6 añadiendo primero aproximadamente 3 ml de hidróxido de sodio de 60 g/100 ml mientras se enfría el matraz Erlenmeyer, y luego hidróxido de sodio 1 N. Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,05 µg de vitamina por ml.

**4.6.3 Solución patrón, 0,05 µg/ml**

Justo antes del uso diluir la solución 4.5.5 como sigue:

5 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

$$10 \text{ ml a } 100 \text{ ml} = 0,05 \text{ µg/ml}$$

**4.6.4 Medio de cultivo para el ensayo**

Medio de prueba para niacina

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio actínico de 100 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón: 30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml

cada producto: 10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml

+ 50 a 100 ml de exceso

**4.6.5 Preparación del ensayo**

**4.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco (bl).

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No:	bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón:	0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0 ml
Agua:	5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,5	2,0	2,0 ml
Medio de cultivo:	5		ml		en		cada		tubo	

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

**4.6.5.2 Serie producto**

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18, y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante un pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No:	9	10	11	12	13
Solución de la muestra:	0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua:	4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo:	5	ml	en	cada	tubo

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

**4.6.6 Esterilización del ensayo**

Esterilizar los tubos durante 15 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

**4.6.7 Inoculación**

**4.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo**

Justo antes de inocular el ensayo, transvertir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo 4.6.1 a un tubo de centrifuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transvertir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (4.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (4.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (4.6.1) entre 0,2 y 0,4 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir de 4 a 8 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (4.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 0,2: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas).
- extinción superior a 0,4: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (4.6.4).

**4.6.7.2 Inoculación**

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

**4.6.8 Incubación**

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 16 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 16 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

**4.6.9 Lecturas**

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transvertir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).\*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

\* Nota: Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

**4.7 Cálculos**

**4.7.1 Curva de calibración**

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico, o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los µg de vitamina a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo	ml	µg	lecturas			media No.
			1	2	3	
0	0,0	0,0	88,7	88,6	88,2	88,5
1	0,25	0,0125	73,4	72,6	71,1	72,4
2	0,50	0,025	62,1	61,5	62,6	62,1
3	0,75	0,0375	53,3	53,2	55,5	54,0
4	1,0	0,050	47,3	48,0	49,1	48,1
5	1,5	0,075	36,8	37,7	40,5	38,3
6	2,0	0,100	31,0	45,6	39,5	35,3
7	2,5	0,125	30,5	27,2	27,2	28,3
8	3,0	0,150	29,0	24,8	24,0	25,9

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

**4.7.2 Contenido de vitamina en el producto**

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo	ml	lecturas		media	µg*	µg/ml No.
		1	2			
9	0,25	(88)	79,0	79,0	0,0145	0,058
10	0,50	59,2	58,2	58,7	0,0300	0,060

11	0,75	52,0	52,2	52,1	0,0413	0,055
12	1,00	43,8	45,8	44,8	0,058	0,058
13	1,50	35,1	35,5	35,3	0,086	0,057

media 0,0576=(C)

( ) = valor aberrante

\* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en mg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de vitamina, expresado en mg de ácido nicotínico por 100 g de producto es igual a:

$$\frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

Donde:

C = media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en µg/ml

V1 = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V2 = parte alícuota de V1 en ml

V3 = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V2, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

2,072 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml (V1). Se ha tomado una parte alícuota de 2 ml (V2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V3).

La media de las concentraciones de niacina leídas en la curva de calibración es 0,0576 µg/ml (C).

El contenido de vitamina es:

$$\frac{0,0576 \times 100 \times 100 \times 100}{2,072 \times 2 \times 1000} = 13,9 \text{ mg/100 g}$$

## 5. Determinación de Pantotenato de Calcio. Método microbiológico.

### 5.1 Fundamento

Este método permite cuantificar pantotenato de calcio utilizando un microorganismo que no es capaz de sintetizarlo (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014); el crecimiento celular se relaciona directamente con la concentración de pantotenato presente.

Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio basal libre de pantotenato. El crecimiento celular se mide turbidimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

### 5.2 Reactivos y materiales

#### 5.2.1 Reactivos

Leche descremada en polvo grado reactivo

Calcio D(+) pantotenato para fines bioquímicos

Acido acético glacial 100% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Papaína

Diastasa

#### 5.2.2 Materiales

Mortero de porcelana, interior esmaltado, diámetro 80 mm.

Pistilo de porcelana, cabeza esmaltada, longitud 75-80 mm (serruchado, si es demasiado largo)

Probeta graduada de 100 ml

Material común de laboratorio

### 5.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a 35 °C ± 1°C

Espectrofotómetro

Micropipeta

Centrífuga

#### **5.4 Ceba y medios de cultivo**

*Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014

Caldo Micro Inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli MRS

Medio de prueba para pantotenato

##### **5.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa**

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio de agar bacteriológico con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS+1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

##### **5.4.2 Mantenimiento de la cepa**

Inocular por punción *Lactobacillus plantarum* en profundidad en el medio 5.4.1 cada cuatro semanas, efectuando un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido 5.4.3. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C.

##### **5.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo**

Caldo micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

#### **5.5 Preparación de soluciones**

##### **5.5.1 Solución fisiológica**

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

##### **5.5.2 Solución de ácido acético aproximadamente 1 N**

Diluir 29 ml de ácido acético glacial en 500 ml con agua destilada.

##### **5.5.3 Solución de hidróxido de sodio, aproximadamente 1 N**

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

##### **5.5.4 Solución tampón pH 4,6**

En un matraz aforado de 500 ml, mezclar 100 ml de ácido acético 1 N con 50 ml de hidróxido de sodio (5.5.3) y llevar a volumen con agua destilada.

##### **5.5.5 Solución patrón**

Justo antes del uso, pesar exactamente 50,0 mg de pantotenato de calcio; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml.

#### **5.6 Procedimiento**

##### **5.6.1 Desarrollo del microorganismo**

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum (5.4.3).

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis h antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

##### **5.6.2 Preparación de la toma de ensayo**

Próximo a la determinación, pesar en pequeños morteros de porcelana de 1 - 2 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 50 µg de pantotenato de calcio. Añadir 100 mg de papaína y 50 mg de diastasa. Moler todo cuidadosamente mediante el pistilo.

Mojar la mezcla con 10 ml de solución tampón pH 4,6 (5.5.4). Cubrir los morteros y los pistilos con papel de aluminio y a continuación colocarlos en una estufa.

Incubar una noche a 42°C.

Después de la incubación, verificar el pH y ajustarlo a 4,6 si es necesario. Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,05 µg de pantotenato de calcio por ml.

*Observación:* Con cada nuevo lote de diastasa y de papaína, efectuar un ensayo en blanco:

Tratar 5 g de papaína o de diastasa como la toma de ensayo. Sin diluir, proceder según 5.6.5.2. El contenido de pantotenato de calcio de la enzima no debe rebasar 1 mg/100 g.

**5.6.3 Solución patrón, 0,05 µg/ml**

Justo antes del uso diluir la solución 5.5.5 como sigue:

5 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml = 0,05 µg/ml

**5.6.4 Medio de cultivo para el ensayo**

Medio de prueba para pantotenato.

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón: 30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml

cada producto: 10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml

+ 50 a 100 ml de exceso

**5.6.5 Preparación del ensayo**

**5.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco (bl).

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución Patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0 ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo								

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

**5.6.5.2 Serie producto**

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13	
Solución de la muestra:	0,25	0,50	4,75	1,0	1,50ml
Agua:	4,75	4,50	4,25	4,0	3,50ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

Esterilizar los tubos durante 15 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

**5.6.6 Inoculación**

**5.6.6.1 Preparación y estandarización del inóculo**

Justo antes de inocular el ensayo, transvertir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo 5.6.1 a un tubo de centrífuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transvertir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (5.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (5.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (5.6.1) entre 0,2 y 0,4 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir de 4 a 8 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (5.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 0,2: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas).
- extinción superior a 0,4: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (5.6.4).

**5.6.6.2 Inoculación**

Mediante una micropipeta de punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

**5.6.7 Incubación**

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 16 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 16 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

**5.6.8 Lecturas**

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transvertir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl). \*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

\* Nota: Si la determinación se hace en absorbancia, buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

**5.7 Cálculos**

**5.7.1 Curva de calibración**

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico, o mediante una calculadora con regresión lineal llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los µg de pantotenato de calcio a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo	ml	µg	lecturas			media No.
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
0	0,0	0,0	99,0	98,9	99,7	99,2
1	0,25	0,0125	93,0	92,2	91,0	92,0
2	0,50	0,025	82,8	83,3	82,9	83,0
3	0,75	0,0375	72,3	70,2	73,0	71,8
4	1,0	0,050	57,4	58,9	64,2	60,1
5	1,5	0,075	39,8	36,5	39,8	38,7
6	2,0	0,100	26,9	27,0	27,2	27,0
7	2,5	0,125	22,4	20,2	21,0	21,2
8	3,0	0,150	18,9	17,1	18,9	18,3

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

**5.7.2 Contenido de vitamina en el producto**

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo	ml	lecturas	media	µg*	µg/ml No.
------	----	----------	-------	-----	-----------

		<u>1</u>	<u>2</u>			
9	0,25	(81)	92,1	92,1	0,0119	0,0476
10	0,50	82,7	81,7	82,2	0,0252	0,0504
11	0,75	71,4	72,2	71,8	0,038	0,0507
12	1,00	57,2	58,8	58,0	0,050	0,0500
13	1,50	37,9	39,1	38,5	0,076	0,0507
					media	0,0498(=C)

() = valor aberrante

\* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en mg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de pantotenato de calcio expresado en mg/100 g de producto es igual a:

$$\frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

C = media de las concentraciones de pantotenato de calcio leídas en la curva de calibración, en µg/ml

V1 = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V2 = parte alícuota de V1, en ml

V3 = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V2, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

1,127 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml(V1). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V3).

La media de las concentraciones de pantotenato de calcio leídas en la curva de calibración es 0,0498 µg/ml (C).

El contenido de pantotenato de calcio es:

$$\frac{0,0498 \times 100 \times 100 \times 100}{1,127 \times 10 \times 1000} = 4,42 \text{ mg/100 g}$$

## 6. Determinación de Acido Fólico. Método microbiológico.

### 6.1 Fundamento

Este método permite cuantificar ácido fólico utilizando *Lactobacillus casei* ATCC 7469, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de folato presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial libre de folato. El crecimiento celular se mide turbidimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración en la muestra.

### 6.2 Reactivos y materiales

#### 6.2.1 Reactivos

Cloruro de calcio fundido o granulado para análisis

Fosfato diácido de potasio anhidro

Fosfato ácido di-potásico anhidro

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Alcohol etílico absoluto

α-amilasa

Lactosa

#### 6.2.2 Materiales

Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 ml

Matraz aforado de vidrio de 100, 250 y 500 ml

Tapones de vidrio

Micropipetas

Material común de laboratorio

Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con papel aluminio.

### **6.3 Aparatos e instrumentos**

Autoclave  
Incubadora a 35 °C ± 1°C  
Espectrofotómetro  
Centrífuga

### **6.4 Cepa y medios de cultivo**

*Lactobacillus casei* ATCC 7469  
Leche descremada en polvo grado reactivo  
Caldo Micro Inoculum  
Agar bacteriológico  
Caldo Bacto Lactobacilli MRS  
Medio de prueba para ácido fólico

#### **6.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa**

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

#### **6.4.2 Mantenimiento de la cepa**

Inocular por punción *Lactobacillus casei* en profundidad en el medio 6.4.1 cada cuatro semanas, efectuando un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido 6.4.3. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C.

#### **6.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo**

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

### **6.5 Preparación de soluciones**

#### **6.5.1 Solución fisiológica**

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

#### **6.5.2 Solución tampón pH 6,1**

Disolver 2 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

#### **6.5.3 Solución de cloruro de calcio, CaCl<sub>2</sub>, al 2%**

Disolver 2 g de cloruro de calcio en agua destilada y completar a 100 ml en un matraz aforado.

#### **6.5.4 Solución patrón**

Pesar exactamente 50,0 mg de ácido fólico (ácido pteroilglutámico), disolver en agua destilada en un matraz aforado de vidrio de 500 ml, añadir 50 ml de NaOH 0,1 N, 100 ml de alcohol y llevar a volumen con agua destilada.

Conservar esta solución a 4°C durante máximo 6 meses.

### **6.6 Procedimiento**

El ácido fólico es fotosensible. Por lo tanto, para todas las soluciones que contienen dicha vitamina se debe utilizar material de vidrio actínico o cubrir el material de vidrio corriente con papel de aluminio o un paño negro.

#### **6.6.1 Desarrollo del microorganismo**

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum (6.4.3).

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis h antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

#### **6.6.2 Preparación de la toma de ensayo**

##### **6.6.2.1 Productos sin almidón**

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, pesar de 1 a 3 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 1 µg de ácido fólico. Disolver en 30 ml de solución tampón pH 6,1 (6.5.2). A fin de evitar la formación de grumos, añadir la solución tampón en pequeñas cantidades pasando el matraz Erlenmeyer bajo el grifo de agua caliente.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocar en el autoclave durante 20 min a 102°C. Enfriar.

Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de vidrio de 100 ml. Añadir al contenido del matraz 0,8 ml de solución de cloruro de calcio al 2% y agitar. Dejar reposar durante 15 minutos, luego llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,2 ng de ácido fólico por ml.

**6.6.2.2 Productos con almidón**

Proceder según el primer apartado bajo 6.6.2.1.

Antes de colocar la solución en el autoclave, añadir una cantidad de mezcla al 6% de α-amilasa pancreática en lactosa, correspondiente a 1% de la toma de ensayo.

Incubar durante 30 min a 42°C. Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocar en el autoclave durante 20 min a 102°C. Enfriar. A continuación transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de vidrio de 100 ml y proseguir como se describe en 6.6.2.1

**Nota:** Con cada nuevo lote de diastasa efectuar un ensayo en blanco.

Mediante una pipeta tomar 10 ml de solución patrón (6.6.3) dilución d. Añadir 30 ml de agua. Añadir 100 mg de mezcla al 6% de α-amilasa pancreática en lactosa. Incubar durante 30 min a 42°C. Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml. Llevar a volumen y filtrar.

La curva de calibración obtenida con esta solución debe ser comparable a aquella obtenida con la solución patrón no tratada.

**6.6.3 Solución patrón 0,2 ng/ml**

Justo antes del uso diluir la solución 6.5.4 como sigue:

10 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

2 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml = 0,2 ng/ml

**6.6.4 Medio de cultivo para el ensayo**

Medio para prueba de ácido fólico.

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón: 30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml

cada producto: 10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml

+ 50 ml a 100 ml de exceso

**6.6.5 Preparación del ensayo**

**6.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar 3 filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0,..., 8; el primero corresponde al blanco.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.:bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo								

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

**6.6.5.2 Serie producto**

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.:9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

**6.6.6 Esterilización del ensayo**

Esterilizar los tubos durante 10 min a 121°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

**6.6.7 Inoculación**

**6.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo**

Justo antes de inocular el ensayo, transvertir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo 6.6.1 a un tubo de centrífuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transvertir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (6.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (6.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (6.6.1) entre 0,40 y 0,60 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir 5 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (6.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 0,40: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas)
- extinción superior a 0,60: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (6.6.4).

