Por otra parte, el sistema de compensación previsto en el artículo 4.°, punto 1, letra b), del mencionado Real Decreto 3241/1983, al significar la aplicación de un tipo determinado sobre las bases de cotización de los funcionarios activos, obliga a reajustar dichos tipos cuando no resulta homogénea la evolución de la cuantía de las diferentes bases de cotización con la del coste real de la asistencia sanitaria, que debe ser el criterio que fundamente el cálculo de la compensación que se ha de efectuar a las Corporaciones Locales que utilizan medios propios.

Asimismo, el tiempo transcurrido desde el 1 de enero de 1984, fecha desde la que MUNPAL se hizo cargo de las obligaciones financieras derivadas de su asunción de la prestación de la asistencia sanitaria, permite conocer mejor y ajustar las necesidades objetivas que la financiación del sistema comporta.

Por lo expuesto, en uso de las facultades conferidas en la disposición final primera del Real Decreto 3241/1983, de 14 de diciembre, dispongo:

Artículo único.–Los tipos aplicables a las bases de cotización de los funcionarios en activo para la determinación de la compensación económica a las Corporaciones Locales, que se establece en el número 1, letra b), del artículo 4.° del Real Decreto 3241/1983, de 14 de diciembre, por el que se regula la prestación de la asistencia sanitaria para el personal protegido por la Mutualidad Nacional de Previsión de la Administración Local, serán los siguientes:

1. El 11,50 por 100, respecto al personal asegurado con anterioridad al 1 de enero de 1987.
2. El 6,60 por 100, cuando se trate de personal asegurado a partir del 1 de enero de 1987.

DISPOSICIONES FINALES

Primera.–Lo dispuesto en la presente Orden surtirá efectos desde el 1 de enero de 1989.

Segunda.–Se faculta a la Dirección Técnica de la Mutualidad Nacional de Previsión de la Administración Local para resolver cuantas cuestiones pueden plantearse en aplicación de la presente Orden.

Tercera.–La presente Orden entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Lo que comunico a VV. II.

Madrid, 23 de mayo de 1989.

ALMUNIA AMANN

Ilmos. Sres. Subsecretario y Director técnico de la Mutualidad Nacional de Previsión de la Administración Local.

MINISTERIO DE RELACIONES CON LAS CORTES Y DE LA SECRETARIA DEL GOBIERNO

12209 *ORDEN de 23 de mayo de 1989 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de alimentos para animales (piensos) y sus primeras materias.*

Por Ordenes de 31 de julio de 1979 («Boletín Oficial del Estado» de 29 y 30 de agosto) y 17 de septiembe de 1981 («Boletín Oficial del Estado» de 14 de octubre), se establecieron diversos métodos oficiales de análisis de piensos.

La situación motivada por nuestra entrada en la Comunidad Económica Europea hace necesario armonizar nuestra legislación con la correspondiente comunitaria, especialmente con lo dispuesto en las Directivas de la Comisión 71/250/CEE, de 15 de junio, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 12 de julio de 1971; 71/393/CEE, de 18 de noviembre, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 20 de diciembre de 1971; 72/199/CEE, de 27 de abril, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 29 de mayo de 1972; 73/46/CEE, de 5 de diciembre de 1972, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 30 de marzo de 1973; 73/47/CEE, de 5 de diciembre de 1972, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 30 de marzo de 1973; 74/203/CEE, de 25 de marzo, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 22 de abril de 1974; 75/84/CEE, de 20 de diciembre de 1974, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 5 de febrero de 1975; 76/372/CEE, de 1 de marzo, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 15 de abril de 1976; 78/633/CEE, de 15 de junio, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 29 de julio de 1978; 81/680/CEE, de 30 de junio, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 29 de agosto de 1981; 81/715/CEE, de 31 de julio, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 10 de septiembre de 1981; 84/4/CEE, de 20 de diciembre de 1983, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 18 de enero de 1984, y 84/425/CEE, de 25 de julio, «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» de 6 de septiembre de 1984, sobre métodos de análisis para el control oficial de alimentos de animales.

La presente Orden se dicta al amparo de los apartados 2 y 5 del artículo 40 en relación con el artículo 2.° de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad («Boletín Oficial del Estado» de 29 de abril), así como de los artículos 4.1 g); 5.1 y 39.1 de la Ley 26/1984, de 19 de julio, General para la Defensa de los Consumidores y Usuarios («Boletín Oficial del Estado» de 24 de julio), leyes ambas que se considera habilitan al Estado para dictar normas reglamentarias de carácter básico.

Con independencia de estos preceptos con rango de ley formal, la reiterada jurisprudencia del Tribunal Constitucional viene indicando que en las leyes ha de atenderse, no sólo a si explícitamente habilitan al Gobierno del Estado para dictar reglamentos con carácter de norma básica, sino a si lo hacen implícitamente en razón de que van encaminadas en su conjunto y, como interés prevalente, a proteger valores de naturaleza básica como son «la unidad del sistema sanitario», «la garantía a la igualdad de todos los españoles en su derecho a la salud», «la exigencia de la unidad de mercado» o la «libre circulación de bienes».

Parece evidente que la sanción de unos métodos uniformes y aplicables al análisis de los productos alimenticios por todas las Administraciones Públicas y a los que deban someterse dichos productos en todo el territorio nacional, viene exigida por aquellos principios de unidad e igualdad, por lo que deben tener el carácter de norma básica del Estado.

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Economía y Hacienda, de Industria y Energía; de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, previo informe preceptivo de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria y oídos los representantes de los sectores afectados, este Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno dispone:

Primero. Se aprueban como oficiales los métodos de análisis de alimentos para animales (piensos) y sus primeras materias que figuran adjuntos a la presente Orden.

Segundo. Cuando no existan métodos oficiales para determinados análisis, y hasta tanto los mismos no sean aprobados por el Organo competente y previamente informados por la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, podrán ser utilizados los aprobados por los Organismos Nacionales o Internacionales de reconocida solvencia.

DISPOSICION ADICIONAL

Lo dispuesto en la presente Orden y los métodos oficiales de análisis de alimentos para animales (piensos) y sus primeras materias que aprueba, se considerarán norma básica de conformidad con lo dispuesto en el artículo 149.1.1.ª y 16.° de la Constitución Española.

DISPOSICION DEROGATORIA

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

DISPOSICION FINAL

La presente disposición entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 23 de mayo de 1989.

ZAPATERO GOMEZ

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

METODOS OFICIALES DE ANALISIS DE PIENSOS Y SUS PRIMERAS MATERIAS

I N D I C E

1. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS
2. ALCALOIDES EN ALTRAMUCES
3. PROTEINA TOTAL
4. (a). GRASA BRUTA (sin hidrólisis previa)
4. (b). GRASA BRUTA (con hidrólisis previa)
5. CLORUROS
6. HUMEDAD
7. CELULOSA
8. AZUCARES
9. ACIDEZ DE LA GRASA
10. CALCIO
11. GRASA
12. CENIZAS BRUTAS
13. (a). BASES NITROGENADAS VOLATILES (POR MICRODIFUSION)
13. (b). BASES NITROGENADAS VOLATILES (POR DESTILACION)
14. CARBONATOS
15. (a). AFLATOXINA B_1 (Cromatografía monodimensional en capa fina)
15. (b). AFLATOXINA B_1 (Cromatografía bidimensional en capa fina)
16. INDICE DE PEROXIDOS
17. FOSFORO TOTAL
18. PROTENIA SOLUBLE EN ACIDO CLORHIDRICO Y PEPSINA
19. ACTIVIDAD DE LA PEPSINA
20. CASEINA TOTAL
21. UREA
22. ACIDO CIANHIDRICO
23. CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO CLORHIDRICO
24. ESENCIA DE MOSTAZA
25. LACTOSA
26. POTASIO
27. SODIO
28. MAGNESIO
29. HIERRO
30. COBRE
31. MANGANESO
32. CINC
33. HUMEDAD EN LAS GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES
34. (a). ALMIDON (Mètodo polarimétrico)
34. (b). ALMIDON (Método de la pancreatina)
35. ACTIVIDAD UREASICA DE LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LA SOJA
36. GOSIPOL LIBRE Y TOTAL
37. TEOBROMINA
38. RETINOL (Vitamina A)
39. TIAMINA (ANEURINA, Vitamina B_1)
40. ACIDO ASCORBICO Y ACIDO DEHIDROASCORBICO (Vitamina C)
41. MENADIONA (Vitamina K_3)
42. VIRGINIAMICINA (por difusión en agar)
43. BACITRACINA-CINC (por difusión en agar)
44. FLAVOFOSFOLIPOL (por difusión en agar)
45. TILOSINA (por difusión en agar)
46. ESPIRAMICINA
47. MONENSINA SODICA
48. AVOPARCINA
49. ANTIBIOTICOS DEL GRUPO DE LAS TETRACICLINAS
50. OLEANDOMICINA
51. AMPROLIO
52. ETOPABATO
53. DITINOLMIDA
54. NICARBACINA
55. BUQUINOLATO
56. SULFOQUINOXALINA
57. FURAZOLIDONA

1. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA ANALISIS Y DISPOSICIONES GENERALES

1.1. PRINCIPIO

La preparación de las muestras para el análisis debe conseguir que sean lo más homogéneas y representativas posibles.

En general los métodos de análisis son aplicables a todo tipo de piensos y sus materias primas. Determinados piensos requieren modalidades analíticas particulares, que se preveen en la descripción de los métodos correspondientes.

Cuando estén indicados dos o más métodos para la determinación de un mismo componente de un pienso, la elección del método aplicable, salvo indicación en contrario, corresponderá al Laboratorio de control, no obstante, se indicará en el boletín de análisis.

1.2. MATERIAL Y APARATOS

En la descripción de los métodos de análisis únicamente se indican los instrumentos o aparatos especiales o que exigen normas especiales. Se considera superfluo mencionar todos los aparatos o utensilios que forman parte de la instrumentación corriente de los laboratorios de control.

Por lo demás, cuando se haga referencia a agua para las diluciones o lavados, se entenderá siempre que se trata de agua destilada. Análogamente, cuando se haga referencia a una solución, sin más indicaciones, se entenderá que se trata de una solución en agua destilada.

1.3. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad contrastada para el método de análisis (p.a.). Para el análisis de oligoelementos la pureza de los reactivos debe ser controlada por una prueba en blanco. Según el resultado se puede requerir una purificación suplementaria.

1.4. PREPARACION DE LA MUESTRA- PROCEDIMIENTO

El análisis químico debe hacerse necesariamente sobre una muestra homogénea. Por el contrario, ciertas determinaciones macroscópicas, así como la determinación de la humedad, deben hacerse sobre la muestra en el estado en que se encuentre al llegar al laboratorio. Para tener en cuenta esta doble exigencia, se dividirá la muestra en dos partes. Una de ellas será apartada en el estado en que se encuentra; la otra se preparará para el análisis químico del modo que se indica seguidamente.

