

378L0633

29. 7. 78

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

N° L 206/43

OCTAVA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 15 de junio de 1978

por la que se fijan los métodos de análisis comunitario para el control oficial de los alimentos para animales

(78/633/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1970, referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽¹⁾, modificado en último lugar por el Acta de adhesión, y en particular su artículo 2,

Considerando que la Directiva anteriormente contemplada prevé que los controles oficiales de los alimentos para animales dirigidos a comprobar que las condiciones prescritas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas referentes a la calidad y a la composición de los animales se respetan y se realizan según modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios;

Considerando que las Directivas de la Comisión 71/250/CEE, de 15 de junio de 1971 ⁽²⁾, 71/393/CEE de 18 de noviembre de 1971 ⁽³⁾, 72/199/CEE de 27 de abril de 1972 ⁽⁴⁾, 73/46/CEE de 5 de diciembre de 1972 ⁽⁵⁾, 74/203/CEE de 25 de marzo de 1974 ⁽⁶⁾, 75/84/CEE de 20 de diciembre de 1974 ⁽⁷⁾ y 76/372/CEE de 1 de marzo de 1976 ⁽⁸⁾ han fijado ya un determinado número de métodos de análisis comunitarios; que, teniendo en cuenta el grado de desarrollo de los trabajos realizados desde entonces, procede establecer una octava serie de métodos;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva concuerdan con el dictamen del Comité permanente de alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

1. Los Estados miembros prescribirán que los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo referente a su contenido en bacitracina-cinc, flavofosfolipol, hierro, cobre, manganeso y cinc, se realizarán según los métodos descritos en el anexo de la presente Directiva.

2. Las disposiciones generales que figuren en el punto 1 «Introducción» del anexo de la primera Directiva 71/250/CEE, excepto la parte referente a la preparación de la muestra por analizar, se podrán aplicar a los métodos descritos en el anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros aplicarán, el 1 de enero de 1979, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva e informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 15 de junio de 1978.

Por la Comisión

Finn GUNDELACH

Vicepresidente

⁽¹⁾ DO n° L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

⁽²⁾ DO n° L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.

⁽³⁾ DO n° L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

⁽⁴⁾ DO n° L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

⁽⁵⁾ DO n° L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.

⁽⁶⁾ DO n° L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.

⁽⁷⁾ DO n° L 32 de 5. 2. 1975, p. 26.

⁽⁸⁾ DO n° L 102 de 15. 4. 1976, p. 8.

ANEXO

1. DOSIFICACIÓN DE LA BACITRACINA-CINC POR DIFUSIÓN EN GELOSA

1. OBJETO Y DOMINIO DE APLICACIÓN

El método permitirá dosificar la bacitracina-cinc en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de dosificación será de 5 mg/kg (5 ppm) (*). El método no será valedero en presencia de sustancias perturbadoras, en particular de fuertes cantidades de cobre o de ácido ascórbico.

2. PRINCIPIO

Se someterá la muestra a una extracción a pH 2 por una mezcla de metanol/agua/ácido clorhídrico. Se llevará el extracto a pH 6,5, concentrado si fuere necesario, y diluido. Se determinará su actividad antibiótica por medida de la difusión de la bacitracina-cinc en un medio de gelosa, sembrado con «*Micrococcus luteus*» (sinónimo: «*M. flavus*»). Se revelará la difusión por la formación de zonas de inhibición del microorganismo. Se considerará el diámetro de dichas zonas como directamente proporcional al logaritmo de la concentración en antibiótico para la gama de las concentraciones utilizadas.

3. MICROORGANISMO: MICROCOCCUS LUTEUS ATCC 10240

3.1. Mantenimiento del extracto base

Sembrar el medio de cultivo (4.1), en tubos inclinados, con «*Micrococcus luteus*». Incubar 24 h a 30-37 °C, conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente y renovar la siembra cada dos semanas.

3.2. Preparación de la suspensión bacteriana (a)

Recoger los gérmenes de un tubo de gelosa (3.1), de preparación reciente, mediante 2 a 3 ml de solución de cloruro de sodio (4.3). Sembrar en superficie con esta suspensión 250 ml del medio de cultivo (4.1) en un frasco de Roux e incubar de 18 a 20 h a 30-37 °C. Recoger los gérmenes en 25 ml de solución de cloruro de sodio (4.3) y homogeneizar. Diluir la suspensión a 1/10 mediante la solución de cloruro de sodio (4.3). La transmisión luminosa de la suspensión, medida a 650 nm bajo un espesor de 1 cm en comparación con la solución de cloruro de sodio (4.3), deberá ser de 75 % aproximadamente.

4. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

4.1. Medio de mantenimiento del extracto base (b)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	15,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (después de esterilizar)	

4.2. Medio de base de la dosificación (b)

Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	20,0 g
Tween 80	1 ml
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (después de esterilizado)	

4.3. Solución a 0,8 % (p/v) de cloruro de sodio: disolver en agua 8 g de cloruro sodio p.a.; diluir a 1 000 ml y esterilizar.