**6.6.7.2 Inoculación**

Mediante una micropipeta de punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

**6.6.8 Incubación**

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 19 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 19 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

**6.6.9 Lecturas**

Mediante un agitador para tubos de ensayo, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transvertir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

**6.7 Cálculos**

**6.7.1 Curva de calibración**

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o mediante una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los ng de ácido fólico a la abscisa.

\*Nota: Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

Ejemplo:

Tubo	ml	ng	lecturas	media No.
------	----	----	----------	-----------

			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
0	0,0	0,0	88,1	87,6	87,5	87,7
1	0,25	0,05	78,4	78,5	79,5	78,8
2	0,50	0,1	70,5	70,4	71,3	70,7
3	0,75	0,15	64,1	64,6	64,6	64,4
4	1,0	0,20	58,9	59,6	59,3	59,3
5	1,5	0,30	50,8	51,3	51,4	51,2
6	2,0	0,40	44,7	44,1	45,5	44,8
7	2,5	0,50	39,7	39,7	38,2	39,2
8	3,0	0,60	35,6	36,1	35,2	35,6

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

### 6.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo	ml	lecturas	media	ng*	ng/ml No.
		<u>1</u>	<u>2</u>		
9	0,25	80,2	79,4	79,8	0,045 0,18
10	0,50	71,6	73,7	72,6	0,095 0,19
11	0,75	66,1	67,7	66,9	0,135 0,18
12	1,00	61,4	(56,5)	61,4	0,185 0,185
13	1,50	53,7	52,1	52,9	0,280 0,187
				media	0,184 (=C)

( ) = valor aberrante

\* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de ácido fólico, expresado en  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de producto es igual a:

$$\frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

C= media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V1= volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V2= parte alícuota de V1, en ml

V3= volumen al que se ha diluido la parte alícuota V2, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

1 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml(V1). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V2), que se ha diluido en un matraz aforado de 250 ml (V3).

La media de las concentraciones en ácido fólico leídas en la curva de calibración es 0,184 ng/ml (C).

El contenido en ácido fólico es:

$$\frac{0,184 \times 250 \times 100 \times 100}{1 \times 10 \times 1000} = 46,0 \mu\text{g}/100\text{ g}$$

## 7. Determinación de Vitamina B12. Método microbiológico

### 7.1 Fundamento

Este método permite cuantificar cianocobalamina utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de cianocobalamina presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial libre de

cianocobalamina. El crecimiento celular se mide turbimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra. El análisis debe realizarse con baja intensidad de luz porque la vitamina B12 es fotosensible.

## **7.2 Reactivos y materiales**

### **7.2.1 Reactivos**

Vitamina B12 para fines bioquímicos  
Acido clorhídrico fumante al 37% para análisis  
Cianuro de sodio (CN) para análisis  
Cristales de cloruro de sodio para análisis  
Hipoclorito de sodio  
Diastasa

### **7.2.2 Materiales**

Micropipetas  
Centrífuga  
Matraz en forma de pera de vidrio de 100 ml  
Matraz aforado de vidrio de 100 y 500 ml  
Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 ml  
Baño de agua  
Refrigerante Allihn  
Frascos con cápsula de polietileno a presión de 8 ml  
Tapón de vidrio  
Pera de goma, propipeta  
Material común de laboratorio  
Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con papel aluminio.

## **7.3 Aparatos e instrumentos**

Autoclave  
Incubadora a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$   
Espectrofotómetro

## **7.4 Cepa y medios de cultivo**

*Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830  
Leche descremada en polvo grado reactivo  
Caldo micro inoculum  
Agar bacteriológico  
Caldo Bacto Lactobacilli MRS  
Medio de prueba para vitamina B12

### **7.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa**

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **7.4.2 Mantenimiento de la cepa**

Inocular por punción *Lactobacillus leichmannii* en profundidad en el medio 7.4.1 cada cuatro semanas, efectuando un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido 7.4.3. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a  $35^{\circ}\text{C}$ .

### **7.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo**

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **7.5 Preparación de soluciones**

### **7.5.1 Solución fisiológica**

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**7.5.2 Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 1 N**

Bajo una campana de extracción diluir 82 ml de ácido clorhídrico al 37% llevándolos a un volumen de 1000 ml con agua destilada, para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

**7.5.3 Solución de cianuro de sodio, 10 g /100 ml**

**CUIDADO: VENENO. UTILIZAR GUANTES.**

En un matraz aforado de 100 ml disolver 10 g de cianuro de sodio en agua destilada y llevar a volumen.

Conservar en el refrigerador a 4°C

**7.5.4 Solución de cianuro de sodio al 1%**

Justo antes del uso, tomar mediante una pipeta y una pera de goma, 1/ml de solución de cianuro de sodio (7.5.3) y diluir a 10 ml con agua destilada en un matraz aforado de 10 ml.

Nota: La solución sobrante de cianuro de sodio al 1% debe destruirse mediante adición de solución de hipoclorito de sodio al 15% (aproximadamente 1 ml por 10 ml de solución de cianuro de sodio). Dejar reaccionar durante 2 días bajo una campana de extracción.

**7.5.5 Solución patrón**

Pesar exactamente 50,0 mg de vitamina B12; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de vidrio de 500 ml. Verificar la concentración de la solución como sigue:

Diluir 1 ml de solución con 3 ml de agua destilada. Medir la extinción de dicha solución en una cubeta de 1 cm a 360 nm.

$$f = \frac{100 \cdot E}{0,517}$$

E = extinción leída

f = contenido de vitamina B12, en porcentaje

Corregir la concentración de la solución proporcionalmente según el ejemplo:

$$0,1 \text{ ng/ml} \cdot \frac{f}{100} = 0,076 \text{ ng/ml}$$

para f = 76

Eliminar la solución si el valor de f es inferior a 70%

Conservar esta solución congelada en porciones de 5 ml en matraces actínicos durante máximo 6 meses.

**7.6 Procedimiento**

La vitamina B12 es fotosensible. Por lo tanto, para todas las soluciones que contienen dicha vitamina se debe utilizar material de vidrio actínico o cubrir el material de vidrio corriente con papel de aluminio o un paño negro.

**7.6.1 Desarrollo del microorganismo**

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum (7.4.3).

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis h antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

**7.6.2 Preparación de la toma de ensayo**

En un matraz de 100 ml con esmerilado normalizado, pesar de 3 a 4 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 100 ng de vitamina B12.

Disolver la toma de ensayo en 25 ml de agua destilada a 50°C. A fin de evitar la formación de grumos, añadir el agua destilada en pequeñas cantidades agitando cada vez.

Añadir 0,2 ml de solución de cianuro de sodio (7.5.4) recién preparada (CUIDADO: VENENO) y agitar.

Dejar la solución durante 30 min a temperatura ambiente, al abrigo de la luz y agitar de vez en cuando. Al cabo de este tiempo, ajustar el pH de 4,8 - 5 con solución de ácido clorhídrico 1 N. A continuación calentar el matraz durante 35 min en un baño de agua en ebullición. Enfriar (\*). Ajustar el pH a 4,6. Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

\* Para productos con almidón se recomienda aplicar un tratamiento enzimático a fin de obtener un filtrado límpido. Añadir a la solución la cantidad de diastasa equivalente al 10% de la toma de ensayo. Incubar durante 30 min a 42°C.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,05 ng de vitamina B12/ ml.

Nota: con cada nuevo lote de diastasa efectuar un ensayo en blanco.

Tratar 3 g de diastasa como la toma de ensayo. El contenido de vitamina B12 de la diastasa no debe rebasar 0,5 µg/100 g.

**7.6.3 Solución patrón 0,05 ng/ml**

Justo antes del uso diluir la solución 7.5.5 como sigue:

10 ml a 100 ml

5 ml a 100 ml

5 ml a 100 ml

2 ml\* a 100 ml = 0,05 ng/ml

\* + 0,2 ml de cianuro de sodio (CUIDADO VENENO)

**7.6.4 Medio de cultivo para el ensayo**

Medio para prueba de vitamina B12

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón: 30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml

cada producto: 10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml

+ 50 ml a 100 ml de exceso

**7.6.5 Preparación del ensayo**

**7.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensaye, colocar 3 filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0,..., 8; el primero corresponde al blanco.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo								

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

**7.6.5.2 Serie producto**

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18, y así sucesivamente para todos los productos analizadas.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo			

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

**7.6.6 Esterilización del ensayo**

Esterilizar los tubos durante 10 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

**7.6.7 Inoculación**

**7.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo**

Justo antes de inocular el ensayo, transvertir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo 7.6.1 a un tubo de centrífuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transvertir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (7.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (7.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (7.6.1) entre 1,10 y 1,25 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir 2 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (7.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 1,10: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 3 gotas)
- extinción superior a 1,25: diluir proporcionalmente con el medio (7.6.4).

**7.6.7.2 Inoculación**

Mediante una micropipeta de punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

**7.6.8 Incubación**

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 14 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 14 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

**7.6.9 Lecturas**

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transvertir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl). \*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

\* Nota: Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

**7.7 Cálculos**

**7.7.1 Curva de calibración**

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o mediante una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los ng de vitamina B12 a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo	ml	ng	lecturas			media No.
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
0	0,0	0,0	95,1	95,0	95,1	95,0
1	0,25	0,0125	82,2	80,9	82,4	81,8
2	0,50	0,025	67,5	67,0	66,1	66,9
3	0,75	0,0375	55,0	56,5	57,5	56,3
4	1,0	0,050	48,5	48,9	47,2	48,2
5	1,5	0,075	37,1	37,8	36,8	37,2
6	2,0	0,100	30,5	30,5	30,3	30,4
7	2,5	0,125	25,4	23,2	24,4	24,3
8	3,0	0,150	20,2	21,2	20,0	20,5

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

**7.7.2 Contenido de vitamina en el producto**

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo	ml	lecturas		media	ng*	ng/ml No.
		<u>1</u>	<u>2</u>			
9	0,25	(93)	81,8	81,8	0,0131	0,0524
10	0,50	66,1	65,3	65,7	0,0263	0,0526

11	0,75	54,8	56,8	55,8	0,038	0,0507
12	1,00	48,5	48,1	48,3	0,049	0,0490
13	1,50	37,0	38,0	37,5	0,077	0,0513

media 0,0512(=C)

( ) = valor aberrante

\* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en µg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de vitamina B12, expresado en µg/100 g de producto es igual a:

$$\frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

C= media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V1= volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V2= parte alícuota de V1, en ml

V3= volumen al que se ha diluido la parte alícuota V2, en ml

m= toma de ensayo, en g

Ejemplo:

2,046 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml (V1). Se ha tomado una parte alícuota de 20 ml (V2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V3).

La media de las concentraciones en vitamina B12 leídas en la curva de calibración es 0,0512 ng/ml (C).

El contenido en vitamina B12 es:

$$\frac{0,0512 \times 100 \times 100 \times 100}{2,046 \times 20 \times 1000} = 1,25 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$$

## 8. Determinación de Biotina

Método microbiológico

### 8.1 Fundamento

Este método permite cuantificar concentraciones desconocidas de biotina utilizando *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, microorganismos que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de biotina presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio libre de biotina y el crecimiento celular se cuantifica turbidimétricamente. Por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

### 8.2 Reactivos y materiales

#### 8.2.1 Reactivos

D (+) - Biotina para fines bioquímicos

Acido sulfúrico 95-97% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Alcohol etílico absoluto

#### 8.2.2 Material

Micropipeta

Material común de laboratorio

### 8.3 Aparatos e instrumentos

Centrífuga

Autoclave

Incubadora a 35°C ± 1°C

Espectrofotómetro

### 8.4 Cepa y medios de cultivo

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Leche descremada en polvo grado reactivo

Caldo micro inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli MRS (MRS - agar)

Medio de prueba para biotina

**8.4.1** Medio de mantenimiento de la cepa

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**8.4.2** Mantenimiento de la cepa

Inocular por punción *Lactobacillus plantarum* en profundidad en el medio 8.4.1 cada cuatro semanas, efectuar un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido 8.4.3. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C.

**8.4.3** Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**8.5** Preparación de soluciones

**8.5.1.** Solución fisiológica

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**8.5.2** Solución de ácido sulfúrico aproximadamente 3 N

Disolver 85 ml de ácido sulfúrico 95 - 97% a 1000 ml con agua destilada. Para ello verter al ácido con PRECAUCION en el matraz aforado que ya contiene agua. Enfriar el matraz durante la operación. Llevar a volumen.

**8.5.3** Solución de Hidróxido de sodio, 60 g/100 ml

Disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo el agua del grifo. Completar a 500 ml en una probeta graduada. Conservar en un frasco con tapón de polietileno o de goma.

**8.5.4** Solución de Hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

**8.5.5** Solución patrón

Pesar exactamente 50,0 mg de biotina; disolver en una mezcla 1:1 agua destilada/ alcohol etílico y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml. Conservar esta solución en un frasco actínico a 4°C durante máximo 6 meses.

**8.6** Procedimiento

**8.6.1** Desarrollo del microorganismo

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis h antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

**8.6.2** Preparación de la toma de ensayo

En un matraz Erlenmeyer de 150 ml, pesar de 1 a 2 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 1 µg de vitamina, añadir 50 ml de ácido sulfúrico 3 N y dispersar bien el producto. A fin de evitar la formación de grumos, añadir el ácido en pequeñas cantidades pasando el matraz Erlenmeyer bajo el grifo de agua caliente después de cada adición.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el autoclave durante 1 h a 120°C. Enfriar.

Ajustar el pH a 4,6 añadiendo primero aproximadamente 3 ml de hidróxido de sodio de 60 g/100 ml mientras se enfría el matraz Erlenmeyer, y luego hidróxido de sodio 1 N. Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 250 o 300 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,2 ng de vitamina por ml.

**8.6.3** Solución patrón, 0,2 ng/ml

Justo antes del uso diluir la solución 8.5.5 como sigue:

1 ml a 100 ml

1 ml a 100 ml

2 ml a 100 ml = 0,2 ng/ml

**8.6.4 Medio de cultivo para el ensayo**

Medio de prueba para biotina

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de material actínico de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón: 30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml

cada producto: 10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml

+ 50 a 100 ml de exceso

**8.6.5 Preparación del ensayo**

**8.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco (bl).

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,5	2,0	2,0 ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo								

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

**8.6.5.2 Serie producto**

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18, y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante un pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo			

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

**8.6.6 Esterilización del ensayo**

Esterilizar los tubos durante 15 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

**8.6.7 Inoculación**

**8.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo**

Justo antes de inocular el ensayo, transvertir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo 8.6.1 a un tubo de centrífuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transvertir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (8.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (8.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (8.6.1) entre 0,2 y 0,4 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir de 4 a 8 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (8.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 0,2: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas).
- extinción superior a 0,4: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (8.6.4)

**8.6.7.2 Inoculación**

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

**8.6.8 Incubación**

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 18 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 18 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

**8.6.9 Lecturas**

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transvertir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).\*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

\* **Nota:** Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

**8.7 Cálculos**

**8.7.1 Curva de calibración**

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los ng de vitamina a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo	ml	ng	lecturas			media No.
			1	2	3	
0	0,0	0,0	96,6	96,5	96,8	96,6
1	0,25	0,05	89,9	89,1	90,1	89,7
2	0,50	0,10	80,9	82,0	82,1	81,7
3	0,75	0,15	75,1	74,8	74,9	74,9
4	1,0	0,20	69,0	68,1	68,9	68,7
5	1,5	0,30	59,9	59,0	58,9	59,3
6	2,0	0,40	51,8	51,8	51,2	51,6
7	2,5	0,50	46,0	45,7	45,1	45,6
8	3,0	0,60	41,5	40,5	40,0	40,7

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada; esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

**8.7.2 Contenido de vitamina en el producto**

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo	ml	lecturas		media	ng*	ng/ml No.
		1	2			
9	0,25	(82)	87,5	87,5	0,065	0,26
10	0,50	80,2	78,2	79,2	0,120	0,24
11	0,75	71,8	72,6	72,2	0,175	0,23
12	1,00	64,7	66,1	65,4	0,235	0,24
13	1,50	54,1	53,8	53,9	0,370	0,25

media 0,244 =(C)

( ) = valor aberrante

\* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas de los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en µg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido en vitamina, expresado en µg de biotina/100 g de producto es igual a:

$$\frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

Donde:

C= media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V1= volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V2= parte alícuota de V1 en ml

V3= volumen al que se ha diluido la parte alícuota V2, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

1,032 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 250 ml (V1). Se ha tomado una parte alícuota de 20 ml (V2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V3).