Dividir la muestra con ayuda de un aparato mecánico o manualmente, después de haber mezclado cuidadosamente la totalidad en una superficie limpia y seca. En el último caso, es conveniente aplicar el método de los cuartos, que consiste en tomar sucesivamente muestras en dos sectores opuestos. Por último, tomar para el análisis una porción de 100 gramos aproximadamente y triturar, si es preciso, para que la totalidad pase por un tamiz de luz de malla de 1 mm.

Introducir inmediatamente esta muestra en un recipiente seco provisto de cierre hermético y tapar.

Si la muestra está húmeda, hay qe proceder a una predesecación, para que el grado de humedad se sitúe en un valor comprendido entre el 8 y el 12%. Con este fin, desecar la muestra a una temperatura adecuada en el tiempo preciso.

1.5. RESULTADOS

El resultado que se mencionará en el Boletín de análisis será el valor medio obtenido a partir de dos determinaciones por lo menos. Salvo disposición en contrario, se expresará en porcentaje de la muestra original, tal como haya llegado al laboratorio. El resultado no debe incluír más cifras significativas que lo que permita la precisión del método de análisis.

1.6. REFERENCIAS

Primera Directiva Comunitaria de 15 de junio de 1971. 71/250/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

2. ALCALOIDES EN ALTRAMUCES

2.1. PRINCIPIO

Los alcaloides son puestos en solución en una mezcla de éter dietílico y de cloroformo, extrayéndose por ácido clorhídrico. Los alcaloides son precipitados por el ácido sílico-túngstico, incinerados y pesados.

2.2. MATERIAL Y APARATOS

2.2.1. Agitador mecánico.

2.2.2. Cápsula de incineración de platino, cuarzo o porcelana.

2.2.3. Horno de mufla eléctrico.

2.3. REACTIVOS

2.3.1. Eter dietílico.

2.3.2. Cloroformo.

2.3.3. Solución de hidróxido sódico 4N.

2.3.4. Acido clorhídrico 0,3N.

2.3.5. Cloruro de sodio.

2.3.6. Solución al 10 por 100 (p/v) de ácido sílico-tungstico (SiO_2 $12WO_3$. 26 H_2O).

2.4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con aproximación de 5 mg, 15 g de la muestra e introducirla en un recipiente de unos 200 ml provisto de tapón esmerilado. Añadir 100 ml de éter dietílico y 50 ml de cloroformo exactamente medidos e inmediatamente y con la ayuda de una bureta graduada, 10 ml de la solución de hidróxido sódico. Agitar vigorosamente al principio para evitar la formación de grumos, continuando la agitación a intervalos; dejar reposar hasta el día siguiente. Si el líquido sobrenadante no está totalmente limpio añadir algunas gotas de agua; filtrar la capa de éter-cloroformo. Recoger 50 ml del filtrado en un matraz aforado de 50 ml y traspasarlos cuantitativamente con la ayuda de 50 ml de éter dietílico a una ampolla de decantación de 150 ml. Extraer tres veces sucesivas con 20 ml de ácido clorhídrico, dejar decantar y recoger el extracto ácido después de cada extracción. Reunir los extractos ácidos en un matraz de 250 ml y eliminar las

últimas trazas de éter y del cloroformo calentado ligeramente. Añadir alrededor de 1 g de cloruro de sodio, dejar enfriar y precipitar los alcaloides mediante la solución del ácido sílico-túngstico (2.6.1.). Agitar mecánicamente durante 30 minutos, dejar reposar durante una noche, filtrar sobre filtro de cenizas conocidas y lavar el precipitado sucesivamente por dos veces con 10 ml y dos veces con 5 ml de ácido clorhídrico.

Situar el filtro que contiene el precipitado en una cápsula de incineración e incinerar a 900 °C. Dejar enfriar y pesar.

2.5. CALCULOS

% alcaloides = 0,2P

siendo:

P = peso de las cenizas.

Expresar los resultados en % de la muestra.

2.6. OBSERVACIONES

Añadir solución sílico-túngstica hasta que se vea que no se forma más precipitado blanco lechoso del alcaloide.

2.7. REFERENCIAS

Primera Directiva Comunitaria de 15 de junio de 1971. (71/250/ CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

3. PROTEINA BRUTA

3.1. PRINCIPIO

El método permite determinar convencionalmente el contenido en proteína bruta de los piensos y sus materias primas a partir del contenido en nitrógeno determinado según Kjeldahl.

Mineralizar la muestra por vía húmeda y alcalinizar por medio de solución de hidróxido de sodio. El amoníaco liberado es arrastrado por destilación y recogido en una cantidad determinada de ácido sulfúrico, valorando el exceso con solución de hidróxido de sodio.

3.2. MATERIAL Y APARATOS

Mineralizador y destilador Kjeldahl.

3.3. REACTIVOS

3.3.1. Sulfato de potasio, p.a.

3.3.2. Catalizador: Oxido de cobre (CuO) p.a. o sulfato de cobre cristalizado ($CuSO_4.5H_2O$) p.a. o mercurio u óxido de mercurio (HgO) p.a.

3.3.3. Cinc granulado, p.a.

3.3.4. Acido sulfúrico (d= 1,84) p.a.

3.3.5. Acido sulfúrico 0,1N.

3.3.6. Acido sulfúrico 0,5N.

3.3.7. Rojo de metilo: disolver 300 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol del 95-96% (v/v).

3.3.8. Solución de hidróxido de sodio al 30 por 100 (p/v).

3.3.9. Solución de hidróxido de sodio 0,1N.

3.3.10. Solución de hidróxido de sodio 0,25N.

3.3.11. Solución saturada de sulfuro de sodio, p.a.

3.3.12. Solución de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) p.a. al 8 por 100 (p/v).

3.3.13. Piedra pómez en granos, lavada con ácido clorhídrico y calcinada.

3.4. PROCEDIMIENTO

3.4.1. Mineralización.

Pesar con precisión de 1 mg, aproximadamente 1 g de muestra e introducirla en el matraz de mineralización.

Añadir 10 a 15 g de sulfato de potasio (3.3.1.), una cantidad apropiada de catalizador (3.3.2.) (0,3 a 0,4 g de óxido de cobre o una gota de mercurio, ó 0,9 a 1,2 g de sulfato de cobre, o una gota de mercurio ó 0,6 a 0,7 g de óxido de mercurio), 25 ml de ácido sulfurico y algunos gránulos de piedra pómez. Homogeneizar.

Calentar el matraz inicialmente con moderación, agitando de vez en cuando, hasta carbonización de la masa y desaparición de espuma, calentar más intensamente hasta ebullición evitando el sobrecalentamiento y adherencia de partículas orgánicas. Cuando la solución aparece transparente e incolora (verde claro en presencia de catalizador a base de cobre) mantener la ebullición una hora dejando enfriar a continuación.

3.4.2. Destilación.

Añadir con precaución y agitando 250 a 350 ml de agua, comprobando que los sulfatos están disueltos totalmente. Dejar enfriar, añadir algunos gránulos de cinc y algunas gotas de indicador de fenolftaleína.

Introducir en el matraz colector del aparato de destilar 25 ml exactamente medidos, de ácido sulfúrico 0,1N ó 0,5N, según que el producto sea pobre o rico en materias nitrogenadas y algunas gotas del indicador rojo de metilo.

Unir el matraz al refrigerante del aparato de destilar, sumergiendo la parte extrema de éste en el líquido del matraz colector por lo menos 1 cm. Introducir lentamente en el matraz, por medio de un embudo con llave, 120 ml de solución de hidróxido de sodio al 30 por 100 ó más cantidad si fuera necesario, debiéndose mantener la coloración roja hasta el fin de la destilación.

Si se ha empleado un catalizador a base de mercurio introducir además en el matraz ya sea 10 ml de solución de sulfuro de sodio (3.3.11.) ya sea 25 ml de solución de tiosulfato de sodio (3.3.12.).

Calentar el matraz de tal manera que se destile 150 ml de líquido en 30 minutos. Después de este tiempo comprobar la neutralidad de la gota del destilado por medio del papel de tornasol. Si la reacción es alcalina continuar con la destilación hasta que el papel de tornasol indique neutralidad en la gota del destilado. Al final de la destilación observar de vez en cuando la coloración de la solución en el colector. Si vira a amarillo añadir inmediatamente un volumen exactamente medido de ácido sulfúrico 0,1N ó 0,5N.

3.4.3. Valoración.

Valorar en el matraz colector el exceso de ácido sulfúrico con la solución de hidróxido de sodio 0,1N ó 0,25N según la normalidad del ácido sulfúrico, hasta que la solución vire al amarillo claro.

3.5. CALCULOS

$$\% \text{ de proteína en la muestra} = \frac{1,4 \times 6,25}{P} (VN - V'N')$$

Siendo:

P = Peso, en g, de la muestra.
V = Volumen, en ml, de ácido sulfúrico introducido en el vaso.
N = Normalidad de la solución de ácido súlfurico.
V'= Volumen, en ml, de NaOH consumidos en la valoración.
N'= Normalidad de la solución de NaOH.

3.6. OBSERVACIONES

3.6.1. Para productos pobres en materias nitrogenadas, el volumen de ácido sulfúrico 0,1N puede ser reducido, si es necesario, a 10 ó 15 ml y completar a 25 ml con agua destilada.

3.6.2. Para los productos ricos en materias nitrogenadas, tales como las harinas de carne o de pescado, utilizar 25 ml de ácido sulfúrico 0,5N.

3.6.3. Efectuar paralelamente un ensayo en blanco.

3.6.4. Para controlar la exactitud del método, efectuar el análisis (mineralización y valoración) con 1,5 a 2 g de acetanilida p.a. (114 °C, % N= 10,36) en presencia de 1 g de acetanilida consume 14,80 ml de ácido sulfúrico 0,5N.

3.7. REFERENCIAS

Tercera Directiva Comunitaria de 2 de abril de 1972. (72/199/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 123 de 29 de mayo de 1972.

4 (a). GRASA BRUTA (sin hidrólisis previa)

4(a).1. PRINCIPIO

La muestra se extrae con éter de petróleo, El solvente se destila y el residuo se seca y se pesa.

El método permite determinar el contenido en materias grasas brutas en piensos. No es aplicable al análisis de semillas y frutos oleaginosos definidos en el reglamento nº 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966.

Aplicable a las materias primas de origen vegetal, a excepción de aquellos en que sus materias grasas no son comletamente extraibles con éter de petróleo sin hidrólisis previa. En dichas excepciones se incluyen entre otros los glútenes, las levaduras, las proteínas de soja y las patatas. Este procedimiento se aplica igualmente a los piensos compuestos, con excepción de los que contienen leche en polvo o cuyas materias grasas no son totalmente extraíbles con éter de petróleo sin hidrólisis previa.

4(a).2. MATERIAL Y APARATOS

4(a).2.1. Extractor. Si el aparato lleva un sifón (tipo Soxhlet) regular el volumen de reflujo de manera que se obtengan al menos 10 ciclos por hora. Si el aparato no tuviera sifón, el volumen de líquido sometido a reflujo será de unos 10 ml por minuto.