4.4. Mezcla de metanol puro/agua/ácido clorhídrico p.a. (d: 1,18-1,19): 80/17,5/2,5 (v/v/v).

(*) 1 mg de bacitracina-cinc (calidad para alimentos de los animales) equivale a 42 unidades internacionales (UI).

(a) Se podrán utilizar otros métodos en la medida en que estuviera demostrado que producen una suspensión bacteriana análoga.

(b) Se podrá utilizar cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

- 4.5. **Tapón fosfato, pH 6,5:**
- | | |
|--------------------------------------|----------|
| Fosfato bipotásico K_2HPO_4 p.a. | 22,15 g |
| Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a. | 27,85 g |
| Agua hasta | 1 000 ml |
- 4.6. Ácido clorhídrico p.a., d: 1,18-1,19
- 4.7. Ácido clorhídrico p.a. 0,1 N
- 4.8. Solución 1 N de hidróxido de sodio p.a.
- 4.9. Solución a 0,04 % (p/v) de púrpura de bromocresol:
- Disolver 0,1 g de púrpura de bromocresol en 18,5 ml de solución 0,01 N de hidróxido de sodio. Completar hasta 250 ml con agua y homogeneizar.
- 4.10. Sustancia patrón: bacitracina-cinc de actividad conocida (en UI).

5. SOLUCIONES PATRÓN

Pesar una cantidad de bacitracina-cinc patrón (4.10) correspondiente a 1 050 UI (según la dosificación indicada). Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 0,1 N (4.7) y dejar reposar 15 minutos. Añadir 30 ml de agua, ajustar el pH a 4,5 mediante el tapón fosfato pH 6,5 (4.5) (alrededor de 4 ml), completar con agua hasta 50 ml y homogeneizar (1 ml = 21 UI).

Preparar a partir de dicha solución y por diluciones sucesivas mediante el tapón fosfato pH 6,5 (4.5) las siguientes soluciones:

S_8	0,42	UI/ml
S_4	0,21	UI/ml
S_2	0,105	UI/ml
S_1	0,0525	UI/ml

6. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

6.1. Extracción

6.1.1. Concentrados, premezclas y alimentos minerales

Pesar una cantidad de muestra de 2 a 5 g, añadir 30 ml de la mezcla (4.4) y agitar brevemente. Comprobar que el pH es de 2 aproximadamente. Agitar durante 10 minutos, añadir 30 ml de tapón fosfato pH 6,5 (4.5) y agitar durante 15 minutos. Diluir mediante el tapón fosfato (4.5) para obtener una concentración presunta en bacitracina-cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.2. Concentrados proteínicos

Pesar una cantidad de muestra de 10 g, añadir 50 ml de la mezcla (4.4) y agitar brevemente. Comprobar que el pH es de 2 aproximadamente. Agitar durante 10 minutos, añadir 50 ml de tapón fosfato pH 6,5 (4.5) y agitar durante 15 minutos. Diluir mediante el tapón fosfato (4.5) para obtener una concentración presunta en bacitracina-cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.3. Otros alimentos

Pesar una cantidad de muestra de 10 g (20 g para una presunta concentración en bacitracina-cinc de 5 mg/kg), añadir 25 ml de la mezcla (4.4) y homogeneizar durante 10 minutos aproximadamente. Añadir 25 ml de tapón fosfato pH 6,5 (4.5), agitar durante 15 minutos y centrifugar. Sacar 20 ml de la solución que sobrenade y ajustar el pH a 6,5 mediante la solución 1 N de hidróxido de sodio (4.8) utilizando como indicador la solución de púrpura de bromocresol (4.9). Evaporar hasta 4 ml aproximadamente en un evaporador rotativo a una temperatura que no sobrepase. 35 °C. Diluir el residuo con agua para obtener una presunta concentración en bacitracina-cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.2. Soluciones del extracto

Preparar a partir de la solución U_8 y por diluciones sucesivas (1 + 1) mediante el tapón fosfato (4.5) las soluciones U_4 (presunta concentración 0,21 UI/ml), U_2 (presunta concentración: 0,105 UI/ml) y U_1 (presunta concentración: 0,0525 UI/ml).

7. MODALIDADES DE DOSIFICACIÓN

7.1. Inoculación del medio de cultivo

Sembrar a 50 °C aproximadamente el medio de base de dosificación (4.2) por la suspensión bacteriana (3.2). Mediante ensayos preliminares sobre placas con el medio (4.2), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permita obtener para las distintas concentraciones en bacitracina-cinc zonas de inhibición tan extensas como sea posible y que permanezcan aún nítidas.