La media de las concentraciones de biotina leídas en la curva de calibración es 0,244 ng/ml (C).

El contenido en vitamina es:

$$\frac{0,244 \times 100 \times 250 \times 100}{1,032 \times 20 \times 1000} = 29,55 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

## **9. Determinación de Vitamina B6 (Piridoxina)**

### **Método microbiológico**

#### **9.1 Fundamento**

Este método permite cuantificar concentraciones desconocidas de vitamina B6 utilizando *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de Piridoxina. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio libre de Piridoxina y el crecimiento celular se cuantifica turbidimétricamente. Por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

#### **9.2 Reactivos y materiales**

##### **9.2.1 Reactivos**

Clorhidrato de Piridoxina para fines bioquímicos

Acido clorhídrico fumante al 37% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Acetato de sodio trihidratado para análisis

##### **9.2.2 Materiales**

Micropipeta

Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 ml

Matraz aforado de vidrio de 100, 250 y 500 ml

Tapón de vidrio

Frascos con cápsula de polietileno a presión

Material común de laboratorio

Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con aluminio.

#### **9.3 Aparatos e instrumentos**

Autoclave

Incubadora a 30°C ± 1°C

Espectrofotómetro

Centrífuga

#### **9.4 Cepa y medios de cultivo**

*Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080

Agar de micro ensayo

Medio de prueba para Piridoxina

##### **9.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa**

Agar de microensayo

Preparar 1 l de medio según las indicaciones de la etiqueta. Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición inclinada, a fin de obtener una pendiente lo más larga posible (agar inclinado).

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**9.4.2** Mantenimiento de la cepa

Inocular por estría *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 en superficie en el medio 9.4.1 cada dos semanas. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 24 h a 30°C.

**9.4.3** Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Piridoxina Y medio para prueba, solución 1:1, enriquecida con 1 ng de vitamina B6/ml.

Diluir 1 ml de solución patrón 9.5.7 a 100 ml. Añadir 1 ml de esta dilución a 500 ml de medio de cultivo 9.6.4 y completar a 1 l con agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**9.5** Preparación de soluciones

**9.5.1** Solución fisiológica

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**9.5.2** Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 0,44 N

Bajo una campana de extracción diluir 36,5 ml de ácido clorhídrico al 37% a 100 ml con agua destilada. Para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

**9.5.3** Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 0,055 N

Bajo una campana de extracción diluir 4,5 ml de ácido clorhídrico al 37% a 1000 ml con agua destilada. Para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

**9.5.4** Solución de hidróxido de sodio, 60 g/100 ml

Disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo agua del grifo. Completar a 500 ml en una probeta graduada. Conservar en un frasco con tapón de polietileno o de goma.

**9.5.5** Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

**9.5.6** Solución de acetato de sodio aproximadamente 2,5 M

En un matraz aforado de 500 ml disolver 170 g de acetato de sodio trihidratado en agua destilada y llevar a volumen.

**9.5.7** Solución patrón

Pesar exactamente 50,0 mg de piridoxina; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml. Conservar esta solución congelada en fracciones de 5 ml durante máximo 6 meses.

**9.6** Procedimiento

La vitamina B6 es fotosensible. Por lo tanto, para todas las soluciones que contienen dicha vitamina se debe utilizar material actínico o cubrir el material de vidrio corriente con papel de aluminio o paño negro.

**9.6.1** Desarrollo del microorganismo

Tres días antes de la inoculación del ensayo, efectuar dos cultivos sucesivos de 24 horas en superficies de agar. Un día antes del ensayo, subcultivar el microorganismo tomado del último cultivo sobre agar, en un tubo del medio líquido 9.4.3.

Incubar durante 24 h a 30°C.

**9.6.2** Preparación de la toma de ensayo

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, pesar de 1 a 2 g de muestra homogénea, que contenga por lo menos 2 µg de vitamina. Poner en suspensión en 180 ml de:

Solución de ácido clorhídrico 0,44 N si el producto contiene almidón.

Solución de ácido clorhídrico 0,055 N si el producto no contiene almidón.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el autoclave durante 1 h a 125°C. Enfriar.

Después de enfriar añadir:

3 ml de solución de hidróxido de sodio (9.5.4) si el producto contiene almidón.

8 ml de solución de acetato de sodio (9.5.6) si el producto no contiene almidón.

Ajustar el pH a 4,6 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 5 ng de vitamina por ml.

**9.6.3 Solución patrón, 5 ng/ml**

Justo antes del uso diluir la solución 9.5.7 como sigue:

5 ml a 100 ml

5 ml a 100 ml

5 ml a 250 ml = 5 ng/ml

**9.6.4 Medio de cultivo para el ensayo**

Medio Y para prueba de piridoxina

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón: 30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml

cada producto: 10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml

+ 50 a 100 ml de exceso

**9.6.5 Preparación del ensayo**

**9.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco (bl).

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,0	2,0 ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo								

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

**9.6.5.2 Serie producto**

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo:	5 ml en cada tubo			

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

**9.6.6 Esterilización del ensayo**

Esterilizar los tubos durante 10 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

**9.6.7 Inoculación**

**9.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo**

Justo antes de inocular el ensayo, transvertir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo 9.4.1 a un tubo de centrifuga estéril, centrifugar a 1000 rpm durante 2 min. Decantar la solución y lavar el sedimento 3 veces con 10 ml de solución fisiológica estéril, centrifugando y decantando la solución después de cada lavado.

Suspender el sedimento en 5 ml de solución fisiológica. Diluir de 3 a 4 gotas de esta suspensión en un tubo que contenga 10 ml de solución fisiológica. Este tubo es el inóculo.

**9.6.7.2 Inoculación**

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

**9.6.8 Incubación**

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 19 h a 30°C. Dado que *Saccharomyces carlsbergensis* es aerobio, inclinar los tubos al máximo a fin de que la superficie de contacto entre el líquido y el aire sea la mayor posible.

Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

**9.6.9 Lecturas**

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transvertir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).\*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

\* **Nota:** Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

**9.7 Cálculos**

**9.7.1 Curva de calibración**

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los ng de vitamina a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	ng	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	91,2	90,6	90,5	90,7
1	0,25	1,25	70,4	70,0	70,2	70,2
2	0,50	2,5	51,5	54,6	55,5	53,9
3	0,75	3,75	42,2	44,4	44,5	43,7
4	1,0	5,0	33,8	33,2	34,5	33,8
5	1,5	7,5	23,2	24,3	26,0	24,5
6	2,0	10,0	20,0	18,5	19,2	19,2
7	2,5	12,5	15,1	15,2	15,7	15,3
8	3,0	15,0	14,2	13,2	13,2	13,5

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

**9.7.2 Contenido de vitamina en el producto**

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo	ml	lecturas		media	ng*	ng/ml No.
		1	2			
9	0,25	(80)	68,3	68,3	1,20	4,78
10	0,50	51,5	54,5	53,0	2,435	4,85
11	0,75	43,5	41,1	42,3	3,615	4,81
12	1,00	34,9	33,7	34,3	4,95	4,95
13	1,50	23,9	25,1	24,5	7,47	4,987
				media	4,87	=(C)

( ) = valor aberrante

\* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en mg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de vitamina, expresado en mg de clorhidrato de piridoxina por 100 g de producto es igual a:

$$\frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

Donde:

C= media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V1= volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V2= parte alícuota de V1 en ml

V3= volumen al que se ha diluido la parte alícuota V2, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

2,032 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 250 ml (V1). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V3).

La media de las concentraciones de piridoxina leídas en la curva de calibración es 4,87 ng/ml (C).

El contenido de vitamina es:

$$\frac{4,87 \times 100 \times 250 \times 100}{2,032 \times 10 \times 1000 \times 1000} = 0,599 \text{ mg/100 g}$$

## **10. Determinación de Inositol**

Método microbiológico

### **10.1 Fundamento**

Este método permite cuantificar Inositol utilizando *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080, microorganismo que no es capaz de sintetizar inositol, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de Inositol presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial basal libre de Inositol. El crecimiento celular se mide turbidimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

### **10.2 Reactivos y materiales**

#### **10.2.1 Reactivos**

myo-inositol para fines bioquímicos

Acido clorhídrico fumante al 37% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Metanol para análisis

α- amilasa pancreática 25 U/mg

Fosfatasa

Lactosa monohidratada

#### **10.2.2 Materiales**

Micropipetas

Material común de laboratorio

### **10.3 Aparatos e instrumentos**

Autoclave

Incubadora a 35°C ± 1°C

Espectrofotómetro

Centrífuga

Termorreactor

### **10.4 Cepa y medios de cultivo**

*Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080

Medio para la prueba de Inositol modificado. Por cada 100 ml agregar (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>: 1,5 g, Ascorbato de sodio: 25 g, ZnSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O: 15 mg, CuSO<sub>4</sub>: 15 mg, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O:15 mg, Nitrato de tiamina: 0,5 mg, Nicotinamida: 5 mg, Lactosa: 23,45 g.

Agar de microensayo

**10.4.1** Medio de mantenimiento de la cepa

Agar de microensayo (Micro Assay)

Preparar 1 l de medio según las indicaciones de la etiqueta. Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición inclinada, a fin de obtener una pendiente lo más larga posible (agar inclinado).

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**10.4.2** Mantenimiento de la cepa

Inocular por estría *Saccharomyces carlsbergensis* en superficie en el medio 10.4.1 cada dos semanas. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 24 h a 30°C.

**10.5** Preparación de soluciones**10.5.1** Solución fisiológica

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

**10.5.2** Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 3 N

Bajo una campana de extracción vertir en un matraz aforado de 1000 ml que ya contenga agua destilada, 250 ml de ácido clorhídrico al 37% y llevar a volumen.

**10.5.3** Solución de ácido clorhídrico - metanol 1:1

En una probeta graduada de 500 ml, mezclar 250 ml de metanol con 250 ml de ácido clorhídrico 3 N

**10.5.4** Solución de hidróxido de sodio, 60 g/100 ml

En una probeta graduada de 500 ml, disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo el agua del grifo. Completar a 500 ml. Conservar en un matraz con tapón de polietileno o de goma.

**10.5.5** Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

En un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno, disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen.

**10.5.6** Solución patrón

Justo antes del uso, pesar exactamente 25,0 mg de Inositol. Disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 250 ml.

**10.5.7** Mezcla de enzimas para hidrólisis

En un mortero, mezclar 0,50 g de  $\alpha$ -amilasa pancreática de aproximadamente 25 unidades/mg y 0,10 g de fosfatasa con 9,4 g de lactosa monohidratada.

**10.6** Procedimiento**10.6.1** Desarrollo del microorganismo

Tres días antes de la inoculación del ensayo, efectuar tres cultivos sucesivos de 24 h en superficie de agar.

Incubar durante 24 h a 30°C.

**10.6.2** Preparación de la toma de ensayo e hidrólisis

En un matraz aforado de 50 ml, pesar 5 g de muestra para ensayo. Añadir aproximadamente 40 ml de agua destilada a 50°C, luego agitar hasta obtención de una suspensión homogénea. Enfriar y llevar a volumen con agua.

De cada muestra tomar una parte alícuota de 10 ml que contenga aproximadamente 0,2 a 0,3 mg de inositol e introducir en un tubo de hidrólisis. En cada tubo añadir 100 mg de mezcla de enzimas 10.5.7, cubrir con papel de aluminio e incubar durante 15 min a 42°C. A continuación añadir 20 mg de papaína e incubar otros 15 min a la misma temperatura.

Luego introducir en cada tubo 15 ml de solución de hidrólisis (10.5.3) y tres perlas de vidrio.

Conectar los refrigerantes, luego calentar a reflujo a 110°C durante 6 h. Dejar enfriar.

**Nota:**

Los hidrolizados pueden conservarse una noche.

Transvertir cuantitativamente el contenido de los tubos a matraces Erlenmeyer de 250 ml. Llevar el pH a 5,2 con solución de hidróxido de sodio de 60 g/100 ml, luego con solución de NaOH 1 N. A continuación transvertir cuantitativamente a matraces aforados de 100 o 150 ml. Llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar sobre papel filtro plisado con velocidad de filtración media. La solución final debe contener de 3 a 4  $\mu$ g de Inositol/ml.

**10.6.3** Solución patrón de 4/ $\mu$ g de Inositol por ml.

Justo antes del uso diluir la solución 10.5.6 como sigue:

10 ml a 250 ml = 4 µg/ml

**10.6.4 Medio de cultivo para el ensayo**

Medio para prueba de Inositol

En un matraz Erlenmeyer de vidrio actínico de 1000 ml, preparar el volumen necesario para los tubos utilizados en el ensayo. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón: 30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml

cada producto: 15 tubos 15 x 5 ml = 75 ml

+ 50 ml a 100 ml de exceso

**10.6.5 Preparación del ensayo**

**10.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensaye, colocar 3 filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0,...., 8; el primero corresponde al blanco.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0 ml
Medio de cultivo: 5	ml en cada tubo								

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

**10.6.5.2 Serie producto**

En otro soporte colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de las tres filas van destinados a un producto, los otros cinco tubos de las tres filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la toma de ensayo, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo, según la tabla siguiente:

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,75	1,0	1,50	2,0	2,50 ml
Agua: 4,25	4,0	3,50	3,0	2,50 ml
Medio de Cultivo: 5	ml en cada tubo			

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra las tres filas de tubos en el soporte.

**10.6.6 Esterilización del ensayo**

Esterilizar los tubos durante 10 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

**10.6.7 Inoculación**

**10.6.7.1 Lavado del cultivo**

Unos instantes antes de la inoculación del ensayo, poner en suspensión el microorganismo del último cultivo sobre agar (10.6.1), adicionando 10 ml de solución fisiológica en el tubo que contiene el cultivo. Transvertir a un tubo de centrifuga estéril y centrifugar durante 2 min a 1000 rpm (aproximadamente 100 g).

Decantar la solución fisiológica. Tomar aproximadamente 2 ml de esta suspensión e introducirla en una cubeta óptica de 1 cm. Medir la absorbancia a 575 nm.

**10.6.7.2 Preparación del inóculo.**

Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre más o menos la misma extinción.