4(a).2.2. Cartuchos de extracción, exentos de materias solubles en éter de petróleo, y cuya porosidad sea compatible con las exigencias del punto 4(a).2.1.

4(a).2.3. Estufa de desecación, bien con vacío a 75 °C ± 3 °C o bien a presión atmosférica a 100 °C ± 3 °C.

4(a).3. REACTIVOS

4(a).3.1. Eter de petróleo, intervalo de ebullición: 40 a 60 °C. El índice de bromo debe ser inferior a 1 y el residuo de evaporación inferior a 2 mg/100 ml.

4(a).3.2. Sulfato de sodio, anhidro.

4(a).3.3. Piedra pómez o perlas de vidrio.

4(a).4. PROCEDIMIENTO

4(a).4.1. Pesar, con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra e introducirlos en un cartucho de extracción (4(a).2.2.) y cubrirlo con tapón de algodón desgrasado.
Poner el cartucho en el extractor (4(a).2.1.) extrayendo durante 6 horas con éter de petróleo (4(a)3.1.). Recoger el extracto en un matraz seco previamente tarado, en el que haya algunos fragmentos de piedra pómez.

Evaporar el solvente por destilación. Secar el residuo, introduciendo el matraz durante hora y media en estufa de desecación (4(a).2.3.). Dejar enfriar en desecador y pesar. Secar de nuevo durante 30 minutos para asegurarse de que el contenido en materia grasa permanezca constante (la diferencia en peso entre dos pesadas sucesivas será inferior a 1 mg).

4(a).4.2. Para los productos de elevado contenido en materias grasas difíciles de triturar o no apropiadas para la toma de una muestra reducida homogénea, proceder como se indica:

Pesar, con precisión de 1 mg, 20 g de la muestra y mezclarlos con 10 g ó más de sulfato de sodio anhidro.

Extraer con éter de petróleo (4(a).3.1.) según se indica en (4(a).4.1.).

Completar el extracto obtenido hasta 500 ml con éter de petróleo (4(a).3.1.) y homogeneizar. Introducir 50 ml de la solución en un pequeño matraz seco y tarado, que contenga algunos fragmentos de piedra pómez (4(a).3.3.). Eliminar el solvente mediante destilación, secar y continuar con el método operatorio indicado en el último párrafo del punto (4(a).4.1.). Valor (a).

Eliminar el disolvente del residuo de extracción que se encuentre en el cartucho. Triturar el resíduo a un tamaño de partícula de 1 mm. Colocarlo de nuevo en el cartucho de extracción (no añadir sulfato de sodio) y continuar con el método operatorio, según se indica en los párrafos segundo y tercero del punto (4(a).4.1.). Valor (b).

4(a).5. CALCULOS

Según 4(a).4.1., expresar el resultado en % de la muestra.

Según 4(a).4.2., el contenido en materias grasas brutas en porcentaje de la muestra viene dado por la fórmula:

$$(10\ a + b) \times 5$$

Siendo:

a = masa, en gramos, del residuo de la primera extracción (parte alícuota del extracto).

b = masa, en gramos, del residuo de la segunda extracción.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra por el mismo analista no debe rebasar:

- 0,2%, en valor absoluto, para contenidos en materias grasas brutas inferiores al 5%.
- 4,0%, del resultado más alto para los contenidos de 5 a 10%.
- 0,4%, en valor absoluto, para los contenidos superiores al 10%.

4(a).6. REFERENCIAS

Directiva de la Comisión de 20 de diciembre de 1983, modificación a la Directiva 71/393/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 15/28 de 18 de enero de 1984. Método nº 4.

4(b). GRASA BRUTA (con hidrólisis previa)

4(b).1. PRINCIPIO

La muestra se trata en caliente con ácido clorhídrico. Dejar enfriar la mezcla y filtrar. Tras haberla lavado y secado, se extrae con éter de petróleo. El solvente se destila y el residuo se seca y se pesa.

El método permite determinar el contenido en materias grasas brutas de los piensos. No es aplicable al análisis de semillas y frutos oleaginosos definidos en el reglamento nº 136/66/CEE del consejo, de 22 de septiembre de 1966.

Aplicable a los piensos simples de origen animal, así como a los mencionados en el método 4(a).1., como excepciones a dicho procedimiento.

4(b).2. MATERIAL Y APARATOS

Los mismos que en 4(a).2.

4(b).3. REACTIVOS

4(b).3.1. Eter de petróleo, intervalo de ebullición: 40 a 60 °C. El índice de bromo debe ser inferior a 1 y el residuo de evaporación inferior a 2 mg/100 ml.

4(b).3.2. Acido clorhídrico 3N.

4(b).3.3. Coadyuvante de filtración, por ejemplo tierra de diatomeas.

4(b).3.4. Piedra pómez o perlas de vidrio.

4(b).4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con aproximación de 1 mg, 2,5 g de muestra (para muestras pobres en materias grasas puede aumentarse a 5 g), introducirlos en un vaso de precipitado de 400 ml, o en un erlenmeyer de 300 ml, añadir 100 ml de ácido clorhídrico 3N (4(b).3.2.) y algunos fragmentos de piedra pómez. Cubrir el vaso con un vidrio de reloj o conectar al erlenmeyer un refrigerante de reflujo. Llevar la mezcla a ebullición suave, utilizando una pequeña llama o una placa calefactora, mantener la ebullición durante una hora. Evitar que el producto se adhiera a las paredes del recipiente.

Enfriar y añadir suficiente coadyuvante de filtración (4(b).3.3.) para evitar la pérdida de materias grasas durante la filtración. Filtrar con doble papel de filtro humedecido, exento de materias grasas. Lavar el resiuo con agua fría hasta la neutralidad del filtrado. Comprobar que éste no contenga materias grasas. Su presencia indicaría la necesidad de realizar una extracción de la muestra con éter de petróleo, previa a la hidrólisis, según el método 4(a).

Poner el doble papel de filtro que contiene el residuo sobre un vidrio de reloj y secarlo durante una hora y media en la estufa a 100 °C ± 3 °C.

Introducir el doble filtro conteniendo el residuo seco en el cartucho de extracción (a(a).2.2.) y cubrirlo con un tapón de algodón desgrasado. Poner el cartucho en el extractor (4(a).2.1.) y seguir el modo operatorio indicado en los párrafos segundo y tercero del punto (4(a).4.1.).

4(b).5. CALCULOS

Como en 4(a).5.1.

4(b).6. REFERENCIAS

La misma que en el método 4(a).

5. CLORUROS

5.1. PRINCIPIO

Los cloruros se solubilizan en agua, defecándose la solución si contiene materias orgánicas, posterior acidificación de la misma con ácido nítrico y precipitación de los cloruros con nitrato de plata. El exceso de nitrato se valora con una solución de sulfocianuro de amonio. Aplicable a todos los piensos.

5.2. MATERIAL Y APARATOS

5.2.1. Agitador de 35 a 40 r.p.m.

5.3. REACTIVOS

5.3.1. Solución de sulfocianuro de amonio 0,1N.

5.3.2. Solución de nitrato de plata 0,1N.

5.3.3. Solución saturada de sulfato amónico-férrico.

5.3.4. Acido nítrico, d= 1,38.

5.3.5. Eter etílico.

5.3.6. Acetona.

5.3.7. Solución Carrez I: Disolver en agua 24 g de acetato de cinc dihidrato ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) y 3 g de ácido acético glacial. Completar hasta 100 ml con agua.

5.3.8. Solución Carrez II: Disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio trihidrato ($K_4(Fe(CN)_6).3H_2O$. Completar a 100 ml con agua.

5.3.9. Carbón activo, exento de cloruros.

5.4. PROCEDIMIENTO

5.4.1. Preparación de la solución.

5.4.1.1. Muestras sin materia orgánica. Pesar, con precisión de 1 mg, de 0 a 10 g de la muestra de forma que no contenga más de 3 g de cloro en forma de cloruro e introducirla en un matraz aforado de 500 ml con 400 ml de agua a 20 °C aproximadamente. Agitar durante 30 minutos, enrasar, homogeneizar y filtrar.

5.4.1.2. Muestras con materia orgánica (menos los citados en 5.4.1.3.). Pesar con precisión de 1 mg, aproximadamente 5 g de muestra e introducirla con 1 g de carbón activo en un matraz aforado de 500 ml. Añadir 400 ml de agua a 20 °C aproximadamente y 5 ml de solución Carrez I, agitar y añadir seguidamente 5 ml de la solución Carrez II. Agitar durante treinta minutos, enrasar, homogeneizar y filtrar.

5.4.1.3. Torta y harina de lino, productos ricos en harina de lino y otros productos ricos en mucílagos o en sustancias coloidales (por ejemplo, almidón hidrolizado).

Preparar la solución como se indica en 5.4.1.2., pero sin filtrar. Decantar (si es necesario centrifugar), separar 100 ml del líquido sobrenadante e introducirlos en un matraz de 200 ml. Mezclar con acetona y enrasar con este disolvente, homogeneizar y filtrar.

5.4.2. Valoración.

Tomar de 25 a 100 ml de filtrado (con contenido en cloro inferior a 150 mg) obtenido en 5.4.1.1., 5.4.1.2. ó 5.4.1.3. e introducirlo en un erlenmeyer, diluir si es necesario, hasta 50 ml con agua. Añadir 5 ml de ácido nítrico, 20 ml de solución saturada de sulfato amónico férrico y dos gotas de la solución de sulfocianuro amónico, añadidas mediante una bureta llena hasta el trazo de cero. Añadir seguidamente mediante una bureta la solución de nitrato de plata hasta un exceso de 5 ml. Añadir 5 ml de éter etílico y agitar fuertemente para recoger el precipitado. Valorar el exceso de nitrato de plata mediante la solución de sulfocianuro amónico hasta que el viraje a rojo oscuro persista durante un minuto.

5.5. CALCULOS

La cantidad de cloro (p) expresado en cloruro de sodio presente en el volumen del filtrado separado para la valoración, viene dada por la fórmula:

$$P = 5{,}845\ (V_1 - V_2)\ mg$$

siendo:

V_1 = volumen, en ml, de solución de nitrato de plata añadida.

V_2 = volumen, en ml, de solución de sulfocianuro amónico 0,1N utilizados en la valoración.

Efectuar un ensayo en blanco sin la muestra a analizar y si consume solución de nitrato de plata 0,1N restar este valor al volumen $(V_1 - V_2)$.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

5.6. OBSERVACIONES

Para los productos ricos en materias grasas, desengrasar previamente mediante éter etílico según 4(a).