7.2. Preparación de las cajas

La difusión en gelosa se realizará en cajas con las cuatro concentraciones de la solución patrón (S_8, S_4, S_2, S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada caja deberá recibir necesariamente las cuatro concentraciones del patrón y del extracto. A tal fin, escoger la dimensión de las cajas de modo que se pueda ahuecar en el medio de gelosa al menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no estén a menos de 30 mm de distancia. Se podrán utilizar como cajas placas de vidrio planas, coronadas por un anillo de aluminio o de materia plástica de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las cajas una cantidad del medio (4.2), sembrado como se indica en 7.1, que permita obtener una capa de unos 2 mm de espesor (50 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, ahuecar las cavidades y depositar en ellas volúmenes exactamente medidos de las soluciones del patrón y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según el diámetro).

Hacer al menos cuatro repeticiones de cada concentración de modo que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

7.3. Incubación

Incubar las cajas de 16 a 18 horas a 30 °C aproximadamente.

8. EVALUACIÓN

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con 0,1 mm de tolerancia. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semi-logarítmico anotando el logaritmo de las concentraciones en frente de los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución patrón y para el extracto procediendo, por ejemplo, de la siguiente manera.

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución patrón (SL) mediante la fórmula:

$$(a) \text{ SL} = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Determinar el punto más apropiado del nivel más elevado de la solución patrón (SH) mediante la fórmula:

$$(b) \text{ SH} = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Determinar del mismo modo los puntos más apropiados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más elevado (UH) sustituyendo S_1, S_2, S_4, S_8 en las fórmulas antes citadas por U_1, U_2, U_4 y U_8 .

Inscribir los valores SL y SH en el mismo gráfico. Juntando los dos puntos, se obtendrá la recta más ajustada para la solución patrón. Procediendo del mismo modo para UL y UH, se obtendrá la recta más ajustada para el extracto.

En ausencia de cualquier interferencia, las rectas deberían ser paralelas. En la práctica, se las considerará como paralelas cuando $(SH - SL)$ y $(UH - UL)$ no difieren de más de 10 % de su media.

Si las rectas no son paralelas, se podrán eliminar o bien U_1 y S_1 , o bien U_8 y S_8 . Los valores SL, SH, UL y UH que permiten conseguir las rectas más ajustadas se calcularán entonces mediante las fórmulas siguientes:

$$(a') \quad \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

y fórmulas análogas para UL y UH. Al utilizar dicha alternativa se deberá igualmente proceder a una comprobación en cuanto al paralelismo de las rectas, como indicado más arriba. Se deberá mencionar en el boletín de análisis la obtención de un resultado procedente de los tres niveles.

Cuando las rectas se consideren como paralelas, se calculará el logaritmo de la actividad relativa (log. A) de acuerdo con una de las fórmulas siguientes.

Para 4 niveles

$$(c) \text{ log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Para 3 niveles

$$(d) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

$$(d') \log. A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Actividad real = presunta actividad x actividad relativa.

Cuando se consideren las rectas como no paralelas, se repetirá la determinación. Si la misma continuara sin permitir alcanzar el paralelismo, se calculará el logaritmo de la actividad relativa (log. A) mediante la fórmula (c). No obstante se deberá considerar el resultado conseguido como una aproximación y procederá mencionarlo así en el boletín de análisis.

9. REPETIBILIDAD

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas con una misma muestra por un mismo analista no debería pasar de:

20 % del resultado más elevado para contenidos de bacitracina-cinc de 5 a 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos superiores a 25 mg/kg y hasta 50 mg/kg,

10 % del resultado más elevado para contenidos superiores a 50 mg/kg.

2. DOSIFICACIÓN DEL FLAVOFOSFOLIPOL POR DIFUSIÓN EN GELOSA

1. OBJETO Y DOMINIO DE APLICACIÓN

El método permitirá dosificar el flavofosfolipol en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de dosificación será de 1 mg/kg (1 ppm).

2. PRINCIPIO

Se someterá la muestra a una extracción por metanol diluido mediante calentamiento por reflujo. El extracto será centrifugado, purificado si fuere necesario en resinas intercambiadoras de iones y diluido. Se determinará su actividad antibiótica por medida de la difusión del flavofosfolipol en un medio de gelosa, sembrado con *Staphylococcus aureus*. El diámetro de dichas zonas se considerará como si fuera directamente proporcional al logaritmo de la concentración en antibiótico para la gama de las concentraciones utilizadas.

3. MICROORGANISMO: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

3.1. Mantenimiento del extracto base

Sembrar el medio de cultivo (4.1), en tubos inclinados, con *Staphylococcus aureus*. Incubar 24 horas a 37 °C, conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente y renovar la siembra cada mes.

3.2. Preparación de la suspensión bacteriana (a)

Extraer dos tubos que contengan el cultivo-madre (3.1) y renovar la siembra cada semana. Incubar 24 horas a 37 °C y conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente.

24 horas antes de la dosificación, sembrar mediante dichos cultivos dos a cuatro tubos inclinados que contengan el medio de cultivo (4.1).

Incubar de 16 a 18 horas a 37 °C. Poner luego los gérmenes en suspensión en la solución de cloruro de sodio (4.3). La transmisión luminosa de la suspensión, medida a 578 nm bajo un espesor de 1 cm por comparación con la solución de cloruro de sodio, deberá ser de 40 % aproximadamente.