Según la extinción obtenida, diluir en un tubo que contenga 10 ml de solución fisiológica "n" gotas del cultivo 10.6.7.1; este tubo constituye el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo 10.6.7.1 superior o igual a 1,5 (después de sustraer la extinción propia del medio), es necesario introducir 1 gota del mismo en el tubo que contiene 10 ml del medio 10.6.4. Si la extinción no se encuentra dentro de los valores arriba citados, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 1,5: introducir dos gotas en el tubo
- extinción inferior a 1,2: introducir tres gotas

**10.6.7.3 Inoculación**

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

**10.6.8 Incubación**

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 21 h a 30°C. Dado que *Saccharomyces carlsbergensis* es aerobio, inclinar los tubos al máximo a fin de que la superficie de contacto entre el líquido y el aire sea lo mayor posible. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

**10.6.9 Lecturas**

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transvertir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).

**NOTA:** si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos dados en transmitancia.

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

**10.7 Cálculos**

**10.7.1 Curva de calibración**

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los µg de Inositol a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	ng	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	95,7	95,9	96,0	95,8
1	0,25	1,0	91,2	90,5	91,2	91,0
2	0,50	2,0	85,6	85,9	85,1	85,5
3	0,75	3,0	79,5	79,5	80,9	80,0
4	1,0	4,0	73,5	72,6	72,5	72,9
5	1,5	6,0	58,4	57,6	55,8	57,3
6	2,0	8,0	50,4	50,4	50,1	50,3
7	2,5	10,0	48,5	45,4	48,5	47,5
8	3,0	12,0	4,0	41,6	44,3	42,6

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina.

Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo, que deben verificarse por separado.

**10.7.2 Contenido de vitamina en el producto**

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo	ml	lecturas			media	µg*	µg/ml No.
		1	2	3			
9	0,75	78,7	80,4	80,2	79,8	2,9	3,87
10	1,0	73,7	74,6	74,2	74,2	3,7	3,70
11	1,5	61,9	62,3	62,8	62,3	5,5	3,67
12	2,0	49,0	49,6	49,8	49,5	8,3	4,15
13	2,5	40,8	40,8	40,3	40,3	**	**
media					3,85 (=C)		

\* = valores leídos en la curva de calibración

\*\* = punto fuera de la curva

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en mg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de inositol, expresado en mg/100 g de producto es igual a:

$$\frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

C= media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en µg/ml

V1= volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V2= parte alícuota de V1, en ml

V3= volumen al que se ha diluido la parte alícuota V2, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

5,025 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 50 ml (V1). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V3).

La media de las concentraciones de Inositol leídas en la curva de calibración es 3,85 µg/ml (C).

El contenido de Inositol es:

$$\frac{3,85 \times 100 \times 50 \times 50}{5,025 \times 10 \times 1000} = 38,5 \text{ mg/100 g}$$

### 11. La determinación de vitamina K1

Método: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

#### 11.1 Fundamento

Se extrae la fracción liposoluble de una muestra en un tubo de centrífuga o mediante una columna de tierra de infusorios. Se separan las grasas en una columna HPLC preparativa y se recoge la fracción que contiene la vitamina K1. Se inyecta esta fracción en una columna HPLC analítica y se determina el contenido de vitamina K1 mediante un detector espectrofotométrico.

#### 11.2 Reactivos y materiales

##### 11.2.1

Dimetilsulfóxido (DNSO) para síntesis

Alcohol etílico absoluto para análisis

n-Hexano grado purísimo

Isooctano para análisis

Acetonitrilo para cromatografía

Vitamina K1

Pirgalol para análisis

Diclorometano para cromatografía

Papaína soluble

Tetrahidrofurano para análisis

20 columnas preparadas para extracción de sustancias lipófilas de soluciones acuosas

Envase de repuesto para 50 rellenos de la columna

Diastasa

##### 11.2.2 Materiales

Tubos para centrífuga de vidrio de 40 ml

Tapones huecos hexagonales de diferentes medidas

Matraces en forma de pera de 10 ml

Matraces en forma de pera de vidrio de 25 y 250 ml

Pipetas graduadas hasta la punta de 1 ml: 0,005; 5 ml: 0,05; 10 ml: 0,10 y 20 ml: 0,10

Micromatraz aforado de precisión de 2 ml

Matraces aforados de vidrio de 10, 50 y 100 ml

Filtro con poro de 0,45 µm

**Nota:** Utilizar material de vidrio actínico cuidadosamente lavado, con el fin de evitar que sea fuente de contaminación.

**11.3 Aparatos e instrumentos**

Jeringuilla para HPLC de 1 ml y de aguja intercambiable

Aguja para jeringuilla de HPLC

Cilindro para gas comprimido, N<sub>2</sub>

Manodentor para gas comprimido, N<sub>2</sub>

Agitador para tubos de ensaye

Estufa de laboratorio

Instalación de HPLC que consta de:

Para cromatografía preparativa: una bomba, un inyector (loop de 500 µl), una columna preparativa, un detector de longitud de onda variable, un registrador para cromatografía analítica: una bomba, un inyector (loop de 100 µl), una columna analítica, un detector de longitud de onda variable, un registrador.

Para una determinación por día, basta con un detector de longitud de onda variable y un solo registrador para ambos sistemas.

Balanza de precisión

Balanza analítica, 162 g; 0,1 mg

Centrífuga

Placa con pinzas para tubos de centrífuga

Mesa vibrante, movimiento alternante

Baño ultrasónico

**11.4 Preparación de soluciones****11.4.1 Solución de pirogalol de 1 g/100 ml**

El día de la determinación disolver en un matraz aforado de 25 ml, 250 mg de pirogalol en alcohol etílico.

**11.4.2 Fase móvil para HPLC preparativa: 1% de acetato de etilo en isooctano.**

En un matraz aforado de 1 000 ml, mezclar 10 ml de acetato de etilo con isooctano previamente degasificado bajo presión reducida y filtrado. Llevar a volumen.

**11.4.3 Fase móvil para purificar la columna preparativa: 10% de acetato de etilo en isooctano.**

En un matraz aforado de 500 ml, mezclar 50 ml de acetato de etilo con isooctano previamente degasificado bajo presión reducida y filtrado. Llevar a volumen.

**11.4.4 Fase móvil para HPLC analítica: acetonitrilo-diclorometano-propanol-2 89:10:1 v/v/v**

Degasificar 1 litro de acetonitrilo bajo presión reducida y filtrar sobre una membrana.

En un matraz aforado de 1 000 ml, mezclar 100 ml de diclorometano y 10 ml de propanol-2 con acetonitrilo y llevar a volumen.

**11.4.5 Soluciones patrón de vitamina K1**

En un matraz aforado de 100 ml, pesar exactamente 40 mg de vitamina K1 (fitomenadiona). Disolver y llevar a volumen con n-hexano. Esta es la solución 1 de 0,40 mg/ml. Se conserva una semana a 4°C.

Justo antes de la determinación, efectuar las diluciones siguientes con n-hexano:

Solución 2: diluir 5 ml de solución 1 en un matraz aforado de 50 ml (40 µg/ml).

Solución 3: diluir 5 ml de solución 2 en un matraz aforado de 50 ml (4 µg/ml). Determinar la concentración exacta de vitamina K1 midiendo la extinción (E) a 248 nm.

$$E1\% \text{ en n-hexano} = 435$$

$$1 \text{ cm}$$

Solución 4: diluir 5 ml de solución 3 en un matraz aforado de 50 ml (0,4 µg/ml). Utilizar esta solución como patrón en la cromatografía preparativa para determinar el tiempo de retención.

Solución 5: Mediante una pipeta, vertir 1 ml de solución 3 en un matraz aforado de 10 ml; evaporar a sequedad el disolvente bajo una ligera corriente de nitrógeno. Disolver y llevar a volumen con la fase móvil 11.4.4. Utilizar esta solución (0,4 µg/ml) como patrón en la cromatografía analítica.

**11.5 Procedimiento****11.5.1 Preparación de la toma de ensayo****11.5.1.1 Extracción en tubos de centrífuga****11.5.1.1.1 Productos sólidos**

Pesar 20,0 g de producto en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 50 ml de agua a 45°C, luego 0,1 g de diastasa; a continuación, incubar durante 20 min a 40°C. Introducir 0,1 g de papaína e incubar de nuevo durante 20 min a 40°C. Llevar a volumen con agua a temperatura ambiente. La suspensión debe ser homogénea; si no, colocar el matraz en un baño ultrasónico durante unos 5 min. Tomar 5 ml de suspensión e introducir en un tubo de centrífuga de vidrio provisto

de un esmerilado. Añadir 10 ml de dimetilsulfóxido y mezclar. Introducir 5 ml de solución de pirogalol y agitar. Luego añadir 10 ml de n-hexano y agitar el tubo vigorosamente durante 10 min mediante una mesa vibrante. Centrifugar el tubo, a fin de separar las dos fases líquidas.

Transvertir la fase superior a otro tubo de centrífuga.

Añadir 10 ml de n-hexano al primer tubo y agitar, luego centrifugar igual que arriba. Tomar la fase superior y añadir a la que ya se ha recuperado.

#### **11.5.1.1.2 Productos líquidos**

Pesar 5 g de producto homogéneo en un tubo de centrífuga de vidrio provisto de un esmerilado. Añadir 10 ml de dimetilsulfóxido y mezclar bien. Añadir 5 ml de solución de pirogalol y agitar. Luego añadir 10 ml de n-hexano y agitar el tubo vigorosamente durante 5 min mediante una mesa vibrante. Centrifugar el tubo, a fin de separar las dos fases líquidas.

Transvertir la fase superior a otro tubo de centrífuga.

Añadir 10 ml de n-hexano al primer tubo y agitar, luego centrifugar igual que arriba. Tomar la fase superior y añadir a la que ya se ha recuperado.

#### **11.5.1.1.3 Lavado del extracto**

En el tubo de centrífuga que contiene la fase orgánica, añadir 10 ml de agua destilada. Agitar vigorosamente durante 5 min mediante la mesa vibrante y centrifugar.

Mediante una pipeta Pasteur tomar lo mejor posible la fase orgánica, que debe ser límpida y transvertirla a un matraz en forma de pera de vidrio de 50 ml. Añadir 2 ml de n-hexano en la superficie de la fase acuosa, tomar de nuevo la fase orgánica e introducir en el matraz.

#### **11.5.1.2 Extracción mediante la columna de tierra de infusorios.**

##### **11.5.1.2.1 Productos sólidos**

En un matraz aforado de 100 ml de vidrio, pesar 2 g de producto. Añadir 0,200 g de papaína, luego 25 ml de agua a 45°C. Mezclar bien, utilizar un baño ultrasónico si es necesario para deshacer los grumos. Incubar durante 30 min en la estufa a 40°C. Añadir 10 ml de dimetilsulfóxido y agitar el matraz durante 5 min mediante una mesa vibrante. Enfriar el matraz si es necesario y añadir 40 ml de tetrahidrofurano. Agitar el matraz vigorosamente durante 10 min. Llevar a volumen con agua y mezclar bien.

##### **11.5.1.2.2 Productos líquidos**

En un matraz aforado de 10 ml de vidrio, pesar 10 g de producto. Añadir 0,200 g de papaína y mezclar bien. Incubar durante 30 min en la estufa a 40°C. A continuación añadir 20 ml de agua y 10 ml de dimetilsulfóxido y agitar el matraz durante 5 min mediante una mesa vibrante. Enfriar el matraz si es necesario y añadir 40 ml de tetrahidrofurano. Agitar el matraz vigorosamente durante 10 min. Llevar a volumen con agua y mezclar bien.

##### **11.5.1.2.3 Preparación de la columna de extracción**

Colocar el filtro circular de 10 mm en el portafiltro inferior e introducir éste en el cuerpo de la columna. Rellenar la columna con el contenido de un sobre y agitar de 10 a 20 segundos mediante un vibrador de reactivos.

Presionar el filtro circular de 24 mm en el anillo con borde reforzado del recambio y deslizar éste dentro del cuerpo de la columna hasta que el filtro se encuentre sobre la superficie del relleno.

Fijar una aguja a la conexión Luer, situada en el extremo inferior de la columna; sujetar ésta mediante una pinza.

##### **11.5.1.2.4 Llenado de la columna y elución**

Mediante una pipeta aforada transvertir 20 ml del contenido del matraz aforado (11.5.1.2.1 o 11.5.1.2.2) a la columna de extracción (11.5.1.2.3). Evitar arrastrar sedimento durante esta operación. Al cabo de 15 min eluir lentamente con 100 ml de n-hexano. La fase acuosa debe permanecer absorbida en la columna. Recoger el eluato en un matraz en forma de pera de 250 ml de vidrio. Interrumpir la operación a más tardar 30 min después que todo el n-hexano haya penetrado en la columna.

#### **11.5.2 Evaporación del extracto y preparación del extracto final de la toma de ensayo**

Evaporar la solución (11.5.1.1.3 o 11.5.1.2.4) bajo presión reducida y eliminar las últimas trazas de disolvente mediante una ligera corriente de nitrógeno. Recuperar el residuo cuantitativamente con la fase móvil y transvertir a un matraz aforado de 5 ml para la extracción en tubos de centrífuga o de 2 ml para la extracción en columnas. Filtrar sobre una membrana antes de inyectar en la columna HPLC.

#### **11.5.3 Cromatografía preparativa**

Mantener el sistema HPLC preparativo con las características siguientes:

Columna: Lichrosorb-Si 60, 5 µm, 8 x 120 mm, o equivalente.

Loop: 500 µl

Fase móvil: ver punto 11.4.2

Caudal: 3 ml/min  
 Detector: Espectrofotómetro 254 nm, 0,05 AUFS  
 Registrador: 10 mm/min

Inyectar primero 0,500 ml de solución patrón 4 y determinar el tiempo de retención aproximado debe ser de 5 a 7 min. A continuación inyectar 0,500 ml de solución de extracto y recoger la fracción que contiene la vitamina K1 en un matraz en forma de pera de 10 ml de vidrio, comenzando unos 30 segundos antes de que se eluya la vitamina K1; interrumpir la operación unos 30 segundos después de que haya sido eluida la vitamina K1.

**11.5.4 Limpieza de la columna preparativa**

A fin de eliminar rápidamente todas las impurezas retenidas por la columna durante la cromatografía preparativa, aumentar la polaridad de la fase móvil utilizando una mezcla al 10% de acetato de etilo en isooctano (11.4.3). Esta operación dura aproximadamente de 10 a 15 min.

Volver a introducir la fase móvil (11.4.2) y eluir hasta obtener una línea de base estable (aproximadamente 10 min). La columna está lista para otra inyección preparativa.

**11.5.5 Cromatografía analítica**

Evaporar a sequedad bajo una ligera corriente de nitrógeno la fracción recogida bajo 11.5.3. Recuperar el residuo con 250 µl de fase móvil (11.4.4); agitar suavemente para disolver bien el residuo.

Montar el sistema HPLC analítico con las características siguientes:

Columna: Spherisorb ODS, 5 µm, 4,6 x 250 mm, o equivalente.  
 Loop: 100 µl  
 Fase móvil: ver punto 11.4.4  
 Caudal: 2 ml/min  
 Detector: espectrofotómetro 248 nm, 0,01 AUFS  
 Registrador: 10 mm/min

Inyectar primero 0,100 ml de solución patrón 5 y determinar el tiempo de retención aproximado: debe ser aproximadamente de 5 min. A continuación inyectar 0,100 ml de la fracción obtenida más arriba.