5.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

6. HUMEDAD

6.1. PRINCIPIO

La muestra se deseca en condiciones definidas, variando en función de la naturaleza del producto. La pérdida de masa es determinada por pesada. Es necesario proceder a una predesecación cuando se trata de sustancias sólidas, con un contenido elevado de humedad. No es aplicable a los productos derivados de la leche considerados como piensos simples, sustancias minerales, piensos compuestos constituídos esencialmente de sustancias minerales y semillas y frutos oleaginosos. Para los cereales y sus productos, excepto productos de cereales hidrolizados y raicilla de cebada (6.3.2.2.), se aplicará el método oficial para Cereales y Derivados.

6.2. MATERIAL Y APARATOS

6.2.1. Molino triturador, fácil de limpiar, que permita una trituración rápida y uniforme, sin provocar calentamientos sensibles, ni condensaciones, evitando al máximo el contacto con el aire.

6.2.2. Balanza analítica de precisión 0,5 mg.

6.2.3. Recipientes secos de metal inoxidable o de vidrio, provistos de una tapa que asegure un cierre estanco; superfie útil que permita obtener una distribución de la muestra del orden de 0,3 g por cm^2.

6.2.4. Estufa isotérmica (± 1 °C) de calefacción eléctrica, que asegure una regulación rápida de temperatura y convenientemente ventilada.

6.2.5. Estufa de vacío, de calefacción eléctrica regulable, provista de una bomba de aceite o de un dispositivo de introducción de aire caliente deshidratado o de un deshidratante.

6.2.6. Desecador con placa de metal o porcelana, que contenga un deshidratante eficaz.

6.3. PROCEDIMIENTO

6.3.1. Preparación de la muestra.

6.3.1.1. Todas las muestras a excepción de las mencionadas en 6.3.1.2.

Separar previamente por lo menos 50 g de la muestra, triturándola o tratándola previamente de forma apropiada, si fuera necesario, para evitar toda variación del contenido en humedad.

6.3.1.2. Alimentos líquidos o pastosos, constituídos esencialmente por materias grasas.

Separar previamente y pesar, con aproximación de 10 mg alrededor de 25 g de muestra. Añadir una cantidad apropiada de arena anhidra, pesada con aproximación de 10 mg y mezclar hasta obtener un producto homogéneo.

6.3.2. Desecación.

6.3.2.1. Todos los alimentos a excepción de los mencionados en 6.3.2.2.

Tarar, con aproximación de 0,5 mg, un recipiente provisto con tapa. Pesar, con aproximación de 1 mg, en el recipiente tarado unos 5 g de muestra y repartirla uniformemente. Colocar el recipiente, sin tapa, en una estufa previamente calentada a 103 °C. Para evitar que la temperatura de la estufa no descienda demasiado, introducir el recipiente con rapidez. Dejar secar durante cuatro horas a partir del momento en que la estufa alcance de nuevo la temperatura de 103 °C. Colocar la tapa sobre el recipiente, retirarlo de la estufa, dejar enfriar de 30 a 45 minutos en un desecador y pesar con aproximación de 1 mg.

En el caso de muestras constituidas esencialmente por materias grasas, efectuar una desecación complementaria de 30 minutos en la estufa a 103 °C la diferencia entre las dos pesadas no debe exceder de 0,1 por 100 de humedad.

6.3.2.2. Piensos compuestos que contengan más del 4 por 100 de sacarosa o de lactosa, productos de cereales hidrolizados, raicilla de cebada, garrofa, cabeza de remolacha, azúcares y solubles de pescado y piensos

compuestos que contengan más del 25 por 100 de sales minerales con agua de cristalización.

Tarar, con una aproximación de 0,5 mg, un recipiente con tapa. Pasar, con una aproximación de 1 mg en el recipiente tarado aproximadamente 5 g de muestra y repartirla uniformemente. Colocar el recipiente en la estufa de vacío previamente calentada a una temperatura de 80 a 85 °C, sin tapa. Para evitar que la temperatura de la estufa descienda demasiado, introducir el recipiente con rapidez. Llevar la presión a 100 Torrs, y dejar secar a esta presión durante cuatro horas, bajo una corriente de aire seco y caliente o con la ayuda de un deshidratante (300 g aproximadamente para 20 muestras). En este último caso, cortar la conexión con la bomba de vacío cuando la presión prescrita se alcance. Contar el tiempo de secado a partir del momento en que la estufa alcance de nuevo la temperatura de 80 a 85 °C. Llevar con precaución la estufa a la presión atmosférica.

Abrir la estufa, tapar inmediatamente el recipiente y sacarlo. Dejar enfriar durante 30 a 45 minutos en el desecador y pesar con una proximación de 1 mg. Proceder a una desecación complementaria de 30 minutos en la estufa de vacío a la temperatura de 80 a 85 °C y pesar de nuevo. La diferencia entre las dos pesadas no debe exceder de 0,1 por 100 de humedad.

6.3.3. Predesecación.

Los alimentos sólidos, cuyo contenido en humedad sea elevado y hagan la molienda difícil deben ser predesecados como se indica a continuación:

Pesar con una aproximación de 10 mg unos 50 g de muestra no molida (si es necesario puede hacerse una división previa en el caso de gránulos o aglomerados) en un recipiente adecuado.

Dejar secar en una estufa, a la temperatura de 60 a 70 °C, hasta que el contenido en humedad sea reducido a un valor comprendido entre 8 y 12 por 100.

Retirar de la estufa, dejar enfriar al aire en el laboratorio durante una hora y pesar con una aproximación de 10 mg. Triturar inmediatamente después como se indica en 6.3.1. y efectuar la desecación como en 6.3.2.1.

6.4. CALCULOS

El contenido en humedad, en tanto por ciento de muestra, se obtiene por las fórmulas siguientes:

6.4.1. Desecación sin predesecación.

$$\frac{100}{M}(M - m)$$

siendo:

M = masa inicial, en g, de la muestra.
m = masa, en g, de la muestra seca.

6.4.2. Desecación con predesecación.

$$\left(\frac{(M' - m)M}{M'} + E - M\right)\frac{100}{E} = 100\left(1 - \frac{M\,m}{EM'}\right)$$

siendo:

E = masa inicial, en g, de la muestra.
M = masa, en g, de la muestra predesecada.
M' = masa, en g, de la muestra después de la molienda
m = masa, en g, de la muestra seca.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones simultáneas efectuadas sobre una misma muestra no debe sobrepasar el 0,2 por 100 de humedad.

6.5. REFERENCIAS

Segunda Directiva de la Comisión de 18 de noviembre de 1971. (71/393 /CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 279 de 20 de diciembre de 1971.

7. CELULOSA BRUTA

7.1. PRINCIPIO

El método permite determinar, en la alimentación animal, las materias orgánicas exentas de grasas e insolubles en medio ácido y en medio alcalino, convencionalmente designadas bajo el nombre de celulosa bruta.

La muestra desengrasada se trata sucesivamente con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de potasio de concentraciones fijadas. Separar el residuo filtrando sobre amianto, lavar, secar, pesar y calcinar a 900 °C. La pérdida de peso resultante de la calcinación corresponde a la fibra bruta.

7.2. MATERIAL Y APARATOS

7.2.1. Vasos de 600 ml de capacidad graduadas de 200 en 200 ml.

7.2.2. Discos de porcelana de 80 mm de diámetro con un espesor de unos 4 mm, perforadas con 32 orificios de 4 mm de diámetro aproximadamente.

7.2.3. Matraces de vacío de 2 l de capacidad con tapón de goma marcados con trazo de referencia al nivel de los 800 ml provistos de un embudo de vidrio de 120 mm de diámetro.

7.2.4. Placas filtrantes, de 40 mm de diámetro y 4 mm de espesor, de borde oblicuo adaptado al cono del embudo (7.2.3.), perforadas con 16 orificios de unos 4 mm de diámetro aproximadamente y recubiertas de una rejilla metálica de 1 mm de malla aproximadamente. Las placas y las rejillas metálicas deben ser inalterables a los ácidos y a los álcalis.

7.2.5. Crisoles de platino o cuarzo para la incineración.

7.2.6. Horno de mufla con termostato.

7.2.7. Desecador.

7.2.8. Filtro de amianto: Poner 2 g de amianto en suspensión (7.3.2.) en 100 ml de agua. Filtrar a vacío sobre placa filtrante recubierta de rejilla metálica (7.2.4.) y colocada en el embudo del matraz de vacío (7.2.3.). Recoger el filtrado y filtrarlo de nuevo en el mismo filtro. Eliminar el filtrado.

7.2.9. Estufa.

7.3. REACTIVOS

7.3.1. Acido sulfúrico 0,26N.

7.3.2. Amianto tratado: Añadir al amianto unas cinco veces su peso en ClH diluído (1 vol. de ClH (d = 1,19) + 3 vol. de agua).

Hervir la mezcla durante unos 45 minutos, dejar enfriar y filtrar sobre embudo Büchner. Lavar el residuo con agua hasta ausencia de acidez en el filtrado. Lavar a continuación con la acetona (7.3.6.). Secar el amianto en la estufa y calcinar después durante 2 h a 900 °C. Dejar enfriar en desecador y conservar en un frasco cerrado.

7.3.3. Emulsión antiespuma.

7.3.4. Solución de hidróxido de potasio 0,23N.

7.3.5. Acido clorhídrico 0,5N.

7.3.6. Acetona pura.

7.3.7. Eter dietílico puro.

7.4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con aproximación de 1 mg, 3 g de muestra y 2 g de amianto tratado en un vaso de 600 ml de capacidad. Añadir 200 ml de ácido sulfúrico 0,26N y unas gotas de emulsión antiespuma. Llevar rápidamente a ebullición y dejarla hervir durante 30 minutos exactos. Para mantener el volumen constante, cubrir el vaso con un dispositivo refrigerador, tal como un matraz de fondo redondo de 500 ml sometido a una circulación de agua fría. Interrumpir la ebullición añadiendo 50 ml de agua fría y filtrar inmediatamente en un filtro de amianto.

Lavar el residuo con 100 ml de agua muy caliente, cinco veces, para obtener un volumen final de filtrado de 800 ml. Transferir cuantitativamente el residuo al vaso provisto de un disco de porcelana para regular la ebullición. Añadir 200 ml de solución de hidróxido de postasio 0,23N. Llevar rápido a ebullición y dejar hervir durante 30 minutos exactos. Añadir 50 ml de agua fría y filtrar al vacío sobre un nuevo filtro de amianto, preparado según 7.2.8. Lavar el residuo con agua muy caliente hasta la neutralidad de las aguas de lavado (prueba con papel de tornasol). Deshidratar lavando tres veces con acetona usando un volumen total de unos 100 ml.

Transferir cuantitativamente el residuo a un crisol, disgregarlo si es necesario, y secarlo a 130 °C hasta obtener un peso constante.

Dejar enfriar en desecador y pesar rápido. Introducir a continuación el crisol en el horno de mufla (7.2.6.) y dejar calcinar durante 30 minutos a 900 °C. Dejar enfriar en desecador y pesar rápidamente.

Hacer un ensayo en blanco aplicando el mismo método operativo con amianto tratado (7.3.2.) en ausencia de la muestra. La pérdida de peso resultante de la calcinación de los 6 g de amianto no debe ser superior a 10 mg.

