

CONTRIBUCION A LA DETERMINACION DE LACTOSA EN LECHE

ADAPTACION DEL METODO COLORIMETRICO DE SOMOGYI-NELSON

Por HECTOR ARIEL AINCIBURU ¹

La lactosa es el único carbohidrato que se halla en la leche en cantidades significativas —como promedio entre 47 y 49 g ⁰/₁₀₀²— y posiblemente haya más métodos para su determinación cuantitativa que para cualquier otro componente de la leche. Este hecho, entre otras cosas, confirma lo inadecuado de algunos de estos métodos.

El método de Somogyi (1) modificado por Nelson (2), para la determinación de glucosa, tiene una aplicación biológica muy extensa, especialmente en Química Clínica para semimicro o micro-técnicas (3).

El propósito del presente trabajo es adecuar la técnica del método referido a la determinación de lactosa en leche.

Las muestras, provenientes del tambo de esta Facultad de Agronomía, fueron suministradas por la cátedra de Industrias Agrícolas de Lechería.

REACTIVOS UTILIZADOS (todas las soluciones utilizadas se prepararon con reactivos p. a de marcas reconocidas):

— tungstato de sodio ($\text{WO}_4\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 10 % (P/V).

— sulfato de cobre ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) 7 % (P/V).

¹ Licenciado en Química. Profesor adjunto, con carácter de semidedicación, de la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Agronomía de La Plata.

² Los datos se refieren a lactosa hidratada ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$) los que, por otra parte, son los consignados en este trabajo.

— solución cupro-alcalina de Somogyi (4): 12 g. de CO_3Na_2 anh. y 6 g. de sal de Rochelle o de Seignette (tartrato doble de Na y K - $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{NaK} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) se disuelven en aproximadamente 100 ml de H_2O destilada; agregar 40 ml de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 5 %, mezclar; agregar 8 g de CO_3HNa y agitar hasta disolución total.

En 250 ml de H_2O destilada caliente disolver 90 g de SO_4Na_2 anhidro. Enfriar y agregar esta solución a la anterior de SO_4Cu ; mezclar bien el total de la solución y llevar a volumen de 500 ml con H_2O destilada.

— reactivo de Nelson (2): en 900 ml de H_2O destilada disolver 50 g de molibdato de amonio ($\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), agregar cuidadosamente 42 ml de SO_4H_2 concentrado, mezclar.

En 50 ml de H_2O destilada disolver 6 g de arseniato de sodio ($\text{AsO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$); agregar esta solución a la anterior de molibdato y mezclar bien. Dejar toda la noche en estufa a 37°C , antes de usar.

— lactosa 1 g %; pesar 1 g de lactosa y llevar a volumen de 100 ml —en matraz aforado— con solución saturada de ácido benzoico, para su conservación.

MATERIAL Y APARATO UTILIZADOS:

- tubos de Folin, de vidrio borosilicato, marca I.V.A., de 25 ml de capacidad¹.
- para las lecturas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro marca "Spectronic 20" de Bausch y Lomb².

TECNICA

A) PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

En distintos matraces aforados de 100 ml de capacidad agregar, respectivamente, los siguientes volúmenes de la solución de lac-

¹ Puede prescindirse del uso de los tubos de Folin, utilizando tubos de ensayo Pyrex, pues el SO_4Na_2 anhidro del reactivo de Somogyi impide la oxidación del Cu_2O .

² Aparato adquirido por la cátedra mediante un subsidio de la Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires, otorgado en el año 1967.

tosa 1 % : 1,5 ml (corresponde a 30 g lactosa/litro) ; 1,75 ml (corresponde a 35 g lactosa/l) ; 2,0 ml (corresp. a 40 g lactosa/l) ; 2,25 ml (corresp. a 45 g lactosa/l) ; 2,50 ml (corresp. a 50 g lactosa/l) ; 2,75 ml (corresp. a 55 g lactosa/l) ; 3,0 ml (corresp. a 60 g lactosa/l) ; 3,25 ml (corresp. a 65 g lactosa/l) y 3,50 ml (corresp. a 70 g lactosa/l). En otro matraz aforado de 100 ml de capacidad, que se rotulará "Blanco", se colocarán 2 ml de H₂O destilada.