Medir la altura de los picos correspondientes a la vitamina K1 en el patrón así como en el extracto.

**Nota:** El grado de silanización de la columna en fase inversa puede variar. Si es necesario, ajustar el porcentaje de diclorometano contenido en la fase móvil 11.4.4 a fin de obtener un tiempo de retención de unos 5 min. Si el tiempo de retención es demasiado largo o demasiado corto, aumentar o disminuir respectivamente la cantidad de diclorometano.

**11.6 Cálculo y expresión de resultados.**

El contenido de vitamina K1 (fitomenadiona), en µg/100 g de producto, es igual a:

Productos líquidos, con tratamiento de extracción en tubos de centrifuga:

$$\frac{h_2 \cdot C \cdot V_0 \cdot V_2 \cdot 100}{h_1 \cdot V_1 \cdot m}$$

Productos sólidos, con tratamiento de extracción en tubos de centrifuga; productos sólidos y líquidos con tratamiento de extracción en columnas:

$$\frac{h_2 \cdot C \cdot V_0 \cdot V_2 \cdot 100 \cdot V}{h_1 \cdot V_3 \cdot V_1 \cdot m}$$

donde:

h<sub>2</sub>= altura del pico del extracto en mm

C = concentración de la solución patrón, en µg/ml (en general 0,4 µg/ml)

V<sub>0</sub> = volumen de extracto obtenido bajo 11.5.2 (en general 5 o 2 ml)

V<sub>2</sub> = volumen en el cual ha sido diluida la fracción después de la cromatografía preparativa (en general 0,250 ml)

V = volumen en el cual ha sido disuelta la toma de ensayo, en ml (en general 100 ml)

h<sub>1</sub> = altura del pico del patrón, en mm

V<sub>3</sub> = parte alícuota de V vertida en la columna de extracción en ml (en general 20 ml), o parte alícuota de V introducida en el tubo de extracción, en ml (para productos sólidos, en general 5 ml)

V<sub>1</sub> = volumen del extracto (V<sub>0</sub>) inyectado en la columna preparativa (en general 0,500 ml)

m = masa de la toma de ensayo, en g

**11.7 Sensibilidad del método**

El límite de detección es de aproximadamente 3 µg/100 g de producto; así pues, es posible medir con precisión aceptable contenidos de vitamina K1 a partir de una concentración de 5 µg/100 g.

**11.8 Repetibilidad**

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media de los resultados.

**12. Determinación de ácido ascórbico (vitamina C)**

**12.1 Determinación visual**

**12.1.1 Fundamento**

Extracción del ácido ascórbico mediante ácido metafosfórico. Valoración visual oxidométrica del ácido ascórbico en el extracto con una solución de 2,6-diclorofenol-indofenol.

**12.1.2 Reactivos y materiales**

**12.1.2.1 Reactivos**

Acido ascórbico

Acido sulfúrico

Acido metafosfórico

Yodo

Sal sódico de 2,6-diclorofenol-indofenol

**12.1.2.2 Materiales**

Pipetas

Matraces aforados

Material común de laboratorio

**12.1.3 Aparatos e instrumentos**

Parrilla de calentamiento

Estufa

**12.1.4 Preparación de soluciones**

**12.1.4.1 Solución estándar de ácido ascórbico 0,5 mg/ml**

Pesar exactamente 50,0 mg de ácido ascórbico, introducirlos en un matraz aforado de 100 ml, si es posible, de vidrio pardo. Disolver con ácido metafosfórico al 2% y llevar a volumen con el mismo ácido. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes del empleo.

**12.1.4.1.1 Verificación de la pureza del ácido ascórbico**

En caso de duda sobre la pureza del ácido ascórbico, pesar aproximadamente 400 mg con una precisión de 1 mg, disolver en una mezcla de 100 ml de agua destilada hervida y enfriada, y 25 ml de ácido sulfúrico al 10%. Valorar rápidamente bajo luz difusa con una solución de yodo, 0,1 N en presencia de una solución de almidón como indicador.

1 ml de yodo 0,1 N corresponde a 8,806 mg de ácido ascórbico.

**12.1.4.2 Solución de ácido meta-fosfórico al 2%**

**12.1.4.2.1 Preparación de la solución base al 10%**

Pesar 60-70 g de ácido meta-fosfórico. Eliminar la capa blanca que se forma generalmente en la superficie, lavando las barritas con agua destilada. Secarlas, con papel filtro y triturarlas en un mortero. Pesar 50 g de este ácido limpio y triturado, y disolverlo sin calentar en 500 ml de agua destilada en un frasco pardo, agitando este último mecánicamente hasta disolución.

Filtrar, si es necesario, sobre un filtro plegado en un frasco de vidrio pardo.

El ácido meta-fosfórico se transforma gradualmente en ácido orto-fosfórico, pero esta solución al 10% puede conservarse en un refrigerador durante tres semanas.

**12.1.4.2.2 Preparación de la solución al 2%**

Preparar la cantidad necesaria en el día de empleo, diluyendo cinco veces con agua destilada un volumen dado de la solución al 10%.

**12.1.4.3 Solución de la sal sódica de 2,6-diclorofenol-indofenol (D.I.) al 0,05%**

Disolver 100 mg de D.I. en un vaso de 50 ml que contenga 20 ml de agua destilada. Llevar rápidamente a ebullición, removiendo con una varilla de vidrio. Enfriar y transferir a un matraz aforado de 200 ml. Llevar a volumen con agua destilada. Filtrar en un frasco pardo. Esta solución se conserva en un refrigerador durante 8 días.

Verificar la concentración antes de cada serie de determinaciones.

La solución es azul en un medio alcalino (sal de Na+) y rosa en un medio ácido.

**12.1.4.4 Acido acético al 10%**

Diluir 100 ml de ácido acético glacial a 1 l con agua destilada.

**12.1.4.5 Eventualmente: solución de yodo 0,1 N con factor conocido (determinado con tiosulfato).**

**12.1.4.6 Eventualmente: solución de ácido sulfúrico al 10%**

Añadir cuidadosamente 57 ml de ácido sulfúrico concentrado a 500 ml de agua destilada. Enfriar a la temperatura ambiente y diluir a 1 l con agua destilada.

**12.1.4.7** Eventualmente: solución de almidón estabilizada al 1%

Disolver 140 g de cloruro de sodio grado purísimo en 375 ml de agua destilada, añadir 5 g de almidón soluble disuelto en 5 ml de agua destilada, calentar a ebullición durante 2 o 3 min, enfriar y filtrar.

**12.1.5** Procedimiento

**12.1.5.1** Determinación del título de la solución de 2,6-diclorofenol-indofenol (D.I.)

Pipetear 3 ml de solución estándar de ácido ascórbico (12.1.4.2) en un vaso de 100 ml, añadir aproximadamente 30 ml de ácido meta-fosfórico al 2% y 5 ml de ácido acético al 10%. Valorar con la solución D.I. utilizando un agitador mecánico hasta la aparición de una coloración rosa que persista durante 15 segundos.

Ejemplo:

Para 2 ml de solución estándar (= 1,5 mg de ácido ascórbico), volumen empleado 5,84 ml de reactivo:

$$\text{Título } T = \frac{1,5}{5,84} = 0,257$$

es decir, 1 ml de solución D.I. corresponde a 0,257 mg de ácido ascórbico.

**12.1.5.2** Preparación de la porción para ensayo

**12.1.5.2.1** Producto sin o con poco almidón. Por ejemplo leche en polvo.

Pesar con una precisión de 0,1 g una cantidad del producto a analizar que contenga aproximadamente 5 a 10 mg de ácido ascórbico; en la mayoría de los casos se pesan 10 g en un matraz aforado de 100 ml.

Añadir 20 ml de ácido meta-fosfórico al 10% y 50 ml de agua destilada a 55°C. Sacudir vigorosamente durante 10 min. Enfriar y llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar rápidamente sobre un filtro plegado, al abrigo de la luz. Las soluciones que filtran demasiado lento deben centrifugarse a 3000 rpm durante 10 min, decantarse y filtrarse por un filtro plegado o sobre lana de vidrio.

**12.1.5.2.2** Productos con almidón, por ejemplo cereales

En un vaso de 100 ml pesar exactamente una porción para ensayo de 10 a 20 g. Añadir 5% (0,5 a 1,0 g) de diastasa y 20 ml de agua destilada. Mezclar mediante una varilla de vidrio de modo que se obtenga una papilla homogénea e incubar 15 minutos en una estufa a 40°C. Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml con 20 ml de solución de ácido meta-fosfórico al 10%; llevar a volumen con agua destilada y agitar vigorosamente. Filtrar sobre un filtro plegado con una velocidad de filtración media.

**12.1.5.2.3** Productos heterogéneos, por ejemplo verdura, fruta

Homogeneizar una muestra de 50 a 100 g con un volumen de ácido meta-fosfórico de 10% representando 1/5 del volumen total al que será ajustada la mezcla.

Transvertir cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml y llevar a volumen con agua destilada.

Centrifugar o filtrar la solución obtenida sobre un filtro plegado.

**12.1.6** Determinación

Tomar una parte alícuota del filtrado correspondiente, de 1-2 mg de ácido ascórbico. Añadir 5 ml de ácido acético al 10% (10 ml para un volumen de filtrado de 30 a 50 ml), valorar luego con D.I. hasta que se obtenga una coloración rosa que persista durante 15 segundos.

Generalmente, deben utilizarse 5 a 10 ml de reactivo para la valoración. Un volumen de reactivo que excede 10 ml no es aconsejable, ya que la solución tiene tendencia a volverse grisácea en estas condiciones.

**Nota:**

Preparar las muestras a medida que se valoran.

**12.1.7** Cálculo y expresión de los resultados

**12.1.7.1** Cálculo y fórmula

El contenido de ácido ascórbico expresado en mg por 100 g de producto es igual a:

$$\frac{a \times T}{v} \times \frac{V}{m} \times 100$$

en donde:

a = ml de reactivo empleados

T = título del reactivo

v = ml de filtrado empleados

V = ml de solución de la toma de ensayo

m = toma de ensayo

Expresar el valor obtenido con una precisión de 0,1 mg.

## 12.2 Valoración con un potenciómetro (medidor de pH)

### 12.2.1 Preparación de la toma de ensayo

La solución se prepara según las indicaciones dadas para la valoración visual.

Tomar una parte alícuota de la solución a valorar que contenga 1 a 2 mg de ácido ascórbico. Añadir 5 ml de ácido acético al 10%.

### 12.2.2 Determinación

Colocar el recipiente de valoración, que contiene la solución a valorar y una barrita magnética, sobre un agitador magnético.

Sumergir un electrodo de platino combinado en la solución.

Ajustar el potenciómetro a una alta sensibilidad y llevar la aguja hacia el punto 0, o a un valor que corresponda a aproximadamente 1/6 de la escala, si el punto 0 se encuentra al comienzo de la misma.

Añadir, mediante una bureta motorizada, porciones de reactivo de 0,1 ml a intervalos de 5 segundos. La aguja del potenciómetro sube ligeramente con cada adición de reactivo, pero baja de nuevo inmediatamente.

El punto alcanzado por la aguja, 5 segundos después de cada adición de reactivo comienza por ser cada vez más bajo para subir de nuevo progresivamente.

Cuando la amplitud de oscilación de la aguja aumente y el punto alcanzado 5 segundos después de la adición del reactivo es netamente más alto, añadir el reactivo en porciones de 0,05 ml y esperar antes de cada nueva adición hasta que la aguja baje de nuevo ligeramente.

Proseguir de esta manera hasta que la aguja baje de nuevo muy poco, añadir luego muy pequeñas porciones de reactivo hasta que la aguja no baje más, sino que permanezca en el punto alcanzado después de la última adición de reactivo.

Este punto será considerado como el punto de equivalencia. Anotar el número de ml de reactivo utilizados para alcanzar dicho punto.

### 12.2.3 Cálculo y expresión de los resultados

#### 12.2.3.1 Cálculo

El contenido en ácido ascórbico expresado en mg/100 g de producto es igual a:

$$\frac{a \times T}{v} \times \frac{V}{m} \times 100$$

en donde:

a = ml de reactivo correspondiente al punto de equivalencia

T = concentración del reactivo

v = ml de filtrado empleados

V = volumen en ml de la solución de la toma de ensayo

m = toma de ensayo en g

#### 12.2.3.2 Expresar el valor obtenido con una precisión de 0,1 mg.

#### 12.2.4 Repetibilidad

$$s = 0,24 \text{ mg } (0 = 10)$$

$$\text{coeficiente de variación } \frac{s}{x} = 0,5\%$$

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones, simultáneamente o rápidamente una después de otra por el mismo analista, no debe exceder 0,8 mg para un producto que contenga aproximadamente 50 mg de ácido ascórbico por 100 g.

## 13. Determinación de fósforo por colorimetría con azul de molibdeno

### 13.1 Fundamento

Calcinación de la muestra. Reacción del fósforo con molibdato de sodio y sulfato de hidracinio como reductor. Medir espectrofotométricamente a 700 nm la absorbancia del complejo de azul de molibdeno que se ha formado.

### 13.2 Reactivos y materiales

#### 13.2.1 Reactivos

Acido clorhídrico fumante 37% para análisis

Acido nítrico 65% para análisis

Acido sulfúrico 95 - 97% para análisis

Sulfato de hidracinio para análisis

Fosfato diácido de potasio para análisis

Carbonato de sodio anhidro para análisis

Molibdato de sodio dihidratado para análisis

### 13.2.2 Materiales

Vasos de forma alta de 1000 ml

Varillas de vidrio de extremos redondeados, de 4 mm de diámetro y 100 mm de longitud

Embudos 60° de 120 mm de diámetro

Recipiente para guardar líquidos de 20 l

Pipetas graduadas hasta la punta de 10, 20 y 25 ml

Pipetas ajustables de 5 ml

Puntas blancas de polipropileno

Filtros redondos rápidos de 125 mm de diámetro

Baño de agua redondo y su tapa

Cubeta de polietileno de 15 l

**Nota:** Evite utilizar detergentes a base de polifosfatos para lavar el material. Toda la vajilla debe enjuagarse abundantemente con agua destilada antes del uso.

### 13.3 Aparatos e instrumentos

Cubetas ópticas de vidrio de 10 x 10 mm

Balanza analítica electrónica

Cronómetro de mesa

Placa calefactora

Espectrofotómetro con accesorios

Cápsulas de porcelana o platino

Si es necesario, descontaminar durante una noche, en una cubeta de polietileno que contenga 15 l de mezcla de ácido nítrico/agua (1:1), todos los matraces aforados, tapones, recipientes de plástico, así como las cápsulas. Enjuagar con agua destilada. Secar en estufa a 80°C.

### 13.4 Preparación de soluciones

#### 13.4.1 Solución de ácido clorhídrico 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml vertir 400 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico. Enfriar y llevar a volumen con agua destilada.

#### 13.4.2 Solución de ácido sulfúrico aproximadamente 10 N

En un vaso de 1000 ml que contenga 500 ml de agua destilada, añadir con cuidado 270 ml de ácido sulfúrico. Mezclar bien y enfriar a temperatura ambiente. Transvertir a un matraz aforado de 1000 ml, enjuagar el vaso y llevar a volumen con agua destilada.