7.5. CALCULOS

El contenido en celulosa bruta en tanto por ciento de muestra viene dado por la fórmula:

$$\text{Celulosa bruta \%} = \frac{(a - b) \times 100}{3}$$

Siendo:

a = Pérdida de peso debida a la calcinación, en la muestra.

b = Pérdida de peso debida a la calcinación, en el ensayo en blanco.

La diferencia entre dos determinaciones simultáneas efectuadas sobre la misma muestra no debe ser superior a:

- 0,3 en valor absoluto, para los contenidos en celulosa bruta inferiores a 10 por 100.

- 3 por 100 en valor relativo para los contenidos en celulosa bruta iguales o superiores al 10 por 100.

7.6. OBSERVACIONES

7.6.1. Las muestras conteniendo más de un 10 por 100 de materia grasa deben desengrasarse con éter etílico antes del análisis. Para ello colocar la muestra (3 g ± 1 mg sobre un filtro de amianto. Añadir unos 50 ml de éter dietílico y filtrar con vacío. Repetir la operación dos veces más. Trasferir cuantitativamente la muestra desengrasada y el amianto a un vaso de 600 ml, continuando el análisis como se ha descrito anteriormente.

7.6.2. Las muestras con contenido en materias grasas protegidas por recubrimiento deben ser desengrasadas como se indica en 7.6.1. y sometidas, además a un nuevo desengrasado después del lavado del residuo proveniente del ataque del ácido. Para esto lavar el residuo de este ataque tres veces con acetona (en total 100 ml), después tres veces con 50 ml de éter dietílico. Trasferir a continuación cuantitativamente el residuo a un vaso de 500 ml y proseguir el análisis como se ha indicado anteriormente.

7.6.3. En el caso de muestras ricas en calcio (más de 2 por 100 de calcio) sustituir el tratamiento de ácido sulfúrico por el de ácido clorhídrico. Pesar 3 g ± 1 mg de muestra en un vaso y 2 g de amianto calcinado introduciéndolos en un vaso de 600 ml. Añadir 100 ml de ClH 0,5N y unas gotas de emulsión antiespuma. Dejar reposar durante 5 minutos. Proceder a continuación como se ha indicado anteriormente.

7.7. REFERENCIAS

Cuarta Directiva de la Comisión, de 5 de diciembre de 1972, (73/46/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 83 de 30 de marzo de 1973.

8. AZUCARES

8.1. PRINCIPIO

El método permite determinar los azúcares reductores y los azúcares totales previa inversión, expresados en glucosa o, en su caso, en sacarosa, por conversión con ayuda del factor 0,95. Este método es aplicable a los piensos compuestos. Se preveen modalidades especiales para otros alimentos. En su caso, procede determinar por separado la lactosa y tenerlo en cuenta al calcular los resultados.

Defecación a apartir de las soluciones de Carrez I y II, previa disolución de los azúcares en etanol diluído. Eliminación del etanol y valoración antes y después de la inversión según el método de Luff-Schoorl.

8.2. MATERIAL Y APARATOS

Agitador mecánico.

8.3. REACTIVOS

8.3.1. Etanol al 40 por 100 (v/v) (d = 0,948 a 20 °C).

8.3.2. Solución Carrez I. Disolver en agua 24 g de acetato de cinc dihidrato y 3 ml de ácido acético glacial y añadir agua destilada hasta 100 ml.

8.3.3. Solución Carrez II. Disolver en agua 10,6 g hexaciano ferrato (II) de potasio ($K_4(FeCN_6).3H_2O$) y añadir agua destilada hasta 100 ml.

8.3.4. Solución de naranja de metilo al 0,1 por 100 (p/v).

8.3.5. Acido clorhídrico 4N.

8.3.6. Acido clorhídrico 0,1N.

8.3.7. Solución de hidróxido de sodio 0,1N.

8.3.8. Solución de sulfato de cobre II. Disolver 25 g de sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) p.a., exento de hierro, en 100 ml de agua.

8.3.9. Solución de ácido cítrico. Disolver 50 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7.H_2O$)) p.a. en 50 ml de agua.

8.3.10. Solución de carbonato de sodio. Disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) p.a. en 300 ml de agua caliente, dejar enfriar.

8.3.11. Solución de tiosulfato de sodio 0,1N.

8.3.12. Solución de almidón. Añadir una mezcla de 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua, a un litro de agua hirviendo. Dejar hervir durante 3 minutos. Dejar enfriar. Añadir 10 mg de ioduro de mercurio (II) como agente conservador.

8.3.13. Acido sulfúrico 6N.

8.3.14. Solución de ioduro de potasio (KI) al 30 por 100 (p/v).

8.3.15. Piedra pómez hervida con ácido clorhídrico y aclarada con agua.

8.3.16. Isopentanol.

8.3.17. Reactivo de Luff-Schoorl.- Verter agitando con cuidado la solución de ácido cítrico (8.3.9.) sobre la solución de carbonato de sodio (8.3.10.). Añadir inmediatamente la solución de sulfato de cobre (8.3.8.) y completar a un litro con agua. Dejar reposar una noche y filtrar. Controlar la normalidad del reactivo obtenido (Cu 0,1N; Na_2CO_3 2N). El pH de la solución debe ser aproximadamente 9,4.

8.4. PROCEDIMIENTO

8.4.1. Preparación de la muestra.- Pesar con aproximación de 1 mg 2,5 g de la muestra, e introducirlo en un matraz aforado de 250 ml. Añadir 200 ml de etanol al 40 por 100 (v/v) y mezclar durante una hora en el agitador. Añadir 5 ml de la solución Carrez I y agitar durante un minuto, adicionar y agitar durante el mismo tiempo con 5 ml de la solución de Carrez II.

Enrasar a 250 ml con la solución de etanol 8.3.1., homogeneizar y filtrar. Tomar 200 ml del filtrado y evaporar aproximadamente hasta la mitad del volumen, a fin de eliminar la mayor parte del etanol. Trasvasar en su totalidad el residuo de evaporación con ayuda de agua caliente a un matraz aforado de 200 ml y enfriar, a continuación enrasar con agua y filtrar si es necesario. Esta solución será utilizada para la determinación de azúcares reductores y después de la inversión para la determinación de azúcares totales.

8.4.2. Determinación de azúcares reductores.- Tomar como máximo 25 ml de la solución preparada según 8.4.1. y que contenga menos de 60 mg de azúcares reductores, expresado en glucosa. Si es necesario, completar el volumen hasta 25 ml con agua destilada y determinar la cantidad de azúcares reductores según Luff-Schoorl. El resultado será expresado en tanto por ciento de glucosa.

8.4.3. Determinación de azúcares totales previa inversión.- Tomar 50 ml de la solución 8.4.1. y llevar a un matraz aforado de 100 ml. Añadir unas gotas de la solución naranja de metilo y adicionar lentamente agitando solución de ácido clorhídrico 4N hasta viraje a rojo. Añadir 15 ml de ácido clorhídrico 0,1N y sumergirlo en un baño de agua caliente a ebullición durante treinta minutos. Refrigerar hasta 20 °C y añadir a continuación 15 ml de la solución de hidróxido de sodio 0,1N (8.3.7). Enrasar a 100 ml con agua y homogeneizar.

Tomar una cantidad que no exceda de 25 ml y contenga menos de 60 mg de azúcares reductores expresado en glucosa. Si es necesario completar el volumen hasta 25 ml con agua destilada y determinar la cantidad de azúcares reductores según Luff-Schoorl. El resultado será expresado en tanto por ciento de glucosa. De expresarlo en sacarosa se debe de multiplicar por el factor 0,95.

8.4.4. Valoración de Luff-Schoorl.- Tomar 25 ml del reactivo Luff-Schoorl (8.3.17.) y llevarlo a un erlenmeyer de 300 ml añadir 25 ml exactamente medidos de la solución defecada de azúcares, adicionar un poco de piedra pómez y calentar agitando sobre la llama del mechero. Colocar inmediatamente el erlenmeyer sobre una tela metálica, perforada por una abertura de 6 cm de diámetro y regulando la llama de manera que solamente el fondo del erlnmeyer sea calentado. Adaptar enseguida un refrigerante de refluyo sobre el erlenmeyer, a partir de este momento hacer hervir la solución y mantener en ebullición durante diez minutos exactamente. Refrigerar inmediatamente al chorro de agua fria durante cinco minutos y proceder a su valoración como sigue:

Añadir 10 ml de la solución de ioduro de potasio (8.3.14.) inmediatamente después y con cuidado 25 ml de ácido sulfúrico 6N (8.3.13.). Valorar a continuación mediante la solución de tiosulfato de sodio 0,1N (8.3.9.) hasta la aparición de color amarillo, añadir en este momento la solución de almidón y terminar de valorar.

Efectuar la misma valoración sobre una mezcla que contenga 25 ml exactamente medidos del reactivo de Luff-Schoorl, 25 ml de

agua, 10 ml de la solución de ioduro de potasio (8.3.14.) y 25 ml de la solución de ácido sulfúrico 6N (8.3.13.) sin llevar a ebullición.

8.5. CALCULOS

Establecer por medio de la tabla I la cantidad de glucosa en mg correspondiente a la diferencia entre las dos valoraciones, según los ml de tiosulfato de sodio 0,1N gastados en cada una de las valoraciones.

Expresar los resultados en tanto por ciento de la muestra.

8.6. OBSERVACIONES

8.6.1. En caso de piensos muy ricos en melazas o piensos poco homogéneos, pesar 20 g e introducirlos en un matraz aforado de un litro con 500 ml de agua. Mezclar durante una hora en el agitador. Defecar mediante los reactivos de Carrez I y II (8.3.2.) y (8.3.3.) como se describe en 8.4.1., utilizando de todos los reactivos dosis cuatro veces superiores. Llevar a 1000 ml con etanol del 80 por 100 (v/v) (8.3.1.). Homogeneizar y filtrar, a continuación eliminar el etanol según (8.4.1.).

En ausencia de almidón exento de productos de hidrolizado, enrasar a 1000 ml con agua destilada.

8.6.2. En el caso de melazas y piensos simples, ricos en azúcares y prácticamente exentos de almidón, pesar 5 g e introducirlos en un matraz aforado de 250 ml, añadir 200 ml de agua destilada y mezclar durante una hora o más en el agitador. Defecar inmediatamente por medio de los reactivos de Carrez I y II, (8.3.2.) y (8.3.3.), según (8.4.1.).

Llevar a 250 ml con agua, homogeneizar y filtrar, para determinar los azúcares totales, proseguir como (8.4.3.).

8.6.3. Es recomendable añadir aproximadamente 1 ml de isopentanol (sin tener en cuenta el volumen) antes de la ebullición, con el reactivo Luff-Schoorl para evitar la formación de espuma.

