

374L0203

22. 4. 74

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

N° L 108/7

QUINTA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 25 de marzo de 1974

por la que se determinan los métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales

(74/203/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos de toma de muestras de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽¹⁾, modificada en último lugar por el Acta ⁽²⁾ adjunta al Tratado relativo a la adhesión de nuevos Estados miembros a la Comunidad Económica Europea y a la Comunidad Europea de la Energía Atómica ⁽³⁾ firmada en Bruselas el 22 de enero de 1972, y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la Directiva antes citada prevé los controles oficiales de los alimentos para animales dirigidos a comprobar si se respetan las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas sobre la calidad y composición de dichos alimentos se efectuarán según los métodos de toma de muestras y de análisis comunitarios;

Considerando que las Directivas 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE y 73/46/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971 ⁽⁴⁾, 18 de noviembre de 1971 ⁽⁵⁾, 27 de abril de 1972 ⁽⁶⁾ y 5 de diciembre de 1972 ⁽⁷⁾ respectivamente, ya han establecido métodos de análisis comunitarios; que, habida cuenta del grado de avance de los trabajos efectuados desde entonces es conveniente establecer una quinta serie de métodos;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros dispondrán los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo que se refiere al contenido en almidón y en productos de degradación de alto peso molecular de almidón de los alimentos que contengan peladuras, pulpas, hojas o cuellos secos de remolachas, pulpas de patatas, levaduras

deshidratadas, productos ricos en inulina o chicharrones se efectúen según el método descrito en el Anexo I de la presente Directiva.

Serán aplicables al método descrito en el Anexo I de la presente Directiva las disposiciones generales que figuren en la Parte I (Introducción) del Anexo de la primera Directiva 71/250/CEE de la Comisión de 15 de junio de 1971.

Artículo 2

Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo que se refiere a sus contenidos en amprolio, etopabato, dinitolmida (DOT), nicarbacina y menadiona (vitamina K₃), se efectúen según los métodos descritos en el Anexo II de la presente Directiva.

Serán aplicables a los métodos descritos en el Anexo II de la presente Directiva las disposiciones generales que figuran en la Parte I (Introducción) del Anexo de la Directiva 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971, con excepción de la parte relativa a la preparación de la muestra para análisis.

Artículo 3

Los Estados miembros aplicarán, a más tardar el 1 de noviembre de 1974, las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 25 de marzo de 1974.

Por la Comisión

El Presidente

François-Xavier ORTOLI

⁽¹⁾ DO n° L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

⁽²⁾ DO n° L 73 de 27. 3. 1972, p. 14.

⁽³⁾ DO n° L 73 de 27. 3. 1972, p. 5.

⁽⁴⁾ DO n° L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.

⁽⁵⁾ DO n° L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

⁽⁶⁾ DO n° L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

⁽⁷⁾ DO n° L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.

ANEXO I

DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN

— Método de la pancreatina —

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar el contenido en almidón y en productos de degradación de alto peso molecular en almidón de los alimentos que contienen peladuras, pulpas, hojas o cuellos desecados de remolacha, pulpas de patata, levaduras deshidratadas, productos ricos en inulina (por ejemplo, peladura y harina de patata) o chicharrones. La determinación sólo se habrá de efectuar cuando el examen microscópico muestre la presencia de cantidades no despreciables de almidón en la muestra.

2. Principio

Los azúcares presentes en la mezcla se eliminan mediante extracción por etanol. El almidón del residuo de extracción se sacarifica mediante la pancreatina. Los azúcares se hidrolizan mediante el ácido clorhídrico y la glucosa se forma y se determina mediante el método de Luff-Schoorl. La cantidad de glucosa obtenida de esta forma multiplicado por un factor constante, da el contenido en almidón de la muestra.

3. Reactivos

- 3.1. Etanol al 90 % (v/v), neutro a la fenolftaleína.
- 3.2. Alcohol n-amílico p.a.
- 3.3. Tolueno p.a.
- 3.4. Solución tampón: Disolver en el agua 9,078 g de fosfato monopotásico KH_2PO_4 y 11,876 g de fosfato disódico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Completar a 1 l mediante agua.
- 3.5. Solución de cloruro de sodio 0,2 N.
- 3.6. Solución de Carrez I: Disolver en el agua 21,9 g de acetato de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 3 g de ácido acético glacial. Completar a 100 ml mediante agua.
- 3.7. Solución de Carrez II: Disolver en el agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Completar a 100 ml mediante agua.
- 3.8. Ácido clorhídrico N.
- 3.9. Ácido clorhídrico p.a., 8 N aproximadamente, d: 1,125.
- 3.10. Solución de hidróxido de sodio p.a., 10 N aproximadamente, d: 1,33.
- 3.11. Indicador: solución al 0,1 % (p/v) de metilorangina.
- 3.12. Pancreatina, pulverulento, que responda a las disposiciones dadas en el punto B: conservar en frascos tapados, a resguardo de la luz y de la humedad.
- 3.13. Reactivo según Luff-Schoorl: verter, agitando con prudencia, la solución de ácido cítrico (3.1.3.2) en la solución de carbonato de sodio (3.1.3.3). Añadir a continuación sulfato de cobre (3.1.3.1) y completar a 1 l mediante agua. Dejar reposar una noche y filtrar. Controlar la normalidad del reactivo así obtenido (Cu 0,1 N; Na_2CO_3 2 N). El pH de la solución debe ser de 9,4 aproximadamente.
 - 3.1.3.1. Solución de sulfato de cobre: disolver 25 g de sulfato de cobre p.a. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua.
 - 3.1.3.2. Solución de ácido cítrico: disolver 50 g de ácido cítrico p.a. $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua.
 - 3.1.3.3. Solución de carbonato de sodio: disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro p.a. en 300 ml aproximadamente de agua caliente. Dejar refrigerar.
- 3.14. Granulados de piedra pómez hervidas en el ácido clorhídrico, lavados en el agua y secados.
- 3.15. Solución al 30 % (p/v) de yoduro de potasio p.a.

- 3.16. Ácido sulfúrico, 6 N aproximadamente, d: 1,18.
- 3.17. Solución de tiosulfato de sodio 0,1 N.
- 3.18. Solución de almidón: añadir una mezcla de 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua a 1 l de agua hirviendo. Hacer hervir durante 3 minutos, después dejar reposar. Preparar justo antes de su empleo.

4. Equipo

- 4.1. Extractor (ver esquema de la página 12), que incluirá:
 - 4.1.1. Un erlenmeyer de 500 ml, de cuello largo,
 - 4.1.2. Un refrigerante de reflujo ajustado al erlenmeyer por medio de un tapón,
 - 4.1.3. Una varilla corrediza en el tubo central del refrigerante, provista de un gancho en su extremidad inferior, una pinza para fijar la varilla,
 - 4.1.4. Una cesta metálica destinada a ser suspendida al gancho de la varilla (4.1.3) y a llevar el crisol filtrante (4.1.5),
 - 4.1.5. Un crisol filtrante para filtración rápida, dimensión máxima de los poros: 90 a 150 μm (por ejemplo G1), 30 ml aproximadamente,
 - 4.1.6. Papeles-filtro, de formato apropiado al crisol filtrante (4.1.5).
- 4.2. Estufa de incubación, regulada a 38 °C.
- 4.3. Matraces aforados de 200 ml, de esmerilado normalizado, con refrigerante de reflujo.
- 4.4. Matraces aforados de 100 ml, de esmerilado normalizado, con refrigerante de reflujo.