(a) Se podrán utilizar otros métodos en la medida en que quede demostrado que producirán una suspensión bacteriana análoga.

4. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

4.1. Medio de mantenimiento del extracto base (a)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	15,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (después esterilización)	

4.2. Medio de base de la dosificación

4.2.1. *Capa inferior* (b)

Peptona de carne	6,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Gelosa	10,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (después esterilización)	

4.2.2. *Capa por sembrar*

Medio (4.1) sumado a 2 g de emulsión antiespumante de silicona (c)

4.3. Solución a 0,4 % (p/v) de cloruro de sodio: disolver en agua 4 g de cloruro de sodio p.a., diluir hasta 1 000 ml y esterilizar.

4.4. Metanol puro.

4.5. Metanol a 50 % (v/v): diluir 500 ml de metanol por 500 ml de agua.

4.6. Metanol a 80 % (v/v): diluir 800 ml de metanol (4.4) por 200 ml de agua.

4.7. Tris (hidroximetil) aminometano p.a.

4.8. Solución metanólica a 1,5 % (p/v) de cloruro de potasio: disolver 1,5 g de cloruro de potasio p.a. en 20 ml de agua, completar hasta 100 ml con metanol (4.4).

4.9. Intercambiador de cationes: Dowex 50 WX8, 20-50 mesh, forma Na (cat. Serva n° 41600) o equivalente.

4.10. Intercambiador de aniones: Dowex 1X2, 50-100 mesh, forma Cl (cat. Serva n° 41010) o equivalente. Antes de utilizarlo, mantener el producto durante 12 a 14 horas en metanol a 80 % (4.6).

4.11. Lana de vidrio.

4.12. Papel indicador de pH (pH 6,6-8,1)

4.13. Ácido ascórbico.

4.14. Sustancia patrón: flavofosfolipol de actividad conocida.

5. EQUIPO

5.1. Tubo para cromatografía, de vidrio, diámetro interior: 9 mm, longitud: 150 a 200 mm, provisto de un grifo en la parte afilada de la extremidad inferior y de un esmerilado normalizado (para empalme del embudo) en la parte superior.

5.2. Embudo con depósito de 250 ml, con grifo y esmerilado normalizado.

5.3. Frasco cónico de 250 ml, de esmerilado normalizado.

5.4. Refrigerante de reflujo, de esmerilado normalizado.

6. SOLUCIONES PATRÓN

Disolver una cantidad exactamente pesada de sustancia patrón (4.14) en metanol a 50 % (4.5) y diluir para obtener una solución madre de flavofosfolipol a 100 µg/ml. Conservada en frasco tapado a 4° C, dicha solución será estable durante dos meses.

(a) Se podrá utilizar cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados, por ejemplo Oxoid Antibiotic Medium (CM 327) sumado a gelosa Oxoid n° 3 (L 13).

(b) Se podrá utilizar cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados, por ej. Oxoid Antibiotic Medium 2 (CM 335) sumada a gelosa Oxoid n° 3 (L 13).

(c) Por ejemplo SE 2 de Wacker Chemie GmbH, Munich.

Preparar a partir de dicha solución y por diluciones sucesivas mediante metanol a 50 % (4.5) las soluciones siguientes:

S ₈	0,2 µg/ml
S ₄	0,1 µg/ml
S ₂	0,05 µg/ml
S ₁	0,025 µg/ml

7. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

7.1. Extracción

7.1.1. *Concentrados, premezclas y alimentos minerales*

Pesar una cantidad de muestra de 2 a 5 g y añadirle unos 150 mg de ácido ascórbico (4.13). Mezclar a 150 mg de metanol a 50 % (4.5) en un frasco (5.3) y ajustar el pH a 8,1-8,2 mediante unos 400 mg de tris (hidroximetil) aminometano (4.7). Controlar el pH mediante papel indicador (4.12). Dejar macerar 15 minutos, ajustar de nuevo el pH a 8,1-8,2 mediante tris (hidroximetil) aminometano (4.7) y luego hacer hervir durante 10 minutos con refrigerante de reflujo (5.4) agitando constantemente. Dejar enfriar, luego centrifugar y decantar el extracto.

7.1.2. *Otros alimentos*

Pesar una cantidad de muestra de 5 a 30 g que contenga al menos 30 µg de flavofosfolipol. Mezclar a 150 ml de metanol a 50 % (4.5) en un frasco (5.3) y ajustar el pH a 8,1-8,2 mediante unos 400 mg de tris (hidroximetil) aminometano (4.7). Controlar el pH mediante el papel indicador (4.12). Dejar macerar 15 minutos, ajustar de nuevo el pH a 8,1-8,2 mediante tris (hidroximetil) aminometano (4.7) y luego hacer hervir durante 10 minutos con refrigerante de reflujo (5.4) agitando constantemente. Dejar enfriar, luego centrifugar y decantar el extracto.