8.6.4. La diferencia entre la cantidad de azúcares totales después de la inversión, expresada en glucosa y la cantidad de azúcares reductores expresada igualmente en glucosa, multiplicada por 0,95 de la cantidad en tanto por ciento de sacarosa.

8.6.5. Para calcular la cantidad de azúcares reductores, excluyendo la lactosa, se puede determinar de las siguientes formas:

8.6.5.1. Para un cálculo aproximado, multiplicar por 0,675 la cantidad de lactosa obtenida, por determinación separada, y restar el resultado otenido de la cantidad en azúcares reductores.

8.6.5.2. Para el cálculo preciso de azúcares reductores, excluyendo la lactosa, es necesario partir de la misma muestra (8.4.1.) para las dos determinaciones finales. Uno de los análisis es efectuado a partir de la solución obtenida en (8.4.1.) y el otro sobre una parte de la solución obtenida para la valoración de la lactosa según el método para la determinación de lactosa.

En los casos (8.6.5.1.) y (8.6.5.2.) la cantidad de azúcares presentes se determinan según el método de Luff-Schoorl, expresado en mg de glucosa.

La diferencia entre los dos valores se expresa en tanto por ciento de la muestra.

8.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

TABLA 1

Para 25 ml de reactivo Luff-Schoorl

$Na_2S_2O_3$ 0,1N	Glucosa fructosa azúcares invertidos $C_6H_{12}O_6$		Lactosa $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltosa $C_{12}H_{22}O_{11}$	
ml	mg	diferencia	mg	diferencia	mg	difer.
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2		88,0		94,6	

9. ACIDEZ DE LA GRASA

Esta determinación será aplicable a aquéllas grasas que se utilicen como materia prima.

El procedimiento será el que figura en el método Nº 10 de los Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas aprobados por Orden de 31 de enero de 1977 (Boletín Oficial del Estado de 14 de julio de 1977).

En el caso de que fuera necesario preparar la muestra se seguirá el procedimiento recogido en el método Nº 1 de la mencionada Orden.

10. CALCIO

10.1. PRINCIPIO

El método permite determinar el contenido en calcio total de los piensos.

La muestra se incinera, las cenizas se tratan con ácido clorhídrico y el calcio se precipita en forma de oxalato de calcio. Después de disolver el precipitado en ácido sulfúrico, el ácido oxálico formado se valora mediante una solución de permanganato de potasio.

10.2. MATERIAL Y APARATOS

10.2.1. Matraz aforado de 250 ml de capacidad.

10.2.2. Erlenmeyer de 250 ml de capacidad.

10.2.3. Crisol de platino, cuarzo o porcelana.

10.2.4. Crisoles filtrantes de vidrio, porosidad G_4.

10.2.5. Horno eléctrico con circulación de aire y regulador automático, para regular a 550 °C.

10.2.6. Baño de agua.

10.3. REACTIVOS

10.3.1. Acido clorhídrico d = 1,14, p.a.

10.3.2. Acido nítrico d = 1,40, p.a.

10.3.3. Acido sulfúrico d = 1,13, p.a.

10.3.4. Amoníaco d = 0,98, p.a.

10.3.5. Solución saturada de oxalato amónico en frío, p.a.

10.3.6. Solición al 30 por 100 (p/v) de ácido cítrico, p.a.

10.3.7. Solución al 5 por 100 (p/v) de cloruro de amonio, p.a.

10.3.8. Solución al 0,04 por 100 (p/v) de verde de bromocresol.

10.3.9. Solución de permanganato potásico; 0,1N, p.a.

10.4. PROCEDIMIENTO

Pesar con aproximación de 1 mg, 5 g de la muestra a analizar (o más si es necesario), calcinarla a 550 °C y trasvasar las cenizas a un erlenmeyer de 250 ml. Añadir 40 ml de ácido clorhídrico (10.3.1.), 60 ml de agua y algunas gotas de ácido nítrico (10.3.2.). Llevar a ebullición y mantenerlo así durante treinta minutos. Enfriar, trasvasar la solución a un matraz aforado de 250 ml, enjuagar el erlenmeyer y completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar.

Tomar con una pipeta según la cantidad presumible de calcio, una alícuota que contenga de 10 a 40 mg de calcio e introducirla en un erlenmeyer de 250 ml. Añadir 1 ml de la solución de ácido cítrico (10.3.6.) y 5 ml de solución de cloruro de amonio (10.3.7.). Completar el volumen a 100 ml aproximadamente con agua. Llevar a ebullición, añadiendo de 8 a 10 gotas de solución de verde de bromocresol (10.3.8.) y 30 ml de solución caliente de oxalato de amonio (10.3.5.). Si aparece un precipitado,

disolver éste mediante la adición de algunas gotas de ácido clorhídrico (10.3.1.).

Neutralizar después muy lentamente con amoniaco (10.3.4.), agitando constantemente, hasta obtener un pH 4,4-4,6 (viraje del indicador). Colocar el erlenmeyer en un baño de agua hirviendo durante treinta minutos, dejando reposar el precipitado formado. Retirarlo del baño, dejarlo reposar durante una hora y filtrar en un crisol filtrante G4. Lavar el erlenmeyer y el crisol con agua hasta la total eliminación del exceso de oxalato de amonio (la ausencia de cloruros en el agua de lavado indica que el lavado es suficiente).

Disolver el precipitado sobre el filtro con 50 ml de ácido sulfúrico caliente (10.3.3.), enjuagar el crisol con agua caliente hasta llevar el filtrado a 100 ml aproximadamente. Calentar a 70-80 °C y valorar mediante la solución de permanganato de potasio (10.3.9.) hasta la obtención de una coloración rosa persistente durante un minuto.

10.5. CALCULO

1 ml de permanganato de potasio 0,1N corresponde a 2,004 mg de calcio.

Expresar el resultado obtenido en tanto por ciento de la muestra.

10.6. OBSERVACIONES

10.6.1. Para pequeñas cantidades de calcio, proceder como en 10.5. Filtrar el precipitado de oxalato de calcio sobre un papel de filtro sin cenizas y calcinarlo en un crisol a 550 °C. Recuperar el residuo con algunas gotas de ácido sulfúrico (10.3.3.), evaporar a sequedad, calcinar de nuevo a 550 °C y pesar.

Si P representa el peso de sulfato cálcico obtenido, la cantidad en calcio de la alícuota tomada será igual a P x 0,2944.

10.6.2. Si la muestra está constituída exclusivamente de materias minerales, proceder a la disolución por ácido clorhídrico sin incineración previa, Para los productos tales que los fosfatos alumínico-cálcicos difíciles de disolver en los ácidos, proceder a una fusión alcalina antes de la disolución. Mezclar íntimamente en un crisol la parte tomada con cinco veces su peso de una mezcla compuesta en partes iguales de carbonato de potasio y de carbonato de sodio. Calentar con precaución hasta la fusión completa de la mezcla. Refrigerar y disolver con ácido clorhídrico.

10.6.3. Si la cantidad en magnesio de la muestra es elevada, proceder a una segunda precipitación de oxalato de calcio.

10.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

11. GRASA
(En productos lácteos reengrasados)

11.1. PRINCIPIO

Determinación de la grasa por el método Gerber.

11.2. MATERIAL Y APARATOS

11.2.1. Butirómetros contrastados, con graduaciones de 0 a 6% de grasa y con divisiones del 0,1%. Se pueden utilizar butirómetros con graduaciones de 0 a 5% y divisiones del 0,1%, cuando la muestra tenga un contenido en grasa inferior al 5%.

11.2.2. Tapones troncocónicos de goma u otro tipo, apropiados.

11.2.3. Pipetas contrastadas de 1 y 10 ml.

11.2.4. Vidrios de reloj.

11.2.5. Baño de agua regulable a 65 ° ± 1 °C.

11.2.6. Centrífuga capaz de alcanzar 1.200 r.p.m.

11.2.7. Embudo desprovisto de cuello y vástago, para la introducción de la muestra en el butirómetro.

11.3. REACTIVOS

11.3.1. Acido sulfúrico de densidad d = 1,82.

11.3.2. Alcohol isoamílico de densidad d = 0,815 e intervalo de destilación de 128 °C a 132°C.

11.4. PROCEDIMIENTO

11.4.1. Pesar, con precisión de 0,1 mg, 1,100 g de producto e introducirlo en el butirómetro a través del embudo. Añadir, a través del embudo, 10 ml de agua tibia (40 °C), arrastrando lo que haya podido adherirse al mismo. Tapar y agitar fuertemente para disolver la leche.

Seguidamente añadir 10 ml de ácido sulfúrico, haciéndolo resbalar suavemente por las paredes del butirómetro. Añadir 1 ml de alcohol isoamílico. Cerrar el butirómetro con el tapón de goma, agitar suavemente y centrifugar a 1.200 r.p.m. durante 3 a 5 minutos. Sacar el butirómetro de la centrífuga e introducir en el baño de agua a 65 °C. Dejar transcurrir algunos minutos y efectuar la lectura.

11.5. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Leer en el butirómetro, en la escala dividida, la altura que ha alcanzado la columna de grasa, habiéndose ajustado a cero el líquido que no contiene grasa. Los grados de la escala indican las decenas, y las décimas las unidades por ciento. Se puede apreciar perfectamente un 0,5%.

11.6. OBSERVACIONES

11.6.1. En el caso de sueros desprovistos de caseína, pueden producir carbonizaciones que dificultan la lectura (debido a que el ácido sulfúrico de densidad d = 1,82 resulta demasiado concentrado). En este caso se puede diluir al 10% (v/v) con agua destilada.

11.6.2. En los productos con grasa muy micronizada, conviene repetir por tres veces las centrifugaciones, el calentamiento a 65 °C y las lecturas, hasta obtener resultados constantes.

11.7. REFERENCIAS

Instituto de Racionalización y Normalización del Trabajo. Una Norma Española, 64.029.

12. CENIZAS BRUTAS

12.1. PRINCIPIO

Incineración de la muestra a 550 °C y pesada del residuo hasta peso constante.

12.2. MATERIAL Y APARATOS

12.2.1. Placa calefactora.

12.2.2. Horno eléctrico con regulación de temperatura.

12.2.3. Crisoles de platino o cuarzo, rectangulares (60 x 40 x 25 mm) o redondos (diámetro: 60 a 75 mm, altura: 20 a 25 mm).

12.2.4. Nitrato de amonio: Solución al 20 % (p/v).

12.3. PROCEDIMIENTO

Pesar alrededor de 5 g de muestra, con una aproximación de 1 mg (para los productos que tengan tendencia a "esponjarse" pesar 2,5 g en un crisol previamente calcinado y tarado. Colocar el crisol sobre la placa calefactora hasta carbonización de la muestra. Introducir el crisol en el horno regulado a 550 ± 5 °C. Mantener a esta temperatura hasta la obtención de cenizas blancas, gris claro o rojizas, aparentemente desprovistas de partículas carbonosas. Colocar el crisol en un desecador, dejar enfriar y pesar inmediatamente.