5. Método operatorio

5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra de forma que pase en su totalidad a través de un tamiz de mallas de 0,5 mm.

5.2. Extracción

Pesar, con precisión de 1 mg, 2 g de la muestra e introducirlos en un crisol filtrante (4.1.5) cuyo fondo se ha recubierto previamente con un papel de filtro (4.1.6) mojado por el etanol (3.1). Introducir en el erlenmeyer (4.1.1) 55 ml de etanol (3.1) y algunos granulados de piedra pómez (3.14). Colocar el crisol filtrante en la cesta metálica (4.1.4) y colgar a éste del gancho de la varilla (4.1.3). Colocar el refrigerante sobre el erlenmeyer y bajar la varilla de forma que el fondo del crisol sobresalga en la superficie del etanol. Fijar la varilla a esta altura con ayuda de la pinza. Llevar el etanol a ebullición y mantenerla durante 3 horas. Dejar refrigerar a continuación y levantar la varilla (4.1.3) de forma que se coloque el crisol lo más alto que sea posible dentro del erlenmeyer. Destapar prudentemente el erlenmeyer y dejar deslizar 45 ml de agua a lo largo de las paredes del frasco. Colocar de nuevo el refrigerante sobre el erlenmeyer y mantener el crisol filtrante a 10 cm por encima del nivel del líquido. Llevar el líquido a ebullición y mantenerla durante 3 horas. Dejar refrigerar, destapar el erlenmeyer y retirar el crisol de la cesta.

5.3. Sacarificación e hidrólisis

Colocar el crisol sobre un matraz de vacío y secar por aspiración. Llevar el residuo de extracción a un mortero y triturar finamente. Transvasar cuantitativamente el polvo con ayuda de 60 ml de agua aproximadamente en un matraz aforado de 200 ml de esmerilado normalizado y añadir algunas gotas de alcohol amílico (3.2). Ajustar al balón un refrigerante de reflujo. Calentar a ebullición y mantener durante 1 hora. Dejar después refrigerar y separar el refrigerante.

Añadir 25 ml de solución tampón (3.4), 250 mg de pancreatina (3.12), 2,5 ml de solución de cloruro de sodio (3.5) y 10 gotas de tolueno (3.3). Agitar durante 2 minutos, colocar el matraz en una estufa de incubación (4.2) y mantenerlo allí durante 21 h, agitando de vez en cuando. Dejar refrigerar a continuación hasta la temperatura ambiente.

Añadir 5 ml de solución de Carrez I (3.6) y agitar durante un minuto. Añadir a continuación 5 ml de solución de Carrez II (3.7) y agitar de nuevo durante un minuto. Completar al volumen mediante agua, homogeneizar y filtrar. Tomar con la pipeta 50 ml de filtrado y llevarlos al matraz aforado de 100 ml (se puede trabajar también sobre 100 ml de filtrado en un matraz aforado de 200 ml). Añadir algunas gotas de indicador (3.11) y acidificar mediante el ácido clorhídrico 8 N (3.9) hasta el viraje al rojo. Añadir a continuación un exceso de 6,25 ml de ácido clorhídrico 8 N (3.9) (12,50 ml si se trabaja sobre 100 ml de filtrado). Añadir al matraz a ebullición y mantenerla durante 1 h. Dejar refrigerar, neutralizar por la solución de hidróxido de sodio 10 N (3.10) hasta viraje al amarillo del indicador, acidificar a continuación ligeramente añadiendo un poco de ácido clorhídrico N (3.8), completar el volumen mediante agua y homogeneizar. Determinar el contenido en glucosa según el método de Luff-Schoorl como se indica en 5.4.

5.4. *Titulación según Luff-Schoorl*

Tomar con la pipeta 25 ml del reactivo según Luff-Schoorl (3.13) y llevarlos a un erlenmeyer de 300 ml; añadir 25 ml, medidos con exactitud, de la solución obtenida en 5.3 que contiene como máximo 60 mg de glucosa. Añadir dos granulos de piedra pómez (3.14), calentar, agitando manualmente, sobre una llama libre de altura media y llevar el líquido a ebullición en 2 minutos aproximadamente. Colocar inmediatamente el erlenmeyer sobre una tela metálica provista de una pantalla de amianto con un agujero de 6 cm aproximadamente de diámetro, bajo la que se ha encendido previamente una llama. Ésta se regula de forma que sólo se calienta el fondo del erlenmeyer. Adaptar a continuación un refrigerante de reflujo sobre el erlenmeyer. A partir de este momento hacer hervir urante 10 minutos exactamente. Refrigerar inmediatamente en el agua fría y después de 5 minutos aproximadamente, titular como sigue.

Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (3.15) y, inmediatamente después y con prudencia (en razón del riesgo de formación de espuma abundante), 25 ml de ácido sulfúrico 6 N (3.16). Titular a continuación por la solución de tiosulfato de sodio 0,1 N (3.17) hasta la aparición de una coloración amarilla clara, añadir el indicador del almidón (3.18) y acabar la titulación.

Efectuar la misma titulación sobre una mezcla medida con exactitud de 25 ml de reactivo según Luff-Schoorl (3.13) y 25 ml de agua, después de haber añadido 10 ml de solución de yoduro de potasio (3.15) y 25 ml de ácido sulfúrico 6 N (3.16), sin llevar a ebullición.

5.5. *Prueba en blanco*

Efectuar una prueba en blanco aplicando el método operatorio descrito en 5.3 y 5.4, a falta de muestra.

6. Cálculo de los resultados

Establecer con ayuda de la tabla adjunta la cantidad de glucosa en mg correspondiente a la diferencia entre los resultados de dos titulaciones (expresados en ml de tiosulfato de sodio 0,1 N) y que se refieren por un lado, al análisis de la muestra y, por otro lado, al ensayo en blanco.

El contenido en almidón en porcentaje de la muestra está dado por la fórmula:

$$0,72 (a - b)$$

en la que

a = mg de glucosa referidos a la muestra,

b = mg de glucosa referidos a la prueba en blanco (ver observación 7.2).

7. Observaciones

7.1. La presencia simultánea en la muestra de almidón parcial o totalmente dextrinizado y de lactosa puede dar lugar a un resultado por exceso del 0,5 al 3 % de almidón. En dicho caso, el contenido real en almidón se obtiene como sigue:

- a) determinar el contenido en azúcares reductores del extracto etanólico obtenido en 5.2 y expresar el resultado en porcentaje de glucosa;
- b) determinar el contenido de la muestra en azúcares reductores solubles en el agua, y expresar el resultado en porcentaje de glucosa;
- c) deducir el resultado obtenido en c) del obtenido en b) y multiplicar la diferencia por 0,9;
- d) deducir el valor obtenido en c) del contenido en almidón obtenido por aplicación del método y calculado como se indica en 6.