En todos los matraces agregar 1 ml de tungstato de sodio 10 %, mezclar; seguidamente agregar, en cada uno de ellos, 1 ml de sulfato de cobre 7 %, mezclar bien y llevar a volumen con H₂O destilada. Dejar en reposo 30 minutos; filtrar o centrifugar.

Colocar 1 ml de cada filtrado o centrifugado en tubo de Folin y agregar, en cada uno de los tubos, 1 ml de solución cupro-alcálica de Somogyi. Calentar, en baño de agua hirviente, exactamente durante 10 minutos. Luego enfriar rápidamente, bajo agua corriente, durante 3 minutos.

A cada tubo agregar 1 ml de reactivo de Nelson, mezclar bien y, en baño de agua hirviente, calentar exactamente durante 5 minutos; rápidamente enfriar, bajo agua corriente, durante 3 minutos. Llevar a volumen de 25 ml con H₂O destilada, mezclar por inversión repetida del tubo de Folin. Esperar 10 minutos y proceder a la lectura en el espectrofotómetro a 540 m μ , ajustando el "Blanco" a 100 % de transmisión.

Los datos obtenidos se hallan representados en la Fig. 1¹.

Como se observa el ensayo cumple con la ley de Beer, dentro del rango de las concentraciones utilizadas.

B) ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

En matraz aforado de 100 ml colocar 0.5 ml de la muestra de leche; agregar 1 ml de tungstato de sodio 10 %, mezclar; agregar 1 ml de sulfato de cobre 7 %, mezclar bien. Llevar a volumen con H₂O destilada. Dejar en reposo 30 minutos, luego filtrar o centrifugar. (Paralelamente efectuar un "Blanco".)

Tomar 1 ml del filtrado o centrifugado en un tubo de Folin y proseguir el ensayo de acuerdo a lo indicado precedentemente en A). Aunque puede utilizarse la curva de calibración para determinar la concentración de lactosa en la muestra de leche, se reco-

¹ Como es de práctica general, debe determinarse la curva de calibración toda vez que se renuevan los reactivos.

mienda proceder a realizar — en cada oportunidad — un “Testigo”, para lo cual se colocarán en un matraz aforado de 100 ml de capacidad 2.5 ml de la solución de lactosa 1 % (corresp. a 50 g lacto-