7.2. Purificación (se podrá omitir dicha modalidad para los concentrados, las premezclas y los alimentos minerales)

Mezclar 110 ml del extracto a 11 g de intercambiador de cationes (4.9), hacer hervir durante un minuto con refrigerante de reflujo (5.4) agitando constantemente. Separar el intercambiador de cationes por centrifugación o filtración. Mezclar 100 ml del extracto a 150 ml de metanol (4.4) y dejar reposar la solución de 12 a 15 horas a 4 °C. Eliminar la materia floculante por filtración en frío.

Poner en el extremo inferior de un tubo (5.1) un tapón de lana de vidrio (4.11), verter en el tubo 5 ml de intercambiador de aniones (4.10) y lavar la columna con 100 ml de metanol a 80 % (4.6). Luego trasvasar en la columna mediante el embudo (5.2) un volumen de filtrado de 100 ml que se supondrá contiene al menos 16 µg de flavofosfolipol (200 ml para una muestra de 30 g de alimento a 1 ppm). Si fuere necesario, diluir el filtrado antes de trasvasarlo en la columna mediante metanol a 80 % (4.6) para obtener una presunta concentración en flavofosfolipol de 16 µg por 100 ml. Regular el caudal de salida del líquido a 2 ml aproximadamente por minuto. Eliminar la totalidad del filtrado. Lavar luego la columna mediante 50 ml de metanol a 80 % (4.6) y eliminar el filtrado.

Diluir el flavofosfolipol mediante la solución metanólica de cloruro de potasio (4.8) manteniendo el caudal de goteo alrededor de 2 ml por minuto. Recoger 50 ml de la disolución en un matraz aforado, añadir 30 ml de agua y homogeneizar. Esta disolución debería tener un contenido en flavofosfolipol de 0,2 µg/ml (= U₈).

7.3. Soluciones del extracto

Si fuere necesario (en particular en los casos en que se hubiere omitido la purificación), diluir el extracto obtenido en 7.1.1 con metanol a 50 % (4.5) para obtener una presunta concentración en flavofosfolipol de 0,2 µg/ml (= U₈).

Preparar a partir de la solución U₈ por diluciones sucesivas (1 + 1) mediante metanol a 50 % (4.5) las soluciones U₄ (presunta concentración): 0,1 µg/ml), U₂ (presunta concentración: 0,05 µg/ml) y U₁ (presunta concentración: 0,025 µg/ml).

8. MODALIDADES DE LA DOSIFICACIÓN

8.1. Inoculación del medio de cultivo

Sembrar a 50 °C aproximadamente el medio de base de la dosificación (4.2.2) a través de la suspensión bacteriana (3.2). Gracias a ensayos preliminares en placas con el medio (4.2.2), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permita obtener para las distintas concentraciones en flavofosfolipol zonas de inhibición tan extensas como sea posible y que permanezcan aún nítidas (unos 30 ml por litro).

8.2. Preparación de las cajas

La difusión en gelosa se realizará en cajas con las cuatro concentraciones de la solución patrón (S₈, S₄, S₂, S₁) y las cuatro concentraciones del extracto (U₈, U₄, U₂, U₁). Cada caja deberá

necesariamente recibir las cuatro concentraciones del patrón y del extracto. A tal fin, escoger la dimensión de las cajas de forma tal que se pueda ahuecar en el medio de gelosa al menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no estén separados por menos de 30 mm. Se podrá utilizar como cajas placas de vidrio planas, coronadas por un anillo de aluminio o de materia plástica de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las cajas una cantidad del medio (4.2.1) que permita obtener una capa de 1,5 mm aproximadamente de espesor (45 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar y añadir una cantidad del medio (4.2.2), sembrado como indicado en el punto 8.1, que permita obtener una capa de 1 mm de espesor (30 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, ahuecar las cavidades y depositar en las mismas volúmenes exactamente medidos de las soluciones del patrón y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según el diámetro).

Hacer al menos cuatro repeticiones de cada concentración de modo que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

8.3. Incubación

Incubar las cajas de 16 a 18 horas a 28-30 °C.

9. EVALUACIÓN

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una tolerancia de 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semi-logarítmico anotando el logaritmo de las concentraciones frente a los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas mejor ajustadas para la solución patrón y para el extracto procediendo, por ejemplo, de la siguiente manera.

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución patrón (SL) mediante la fórmula:

$$(a) SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Determinar el punto más apropiado del nivel más elevado de la solución patrón (SH) mediante la fórmula:

$$(b) SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Determinar del mismo modo los puntos más apropiados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más elevado (UH) sustituyendo S_1 , S_2 , S_4 y S_8 en las fórmulas arriba mencionadas por U_1 , U_2 , U_4 y U_8 .

Inscribir los valores SL y SH en el mismo gráfico. Uniendo los dos puntos, se obtendrá la recta mejor ajustada para la solución patrón. Procediendo del mismo modo para UL y UH, se conseguirá la recta mejor ajustada para el extracto.