7.2. La cantidad de glucosa que se refiere a la prueba en blanco es normalmente de 0,25 mg. No puede ser superior a 0,50 mg.

8. Disposiciones referidas a la pancreatina

Aspecto físico: polvo blanco-amarillento, amorfo.

Contenido en glucosa: la cantidad de glucosa de la prueba en blanco (ver 5.5) es normalmente de 0,25 mg. Un resultado superior a 0,50 mg indica que la pancreatina ya no es utilizable.

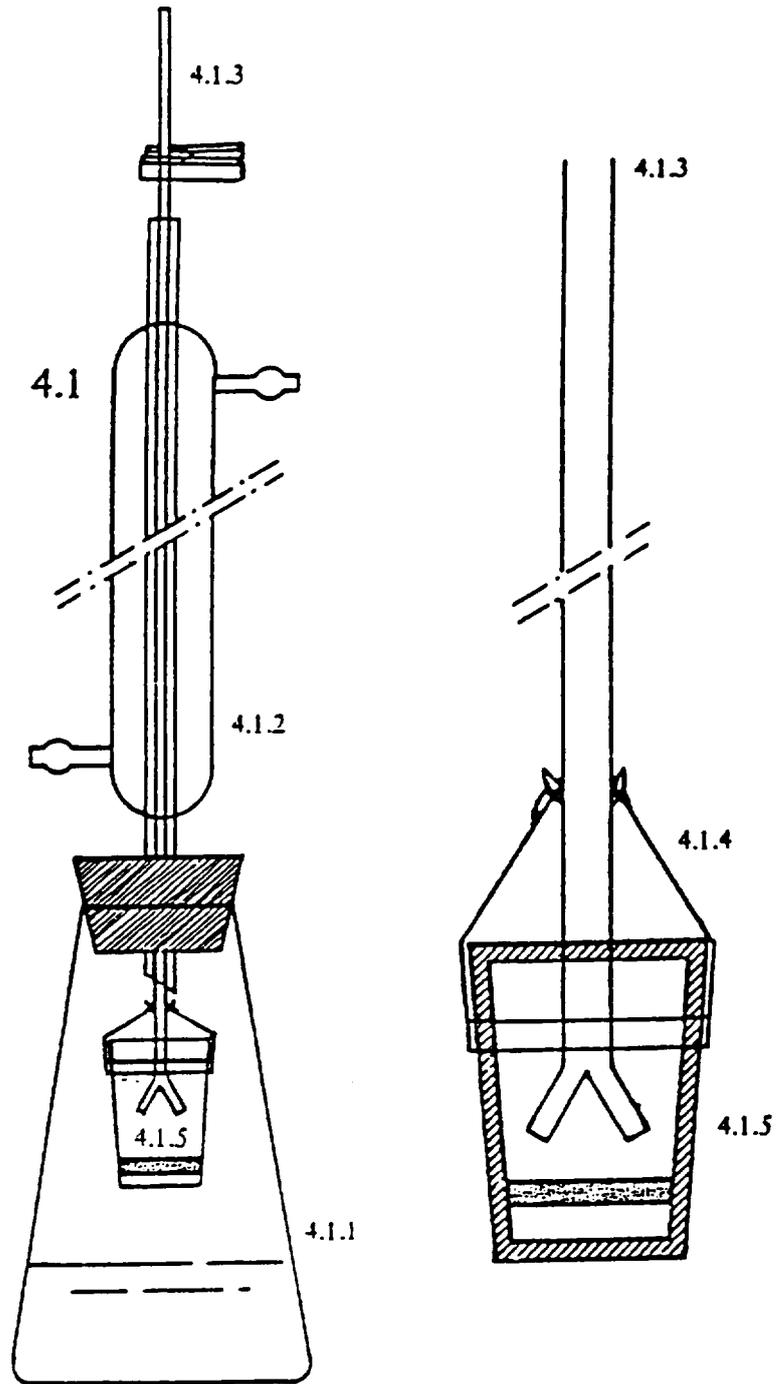
Control del consumo de yodo: poner en suspensión 62,5 mg de pancreatina en 50 ml de agua aproximadamente llevados a 25-30 °C. Añadir 1 ml de solución de yodo 0,1 N. Remover durante 2 minutos. Titular por una solución de tiosulfato de sodio 0,1 N en presencia de indicador de almidón. El consumo de solución de yodo por la pancreatina no debe exceder de 0,5 ml.

Control de la actividad amilolítica: mezclar 100 ml de solución de almidón (3.18), 5 ml de solución tampón (3.4), 0,5 ml de solución del cloruro de sodio (3.5) y 62,5 mg de pancreatina. Llevar la mezcla a 25-30 °C, remover durante 2 minutos. Añadir 1 ml de solución de yodo 0,1 N. La coloración azul debe haber desaparecido en los 15 minutos que siguen a la adición de la solución de yodo.

Tabla de valores para 25 ml de reactivo según Luff-Schoorl

ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N, 2 minutos de calentamiento, 10 minutos de ebullición

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N	Glucosa, fructosa, azúcares invertidos $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Lactosa $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltosa $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N
	ml	mg	diferencia	mg	diferencia	mg	
1	2,4		3,6		3,9		1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,8	59,8	4,1	15
16	41,3	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1	17
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2	18
19	50,0	2,9	71,7	4,0	76,5	4,3	19
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4	20
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6	23



ANEXO II

1. DETERMINACIÓN DEL AMPROLIO

[Clorhidrato de cloruro 1-(4-amino-2-propil-5-pirimidilmetil)-2-picolinio]

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar el amprolio en los alimentos, los concentrados y en las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 40 ppm.

2. Principio

La muestra se somete a la extracción mediante metanol diluido. El extracto se purifica sobre columna de óxido de aluminio y se trata mediante una solución metanólica de 2,7-dihidroxi-naftaleno, ferricianuro de potasio, cianuro de potasio e hidróxido de sodio. Se desarrolla una coloración púrpura. El amprolio determina por espectrofotometría a 530 nm.