12.4. CALCULOS

El porcentaje de cenizas sobre materia natural se obtiene por la fórmula siguiente:

$$\text{Cenizas \% (materia natural)} = \frac{(P_1 - P_2)100}{P - P_2}$$

Siendo:

P = peso, en g, de la cápsula con la muestra.

P_1 = peso, en g, de la cápsula con las cenizas.

P_2 = peso, en g, de la cápsula vacía.

12.5. OBSERVACIONES

12.5.1. Las materias difíciles de incinerar deben someterse a una primera incineración de tres horas, se enfrían y se les adiciona algunas gotas de una solución al 20% de nitrato de amonio. Continuando la incineración después de la desecación en estufa.

Repetir eventualmente la operación hasta incineración completa.

12.5.2. Para las materias resistentes al tratamiento anterior, operar como sigue: Después de una incineración de tres horas, arrastrar las cenizas con agua caliente y filtrar sobre un

pequeño filtro de cenizas conocidas. Incinerar el filtro y su contenido en el crisol inicial.

Llevar el filtrado al crisol frío, evaporar a sequedad, incinerar y pesar.

12.5.3. En el caso de aceites y grasas, pesar 25 g en un crisol de capacidad apropiada. Carbonizar inflamando la muestra por medio de una mecha de papel de filtro sin cenizas. Después de la combustión humedecer con la mínima cantidad de agua posible. Desecar y continuar como se indica en 12.5.

12.6. REFERENCIAS.

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

13(a). BASES NITROGENADAS VOLATILES (nitrogéno amoniacal) (Por microdifusión)

13(a).1. PRINCIPIO

El método permite determinar el contenido en bases nitrogenadas volátiles, expresadas en amoníaco, de los piensos para animales.

La muestra se extrae con agua, la solución se defeca y se filtra. La bases nitrogenadas volátiles se desplazan con una solución de carbonato de potasio por microdifusión, se recogen en una solución de ácido bórico y se valora con ácido sulfúrico.

13(a).2. MATERIAL Y APARATOS

13(a).2.1. Mezclador: de aproximadamente 35 a 40 oscilaciones por minuto.

13(a).2.2. Células de Conway (v. esquema), de vidrio o de material plástico.

13(a).2.3. Microburetas, graduadas a 1/100 ml.

13(a).3. REACTIVOS

13(a).3.1. Solución al 20% (p/v) de ácido tricloroacético.

13(a).3.2. Indicador: disolver 33 mg de verde de bromocresol y 65 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol al 95-96%.

13(a).3.3. Solución de ácido bórico. En un matraz aforado de 1 litro, disolver 10 g de ácido bórico p.a. en 200 ml de etanol al 95-96% y 700 ml de agua. Añadir 10 ml de indicador (13(a).3.2.). Mezclar y ajustar si fuera necesario, la coloración de la solución al rojo claro por adición de una solución de hidróxido de sodio. 1 ml de esta solución permite fijar como máximo 300 g de NH_3.

13(a).3.4. Solución saturada de carbonato de potasio:disolver 100 g de carbonato de potasio p.a. en 100 ml de agua en ebullición. Dejar enfriar y filtrar.

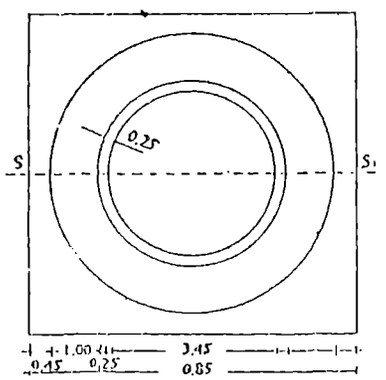
13(a).3.5. Acido sulfúrico 0,02N.

13(a).4. PROCEDIMIENTO

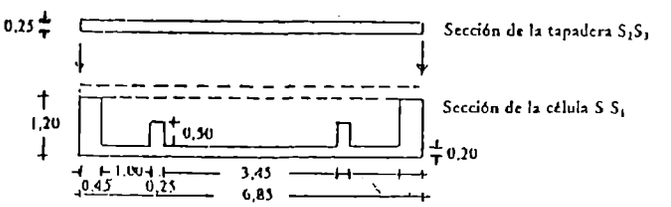
Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de la muestra e introducirlos en un matraz aforado de 200 ml con 100 ml de agua. Mezclar durante 30 minutos en el mezclador. Añadir 50 ml de solución de ácido tricloroacético (13(a).3.1.), completar al volumen con agua, agitar vigorosamente y filtrar sobre un filtro de pliegues.

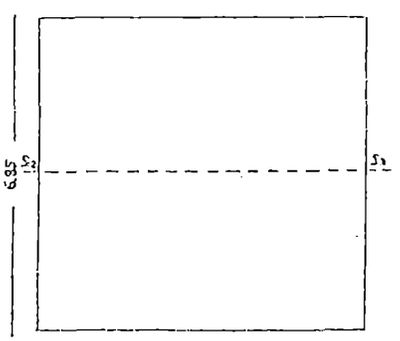
CÉLULA DE CONWAY

Escala 1/1



Plano de la célula





Plano de la tapadera de cristal esmerilado

Introducir con la pipeta en la parte central de la célula de Conway 1 ml de solución de ácido bórico (13(a).3.3.) y en la corona de la célula 1 ml del filtrado de la muestra. Cubrir parcialmente con ayuda de la tapa engrasada. Dejar caer rapidamente en la corona 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio (13(a).3.4.) y cerrar la tapa herméticamente. Remover con precaución la célula proporcionándole un movimiento de rotación al plano horizontal, con objeto de garantizar la mezcla de los dos reactivos. Dejar incubar bien durante cuatro horas por lo menos a la temperatura ambiente o bien durante una hora a 40 °C.

Valorar las bases volátiles en la solución de ácido bórico con ácido sulfúrico 0,02N (13(a).3.5.) empleando una microbureta (13(a).2.3.).

Efectuar una prueba en blanco aplicando el mismo método operatorio.

13(a).5. CALCULO DE LOS RESULTADOS

1 ml de ácido sulfúrico 0,02N corresponde a 0,34 mg de amoníaco.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder del 10% en valor relativo para los contenidos en amoníaco inferiores al 1,0%; 0,1 en valor absoluto para los contenidos en amoníaco iguales o superiores al 1,0%.

13(a).6. OBSERVACIONES

Si el contenido en amoníaco de la muestra fuera superior al 0,6% diluir el filtrado inicial.

13(a).7. REFERENCIAS

Segunda Directiva de la Comisión de 18 de noviembre de 1971. (71/393/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 279 de 20 de diciembre de 1971.

13(b). BASES NITROGENADAS VOLATILES (Por destilación)

13(b).1. PRINCIPIO

El método permite determinar el contenido de bases nitrogenadas volátiles, expresadas en amoniaco, de las harinas de pescado que no contengan prácticamente urea. Unicamente es aplicable para contenidos en amoníaco inferiores al 0,25%.

La muestra se extrae con agua, la solución se defeca y se filtra. Las bases nitrogenadas volátiles se desplazan por ebullición mediante adición de óxido de magnesio y se recogen en una cantidad conocida de ácido sulfúrico cuyo exceso se valora con una solución de hidróxido de sodio.

13(b).2. MATERIAL Y APARATOS

13(b).2.1. Mezclador: de 35 a 40 oscilaciones por minuto aproximadamente.

13(b).2.2. Aparato de destilación del tipo Kjeldahl.

13(b).3. REACTIVOS

13(b).3.1. Solución al 20% (p/v) de ácido tricloroacético.

13(b).3.2. Oxido de magnesio, p.a.

13(b).3.3. Emulsión de antiespuma (por ej. silicona).

13(b).3.4. Acido sulfúrico 0,1N.

13(b).3.5. Solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

13(b).3.6. Solución al 0;3% (p/v) de rojo de metilo en etanol del 95-96%.

13(b).4. PROCEDIMIENTO

Pesar con precisión de 1 mg, 10 g de la muestra e introducirlos con 100 ml de agua en un matraz aforado de 200 ml. Mezclar durante 30 minutos en el mezclador. Añadir 50 ml de solución de ácido tricloroacético (13(b).3.1.), completar el volumen con agua, agitar con fuerza y filtrar sobre un filtro de pliegues.

Tomar una cantidad de filtrado límpida en función del contenido supuesto en bases nitrogenadas volátiles (100 ml son suficientes, en general). Diluír en 200 ml y añadir 2 g de óxido de magnesio (13(b).3.2.) y algunas gotas de emulsión antiespuma (13(b).3.3.). La solución debe ser alcalina en el papel de tornasol; si no lo es, añadir óxido de magnesio (13(b).3.2.). Destilar 150 ml aproximadamente de la solución en un aparato del tipo Kjeldahl y recoger el destilado en un erlenmeyer que contenga un volumen exactamente medido (25 a 50 ml) de ácido sulfúrico 0,1N (13(b).3.4.). Durante la destilación, evitar un recalentamiento de las paredes. Llevar la solución sulfúrica a ebullición durante 2 minutos, enfriar y valorar el exceso de ácido sulfúrico con la solución de hidróxido de sodio 0,1N (13(b).3.5.) en presencia del indicador rojo de metilo (13(b).3.6.).

Efectuar un ensayo en blanco aplicando el mismo método operatorio.

13(b).5. CALCULOS

1 ml de ácido sulfúrico 0,1N corresponde a 1,7 mg de amoníaco.

Expresar el resultado en porcentaje de muestra.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder, en valor relativo, del 10% de amoníaco.

13(b).6. REFERENCIAS

Segunda Directiva de la Comisión de 18 de noviembre de 1971. (71/393/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 279 de 20 de diciembre de 1971.

14. CARBONATOS

14.1. PRINCIPIO

Descomposición de los carbonatos mediante la acción del ácido clorhídrico y comparación del volumen de anhídrido carbónico desprendido frente a una cantidad conocida de carbonato cálcico medido en las mismas condiciones.

14.2. MATERIAL Y APARATOS

14.2.1. Aparato de Scheibler-Dietrich, según figura 14.1.

14.3. REACTIVOS

14.3.1. Acido clorhídrico, d = 1,10.

14.3.2. Carbonato de calcio.

14.3.3. Solución de ácido sulfúrico 0,1N o aproximado, coloreada con rojo de metilo.

14.4. PROCEDIMIENTO

Según la concentración en carbonatos de la muestra pesar: 0,5 g cuando la riqueza esté comprendida entre el 50% y 100% expresado en carbonato cálcico.

1 g cuando la riqueza esté comprendida entre el 10% y el 50% expresado en carbonato cálcico.

2 g a 3 g cuando la riqueza sea inferior al 10% expresado en carbonato cálcico.

Una vez pesada la cantidad idónea de muestra a analizar introducirla en el frasco (4) del aparato de Scheibler-Dietrich, el cual estará provisto de un pequeño tubo de material irrompible conteniendo 10 ml de la solución 14.3.1. Conectar a continuación el frasco con el aparato. Girar la llave (5) de tres vías de forma que el tubo (1) comunique con el exterior.