#### 13.4.3 Solución de molibdato de sodio 2,5 g/100 ml

En un matraz aforado de 500 ml, disolver 12,5 g de molibdato de sodio, en 200 ml de ácido sulfúrico 10 N. Dejar enfriar a temperatura ambiente, transvertir a un matraz aforado de 500 ml y llevar a volumen con 13.4.2.

#### 13.4.4 solución de sulfato de hidracinio, 0,15 g/100 ml

**CUIDADO:** El sulfato de hidracinio es tóxico.

En un matraz aforado de 200 ml introducir 0,30 g de sulfato de hidracinio. Disolver y llevar a volumen con agua destilada.

#### 13.4.5 Reactivo de molibdato de sodio y sulfato de hidracinio

Justo antes del uso, mezclar 125 ml de solución 13.4.3 y 50 ml de solución 13.4.4 en un matraz aforado de 500 ml. Llevar a volumen con agua destilada.

**Nota:** Esta solución no se conserva.

#### 13.4.6 Solución patrón de fósforo, 1000 mg/l

Secar 5 g de fosfato diácido de potasio, durante 2 h a 105°C.

En un matraz aforado 500 ml introducir 2,197 g de fosfato diácido de potasio seco. Disolver con agua destilada y añadir 15 ml de solución 13.4.1. Llevar a volumen con agua destilada y mezclar bien.

En un recipiente de polietileno o de polipropileno, esta solución se conserva durante un mes.

#### 13.4.7 Solución patrón de fósforo, 10 µg/ml

El día del uso, verter mediante una pipeta, en un matraz aforado de 100 ml; 1,0 ml de solución 13.4.6. Llevar a volumen con agua destilada y mezclar bien.

#### 13.4.8 Solución de carbonato de sodio e hidróxido de sodio

En un matraz aforado de 200 ml, introducir 10,0 g de carbonato de sodio y 1,2 g de hidróxido de sodio. Disolver en agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua destilada.

**13.5 Preparación de la muestra para ensayo**

**13.5.1 Productos sólidos**

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario, moler el producto mediante un molino o mortero.

**13.5.2 Productos semi-líquidos**

Transvertir el contenido del bote a un vaso de capacidad suficiente. Homogenizar mediante una batidora. Mezclar bien.

**13.5.3 Productos líquidos**

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de polipropileno. Guardar en el refrigerador (4°C). Deje alcanzar la temperatura ambiente antes de pesar.

**13.6 Procedimiento**

Efectuar cada determinación doble.

**13.6.1 Calcinación**

**13.6.1.1 Productos no acidificados**

Calcinar a una temperatura máxima de 550°C.

Mojar las cenizas con un poco de agua destilada, luego añadir 10,0 ml de ácido clorhídrico 6 N. Calentar sobre un baño maría en ebullición hasta disolución completa de las cenizas. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Filtrar la solución a través de un filtro exento de cenizas y recoger el filtrado en un matraz aforado de 100 ml. Enjuagar la cápsula y el filtro con agua destilada. Llevar a volumen con agua destilada.

**13.6.1.2 Productos acidificados**

A fin de evitar pérdida de fósforo, proceder como sigue:

En una cápsula de platino o equivalente, pesar con una aproximación de 0,1 mg de 2 a 5 g de muestra para ensayo. Añadir 10,0 ml de solución 13.4.8. Mezclar bien con una varilla de vidrio. Enjuagar la varilla con un poco de agua destilada. En una campana, evaporar a sequedad la toma de ensayo sobre una placa calefactora. Luego calcinar el producto y disolver las cenizas como se describe arriba.

**13.6.2 Dilución**

Si la concentración de fósforo en la solución de la toma de ensayo rebasa 90 µg/l, diluir con agua destilada. La solución a analizar debe contener entre 10 y 90 µg de fósforo/ml.

**13.6.3 Determinación**

En matraces aforados de 50 ml, verter mediante una pipeta, según el esquema siguiente:

Solución	Patrones (1) (ml)	Toma de ensayo (ml)	Blanco (ml)
De la toma de ensayo		1,0 (2)	
Agua destilada	24 23 20 15	24 (3)	25
13.4.7	1 2 5 10		
13.4.5	20 20 20 20	20	20

(1) Estas soluciones contienen 10 - 20 - 50 y 100 µg de fósforo.

(2) Verter más si el contenido en fósforo es muy bajo.

(3) Ajustar el volumen de agua según el volumen de solución de la toma de ensayo, a fin de obtener un volumen total de aproximadamente 25 ml.

Mezclar bien, llevar a volumen con agua destilada. Tapar los matraces. Mezclar bien y dejar reaccionar durante 15 min en un baño de agua en ebullición para el revelado del color. Enfriar a temperatura ambiente.

**13.6.4 Medida espectrofotométrica**

Medir la extinción de las soluciones arriba indicadas en cubetas de vidrio de 10 mm a la longitud de onda de 700 nm contra el blanco (B).

**Notas:**

Todas las medidas, tanto las soluciones patrón como las tomas de ensayo, deben efectuarse en el intervalo de una h después del final de la reacción, debido a la inestabilidad de la coloración.

El complejo de azul de molibdeno presenta el máximo de absorción a 830 nm, no obstante, la sensibilidad aún es buena a 700 nm. Así pues, es posible utilizar una gama más amplia de espectrofotómetros.

**13.7 Cálculo y expresión de resultados**

**13.7.1 Cálculo**

Trazar la curva de calibración llevando a la abscisa el contenido en fósforo (en µg) y a la ordenada la extinción leída en el espectrofotómetro.

Leer en la curva de calibración el valor en µg de fósforo correspondiente a la extinción media (C).

El contenido de fósforo, en mg/100 g de producto, es igual a:

$$\frac{C \times V \times D}{10 \times m \times A}$$

donde:

C = contenido de fósforo en la solución de la toma de ensayo, leído en la curva de calibración, en µg

D = factor de dilución, si es necesario

m = masa de la toma de ensayo en g

V = volumen total de la solución de la toma de ensayo, en ml (100)

A = parte alícuota de la solución de la toma de ensayo para la determinación

### 13.7.2 Expresión de los resultados

Expresar los resultados en mg/100 g con tres cifras significativas.

### 13.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos por el mismo método con la misma materia sometida al ensayo, en las mismas condiciones y corto intervalo de tiempo, no debe exceder 2% del valor medio.

## 14. Determinación de calcio por absorción atómica

### 14.1 Fundamento:

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

### 14.2 Reactivos y materiales

#### 14.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Oxido de lantano (III) (máximo 0,0005% Ca) para espectroscopía de absorción atómica

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de calcio

Solución patrón de calcio lista para el uso, 1000 mg/l

#### 14.2.2 Materiales

Matraces aforados, 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 µl y 200 - 1000 µl

Pipetas ajustables, 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 µl

Puntas azules de 200 a 1000 µl

Puntas blancas

Probetas graduadas, forma alta, 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer, cuello estrecho, 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible, cuello estrecho de 100, 1000 ml

Cubeta de polietileno, 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l de mezcla de ácido nítrico/agua (1:1).

En este baño descontaminar una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar

### 14.3 Aparatos e instrumentos

Balanza de precisión, capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de calcio de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

### 14.4 Preparación de soluciones

#### 14.4.1 Solución de lantano, 5 g/100 ml

En un matraz aforado de 1000 ml pesar 58,6 g de óxido de lantano. Añadir aproximadamente 200 ml de agua destilada, agitar hasta que todo el óxido esté bien mojado. Añadir lentamente 250 ml de ácido clorhídrico concentrado (mínimo 37%). Enfriar y llevar al volumen con agua destilada.

Debe verificarse el contenido de calcio de cada nuevo lote de óxido de lantano preparando una solución de lantano de 1 g/100 ml y comparando su contenido en calcio con aquél de una solución patrón de calcio de 0 µg/ml procedente de un lote anterior.

**14.4.2** Solución de ácido clorhídrico, 4 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

**14.4.3** Solución de ácido clorhídrico, 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

**14.4.4** Solución patrón de calcio, 1000 mg/l

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolleta de cloruro de calcio. Enjuagar la ampolleta y llevar al volumen con agua destilada.

Conservar en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de calcio de 1000 mg/l lista para el uso.

**14.4.5** Soluciones patrón diluidas de calcio

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0 - 100 - 200 - 300 - 500 y 1000 µl de solución patrón de calcio, 1000 mg/l. Añadir 20 ml de solución de lantano (14.4.1) y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 y 10,0 µg de calcio/ml. Transvertir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

**14.5** Preparación de la muestra para ensayo

**14.5.1** Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

**14.5.2** Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

**14.6** Procedimiento

**14.6.1** Toma de ensayo

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g, 1,00 g de producto en polvo o 10,00 g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N. Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

**14.6.2** Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo, que la concentración final esté comprendida entre 1 y 10 µg/ml. Añadir 20 ml de solución de lantano. Llevar al volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 g de lantano/100 ml.

**14.6.3** Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de calcio de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 422,7 nm

Llama: aire-acetileno, reductora

Dejar calentar la lámpara durante 15 - 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (14.4.5), luego las soluciones de la toma de ensayo (14.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución 14.4.2, luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 segundos. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (14.6.2)

**14.7 Cálculo y expresión de resultados**

**14.7.1 Modo de cálculo**

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de calcio en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 10}$$

Donde:

C = concentración de calcio en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de calcio en el blanco (solución patrón de 0 µg de calcio/ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo, en ml

D = factor de dilución (14.6.2)

m = masa de la toma de ensayo, en g

**14.7.2 Expresión de los resultados**

Contenidos inferiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con dos cifras significativas.

Contenidos superiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con tres cifras significativas.

**14.8 Repetibilidad**

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 5% de su valor medio.

**15. Determinación de magnesio por absorción atómica**

**15.1 Fundamento**

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

**15.2 Reactivos y materiales**

**15.2.1 Reactivos**

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Oxido de lantano (III) (máximo 0,0005% Ca) para espectroscopía de absorción atómica.

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de magnesio

Solución patrón de magnesio lista para el uso, 1000 mg/l

**15.2.2 Materiales**

Matraces aforados, 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 µl y 200 - 1000 µl

Pipetas ajustables, 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 µl

Puntas azules de 200 a 1000 µl

Puntas blancas

Probetas graduadas, forma alta, 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer, cuello estrecho, 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible, cuello estrecho de 100, 1000 ml

Cubeta de polietileno de 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l de mezcla de ácido nítrico/agua (1:1).

En este baño descontaminar una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

**15.3 Aparatos e instrumentos**

Balanza de precisión, capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de calcio de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

#### **15.4 Preparación de soluciones**

##### **15.4.1 Solución de lantano, 5 g/100 ml**

En un matraz aforado de 1000 ml pesar 58,6 g de óxido de lantano. Añadir aproximadamente 200 ml de agua destilada, agitar hasta que todo el óxido esté bien mojado. Añadir lentamente 250 ml de ácido clorhídrico concentrado (mínimo 37%). Enfriar y llevar al volumen con agua destilada.

Debe verificarse el contenido de magnesio de cada nuevo lote de óxido de lantano preparando una solución de lantano de 1 g / 100 ml y comparando su contenido en magnesio con aquel de una solución patrón de magnesio de 0 µg/ml procedente de un lote anterior.

##### **15.4.2 Solución de ácido clorhídrico, 4 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

##### **15.4.3 Solución de ácido clorhídrico, 6 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

##### **15.4.4 Solución patrón de magnesio, 1000 mg/l**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolleta de cloruro de magnesio. Enjuagar la ampolleta y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de magnesio de 1000 mg/l lista para el uso.

##### **15.4.5 Solución patrón de magnesio de 100 mg/l**

En un matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta 10 ml de solución 15.4.4. Llevar a volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un mes a temperatura ambiente.

##### **15.4.6 Soluciones patrón diluidas de magnesio**

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0 - 0,2 - 0,5 - 1,0 y 1,5 ml de solución (15.4.5). Añadir 20 ml de solución de lantano (15.4.1) y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0,2 - 0,5 - 1,0 y 1,5 µg de magnesio/ml. Transvertir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

#### **15.5 Preparación de la muestra para ensayo**

##### **15.5.1 Productos sólidos**

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

##### **15.5.2 Productos líquidos**

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

#### **15.6 Procedimiento**

##### **15.6.1 Toma de ensayo**

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g, 1,00 g de producto en polvo o 10,00 g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (15.4.3). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

##### **15.6.2 Dilución**

En un matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (15.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 0,2 y 1,5 µg/ml. Añadir 20 ml de solución de lantano. Llevar al volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 g de lantano/100 ml.

##### **15.6.3 Determinación**

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de magnesio de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 282,2 nm

Llama: aire-acetileno, reductora

Dejar calentar la lámpara durante 15 - 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (15.4.6), luego las soluciones de la toma de ensayo (15.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución 15.4.2, luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 segundos. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (15.6.2)

### 15.7 Cálculo y expresión de resultados

#### 15.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de magnesio en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 10}$$

Donde:

C = concentración de magnesio en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de magnesio en el blanco (solución patrón de 0 µg de magnesio/ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo, en ml

D = factor de dilución (15.6.2)

m = masa de la toma de ensayo, en g

#### 15.7.2 Expresión de los resultados

Contenidos inferiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con dos cifras significativas.

Contenidos superiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con tres cifras significativas.

### 15.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 5% de su valor medio.

## 16. Determinación de zinc por absorción atómica

### 16.1 Fundamento

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

### 16.2 Reactivos y materiales

#### 16.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de zinc

Solución patrón de zinc lista para el uso, 1000 mg/l

#### 16.2.2 Materiales

Matraces aforados, 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 µl y 200 - 1000 µl

Pipetas ajustables, 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 µl

Puntas azules de 200 a 1000 µl

Puntas blancas

Probetas graduadas, forma alta, 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer, cuello estrecho, 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible, cuello estrecho de 100, 1000 ml

Cubeta de polietileno, 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l se mezcla de ácido nítrico/agua (1:1).

En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

### **16.3** Aparatos e instrumentos

Balanza de precisión, capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de zinc de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

### **16.4** Preparación de soluciones

#### **16.4.1** Solución de ácido clorhídrico 1,2 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar a volumen con agua destilada.

#### **16.4.2** Solución de ácido clorhídrico, 4 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

#### **16.4.3** Solución de ácido clorhídrico, 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

#### **16.4.4** Solución patrón de zinc, 1000 mg/l

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolla de cloruro de zinc. Enjuagar la ampolla y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de zinc de 1000 mg/l lista para el uso.

#### **16.4.5** Solución patrón de zinc de 10 mg/l

En un matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta 1,0 ml de solución 16.4.4. Llevar a volumen con ácido clorhídrico.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente una semana a temperatura ambiente.

#### **16.4.6** Soluciones patrón diluidas de zinc

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0 - 1 - 2,5 - 5 - 7,5 y 10 ml de solución (16.4.5). Añadir 20 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 0,1 - 0,25 - 0,50 - 0,75 y 1,0 µg de zinc/ml. Transvertir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

### **16.5** Preparación de la muestra para ensayo

#### **16.5.1** Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

#### **16.5.2** Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

### **16.6** Procedimiento

#### **16.6.1** Toma de ensayo

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g; 1,00 g de producto en polvo o 10,00 g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (16.4.3). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

### 16.6.2 Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (16.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 0,1 y 0,8 µg/ml. Llevar al volumen con solución de ácido clorhídrico 1,2 N.