En ausencia de cualquier interferencia, las rectas deberían ser paralelas. En la práctica, se las considerará como si fueren paralelas cuando (SH-SL) y (UH-UL) no difirieran de más del 10 % de su media.

Si las rectas no fueren paralelas, se podrá eliminar o bien U_1 y S_1 o bien U_8 y S_8 . Los valores SL, SH, UL y UH que permitan obtener las rectas mejor ajustadas se calcularán entonces mediante las fórmulas siguientes:

$$(a') SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

y fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de dicha alternativa deberá igualmente ser objeto de una verificación en cuanto al paralelismo de las rectas como indicado más arriba. Se deberá mencionar en el boletín de análisis la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando se consideren las rectas como paralelas, se calculará el logaritmo de la actividad relativa (log. A) mediante alguna de las fórmulas siguientes.

Para 4 niveles

$$(c) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Para 3 niveles

$$(d) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

$$(d') \log. A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Actividad real = actividad presunta x actividad relativa.

Cuando las rectas se consideren como no paralelas, repetir la determinación. Si la misma continuara sin permitir alcanzar el paralelismo, calcular el logaritmo de la actividad relativa (log. A) mediante la fórmula (c). Sin embargo, se deberá considerar el resultado obtenido como aproximativo y será procedente mencionarlo en el boletín de análisis.

10. REPETIBILIDAD

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas en la misma muestra por el mismo analista no debería sobrepasar:

0,5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos en flavofosfolipol de 1 a 2 mg/kg,

25 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 2 mg/kg y hasta 10 mg/kg,

20 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 10 mg/kg y hasta 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos superiores a 25 mg/kg y hasta 50 mg/kg,

10 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 50 mg/kg.

3. DOSIFICACIÓN DE LOS OLIGOELEMENTOS HIERRO, COBRE, MANGANESO Y CINC

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método permitirá dosificar los oligoelementos hierro, cobre, manganeso y cinc en los alimentos de los animales. Los límites inferiores de determinación serán los siguientes:

Hierro (Fe)	20 mg/kg,
Cobre (Cu)	10 mg/kg
Manganeso (Mn)	20 mg/kg
Cinc (Zn)	20 mg/kg

2. PRINCIPIO

Se meterá en solución la muestra en el ácido clorhídrico después de la eventual destrucción de las materias orgánicas. Se determinarán los elementos hierro, cobre, manganeso y cinc, después de dilución apropiada, por espectrometría de absorción atómica.

3. REACTIVOS

Observaciones preliminares

El agua utilizada para la preparación de los reactivos y de las soluciones requeridas en el transcurso del análisis deberán estar exentos de los cationes por determinar. Se obtendrá bien por doble destilación en un aparato de borosilicato o de cuarzo, bien por doble permutación en resina intercambiadora de iones.

Los reactivos deberán ser al menos de la calidad «para análisis» (p.a.). La ausencia del elemento por determinar deberá ser controlada por un ensayo en blanco. Si fuere necesario, se someterán los reactivos a una purificación más profunda.

Se podrán sustituir las soluciones patrón descritas a continuación por soluciones patrón comerciales con tal que las mismas sean garantizadas y controladas antes de su empleo.

- 3.1. Ácido clorhídrico p.a., d : 1,19.
- 3.2. Ácido clorhídrico p.a., 6 N.
- 3.3. Ácido clorhídrico p.a., 0,5 N.

- 3.4. Ácido fluorhídrico a 38-40 % (v/v), con un contenido de hierro inferior a 1 mg/l y cuyo residuo de evaporación sea inferior a 10 mg (expresados en sulfatos)/l.
- 3.5. Ácido sulfúrico p.a., d : 1,84.
- 3.6. Agua oxigenada p.a., a 100 vol. aproximadamente de oxígeno (30 % en peso).
- 3.7. Solución patrón de hierro (1 000 µg Fe/ml): disolver 1 g de hierro de hilo p.a. en 200 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2), añadir 16 ml de agua oxigenada (3.6) y completar con agua hasta 1 l.
- 3.7.1. Solución patrón de trabajo (100 µg Fe/ml): diluir la solución patrón (3.7) con agua a 1 + 9.
- 3.8. Solución patrón de cobre (100 µg Cu/ml): disolver 1 g de cobre en polvo pa en 25 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2), añadir 5 ml de agua oxigenada (3.6) y completar con agua hasta 1 l.
- 3.8.1. Solución patrón de trabajo (10 µg Cu/ml): diluir la solución patrón (3.8) a 1 + 9 con agua; diluir luego con agua la solución obtenida a 1 + 9.
- 3.9. Solución patrón de manganeso (1 000 µg Mn/ml): disolver 1 g de manganeso en polvo p.a. en 25 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2) y completar con agua hasta 1 l.
- 3.9.1. Solución patrón de trabajo (10 µg Mn/ml): diluir la solución patrón (3.9) con agua a 1 + 9; diluir luego con agua la solución obtenida a 1 + 9.
- 3.10. Solución patrón de cinc (1 000 µg Zn/ml): disolver 1 g de cinc en cinta o en placa p.a. en 25 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2) y completar con agua hasta 1 l.
- 3.10.1. Solución patrón de trabajo (10 µg Zn/ml): diluir la solución patrón (3.10) con agua a 1 + 9; diluir luego la solución obtenida con agua a 1 + 9.
- 3.11. Solución de cloruro de lantano: disolver 12 g de óxido de lantano en 150 ml de agua, añadir 100 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2) y completar con agua hasta 1 l.