3. Reactivos

- 3.1. Metano p.a.
- 3.2. Metanol diluido: mezclar 2 volúmenes de metanol (3.1) y 1 volumen de agua.
- 3.3. Solución al 0,2 % (p/v) de ferricianuro de potasio $K_3Fe-(CN)_6$ p.a. Dicha solución se mantiene estable durante dos semanas.
- 3.4. Solución al 1 % (p/v) de cianuro de potasio p.a. Dicha solución se mantiene estable durante dos semanas.
- 3.5. Solución al 1,125 % (p/v) de hidróxido de sodio p.a.
- 3.6. Solución metanólica de hidróxido de sodio: tomar 15 ml de la solución (3.5) y completar a 200 ml mediante metanol (3.1).
- 3.7. Solución al 0,0025 % (p/v) de 2,7-dihidroxi-naftaleno: disolver 25 mg de 2,7-dihidroxi-naftaleno p.a. en el metanol (3.1) y completar a 1 000 ml mediante metanol (3.1).
- 3.8. Reactivo de coloración: introducir 90 ml de solución de 2,7-dihidroxi-naftaleno (3.7) en un pequeño matraz cónico de 250 ml (4.1), añadir 5 ml de solución de ferricianuro de potasio (3.3) y homogeneizar. Añadir a continuación 5 ml de solución de cianuro de potasio (3.4), tapar el matraz y homogeneizar. Dejar reposar durante 30 a 35 minutos, añadir 100 ml de solución metanólica de hidróxido de sodio (3.6), homogeneizar y filtrar sobre un crisol filtrante (4.3). Utilizar dicho reactivo en los 75 minutos que siguen a la filtración.
- 3.9. Óxido de aluminio para cromatografía sobre columna. Antes de la utilización, agitar durante 30 minutos 100 g de óxido de aluminio con 500 ml de agua, filtrar, lavar tres veces el sedimento sobre el filtro con 50 ml de metanol (3.1) cada vez, secar por aspiración, dejar reposar una noche y secar durante 2 h a 100 °C en una estufa de vacío, Dejar refrigerar en desecador. Controlar la actividad sometiendo el análisis, a partir del punto 5.2, una cantidad determinada de solución de patrón (3.11). El índice de recuperación del amprolio debe ser del 100 % \pm 4 %.
- 3.10. Substancia de calibrado: aprolio puro que responda a las características definidas a continuación.
Punto de fusión (descomposición): 248 °C.
Coeficiente de extinción molecular a 265 y a 235 nm en el agua destilada: $11,0 \times 10^3$.
- 3.11. Solución patrón: pesar, con precisión de 0,1 mg, 50 mg de substancia patrón (3.10). Disolver por el metanol diluido (3.2) en un matraz aforado de 500 ml, completar al volumen por el mismo disolvente y homogeneizar. Tomar 100 ml, completar 50 ml mediante metanol diluido (3.2) en un matraz aforado y homogeneizar, 1 ml de dicha solución contiene 20 μ g de amprolio.

4. Equipo

- 4.1. Pequeños matraces cónicos de 50, 250 y 500 ml, de tapón esmerilado.
- 4.2. Agitador.
- 4.3. Crisol filtrante, porosidad G 3, diámetro: 60 mm.
- 4.4. Tubo para cromatografía, de cristal (diámetro interior: 9 mm longitud: 400 a 500 mm).
- 4.5. Centrifugadora, con tubos de 25 ml de tapón esmerilado.
- 4.6. Espectrofotometría, con cubetas de 10 mm de espesor.

5. Método operatorio

5.1. Extracción y purificación

5.1.1. Alimentos y premezclas

Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de la muestra finamente dividida y homogeneizada. Para las premezclas, pesar de 3 a 6 g, con precisión de 1 g. Introducir la toma de muestra en un erlenmeyer de 250 ml (4.1) y añadir 100 ml exactamente de metanol diluido (3.2). Agitar durante 60 minutos y filtrar. Diluir, si fuera necesario mediante el metanol diluido (3.2) para obtener una solución que contenga de 5 a 15 µg de amprolio por ml. Introducir en un tubo para cromatografía (4.4), previamente provisto en su extremidad inferior de un tapón de algodón, 5 g de óxido de aluminio (3.9) y a continuación 25,0 ml del extracto. Dejar correr el líquido, eliminar los 5 primeros ml y recoger los 12 ml siguientes en una probeta graduada.

5.1.2. Concentrados

Pesar, con precisión de 1 mg, 0,5 g de la muestra finamente dividida y homogeneizada, introducirlos en un pequeño matraz cónico de 500 ml (4.1), añadir 250 ml de metanol diluido (3.2), agitar durante 60 minutos y filtrar. Tomar 5,0 ml del filtrado y completar a 200 ml mediante el metanol diluido (3.2) en un matraz aforado.

5.2. Desarrollo de la coloración y medición de la densidad óptica

Tomar 5,0 ml de la solución obtenida en 5.1.1 o 5.1.2 e introducirlos en un tubo de centrifugación A (4.5). Introducir 5,0 ml de metanol diluido (3.2) en un tubo de centrifugación B (4.5). Añadir en cada tubo 10,0 ml del reactivo de coloración (3.8), tapar los tubos, homogeneizar y dejar reposar durante 18 minutos. Centrifugar a continuación durante 3 minutos para obtener soluciones limpiadas y decantar las soluciones A y B en los pequeños matraces cónicos de 50 ml (4.1).

Medir inmediatamente mediante el espectrofotómetro a 530 nm la densidad óptica de la solución A, utilizando como blanco la solución B. Determinar la cantidad de amprolio refiriéndose a la curva de muestrar (5.3).

5.3. Curva de muestras

Introducir en los tubos de centrifugación (4.5) volúmenes respectivos de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 ml de solución patrón (3.11). Completar el volumen de los cuatro primeros tubos hasta 5,0 ml con metanol diluido (3.2). Añadir en los cinco tubos 10,0 ml de reactivo de coloración (3.8), tapar los tubos, homogeneizar y dejar reposar durante 18 minutos. Centrifugar a continuación durante 3 minutos y decantar las soluciones en matraces cónicos de 50 ml (4.1).

Medir inmediatamente mediante el espectrofotómetro a 530 nm la densidad óptica de las soluciones, utilizando como blanco una mezcla de 5 ml de metanol diluido (3.2) y 10 ml del reactivo de coloración (3.8). Trazar la curva de muestras llevando a la ordenada los valores de la densidad óptica y a la abscisa las cantidades correspondientes de amprolio en mg.

6. Cálculo y premezclas

6.1. Alimentos y premezclas

El contenido en mg de amprolio por kg de muestra está dado por la fórmula

$$\frac{A}{P} \cdot F \cdot 20\ 000$$

en la que:

A = cantidad en mg de amprolio determinada mediante la medición fotométrica,

P = peso en g de la toma de muestras,

F = coeficiente de dilución (efectuado si se diera el caso en 5.1.1).

6.2. Concentrados

El contenido en amprolio en porcentaje de muestra está dado por la fórmula

$$\frac{A}{P} \cdot 200$$

en la que:

A = cantidad en mg de amprolio determinada por la medición fotométrica,

P = peso en g de la toma de muestras.

7. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder de 10 ppm, en valor absoluto, para los contenidos en amprolio inferiores a 100 ppm; del 10 %, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre 100 y 5 000 ppm; de 500 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5 000 y 10 000 ppm; del 5 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 10 000 ppm.

2. DETERMINACIÓN DEL ETOPABATO

(metil-4-acetamida-2-etoxibenzoato)

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar el etopabato en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 2 ppm.

2. Principio

La muestra está sometida a la extracción por metanol diluido. La solución se acidificará y se extraerá por el cloroformo. El extracto clorofórmico se lava primero con una solución alcalina y después con agua. El extracto purificado se concentra, el etopabato se hidroliza mediante el ácido clorhídrico diluido. El derivado aminado así formado se diazotea y se acopla con la N-(1-nafti) etilenodiamina. El complejo coloreado se extrae mediante el butanol y la densidad óptica de la solución se mide a 555 nm.