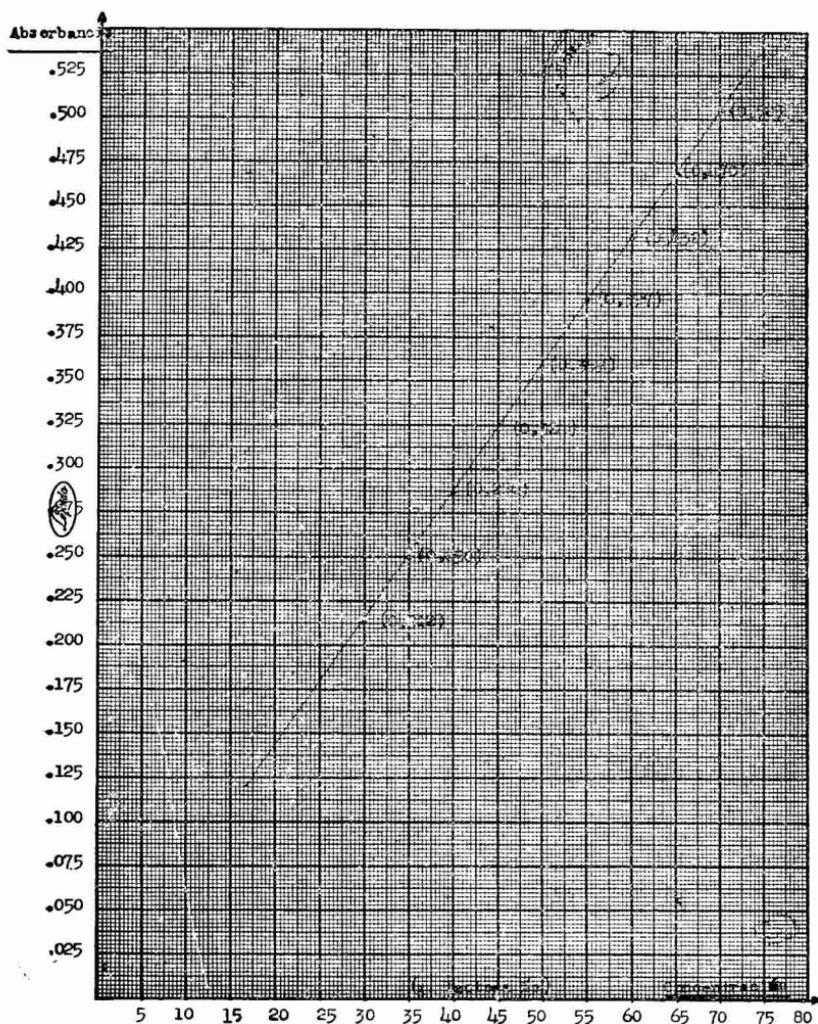


Fig. 1. — Curva de calibración

sa/l); agregar 1 ml de tungstato de sodio 10 %, mezclar; agregar 1 ml de sulfato de cobre 7 %, mezclar bien; llevar a volumen con H₂O destilada. Dejar en reposo 30 minutos y proseguir de acuerdo a la técnica descrita con anterioridad.

$$\text{Cálculo} = \frac{\text{D.O. « Muestra »}}{\text{D.O. « Testigo »}} \times 50 = \text{g. lactosa/litro}$$

C) REPRODUCCIÓN DE DATOS

En ocho tubos de Folin se colocó 1 ml del filtrado de la defecación de una misma muestra de leche y se determinó, simultáneamente, el contenido de lactosa en cada uno de ellos.

Los datos obtenidos se hallan indicados en la Tabla I.

Se observa una excelente reproductibilidad en los datos obtenidos, lo que permite estimar su utilidad como método de rutina.

D) RECUPERACIÓN DE LACTOSA

Con la finalidad de realizar otro control del método, en cuanto a su exactitud y precisión, se aumentó la concentración de lactosa en una de las muestras de leche, por agregado de lactosa. Luego se determinó la concentración resultante mediante la técnica indicada en B).

Los datos correspondientes al ensayo se hallan indicados en la Tabla II.

La recuperación de lactosa en los ensayos (desviación máxima en el orden del 0,12 %) demuestra la exactitud y precisión del método.

E) INFLUENCIA DE LA SACAROSA

En cuanto la sacarosa se utiliza en la fabricación de diversos productos lácteos, se estimó conveniente estudiar el efecto que sobre la determinación de lactosa puede tener el agregado de sacarosa.

A tal fin se utilizó una muestra de azúcar refinada que, en ensayos previos, no produjo reducción del reactivo cupro-alcálico de Somogyi. Este producto fue agregado, en cantidades variables, a cuatro alícuotas de 100 ml de una misma muestra de leche. La concentración de lactosa en la muestra original y en las cuatro muestras con sacarosa fue determinada de acuerdo a la técnica indicada en B).

Los datos correspondientes se hallan consignados en la tabla III. (Los valores de lactosa calculada tienen en cuenta la dilución debida al agregado de sacarosa).