4. EQUIPO

- 4.1. Horno de mufla, de temperatura regulable y controlada.
- 4.2. Material de vidrio de borosilicato, resistente. Se recomendará utilizar un material que sirva exclusivamente para las dosificaciones de los oligoelementos.
- 4.3. Cápsulas de platino y, eventualmente, de cuarzo.
- 4.4. Espectrofotómetro de absorción atómico, que responda a las exigencias del método en cuanto a la sensibilidad y a la precisión en la gama de las medidas útiles.

5. MODO OPERATIVO

5.1. Muestra que contenga compuestos orgánicos

5.1.1. Incineración y preparación de la solución por analizar (*)

- i) Colocar de 5 a 10 g de la muestra, pesados don 0,2 mg de tolerancia, en una cápsula de cuarzo o de platino (4.3) (ver nota b), secar en la estufa a 105 °C e introducir la cápsula en el horno de mufla (4.1) frío. Cerrar el horno (ver nota c) y elevar progresivamente su temperatura para alcanzar de 450 a 475 °C en 90 minutos aproximadamente. Mantener dicha temperatura durante 4 a 16 horas (por ejemplo, durante la noche) de forma a eliminar la materia carbonosa, abrir luego el horno y dejar enfriar (ver nota d).

Humectar las cenizas con agua, luego trasvasarlas a un vaso precipitado de 250 ml. Enjuagar la cápsula con 5 ml de ácido clorhídrico (3.1) y trasvasar lentamente y con precaución la solución de enjuague en el vaso precipitado (se podrá producir una reacción violenta por formación de

(*) Los forrajes verdes (frescos o deshidratados) podrán contener grandes cantidades de sílice vegetal que puedan retener oligoelementos y que se deberán eliminar. Se deberán someter las muestras de dichos alimentos al siguiente tratamiento. Efectuar la operación (5.1.1 i) hasta la fase de la filtración. Lavar el papel filtro que contenga el residuo insoluble por dos veces con agua hirviendo y colocarlo en una cápsula de platino (4.3). Incinerar en el horno de mufla (4.1) a una temperatura inferior a 550 °C hasta que toda la materia carbonosa hubiere desaparecido por completo. Dejar enfriar, añadir algunas gotas de agua, luego de 10 a 15 ml de ácido fluorhídrico (3.4) y evaporar en seco a 150 °C aproximadamente. Si el residuo contiene aún sílice, disolver la misma en algunos ml de ácido fluorhídrico (3.4) y evaporar en seco. Añadir 5 gotas de ácido sulfúrico (3.5) y calentar hasta desaparición de los humos blancos. Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2) y 30 ml aproximadamente de agua, calentar, filtrar la solución en un matraz aforado de 250 ml y completar hasta su volumen con agua (la concentración de hl será de 0,5 N aproximadamente). Proseguir el procedimiento a partir del punto 5.1.3.

CO₂. Añadir luego gota a gota ácido clorhídrico (3.1), agitando al mismo tiempo el contenido del vaso precipitado, hasta el cese de la efervescencia. Evaporar en seco agitando periódicamente con una varilla de vidrio.

Añadir al residuo 15 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2) y luego unos 120 ml de agua. Mezclar con la ayuda de una varilla de vidrio, dejar la misma en el vaso precipitado y recubrir con un vidrio de reloj. Poner el líquido en ebullición suave y mantener la ebullición hasta que aparentemente ya no se disuelvan las cenizas. Filtrar en un papel filtro sin cenizas y recoger el filtrado en un matraz aforado de 250 ml. Lavar el vaso precipitado y el filtro con 5 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2) caliente y por dos veces con agua hirviendo. Completar con agua hasta su volumen (la concentración en hl será de 0,5 N aproximadamente).

- ii) Si el residuo que se encuentre en el filtro apareciere negro (carbonoso), colocarlo de nuevo en el horno e incinerar a 450-475 °C. Dicha incineración, que requerirá únicamente algunas horas (3 a 5 horas aproximadamente) se completará cuando las cenizas aparezcan blancas o casi blancas. Disolver el residuo en unos 2 ml de ácido clorhídrico (3.1), evaporar en seco y añadir 5 ml de ácido clorhídrico 6 N (3.2). Calentar, filtrar la solución en el matraz aforado y completar con agua hasta su volumen (la concentración en hl será de 0,5 N aproximadamente).

Observaciones:

- a) Al dosificar los oligoelementos, será oportuno llamar la atención en cuanto a los riesgos de contaminación, en particular por el cinc, el cobre y el hierro. Por ello los instrumentos utilizados para la preparación de las muestras deberán ser exentos de dichos metales.