3. Reactivos

- 3.1. Metanol p.a.
- 3.2. Metanol al 50 % (v/v): mezclar los volúmenes iguales de metanol (3.1) y de agua.
- 3.3. Ácido clorhídrico p.a., d: 1,19.
- 3.4. Ácido clorhídrico diluido a 1/10: tomar 10,0 ml de ácido clorhídrico (3.3), completar a 100 ml con agua.
- 3.5. Ácido clorhídrico 0,3 N aproximadamente: tomar 25,0 ml de ácido clorhídrico (3.3), completar a 1 000 ml con agua.
- 3.6. Cloroformo p.a.
- 3.7. Solución al 4 % (p/v) de carbonato de sodio: disolver 40,0 g de carbonato de sodio anhidro p.a. en el agua y completar a 1 000 ml con agua.
- 3.8. Solución al 0,2 % (p/v) de nitrito de sodio: disolver en el agua 100 mg de nitrito de sodio p.a. y completar a 50 ml con agua en un matraz aforado. Preparar inmediatamente antes del empleo.
- 3.9. Solución al 1,0 % (p/v) de sulfanato de amonio: disolver en el agua 500 mg de sulfanato de amonio p.a. y completar a 50 ml con agua en un matraz aforado. Preparar inmediatamente antes de su empleo.
- 3.10. Solución al 0,2 % (p/v) de N-(1-nafti) etilenodiamina: disolver en el agua 100 mg de N-(1-nafti) etilenodiamina p.a. y completar a 50 ml mediante agua en un matraz aforado. Preparar inmediatamente antes del empleo.
- 3.11. Cloruro de sodio anhidro, p.a.
- 3.12. Butanol-n, p.a.
- 3.13. Substancia patrón: etopabato puro.
- 3.14. Soluciones de calibrado:
 - 3.14.1. Solución a 0,040 mg de etopabato por ml: pesar, con precisión de 0,1 mg, 40 g de substancia patrón (3.13). Disolver mediante metanol diluido (3.2) en un matraz aforado de 100 ml, completar al volumen mediante el mismo disolvente y homogeneizar. Tomar 10,0 ml, completar a 100 ml mediante el metanol (3.2) en un matraz aforado y homogeneizar. Dicha solución se mantiene estable durante un mes.
 - 3.14.2. Solución a 0,016 mg de etopabato por 20 ml: tomar 5,0 ml de la solución (3.14.1), completar a 250 ml por el metanol diluido (3.2) en un matraz aforado y homogeneizar. Preparar antes de su empleo.

4. Equipo

- 4.1. Matraces cónicos de 250 ml, de tapón esmerilado.
- 4.2. Ampollas de decantar de 100 ml, de tapón esmerilado.
- 4.3. Agitador.

- 4.4. Aparato rotativo de evaporación en vacío, con matraces de 250 ml.
- 4.5. Baño de agua.
- 4.6. Centrifugadora, con tubos de 15 y 50 ml, de esmerilado normalizado.
- 4.7. Refrigerante de aire, de esmerilado normalizado.
- 4.8. Espectrofotómetro, con cubetas de 10 mm de espesor.

5. Método operatorio

5.1. Extracción

Pesar, con precisión de 1 mg, una cantidad de muestra finamente dividida y homogeneizada que contenga 80 µg aproximadamente de etopabato. Introducir la toma de muestras en un matraz cónico de 250 ml (4.1) y añadir 100,0 ml de metanol diluido (3.2). Mezclar, tapar el matraz y agitar durante 1 hora con la ayuda de un agitador (4.3). Dejar decantar, filtrar y eliminar los primeros ml del filtrado.

5.2. Purificación

NB: Todas las operaciones descritas en este punto deben efectuarse rápidamente.

Introducir 20,0 ml del extracto límpido en una ampolla de decantación de 100 ml (4.2), añadir 5,0 ml de ácido clorhídrico diluido a 1/10 (3.4) y 20,0 ml de cloroformo (3.6). Agitar primero con prudencia y después vigorosamente durante 3 minutos. Dejar reposar hasta la separación de las fases y recoger la fase clorofórmica en una segunda ampolla de decantación de 100 ml (4.2).

Extraer la fase ácida dos veces sucesivas mediante 20,0 ml de cloroformo (3.6) cada vez. Reunir los extractos clorofórmicos en la segunda ampolla de decantar y eliminar la fase ácida. Añadir a la solución clorofórmica 10 ml de solución de carbonato de sodio (3.7), agitar durante 3 minutos y dejar reposar hasta la separación de las fases. Recoger la fase clorofórmica en una tercera ampolla de decantación de 100 ml (4.2) y eliminar la fase acuosa. Añadir a la solución clorofórmica 10 ml de solución de carbonato de sodio (3.7), agitar durante 3 minutos y dejar reposar hasta la separación de las fases.

Recoger la fase clorofórmica en una cuarta ampolla de decantación de 100 ml (4.2), lavar dos veces sucesivamente con 25 ml de agua cada vez, separar las fases acuosas y recoger cuantitativamente el extracto clorofórmico en un matraz de 250 ml (4.4). Reunir las fases acuosas, lavar las ampollas de decantación vaciadas mediante algunos ml de cloroformo (3.6), lavar a continuación la fase acuosa mediante dicho cloroformo. Separar la fase clorofórmica y añadirla al extracto recogido en un matraz.

5.3. Hidrólisis

Evaporar el extracto clorofórmico hasta 2 ml aproximadamente sobre un baño de agua a 50 °C con la ayuda del aparato rotativo de evaporación en vacío (4.4). Disolver el residuo mediante 2 a 3 ml de metanol (3.1) transvasar cuantitativamente la solución a un tubo de centrifugación de 50 ml (4.6) con ayuda de dos porciones de 10 ml y una porción de 5 ml de ácido clorhídrico 0,3 N aproximadamente (3.5). Añadir algunos fragmentos de piedra porosa, homogeneizar y armar al tubo de un refrigerante de aire (4.7). Sumergir el tubo en un baño de agua hirviendo y mantenerlo durante 45 minutos. Dejar refrigerar a continuación bajo una corriente de agua fría.

5.4. Desarrollo de la coloración y medición de la densidad óptica

Añadir 1,0 ml de solución de nitrato de sodio (3.8), agitar y dejar reposar 2 minutos. Añadir 1,0 ml de solución de sulfanato de amonio (3.9), agitar y dejar reposar 2 minutos. Añadir 1,0 ml de solución de N-(1-naftil) etilenodiamina (3.10), agitar y dejar reposar 10 minutos. Añadir 5,0 g de cloruro de sodio (3.11) y 10,0 ml de butanol-n (3.12), agitar vigorosamente hasta la disolución completa del cloruro de sodio.

Prepara la solución butanólica sobrecadente con ayuda de una pipeta, introducirla en un tubo de centrifugación de 15 ml (4.6) y centrifugar. Medir a continuación la densidad óptica E_A con el espectrómetro a 555 nm por comparación con el butanol-n (3.12).

5.5. Prueba en blanco

Efectuar una prueba en blanco aplicando el método operatorio, a partir del punto 5.2, a 20,0 ml de metanol diluido (3.2). Medir la densidad óptica E_B a 555 nm por comparación con el butanol-n (3.12).