### 16.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de zinc de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 213,9 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante (azul, pobre en acetileno)

Dejar calentar la lámpara durante 15 - 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (16.4.6), luego las soluciones de la toma de ensayo (16.6.1 o 16.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución 16.4.2, luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 3 segundos. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (16.6.2).

### 16.7 Cálculo y expresión de resultados

#### 16.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de zinc en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 10}$$

Donde:

C = concentración de zinc en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de zinc en el blanco (solución patrón de 0 µg de zinc por ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo, en ml

D = factor de dilución (16.6.2)

m = masa de la toma de ensayo, en g

#### 16.7.2 Expresión de los resultados

Expresar los resultados con dos cifras significativas.

### 16.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 4% de su valor medio.

## 17. Determinación de hierro por absorción atómica

### 17.1 Fundamento

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

### 17.2 Reactivos y materiales

#### 17.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de hierro

Solución patrón de hierro lista para el uso, 1000 mg/l

#### 17.2.2 Materiales

Matraces aforados, 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 µl y 200 - 1000 µl

Pipetas ajustables, 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200  $\mu$ l  
Puntas azules de 200 a 1000  $\mu$ l  
Puntas blancas  
Probetas graduadas, forma alta, 10, 25 y 500 ml  
Matraces Erlenmeyer, cuello estrecho, 100 ml  
Embudos  
Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)  
Fascos de polietileno flexible, cuello estrecho de 100, 1000 ml  
Cubeta de polietileno, 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l se mezcla de ácido nítrico/agua (1:1)

En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

### **17.3 Aparatos e instrumentos**

Balanza de precisión, capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de hierro de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

### **17.4 Preparación de soluciones**

#### **17.4.1 Solución de ácido clorhídrico 1,2 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar a volumen con agua destilada.

#### **17.4.2 Solución de ácido clorhídrico, 4 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

#### **17.4.3 Solución de ácido clorhídrico, 6 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

#### **17.4.4 Solución patrón de hierro, 1000 mg/l**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampollita de cloruro de hierro. Enjuagar la ampollita y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de hierro de 1000 mg/l lista para el uso.

#### **17.4.5 Soluciones patrón diluidas de hierro**

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0 - 100 - 200 - 500 y 1000  $\mu$ l de solución (17.4.4). Añadir 20 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 1,0 - 2,0 - 5,0 y 10,0  $\mu$ g de hierro/ml. Transvertir inmediatamente a fascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

### **17.5 Preparación de la muestra para ensayo**

#### **17.5.1 Productos sólidos**

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

#### **17.5.2 Productos líquidos**

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C).

Mezclar bien antes de su uso.

### **17.6 Procedimiento**

#### **17.6.1 Toma de ensayo**

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g; 1,00 g de producto en polvo o 10,00 g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (17.4.3). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura

ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

#### 17.6.2 Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (17.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 1 y 8 µg/ml. Llevar al volumen con solución de ácido clorhídrico 1,2 N.

#### 17.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de hierro de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 248,3 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante (azul, pobre en acetileno)

Dejar calentar la lámpara durante 15 - 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (17.4.5), luego las soluciones de la toma de ensayo (17.6.1 o 17.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución 17.4.2, luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 segundos. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario.

#### 17.7 Cálculo y expresión de resultados

##### 17.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de hierro en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 10}$$

Donde:

C = concentración de hierro en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de hierro en el blanco (solución patrón de 0 µg de hierro por ml)

V = volumen inicial (17.6.1), en ml (en general 50)

D = factor de dilución (17.6.2)

m = masa de la toma de ensayo, en g

##### 17.7.2 Expresión de los resultados

Expresar los resultados con dos cifras significativas.

#### 17.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 10% de su valor medio.

### 18. Determinación de potasio por absorción atómica

#### 18.1 Fundamento

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por emisión de llama.

#### 18.2 Reactivos y materiales

##### 18.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Acido clorhídrico fumante 37%

Solución patrón de potasio mínimo para análisis

Solución patrón de potasio lista para el uso, 1000 mg/l

##### 18.2.2 Materiales

Matraces aforados, 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 µl y 200 - 1000 µl

Pipetas ajustables, 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 µl  
Puntas azules de 200 a 1000 µl  
Puntas blancas  
Probetas graduadas, forma alta, 10, 25 y 500 ml  
Matraces Erlenmeyer, cuello estrecho, 100 ml  
Embudos  
Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)  
Fascos de polietileno flexible, cuello estrecho de 100, 1000 ml  
Cubeta de polietileno, 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l se mezcla de ácido nítrico/agua (1:1)  
En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

### **18.3 Aparatos e instrumentos**

Balanza de precisión, capacidad 4100/600g: 0,1/0,001  
Lámpara de potasio de tipo cátodo hueco  
Espectrofotómetro de absorción atómica  
Destilador de agua  
Baño de agua

### **18.4 Preparación de soluciones**

#### **18.4.1 Solución de ácido clorhídrico 1,2 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar a volumen con agua destilada.

#### **18.4.2 Solución de ácido clorhídrico, 4 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

#### **18.4.3 Solución de ácido clorhídrico, 6 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

#### **18.4.4 Solución patrón de potasio, 1000 mg/l**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolleta de cloruro de potasio. Enjuagar la ampolleta y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de potasio de 1000 mg/l lista para el uso.

#### **18.4.5 Soluciones patrón diluidas de potasio**

En matraces aforados de 100 ml vertir mediante una pipeta 0 - 100 - 200, 500 y 1000 ml de solución (18.4.4). Y llevar al volumen con solución 18.4.1. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 1,0 - 2,0 - 5,0 y 10,0 µg de potasio/ml. Transvertir inmediatamente a fascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

### **18.5 Preparación de la muestra para ensayo**

#### **18.5.1 Productos sólidos**

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

#### **18.5.2 Productos líquidos**

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

### **18.6 Procedimiento**

#### **18.6.1 Toma de ensayo**

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g; 1,00 g de producto en polvo o 10,00 g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (18.4.3). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

### 18.6.2 Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (18.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 1 y 10 µg/ml. Llevar al volumen con solución de ácido clorhídrico 1,2 N.

### 18.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Longitud de onda: 766,5 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante

Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador y ajustar el fotomultiplicador de manera óptima; para ello aspírese el patrón más concentrado.

Aspirar las soluciones patrón (18.4.5), luego las soluciones de la toma de ensayo (18.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución 18.4.2, luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 segundos. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (18.6.2)

### 18.7 Cálculo y expresión de resultados

#### 18.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de potasio en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\frac{(C-B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C-B) \times V \times D}{m \times 10}$$

Donde:

C = concentración de potasio en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de potasio en el blanco (solución patrón de 0 µg de potasio por ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo, en ml

D = factor de dilución

m = masa de la toma de ensayo, en g

#### 18.7.2 Expresión de los resultados

Contenidos inferiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con dos cifras significativas.

Contenidos superiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con tres cifras significativas.

### 18.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 5% de su valor medio.

## 19. Determinación de cloruro (Cl-) por valoración

### 19.1 Fundamento

Haciendo una solución o suspensión del producto en ácido nítrico, se valora por potenciometría directa mediante un electrodo de vidrio y una solución valorada de nitrato de plata hasta un potencial final previamente establecido.

### 19.2 Reactivos y materiales

#### 19.2.1 Reactivos

Solución de nitrato de plata de 0,1 mol o nitrato de plata para análisis

Solución de cloruro de sodio 0,1 mol o cloruro de sodio para análisis

Gelatina en polvo

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

#### 19.2.2 Materiales

Vasos de forma alta de 150 ml

Pipetas automáticas de báscula de 1 ml

Material común de laboratorio

Bureta de 20 o 25 ml

Agitador magnético

### **19.3 Aparatos e instrumentos**

Los aparatos de medidas descritos se refieren al método más utilizado, es decir, la determinación semiautomática.

Desecadores

Pesafiltros de forma alta con tapón esmerilado de 10 ml

Soportes para desecadores

Estufa de laboratorio

Electrodo anular de plata

La valoración potenciométrica puede efectuarse de tres maneras y el equipo para cada una de ellas es el siguiente:

#### **19.3.1 Determinación manual**

Medidor de pH/milivoltímetro con escala de lectura de  $\pm 700$  mV

Electrodo de plata con superficie tan grande como sea posible (para mayor estabilidad), y electrodo de referencia. O bien un solo electrodo anular de plata combinado.

#### **19.3.2 Determinación semiautomática**

Puesto de valoración automático, compuesto de: aparato de medida (milivoltímetro); aparato de mando programable (valorador, generador de impulsos) y bureta de pistón motorizada.

Imprimente o trazador de curvas (facultativo)

Electrodo (ver 19.3.1)

#### **19.3.3 Determinación automática**

Además de los aparatos citados en 19.3.2:

Cambiador de muestras automático con unidad de mando y puesto de valoración

Valorador según 19.3.2 con bureta de pistón motorizada, pero con distribución y llenado a control remoto, así como transmisión de datos a la imprimente.

**Nota:** Según los instrumentos disponibles se puede optar por una solución intermedia.

### **19.4 Preparación de soluciones**

#### **19.4.1 Solución de nitrato de plata 0,1 N**

En un matraz aforado de 1000 ml diluir el contenido de una ampollita de solución 0,1 N lista para el uso, o bien: si no se dispone de solución valorada lista para el uso, pesar, con una aproximación de 0,5 mg; 16,9890 g de nitrato de plata previamente secado durante 2 h a  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml. Comprobar el título, por valoración según 19.5.3, de 20 ml de solución exactamente 0,1 N de cloruro de sodio.

#### **19.4.2 Solución de cloruro de sodio 0,1 N**

En un matraz aforado de 1000 ml diluir el contenido de una ampollita de solución 0,1 N lista para uso, o bien: si no se dispone de solución valorada lista para el uso, pesar, con una aproximación de 0,5 mg; 5,8440 g de cloruro de sodio previamente secado durante 2 h a  $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

**19.4.3 Solución de gelatina aproximadamente 5g/100 ml (volumen aproximado de 15 ml), justo antes del uso, disolver, calentando 1 g de gelatina en 20 ml de agua destilada. Enfriar.**

### **19.5 Procedimiento**

La preparación de la muestra, la toma de ensayo y la disolución son idénticas para las tres variantes. No es preciso clarificar la solución a valorar, ya que ni el color del producto ni su contenido en sustancias insolubles influyen en el potencial final. En general, una adición de ácido nítrico elimina las interferencias.

#### **19.5.1 Toma de ensayo y disolución**

En un recipiente de valoración o en un vaso pesar con una aproximación de 0,1 mg, entre 1 y 5 g de producto, según el contenido supuesto en cloruro y la homogeneidad del producto. Para productos líquidos, añadir mediante una pipeta un volumen exacto correspondiente a los mismos criterios. La toma de ensayo debe consumir entre 1 y 15 ml de nitrato de plata. Añadir agua destilada para obtener un volumen final de unos 50 ml, así como un imán mezclador. Colocar sobre un agitador magnético y agitar hasta obtener una solución o una suspensión fina, sin grumos. La duración varía entre 1 y 30 min, según la naturaleza del producto. Mediante una pipeta automática añadir 1 ml de ácido nítrico concentrado y mezclar. El pH de la solución debe ser inferior a 1,5. En caso de duda, verificarlo mediante un medidor de pH y, si es necesario añadir más ácido nítrico.

#### **19.5.2 Determinación manual**

##### **19.5.2.1 Preparación del aparato**

Conectar los electrodos al aparato de medida y, si es necesario, precalentar el mismo según las instrucciones del fabricante. Sumergir el o los electrodos, pero nunca la punta de la bureta, en una mezcla de 50 ml de agua destilada y 1

ml de ácido nítrico concentrado (solución de calibración) y colocar sobre un agitador magnético. Ajustarlo de modo que mezcle bien sin salpicar durante las valoraciones ulteriores. Consultar el manual del aparato para ajustar la escala de los milivoltios mediante una contratensión a fin de obtener un potencial cercano al medio de la escala de lectura (ese será el potencial final). Después de esta calibración no se deben efectuar más ajustes en el milivoltímetro.

Ver notas (19.8)

#### **19.5.2.2 Valoración**

Sumergir los electrodos en la solución acidificada de la toma de ensayo. Si se utiliza un agitador magnético y una bureta de pistón, sumergir asimismo la punta de la bureta a media altura del electrodo de plata, o a la altura del anillo de plata si se utiliza un electrodo combinado, a aproximadamente 1 cm delante de éste (en el sentido de rotación del líquido). Así es posible valorar con la mayor precisión, ya que el electrodo señala inmediatamente un exceso de reactivo.

Agitando continuamente, sin tocar los electrodos, valorar mediante la solución de nitrato de plata 0,1 N, primero rápidamente hasta unos 100 mV antes del potencial final, luego lentamente con porciones cada vez más pequeñas hasta el potencial final, que debe permanecer estable durante al menos 10 segundos. Una ejecución minuciosa con bureta de pistón permite determinar el punto final con una precisión de 0,01 ml.

Variante: Para determinaciones aún más precisas, sobre todo para determinar contenidos muy bajos en cloruro, la valoración a "potencial final" puede reemplazarse ventajosamente por la valoración "en incrementos" o porciones. El volumen de reactivo correspondiente al punto de equivalencia puede encontrarse ya sea gráficamente, ya sea por cálculo.

#### **19.5.2.3 Enjuague de los electrodos**

Enjuagar los electrodos con agua destilada inmediatamente después de cada valoración. Si se pega materia grasa a los electrodos, eliminarla sumergiéndolos brevemente en acetona.

#### **19.5.2.4 Verificación del potencial de fin de reacción**

Al efectuar grandes series de valoraciones hasta potencial final, debe verificarse la concordancia entre el potencial final fijado y aquel medido por los electrodos sumergidos en la mezcla agua/ácido nítrico. Para ello, después de 30 a 60 min de valoración y después de apartar la punta de la bureta, sumergir los electrodos en el vaso que contiene la mezcla agua/ácido nítrico y agitar. Si es necesario, corregir el potencial. (Una diferencia de más de 10 mV indica que los electrodos están sucios)

#### **19.5.2.5 Verificación del método**

Periódicamente valorar según el punto 19.5.2.2; 20 ml de solución exactamente 0,1 N de cloruro de sodio.

Al valorar soluciones puras de Cl<sup>-</sup>, el cloruro de plata precipitado tiende a adherirse a la superficie activa del electrodo de plata o al anillo de plata del electrodo combinado, lo cual impide el buen funcionamiento. Para evitar este inconveniente, se recomienda añadir antes de comenzar la valoración unos mililitros de solución de aproximadamente 5g/100 ml de gelatina recién preparada. Corregir mediante un ensayo en blanco si la gelatina contiene cloruro.

### **19.5.3 Determinación semiautomática**

#### **19.5.3.1 Preparación del aparato**

Montar el aparato, efectuar las manipulaciones y verificar el funcionamiento del valorador según las instrucciones del fabricante.

La disposición de los electrodos y de la punta de la bureta en el recipiente de valoración debe ser exactamente la misma como para la valoración manual.

Antes de cada valoración comprobar:

El llenado del sistema de la bureta y, si es necesario, la posición de la llave.

La puesta a cero de la bureta y, si es necesario, del registrador.

La posición de la punta de la bureta

La velocidad del motor de la bureta si es manual. La velocidad mínima ofrece mayor precisión.

La velocidad del agitador

La velocidad del papel y la escala deseada en el registrador.