Para reducir los riesgos de contaminación, convendrá trabajar en atmósfera exenta de polvo, con un material rigurosamente limpio y aparatos de vidrio cuidadosamente lavados. La dosificación del cinc será especialmente sensible a las contaminaciones procedentes en particular de los aparatos de vidrio, de los reactivos, del polvo, etc.

- b) Calcular el peso de la muestra por incinerar en función del contenido aproximativo del alimento en oligoelementos por dosificar y de la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. Para determinados alimentos pobres en oligoelementos, podrá ser necesario extraer una muestra de 10 a 20 g y de limitar el volumen de la solución final a 100 ml.
- c) Incinerar en un horno cerrado sin inyección de aire o de oxígeno.
- d) La temperatura indicada por el pirómetro no deberá sobrepasar los 475 °C.

5.1.2. *Determinación espectrofotométrica*

5.1.2.1. Preparación de las soluciones patrón

Preparar para cada oligoelemento por dosificar una gama de soluciones patrón a partir de las soluciones patrón de trabajo 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 y 3.10.1, de forma que cada solución patrón tuviere una concentración en HCl de 0,5 N aproximadamente y, en el caso del hierro, del manganeso y del cinc, una concentración en cloruro de lantano que corresponda a 0,1 % de lantano (p/v). Las concentraciones escogidas en oligoelementos deberán encontrarse en la zona de sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. Los cuadros siguientes darán, a título de ejemplo, tipos de composición de solución patrón; según el tipo y la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado, podrá ser necesario escoger otras concentraciones.

Hierro

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de solución patrón de trabajo (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe) + ml hl 6 N (3.2)	0 7	0,5 7	1 7	2 7	3 7	4 7	5 7

+ 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11); completar con agua hasta 100 ml.

Cobre

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solución patrón de trabajo (3.8.1) (1 ml = 10 µg CU) + ml hl 6 N (3.2)	0 8	1 8	2 8	4 8	6 8	8 8	10 8

Completar con agua hasta 100 ml.

Manganeso

g Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solución patrón de trabajo (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn) + ml hl 6 N (3.2)	0 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7	10 7

+ 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11); completar con agua hasta 100 ml.

Cinc

g Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de solución patrón de trabajo (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn) + ml hl 6 N (3.2)	0 7	0,5 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7

+ 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11); completar con agua hasta 100 ml

5.1.2.2. Preparación de la solución por analizar

Para la dosificación del cobre, la solución preparada según 5.1.1 podrá, como regla general, utilizarse directamente. Si fuere necesario llevar su concentración a la gama de las concentraciones de las soluciones patrón, se podrá introducir con una pipeta una parte alícuota en un matraz aforado de 100 ml y completar con ácido clorhídrico 0,5 N (3.3) hasta su volumen.

Para la dosificación del hierro, del manganeso y del cinc, introducir con la pipeta una porción alícuota de la solución preparada según 5.1.1 en un matraz aforado de 100 ml; añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11) y completar con ácido clorhídrico 0,5 N (3.3) (ver también punto 8 «Observación») hasta su volumen.

5.1.2.3. Prueba en blanco

Realizar una prueba en blanco que comprenda todas las etapas prescritas del modo operatorio, con exclusión de la presencia de la muestra.

No se deberá utilizar la solución patrón «O» para la prueba en blanco.

5.1.2.4. Medida de la absorción atómica

Medir la absorción de las soluciones patrón y de la solución por analizar, utilizando una llama oxidante aire-acetileno, con las siguientes longitudes de onda:

Fe 248,3 nm
Cu 324,8 nm
Mn 279,5 nm
Zn 213,8 nm.

Realizar cuatro veces cada medida.

5.2. Compuestos minerales

En ausencia de materia orgánica, será inútil la incineración previa. Aplicar el modo operatorio a partir del punto 5.5.1 i) del segundo apartado. Se podrá omitir la evaporación en presencia de ácido fluorhídrico.

6. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcular la concentración en oligoelementos en la solución por analizar mediante una curva de contraste y expresar el resultado en mg de oligoelemento por kg de muestra (ppm).

7. REPETIBILIDAD

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra por el mismo analista no debiere sobrepasar:

— 5 mg/kg en valor absoluto, para los contenidos respectivos en oligoelementos hasta 50 mg/kg,

- 10 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 50 y hasta 100 mg/kg,
- 10 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos superiores a 100 y hasta 200 mg/kg,
- 5 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 200 mg/kg.

8. OBSERVACIÓN

La presencia de grandes cantidades de fosfatos podrá interferir en la dosificación del hierro, del manganeso y del cinc. Se deberá corregir dicha interferencia por adición de solución de cloruro de lantano (3.11). Sin embargo, si la muestra tuviere una relación ponderal $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{p} > 2$ se podrá omitir la adición de solución de cloruro de lantano (3.11) a la solución por analizar y a las soluciones patrón.