5.6. Prueba patrón

Efectuar una prueba aplicando el mismo método operatorio, a partir del punto 5.2, a 20,0 ml de solución patrón (3.14.2). Medir la densidad óptica E_C a 555 nm por comparación con el butanol-n (3.12).

6. Cálculo de los resultados

El contenido en mg de etopabato por kg de la muestra está dado por la fórmula

$$\frac{(E_A - E_B)}{(E_C - E_B)} \cdot \frac{80}{P}$$

en la que

E_A = densidad óptica de la solución procedente de la muestra,

E_B = densidad óptica de la solución resultante de la prueba en blanco,

E_C = densidad óptica de la solución resultante de la prueba patrón,

P = peso en gramos de la toma de muestras.

5. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder:

del 20 %, en valor relativo, para los contenidos en etopabato inferior a 7,5 ppm,

de 1,5 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 7,5 y 10 ppm,

del 15 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 10 ppm.

3. DETERMINACIÓN DE LA DINITOLMIDA (DOT)

(3,5-dinitro-o-toluamida)

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar la dinitolmida (DOT) en los alimentos, los concentrados y las premezclas. Los derivados del nitroturano interfieren. El límite inferior de la determinación es de 40 ppm.

2. Principio

La muestra está sometida a la extracción por acetonitrilo. El extracto se purifica sobre óxido de aluminio y se filtra. Una parte alícuota del filtrado se evapora en seco. El residuo se recoge mediante la dimetilformamida y se trata mediante la etilendiamina. Se desarrolla una coloración púrpura. La dinitolmida se determina por espectrofotometría a 560 nm.

3. Reactivos

- 3.1. Acetonitrilo al 85 % (v/v): mezclar 850 ml de acetonitrilo puro y 150 ml de agua; destilar la mezcla antes de su empleo; recoger la fracción destilando entre 75 y 77 °C.
- 3.2. Óxido de aluminio para cromatografía sobre columna. Calcinar durante 2 h al menos a 750 °C, refrigerar en desecador y conservar en frasco de cristal marrón, de tapón esmerilado. Antes de su utilización, humedecer tal como se indica: introducir en un frasco de cristal marrón 10 g de óxido de aluminio y 0,7 ml de agua, tapar herméticamente, volver a calentar durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo agitando durante todo el tiempo con energía. Dejar refrigerar agitándolo. Controlar al actividad sometiendo al análisis, a partir del punto 5.1, una cantidad determinada de solución de muestra (3.6). El índice determinado de recuperación de la dinitolmida debe ser del 100 % \pm 2 %.
- 3.3. N,N-dimetilformamida al 95 % (v/v): mezclar 95,0 ml de N,N-dimetilformamida p.a. y 5,0 ml de agua.
- 3.4. Etilendiamina p.a., contenido máximo en agua: 2,0 %.
- 3.5. Substancia patrón: 3,5 dinitro-o-toluamida pura que responda a las siguientes características:
Punto de fusión: 177 °C.
Coeficiente de extinción molecular a 248 nm en el acetonitrilo: $13,1 \times 10^3$.
Coeficiente de extinción molecular a 266 nm en la N,N-dimetilformamida: $10,1 \times 10^3$.
- 3.6. Solución patrón: pesar, precisión de 0,1 mg, 40 mg de substancia patrón (3.5). Disolver por acetonitrilo (3.1) en un matraz aforado de 200 ml, completar el volumen por el mismo disolvente y homogeneizar. Tomar 20,0 ml, completar a 100 ml por el acetonitrilo (3.1) en un matraz aforado y homogeneizar. 1 ml de dicha solución contiene 40 μ g de dinitolmida.

4. Equipo

- 4.1. Matraz cónico de 250 ml, de esmerilado normalizado.
- 4.2. Refrigerante de reflujo, de esmerilado normalizado.
- 4.3. Crisol filtrante, porosidad G 3, diámetro 60 mm.
- 4.4. Aparato de filtración sobre vacío (por ejemplo aparato de Witt).
- 4.5. Baño de agua, regulado a 50 °C.
- 4.6. Espectrofotómetro, con cubetas de 10 mm de espesor.

5. Método operativo

5.1. Extracción y purificación

Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de la muestra finamente dividida y homogeneizada. Para los concentrados y las premezclas, pesar con precisión de 1 mg, 1 g. Introducir la toma de muestras en un matraz cónico de 250 ml (4.1) y añadir 65 ml de acetonitrilo (3.1). Mezclar, dotar el matraz cónico de un refrigerante de reflujo (4.2) y calentar sobre el baño de agua (4.5) durante 30 minutos agitándolo continuamente. Dejar refrigerar bajo una corriente de agua fría. Añadir 20 g de óxido de aluminio (3.2), agitar durante 3 minutos y dejar decantar.

Situar un matraz aforado de 100 ml en el aparato de filtrar (4.4), ajustar el crisol filtrante (4.3) y filtrar el líquido aspirando. Transvasar a continuación el sedimento al crisol con la ayuda de algunos ml de acetonitrilo (3.1) y aspirar. Cortar el vacío, volver a poner el sedimento en suspensión en algunos ml de acetonitrilo (3.1) y aspirar de nuevo. Repetir estas últimas operaciones hasta que el volumen del filtrado alcance 95 ml aproximadamente. Completar el volumen a 100 ml mediante el acetonitrilo (3.1) y homogeneizar.

Si fuera necesario, tomar una parte alícuota y diluir mediante acetonitrilo (3.1) para obtener una solución que contenga de 5 a 15 µg de dinitolmida por ml.

5.2. *Desarrollo de la coloración y medición de la densidad óptica*

Introducir respectivamente en tres vasos de 50 ml A, B y C, 4,0 ml de la solución obtenida en 5.1. Añadir, además, en el vaso C solamente, 1,0 ml de solución patrón (3.6). Llevar los tres vasos sobre el baño de agua (4.5) situado bajo una campana de gases bien ventilada y evaporar en seco, bajo corriente de aire. Dejar refrigerar hasta la temperatura ambiente.

Añadir 10,0 ml de N,N-dimetilformamida (3.3) en el vaso A y 2,0 ml respectivamente en los vasos B y C. Dejar en contacto durante algunos minutos agitando ligeramente hasta la completa disolución del residuo. Añadir a continuación 8,0 ml de etilendiamina (3.4) en los vasos B y C y homogeneizar. Medir, cinco minutos exactamente después de la adición de etilendiamina, la densidad óptica de las tres soluciones mediante el espectrofotómetro (4.6) a 560 nm, empleando como blanco la N,N-dimetilformamida (3.3).

6. **Cálculo de los resultados**

El contenido en mg de dinitolmida por kg de muestra está dado por la fórmula

$$\frac{(E_B - E_A)}{(E_C - E_B)} \cdot \frac{F}{P} \cdot 1000$$

en la que:

E_A = densidad óptica de la solución A (testigo),

E_B = densidad óptica de la solución B (muestra),

E_C = densidad óptica de la solución C (patrón interno),

P = peso en g de la toma de muestras,

F = coeficiente de dilución (efectuado si se diera el caso 5.1).

7. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de las determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder:

de 10 ppm, en valor absoluto, para los contenidos en dinitolmida inferiores a 100 ppm,
del 10 %, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre 100 y 5 000 ppm,
de 500 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5 000 y 10 000 ppm,
del 5 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 10 000 ppm.

4. DETERMINACIÓN DE LA NICARBACINA

(mezcla equimolecular de 4,4-dinitrocarbanilida y 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina)

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar la nicarbacina en los alimentos, los concentrados y las premezclas que no contienen más del 5 % de harinas de hierbas. Los derivados del nitrofurano, el acetilenheptino y el carbodox interferente. El límite inferior de la determinación es de 20 ppm.

2. Principio

La mezcla está sometida a la extracción por la N,N-dimetilformamida. El extracto se purifica por cromatografía sobre columna de óxido de aluminio; la nicarbacina es eluida por el etanol. El eluido se trata por una solución etanólica de hidróxido de sodio; se desarrolla una coloración amarilla. La nicarbacina se determina mediante la espectrofotometría a 430 nm.

3. Reactivos

3.1. N,N-dimetilformamida p.a.

3.2. Óxido de aluminio para cromatografía sobre columna.

Calcinar durante 2 h al menos a 750 °C, refrigerar en el desecador y conservar en frasco de cristal marrón de tapón esmerilado. Antes de su empleo, controlar la actividad sometiendo al análisis, a partir del punto 5.2, una cantidad determinada de solución patrón (3.8.3).

El índice de recuperación de la nicarbacina debe ser del 100 % \pm 2 %.

3.3. Etanol al 95 % (v/v).

3.4. Etanol al 80 % (v/v).

3.5. Solución al 50 % (p/v) de hidróxido de sodio p.a.

3.6. Solución etanólica al 1 % (p/v) de hidróxido de sodio:

Llevar 1 ml de solución de hidróxido de sodio (3.5) a un matraz aforado de 50 ml, completar al volumen por el etanol al 80 % (3.4). Preparar en el momento de su empleo.

3.7. Substancia de patrón: nicarbacina pura, coeficiente de extinción molecular a 362 nm en la N,N-dimetilformamida: $37,8 \times 10^3$.

3.8. Soluciones patrón:

3.8.1. Solución a 1,25 mg de nicarbacina por ml: pesar, con precisión de 0,1 mg, 125 mg de substancia patrón (3.7). Disolver mediante 75 ml de N,N-dimetilformamida (3.1) en un matraz aforado de 100 ml, calentando ligeramente. Dejar refrigerar, completar al volumen mediante el mismo disolvente y homogeneizar. Conservar a resguardo de la luz.

3.8.2. Solución a 0,125 mg de nicarbacina por ml: tomar 10,0 ml de la solución (3.8.1), completar a 100 ml por la N,N-dimetilformamida (3.1) en un matraz aforado y homogeneizar.

3.8.3. Solución a 0,025 mg de nicarbacina por ml: tomar 20,0 ml de la solución (3.8.2), completar a 100 ml por la N,N-dimetilformamida (3.1) en un matraz aforado y homogeneizar.

4. Equipo

4.1. Matraz cónico de 250 ml, de esmerilado normalizado.

4.2. Refrigerante de reflujo, de esmerilado normalizado.

4.3. Baño de agua hirviendo.

4.4. Centrifugadora, con tubos de 120 ml.

4.5. Tubo para cromatografía de cristal (diámetro interior; 25 mm, longitud: 30 mm).

4.6. Espectrofotómetro, con cubetas de 10 mm de espesor.

4.7. Bureta graduada a 1/10 ml.

5. Método operativo

5.1. Extracción

Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de la muestra finamente dividida y homogeneizada. Para los concentrados y las premezclas, pesar con precisión de 1 mg, 1 g. Introducir la toma de muestras en un matraz cónico de 250 ml (4.1) y añadir 100 ml exactamente de N,N-dimetil-formamida

(3.1). Mezclar, dotar al matraz de un refrigerante de reflujo (4.2) y calentar sobre baño de agua (4.3) durante 15 minutos agitando de vez en cuando. Dejar refrigerar bajo una corriente de agua fría.

Transvasar a continuación el líquido sobrenadante a un tubo de centrifugación (4.4) y centrifugar durante aproximadamente 3 minutos.

Si fuera necesario, tomar 25,0 ml del líquido sobrenadante y diluir mediante la N,N-dimetilformamida (3.1) para obtener una solución que contenga de 2,0 a 10,0 µg de nicarbacina por ml.

5.2. *Cromatografía*

Introducir en un tubo para cromatografía (4.5) 30 g de aluminio (3.2) en suspensión en la N,N-dimetilformamida (3.1). Dejar descender el líquido hasta 1 cm por encima de la columna de óxido de aluminio e introducir a continuación en la columna 25,0 ml del extracto obtenido en 5.1. Dejar fluir el líquido evitando dejar la columna seca y lavar tres veces la columna mediante 10 ml de N,N-dimetilformamida (3.1) cada vez. Eluir a continuación mediante 70 ml etanol al 95 % (3.3). Eliminar los 10 primeros ml del eluido y recoger el resto dividiendo de la siguiente forma:

una fracción a) de 5 ml,

una fracción b) de 50 ml en un matraz aforado,

una fracción c) de 5 ml.

Controlar que las fracciones a) y c) noden una coloración amarilla por adición de solución etanólica de hidróxido de sodio (3.6). Continuar las operaciones sobre la fracción b) tal como se indica en 5.3.

5.3. *Desarrollo de la coloración y medición de la densidad óptica*

Introducir respectivamente 20,0 ml de la fracción b) del eluido en dos matraces aforados A y B de 25 ml. Añadir en el matraz A 5,0 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio (3.6) y 5,0 ml de etanol al 95 % (3.3) en el matraz B. Homogeneizar.

Medir, en los cinco minutos siguientes, la densidad óptica de las dos soluciones a 430 nm, utilizando como blanco una mezcla de 20,0 ml de etanol al 95 % (3.3) y 5,0 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio (3.6).

Restar el valor de la densidad óptica de la solución B del de la solución A. Determinar, a partir de dicho valor, la cantidad de nicarbacina que se refiera a la curva de calibrado (5.4).

5.4. *Curva de calibrado*

Someter 25,0 ml de la solución de patrón (3.8.3) a la cromatografía tal como se indica en 5.2. Transvasar mediante la bureta graduada (4.7) la fracción b) del eluido y hacer fluir a matraces aforados de 25 ml unos volúmenes respectivos de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 ml (correspondientes respectivamente a 0,025, 0,050, 0,075, 0,100 y 0,125 mg de nicarbacina). Añadir a cada matraz 5,0 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio (3.6), completar el volumen mediante el etanol al 95 % (3.3) y homogeneizar.

Medir en los 5 minutos que siguen la densidad óptica de las soluciones a 430 nm, empleando como blanco una mezcla de 20 ml de etanol al 95 % (3.3) y 5,0 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio (3.6).

Trazar la curva de calibrado llevando a las ordenadas los valores de la densidad óptica y a las abscisas las cantidades correspondientes de nicarbacina en mg.