#### **19.5.3.2 Valoración**

Dado que la valoración es automática se necesita vigilar el aparato cuando menos la primera vez después del ajuste. El valorador se para automáticamente en caso de valoración a potencial final; en cambio, si la valoración se registra gráficamente, debe interrumpírsele cuando el milivoltímetro indica unos 120 mV más allá del punto final.

Al efectuar grandes series de valoraciones hasta potencial final, debe verificarse la concordancia entre el potencial final fijado y aquel medido por los electrodos sumergidos en la mezcla agua/ácido nítrico. Apartar la punta de la bureta. (Ver punto 19.5.2.4)

Para la limpieza de los electrodos después de cada valoración, ver 19.5.2.3 y 19.8

### **19.5.4 Determinación automática**

Montar y utilizar la instalación siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante.

Normalmente ajustar el valorador como para la determinación semiautomática. Sólo pueden efectuarse valoraciones a potencial final.

Deben observarse estrictamente todos los detalles indicados más arriba: disposición de los electrodos en el recipiente de valoración, tratamiento de los electrodos, etc.; si es necesario puede adaptarse el volumen de la solución a valorar a la capacidad del recipiente de valoración. La cantidad de ácido nítrico debe ser de al menos 1 ml por 50 ml de solución a valorar.

Antes de comenzar la valoración, además de los controles indicados bajo 19.5.3.1, ajustar el programador del cambiador de muestras y comprobar los puntos siguientes:

Posición correcta de los recipientes de valoración en el cambiador de muestras.

Cantidad suficiente de reactivo, de agua de enjuague y de papel en el registrador.

Comprobar el buen funcionamiento del aparato durante la primera valoración. Basta con verificar de vez en cuando la reserva de reactivo, de agua de enjuague y de papel en el registrador, así como el funcionamiento correcto de la valoración y de la impresión.

### 19.6 Cálculo y expresión de resultados

#### 19.6.1 Cálculo

El contenido de cloruro en el producto, expresado en porcentaje de masa, es igual a:

$$\frac{A \times 35,45 \times N \times 100}{m \times 1000}$$

donde:

A = número de ml de solución de nitrato de plata 0,1 N utilizados para la valoración (lectura en la bureta o determinados gráficamente o por cálculo)

35,45 = peso atómico del cloro

N = normalidad exacta de la solución de nitrato de plata (0,1)

m = masa de la toma de ensayo, en g; o volumen en ml.

#### 19.6.2 Expresión de resultados

Expresar los resultados en g de cloruro/100 g o 100 ml.

Para expresar el resultado en mg de cloruro/100 g, multiplicar el porcentaje por 100.

Si es necesario, también se puede dar el resultado en cloruro de sodio, reemplazando en la fórmula de cálculo, el peso atómico del cloro (35,45) por el del cloruro de sodio (58,44)

### 19.7 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 1% de su valor medio.

La heterogeneidad de una muestra puede influir desfavorablemente en la repetibilidad y la reproducibilidad.

### 19.8 Notas

#### 19.8.1 Agua destilada

Utilizar agua destilada totalmente exenta de cloruro.

#### 19.8.2 Mantenimiento de los electrodos

##### 19.8.2.1 Electrodo de plata

- Normalmente: enjuagar con agua destilada y secar.
- Electrodo grasiento: sumergir en acetona, enjuagar con agua destilada y secar.
- Electrodo manchado, sucio u oscuro (violeta): frotar con un paño mojado y detergente para vajilla, enjuagar con agua destilada y secar.
- Conservar en un lugar seco, en una caja u otro recipiente hermético, a fin de retrasar la oxidación de la plata.

##### 19.8.2.2 Electrodo de referencia

- Enjuagar con agua destilada y secar.
- Para el mantenimiento, sírvase consultar las instrucciones del fabricante. En general debe renovarse periódicamente el electrolito.
- Conservar en un lugar seco o en agua.

##### 19.8.2.3 Electrodo anular de plata combinado

- Enjuagar con agua destilada y secar.
- Tratar la parte de plata como un electrodo de plata.
- Para el mantenimiento, sírvase consultar las instrucciones del fabricante. En general debe renovarse periódicamente el electrolito.

- Conservar en un lugar seco o en agua.

**19.8.2.4** Enjuague de los electrodos

**Cuidado:** Enjuagar los electrodos previamente con agua destilada y apartar la punta de la bureta, ya que incluso trazas de iones Ag<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup> pueden interferir en la calibración y acarrear errores en toda la serie de análisis. Esta observación también es válida para las calibraciones de control, que deben efectuarse aproximadamente cada 60 min durante las series de análisis. Un desvío importante en estas calibraciones indica que los electrodos están sucios.

**19.9** Cálculos para la valoración con adiciones constantes

Después de cada adición, leer el potencial cuando se haya estabilizado. Calcular la diferencia de potencial entre las adiciones. El punto de equivalencia se sitúa entre los dos volúmenes con la mayor diferencia de potencial.

Sean V1, V2, V3, V4 los volúmenes cuyos potenciales son P1, P2, P3, P4; las diferencias de potencial son P2 - P1, P3 - P2, P4 - P3, y P3 - P2 es la diferencia mayor. V2 = V1 + V; V3 = V2 + V; V4 = V3 + V; V = volumen de la adición.

El punto de equivalencia exacto se sitúa en:

$$V_{s2} + \frac{(P_4 - P_3) \times V}{(P_2 - P_1) + (P_4 - P_3)}$$

Ejemplo numérico:

AgNO3 [ml]	Lectura [mV]	diferencia [mV]
9,0	58,0	
9,1	59,6	1,6 para 0,1 ml AgNo3
9,2	62,5	2,9
9,3	64,6	2,1
9,4	68,1	3,5
9,5	70,9	2,8
9,6	73,9	3,0
9,7	79,3	5,4
9,8	83,9	4,6
9,9	92,4	8,5
10,0	102,7 P1	10,3
10,1	114,9 P2	12,2
10,2	155,7 P3	40,8 mayor
10,3	196,0 P4	40,3
10,4	218,5	22,5
10,5	227,3	8,8
10,6	234,2	6,9

V2 = 10,1 ml

V = 0,1 ml

$$10,1 + \frac{40,3 \times 0,1}{12,2 + 40,3} = 10,177 \text{ ml}$$

**20. Determinación de iodo (I-). Método del electrodo de ión selectivo**

**20.1** Fundamento

La proteína es removida por precipitación con ácido. El iodo en el filtrado se mide usando el electrodo de ión selectivo, seguida de otra medición después de agregar una solución estándar de adición conocida. Las interferencias para las respuestas del electrodo son eliminadas con Nitrato de Níquel.

**20.2** Aparatos

Balanza analítica con sensibilidad de ± 0,1 mg.

Potenciómetro digital con escala de 0,1 mV.

Licudadora con motor a prueba de explosión.

Electrodos: 1) Electrodo de ión-selectivo de I-  
2) Electrodo de referencia Ag/AgCl

**20.3** Reactivos y materiales

**20.3.1** Materiales

Matraces volumétricos

Frascos de vidrio color ámbar

Material común de laboratorio

Agitador magnético, cubierto con una capa de estireno espumoso o material aislante para prevenir calentamiento de la muestra.

Papel filtro, de filtración rápida, doblados, con retención de partículas de 20-25 µm (sustitutable por papel filtro No. 541)

### 20.3.2 Reactivos

#### 20.3.2.1 Agua destilada

20.3.2.2 Solución de ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) al 3% v/v. Transferir 15 ml de ácido acético glacial a un matraz volumétrico de 500 ml que contenga aproximadamente 250 ml de agua. Llevar a volumen con agua y mezclar bien.

20.3.2.3 Yoduro de potasio (KI) o yoduro de sodio (NaI), se recomienda usar preferentemente estándares de referencia.

#### 20.3.2.4 Solución estándar de Iodo

20.3.2.4.1 (Solución I) Solución estándar de referencia de I<sup>-</sup>, de 0,100 ± 0,001 M (12,6 g de iodo/l) estandarizada. Pesar 16,998 g de KI o 14,898 de NaI y disolverlos en un matraz aforado de 1000 ml, llevar al volumen con agua, almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente y protegido de la luz, descartar 12 meses después de la estandarización o 6 meses después de haberse abierto el frasco.

##### 20.3.2.4.1.1 Estandarización de la solución I

Preparar los siguientes reactivos:

- Solución estándar titulante de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) 0,0141 M (0,0141). Disolver 2,395 g de AgNO<sub>3</sub> en agua destilada y diluir a un litro con agua destilada, almacenar en frasco ámbar.

- Solución indicadora de cromato de potasio (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>). Disolver 50 g de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> en un poco de agua, agregar de la solución de nitrato de plata anteriormente preparada hasta que se forme un precipitado rojo. Dejar reposar por 12 h, filtrar y diluir a un litro con agua destilada.

- Acido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,1 N o

- Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N

Procedimiento: medir lo más exactamente posible 10 ml de la solución I de referencia de Iodo y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml y diluir a la marca con agua destilada, llevar a un pH entre 7 y 10 usando ácido sulfúrico o hidróxido de sodio 0,1 N. Tomar alícuotas de 25 ml y completar con agua destilada hasta aproximadamente 100 ml, agregar 1,0 ml de la solución indicadora de cromato de potasio y titular con la solución de nitrato de plata, hasta un vire color rojizo, asegurar la consistencia del punto final. Correr paralelamente un blanco de reactivos.

Cálculos

$$\text{mg I}^- / \text{l} = \frac{(A - B) \times N \times 126\,900}{\text{ml de la muestra} \times (25 \text{ ml})}$$

en donde:

A = ml gastados de nitrato de plata en la muestra

B = ml gastados de nitrato de plata en el blanco

N = Normalidad del nitrato de plata

126 900 = miliequivalentes del I<sup>-</sup> por 100 ml

20.3.2.4.2 Solución II. Solución stock de Iodo 101,5 mg/l. Colocar 8 ml de solución estándar de referencia de Iodo dentro de un matraz volumétrico de 1 l. Diluir a volumen con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar después de dos semanas.

20.3.2.4.3 Solución III. Solución estándar intermedia de I<sup>-</sup>, 1,0 mg/l. Colocar con una pipeta 5 ml de la solución II (stock de Iodo), dentro de un matraz volumétrico de 500 ml. Diluir a un volumen con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar después de dos semanas.

20.3.2.4.4 Solución IV. Solución estándar intermedia de I<sup>-</sup>, 0,1 mg/l. Colocar con una pipeta 10,0 ml de solución III (estándar intermedia de Iodo), dentro de un matraz de 100 ml. Diluir a volumen con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar después de dos semanas.

20.3.2.4.5 Solución V. Solución estándar de adición conocida. Colocar con una pipeta 10 ml de solución II (stock de Iodo), dentro de un matraz volumétrico de 1 l. Diluir a volumen con agua y mezclar bien. Tomar una alícuota de 100 ml de esta solución y adicionar 1,0 ml de cada una de las siguientes soluciones: AFI, solución de nitrato de níquel y agua. Preparar solución fresca diariamente.

20.3.2.5 Solución para guardar el electrodo. Solución de Iodo 0,1 mg/l. Diluir 1 ml de la solución II (stock de Iodo) a 1 l con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar la solución

después de 3 meses. Guardar el electrodo de ión selectivo en esta solución cuando no se use, reemplazar la solución semanalmente.

**20.3.2.6** Ajustador de fuerza iónica (AFI). Solución de nitrato de sodio 5 M. Disolver 42,5 g de nitrato de sodio,  $\text{NaNO}_2$ , en aproximadamente 50 ml de agua en un matraz volumétrico de 100 ml, diluir al volumen con agua y mezclar bien.

**20.3.2.7** Solución de nitrato de níquel 2,0 M,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Disolver 58,2 g de nitrato de níquel hexahidratado en aproximadamente 50 ml de agua en un matraz volumétrico de 100 ml. Diluir a volumen con agua y mezclar muy bien.

**20.4** Preparación de la muestra

Si la muestra es líquida tomar directamente 100 ml. Si la muestra es sólida, pesar una cantidad de muestra tal que contenga entre 75 y 150  $\mu\text{l}$  de Iodo y reconstituirla con agua hasta un volumen de 100 ml.

Colocar la muestra en un matraz volumétrico de 250 ml, adicionar 10 ml de solución de ácido acético al 3%, diluir al volumen con agua y mezclar bien. Pasar el contenido del matraz a una licuadora y mezclar a baja velocidad por 2 min. Filtrar para obtener un filtrado claro, si el filtrado es turbio descartar los primeros 10 ml.

**20.5** Determinación

Precaución: Agitar todas las soluciones con agitador magnético antes de medir el potencial con el electrodo).

**20.5.1** Calibración de la pendiente del electrodo. En un vaso de precipitados tomar 100 ml de la solución IV estándar intermedia de iodo (0,1 mg/l), introducir los electrodos y agregar con agitación 1 ml de cada una de las siguientes soluciones: solución AFI, solución de nitrato de níquel y agua, cuando la lectura del potencial sea estable aproximadamente de 2 a 5 min, registrar hasta décimas de mV como E1.

Retirar los electrodos, enjuagarlos con agua y secarlos.

En otro vaso de precipitados colocar 100 ml de la solución III estándar intermedia de iodo (1,0 mg/l), introducir los electrodos y adicionar con agitación 1 ml de las siguientes soluciones: solución AFI, solución de nitrato de níquel y agua, cuando la lectura del potencial sea estable aproximadamente de 2 a 5 min registrar la lectura hasta décimas de mV como E2.

Retirar los electrodos enjuagarlos con agua y secar.

Calcular la pendiente (S) del par de electrodos de la siguiente manera:

$$S = E2 - E1.$$

Medir la pendiente cada 4 h cuando el electrodo esté en uso continuo. Usar el valor de la pendiente más reciente para calcular los resultados de las subsecuentes mediciones de iodo.

**20.5.2** Valoración de la muestra. En un vaso de precipitados tomar 100 ml de la muestra filtrada y agitarla con un agitador magnético, adicionar 1,0 ml de las siguientes soluciones: solución AFI, solución de nitrato de níquel y ácido nítrico concentrado. Colocar los electrodos en la solución a analizar. Cuando la lectura del potencial sea estable aproximadamente 2 min registrar la lectura hasta décimas de mV como E3, inmediatamente con una pipeta adicionar 10 ml de la solución V estándar de adición conocida y agitar. Cuando sea estable aproximadamente 2 min registrar hasta décimas de mV como E4.

**20.5.3** Cálculos

Calcular el contenido de Iodo (C) de la muestra como sigue:

$$C = Q \times 0,9854 \text{ ml/l} \times 2,50 \times 1,03$$

$$\text{Usando } Q = \frac{0,0885}{\text{antilog} [(E4 - E3) / S] - 0,912}$$

donde:

0,9854 mg/l = concentración de iodo de la solución de estándar de adición conocida

2,50 = Factor de corrección por dilución de 100 ml de muestra a 250 ml.

1,03 = Factor de corrección de 100 ml de muestra filtrada con el volumen total de reactivos de 103 ml y

$S = E2 - E1$

$$0,0885 = \frac{\text{ml de estándar adicionado}}{\text{ml originales} + \text{ml de estándar adicionado}} = \frac{10}{(103 + 10)}$$

$$0,912 = \frac{\text{ml originales}}{\text{ml originales} + \text{ml de estándar adicionado}} = \frac{103}{(103 + 10)}$$