TABLA I

Concentración de lactosa de ocho ensayos de una misma muestra de leche

Ensayo	% Transmitancia	Absorbancia	Concentración
1	44	0,357	49,25 g ^o /100
2	44	0,357	49,25 »
3	44	0,357	49,25 »
4	44,5	0,352	49,00 »
5	44,5	0,352	49,00 »
6	44	0,357	49,5 »
7	44	0,357	49,25 »
8	44,5	0,352	49,00 »

TABLA II

Determinación de lactosa agregada

Agregado (g ^o /100)	Determinado (g ^o /100)	Diferencia (g ^o /100)
0	49,85	—
2	50,75	— 1,10
5	53,75	— 1,10
7,5	57,25	— 0,10
10	58,65	— 1,20
15	65,30	+ 0,45

TABLA III

Determinación de lactosa en presencia de sacarosa

Sacarosa agreg. (g ^o /100)	Lactosa (g ^o /100)		Diferencia
	Calculada	Hallada	
0	—	45,15	—
5	42,95	44,00	+ 1,15
10	40,63	41,60	+ 0,97
15	38,38	39,80	+ 1,42
20	36,12	37,50	+ 1,38

Los valores obtenidos demuestran que puede ser utilizado este método, con excelente resultado, para la determinación de lactosa en presencia de sacarosa.

CONCLUSIONES

Los ensayos realizados permiten afirmar que el método colorimétrico de Somogyi-Nelson puede aplicarse a la determinación de lactosa en leche; con la ventaja de requerir, para su ejecución, pequeñas cantidades de muestra.

La reproducción de datos (tabla I) y la recuperación de lactosa (tabla II) obtenidos por este método, demuestran que puede ser utilizado con la seguridad de contar con un excelente método comparable a los mejores propuestos para este propósito. Además, como se observa en la tabla III, el método puede ser aplicado a la determinación de lactosa en presencia de sacarosa.

Este método tiene las mismas limitaciones que la mayoría de los métodos químicos indicados por otros autores, especialmente porque no es específico para la lactosa.

RESUMEN. — Se ha realizado una adaptación del método colorimétrico de Somogyi-Nelson para la determinación de lactosa en leche, utilizando un volumen de muestra de 0,5 ml y un espectrofotómetro «Spectronic 20» para las lecturas.

Se detalla la técnica utilizada para obtener la curva de calibración y la realización del análisis de las muestras.

Los valores obtenidos en los ensayos de reproducción de datos y de recuperación de lactosa demuestran la exactitud y precisión del método.

El estudio de la influencia de cantidades variables de sacarosa, sobre la determinación de lactosa, permite llegar a la conclusión de que puede aplicarse el método a productos lácteos que contienen sacarosa, como en el caso de cremas heladas y leche condensada.

SUMMARY. — **Contribution to the lactose determination in milk. Adaptation to the Somogyi-Nelson colorimetric method**, by HÉCTOR ARIEL AINCIBURU. — The adaptation of the Somogyi-Nelson colorimetric method has been done to determine lactose in milk, using 0,5 ml of sample and a spectrophotometer — «Spectronic 20» — for the readings.

The technique utilized to obtain the calibration curve and the sample analysis is detailed.

The accuracy and precision of the reported method is made evident through the values obtained in the assays of data reproduction and lactose recovery.

The study of the influence of added sucrose — in variables amounts — on the measurement of lactose concluded that the method can be applied for dairy products containing sucrose, such as ice cream and condensed milk.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. SOMOGYI, MICHAEL, J. Biol. Chem. *117*, 771 (1937).
2. NELSON, NORTON, J. Biol. Chem. *153*, 375 (1944).
3. NATELSON, SAMUEL, *Microtechniques of Clinical Chemistry*. C. C. Thomas Publ. III, U. S. A.
4. SOMOGYI, MICHAEL, J. Biol. Chem. *195*, 19 (1952).

Laboratorio Cátedra Química Orgánica
Facultad de Agronomía La Plata