6. *Cálculo de los resultados*

El contenido en mg de nicarbacina por kg de muestra está dado por la fórmula

$$\frac{A}{P} \cdot F \cdot 10\,000$$

en la que:

A = cantidad en mg de nicarbacina determinada por la medición fotométrica,

P = peso en g de la toma de muestras,

F = coeficiente de dilución (efectuado si se diera el caso en 5.1).

7. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe rebasar:

10 ppm, en valor absoluto, para los contenidos en nicarbacina inferiores a 100 ppm,

el 10 %, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre 100 y 5 000 ppm,

500 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5 000 y 10 000 ppm,

el 5 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 10 000 ppm.

5. DETERMINACIÓN DE LA MENADIONA (VITAMINA K₃)

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar la menadiona (vitamina K₃) en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 1 ppm.

2. Principio

La muestra se somete a la extracción mediante el metano diluido. La mezcla se defeca con ayuda de una solución de tanino y se centrifuga. El extracto se trata mediante una solución de carbonato de sodio, la menadiona se libera y extrae mediante el 1,2-dicloroetano. El extracto dicloroetano se trata según su contenido en menadiona, ya sea directamente, ya sea previa evaporación, por la 2,4-dinitrofenilhidracina en solución en el etanol acidificado por el ácido clorhídrico. El hidrazono obtenido, añadiéndole un exceso de amoníaco, da lugar a un complejo de color azul verdoso cuya densidad óptica se mide a 635 nm.

3. Reactivos

- 3.1. Etanol al 96 % (v/v).
- 3.2. Etanol (3.1) diluido al 40 % mediante agua.
- 3.3. Solución al 10 % (v/v) de tanino, a partir de tanino puro, en polvo.
- 3.4. 1,2-dicloroetano p.a.
- 3.5. Solución al 10 % (p/v) de carbonato de sodio anhidro p.a.
- 3.6. Ácido clorhídrico al 37 % (p/v), d: 1,19.
- 3.7. Etanol absoluto p.a.
- 3.8. Reactivo por la 2,5-dinitrofenilhidracina: disolver 40 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina p.a. en 40 ml aproximadamente de etanol absoluto (3.7) hirviendo, dejar refrigerar y transvasar a un matraz aforado de 50 ml. Añadir 1 ml de ácido clorhídrico (3.6) y completar al volumen mediante el etanol absoluto (3.7). Preparar inmediatamente antes de su empleo.
- 3.9. Amoníaco al 25 % (p/p), d = 0,91.
- 3.10. Solución amoniacal de etanol: mezclar un volumen de etanol (3.7) y un volumen de amoníaco (3.9).
- 3.11. Soluciones de patrón de menadiona (vitamina K₃) en el 1,2-dicloroetano (3.4) y completar a 200 ml. Diluir unas partes alcuotas de dicha solución mediante el 1,2-dicloroetano (3.4) para obtener una serie de soluciones cuyas concentraciones en menadiona estén comprendidas entre 2 y 10 µg por ml. Debe estar recién preparado antes de su empleo.

4. Equipo

- 4.1. Agitador mecánico.
- 4.2. Centrifugadora (de 3 000 a 5 000 t/minuto).
- 4.3. Ampollas de decantación de 100 y 250 ml, de tapón esmerilado.
- 4.4. Aparato rotativo de evaporación en vacío, con matraces de 250 ml.
- 4.5. Baño de agua.
- 4.6. Espectrofotómetro, con cubetas de 10 mm de espesor.

5. Método operatorio

N. B. Todas las manipulaciones deben hacerse al resguardo de la luz directa, en su caso en un equipo de vidrio marrón.

5.1. Toma de muestras

Realizar una toma de muestras de la muestra finamente dividida, proporcional al contenido supuesto en menadiona, o sea:

de 0,1 a 5,0 g para los concentrados y premezclas,
de 20 a 30 g para los alimentos.

Introducir inmediatamente la toma de muestras en el frasco de 250 ml de tapón esmerilado.

5.2. *Extracción*

Añadir 96 ml exactamente de etanol diluido (3.2) y agitar mecánicamente durante 15 minutos a la temperatura ambiente.

Añadir a continuación 4,0 ml de solución de tanino (3.3), mezclar, transvasar el extracto a un tubo de centrifugar, centrifugar (3 000 a 5 000 t/minuto) y decantar.

Introducir 20 a 40 ml medidos con exactitud del extracto en una ampolla de decantación de 250 ml, añadir mediante la pipeta 50 ml de 1,2-dicloretano (3.4), mezclar y añadir mediante la pipeta 20 ml de solución de carbonato de sodio (3.5). Agitar enérgicamente durante 30 segundos y recoger a continuación la fase diclorotánica en una ampolla de decantación de 100 ml. Añadir 20 ml de agua, agitar de nuevo durante 15 segundos, recoger la fase diclorotánica y eliminar los restos de agua con la ayuda de bandas de papel de filtro.

Para los concentrados y premezclas, tomar una parte alícuota del extracto y diluir mediante 1,2-dicloretano (3.4) para obtener una concentración en menadiona de 2 a 10 µg por ml. Para los alimentos, evaporar en seco una parte alícuota del extracto, bajo presión reducida y en atmósfera de nitrógeno, en el baño de agua a 40 °C. Recoger rápidamente el residuo mediante 1,2-dicloretano (3.4) para obtener una solución que contenga de 2 a 10 µg de menadiona por ml.

5.3. *Formación de la hidrazona*

Llevar 2,0 ml del extracto diclorotánico obtenido en 5.2 al matraz aforado de 10 ml y añadir 3,0 ml del reactivo por el 2,4-dinitrofenilhidroziona (3.8), tapar el matraz con la ayuda de un tapón de corcho o de teflón de forma que se evite cualquier evaporación y calentar durante 2 horas a 70 °C sobre baño de agua. Dejar refrigerar, añadir 3,0 ml de solución amoniacal de etanol (3.10), mezclar, completar al volumen mediante etanol absoluto (3.7) y mezclar de nuevo.

5.4. *Medición de la densidad óptica*

Medir la densidad óptica del complejo coloreado en azulverdoso mediante el espectrofotómetro a 635 nm por comparación con un blanco de reactivos obtenidos tratando 2,0 ml de 1,2-dicloretano (3.4) como se indica en 5.3. Determinar la cantidad de menadiona refiriéndose a una curva de muestras establecida para cada serie de análisis.

5.5. *Curva de muestras*

Tratar 2,0 ml de las soluciones de calibrado de menadiona (3.11) tal como se indica 5.3. Medir la densidad óptica como se indica en 5.4. Trazar la curva de muestras llevando a las ordenadas los valores de la densidad óptica y a las abscisas las cantidades correspondientes de menadiona en µg.

6. *Cálculo de resultados*

Calcular el contenido en menadiona de la muestra teniendo en cuenta el peso de la toma de muestras y de las diluciones efectuadas a lo largo del análisis. Expresar el resultado en mg de menadiona por kg.

7. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder:

- del 20 %, en valor relativo, para los contenidos en menadiona inferiores a 10 ppm,
- de 2 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 10 y 14 ppm,
- del 15 %, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre 14 y 100 ppm,
- de 15 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 100 y 150 ppm,
- del 10 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 150 ppm.