Por medio del tubo móvil (2), que está lleno de ácido sulfúrico coloreado (14.3.3.) y unido al tubo graduado (1), llevar el nivel del líquido a la graduación de cero. Girar la llave (5) de modo que haga comunicar los tubos (1) y (2) y comprobar el nivel a cero.

Previa inclinación del frasco (4), dejar pasar lentamente todo el ácido clorhídrico (14.3.3.) sobre la muestra. Igualar la presión bajando el tubo (2). Agitar el frasco (4) hasta que cese por completo el desprendimiento del gas carbónico.

Restablecer la presión reduciendo el líquido al mismo nivel en los tubos (1) y (2). Hacer la lectura pasados unos minutos, hasta que el volumen gaseoso permanezca constante.

Efectuar en las mismas condiciones un ensayo comparativo con 0,5 g de carbonato de calcio (14.3.2.).

14.5. CALCULOS

$$\% \ CO_3Ca = \frac{V \times 100}{T \times 2P}$$

Siendo:

V = volumen, en ml, de CO_2 desprendido por la muestra.

T = volumen, en ml, de CO_2 desprendido por 0,5 gramos de CO_3Ca (14.3.2.).

P = peso, en gramos, de la muestra.

14.6. OBSERVACIONES

14.6.1. Cuando la muestra tomada es superior a 2 gramos introducir previamente 15 ml de agua destilada en el frasco (4) y mezclar antes de comenzar el análisis. Emplear el mismo volumen de agua para el análisis comparativo.

14.6.2. Si se utiliza un aparato de un volumen diferente al de Scheibler-Dietrich, es necesario adaptar la cantidad de muestra tomada de la ebullición y la sustancia a comparar, así como, el cálculo de resultados.

14.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. 71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

15(a). AFLATOXINA B_1
(Cromatografía monodimensional en capa fina)

15(a).1. PRINCIPIO

Extracción de la aflatoxina B_1 con cloroformo. Purificación por cromatografía en columna con gel de sílice. Evaporación del eluato y disolución del residuo en cloroformo o con una mezcla de benceno y acetonitrilo. Cromatografía en capa fina y cuantificación por comparación con patrones o por fluorodensitometría. Confirmación de la aflatoxina B_1.

El método es aplicable a: tortas de cacahuete, de copra de linaza, de sésamo, de babassu y gérmenes de maíz, cereales y derivados, harina de guisantes, pulpa y fécula de patatas.

El límite de detección es de 0,0i mg/kg.

15(a).2. MATERIAL Y APARATOS

15(a).2.1. Triturador-mezclador.

15(a).2.2. Aparato para agitar o agitador magnético.

15(a).2.3. Filtros plegados, Schleicher y Schüll nº 588 o equivalente, diámetro: 24 cm.

15(a).2.4. Columnas para cromatografía (diámetro interior: 22 mm, longitud 300 mm), con grifo de teflón y de capacidad de 250 ml.

15(a).2.5. Aparato rotativo de evaporación en vacío, con matraz de 500 ml.

15(a).2.6. Frascos cónicos de 500 ml, con tapón esmerilado.

15(a).2.7. Equipo para cromatografía en capa fina.

15(a).2.8. Placas de vidrio para cromatografía en capa fina, 200 x 200 mm, preparadas de la siguiente manera (con las

cantidades indicadas se pueden recubrir cinco placas): introducir 30 g de gel de sílice G-HR (15(a).3.1.15.) en un frasco cónico, añadir 60 ml de agua, tapar y agitar durante un minuto. Extender la suspensión en las placas con objeto de obtener una capa uniforme de 0,25 mm de espesor. Dejar secar al aire y conservar después en un desecador provisto de gel de sílice. En el momento de su utilización, activar las placas manteniéndolas durante una hora en la estufa a 110 °C. Las placas ya listas para su utilización son prácticas en la medida en que dan resultados parecidos a los de las placas preparadas según se ha indicado.

15(a).2.9. Lámpara ultravioleta de ondas largas (360 nm). La intensidad de irradiación debe permitir distinguir, incluso con claridad, una mancha de 1,0 ng de aflatoxina B_1 en una placa para cromatografía en capa fina, a una distancia de 10 cm de la lámpara.

15(a).2.10. Tubos de 10 ml, graduados, con tapones de polietileno.

15(a).2.11. Espectrofotómetro ultravioleta.

15(a).2.12. Fluordensítometro (eventualmente).

15(a).3. REACTIVOS

15(a).3.1. Acetona.

15(a).3.2. Cloroformo estabilizado por 0,5 al 1% de etanol del 96% (v/v).

15(a).3.3. n-Hexano.

15(a).3.4. Metanol.

15(a).3.5. Eter dietílico anhidro, exento de peróxidos.

15(a).3.6. Mezcla de benceno y acetonitrilo 98/2 (v/v).

15(a).3.7. Mezcla de cloroformo (15(a).3.2.) y de metanol 97/3 (v/v).

15(a).3.8. Gel de sílice, para cromatografía en columna granulométrica 0,05 a 0,20 mm.

15(a).3.9. Algodón previamente desengrasado, mediante cloroformo, o lana de vidrio.

15(a).3.10. Sulfato de sodio anhidro.

15(a).3.11. Gas inerte, por ejemplo nitrógeno.

15(a).3.12. Solución de ácido clorhídrico 1N.

15(a).3.13. Solución de ácido sulfúrico al 50% (v/v).

15(a).3.14. Tierra de diatomeas lavada con ácido.

15(a).3.15. Gel de sílice para cromatografía en capa fina.

15(a).3.16. Solución patrón de 0,1 microgramos, aproximadamente de aflatoxina B_1 por mililitro en el cloroformo (15(a).3.2.) o en la mezcla de benceno/acetonitrilo (15(a).3.6.), preparada y controlada como se indica en (15(a).6.).

15(a).3.17. Solución patrón cualitativa de 0,1 microgramos aproximadamente de aflatoxina B_1 y B_2 por ml por el cloroformo (15(a).3.2.) o en la mezcla benceno/acetonitrilo (15(a).3.6.). Estas concentraciones se dan a título indicativo y deben ajustarse con objeto de obtener la misma intensidad de fluorescencia para las dos aflatoxinas.

15(a).3.18. Disolventes de desarrollo.

15(a).3.18.1. Cloroformo (15(a).3.2.) / acetona (15(a).3.1.): 9/1 (v/v), cubeta no saturada.

15(a).3.18.2. Eter dietílico (15(a).3.5.) / metanol (15(a).3.4.) /agua: 96/3/1 (v/v/v), cubeta no saturada.

15(a).3.18.3. Eter dietílico (15(a).3.5.) / metanol (15(a).3.4.) /agua: 94/4,5/1,5 (v/v/v), cubeta saturada.

15(a).3.18.4. Cloroformo (15(a).3.2.) / metanol (15(a).3.4.): 94/6 (v/v), cubeta saturada.

15(a).3.18.5. Cloroformo (15(a).3.2.) / metanol (15(a).3.4.): 97/3 (v/v), cubeta saturada.

15(a).4. PROCEDIMIENTO

15(a).4.1. Preparación de la muestra

Proceder como se indica en el método oficial nº 1.

Las muestras que contengan más de un 5% de materias grasas deben desengrasarse con éter de petróleo después de su preparación.

15(a).4.2. Extracción

Introducir 50,0 g de la muestra molida y homogeneizada en un frasco cónico de 500 ml (15(a).2.6.). Añadir 25 g de tierra de diatomeas (15(a).3.14), 25 ml de agua y 250 ml de cloroformo (15(a).3.2.). Tapar el frasco, sacudir o agitar durante 30 minutos con ayuda del aparato (15(a).2.2.) y filtrar mediante filtro plegado (15(a).2.3.). Eliminar los 10 primeros ml del resultado de la filtración y recoger a continuación 50 ml.

15(a).4.3. Purificación en columna

Proveer la extremidad inferior de la columna para cromatografía (15(a).2.4.) de un tapón de algodón o de lana de vidrio (15(a).3.9.), llenar los dos tercios del tubo de cloroformo (15(a).3.2.) y añadir 5 g de sulfato de sodio (15(a).3.10.).

Comprobar que la superficie superior de la capa de sulfato de sodio está plana; añadir a continuación, en pequeñas porciones, 10 g de gel de sílice (15(a).3.8.).

Remover con precaución después de cada adición con el fin de eliminar las burbujas de aire. Dejar que se pose durante 15 minutos y añadir seguidamente, con precaución, 15 g de sulfato de sodio (15(a).3.10.). Dejar descender el líquido hasta la proximidad inmediata de la superficie superior de la capa de sulfato de sodio.

Mezclar los 50 ml de extracto recogidos en (15(a).4.2.) con 100 ml de *n*-hexano (15(a).3.3.) y transvasar cuantitativamente la mezcla en la columna. Dejar descender el líquido hasta la superficie superior de la capa de sulfato de sodio. Eliminar el líquido filtrado. Añadir a continuación 100 ml de éter dietílico (15(a).3.5.) y dejar descender de nuevo el líquido hasta la superficie superior de la capa de sulfato de sodio. Durante estas operaciones, procurar que el flujo sea de 8 a 12 ml por minuto y que la columna no se vacíe. Eliminar los líquidos filtrados. Eluir después mediante 150 ml de la mezcla cloroformo/metanol (15(a).3.7.) y recoger la totalidad del eluído.

Evaporar éste casi a sequedad bajo una corriente de gas inerte (15(a).3.11.) y a una temperatura que no supere los 50 °C, mediante el aparato rotativo de evaporación en vacío (15(a).2.5.). Introducir cuantitativamente el residuo por medio de cloroformo (15(a).3.2.) o de la mezcla benceno/acetonitrilo (15(a).3.6.) en un tubo de 10 ml (15(a).2.10). Concentrar la solución bajo una corriente de gas inerte (15(a).3.11.) y llevar después el volumen a 2,0 ml por medio de clororformo (15(a).3.2.) o de la mezcla benceno/acetonitrilo (15(a).3.6.).

15(a).4.4. Cromatografía en capa fina

Depositar puntualmente en una placa para cromatografía en capa fina (15(a).2.8.), a 2 cm del borde inferior y a intervalos de 2 cm, los volúmenes de la solución patrón y del extracto indicados a continuación:

- 10, 15, 20, 30 y 40 microlitros de la solución patrón de aflatoxina B_1 (15(a).3.16).
- 10 microlitros del extracto obtenido en (15(a).4.3.) y, en superposición en el mismo punto, 20 microlitros de la solución patrón (15(a).3.).
- 10 y 20 microlitros del extracto obtenido en (15(a).4.3.).

Desarrollar el cromatograma fuera del alcance de la luz, con ayuda de uno de los disolventes de desarrollo (15(a).3.16)). La elección del disolvente debe determinarse previamente depositando en la placa 25 microlitros de la solución patrón cualitativa (15(a).3.17.) y asegurándose de que, durante el desarrollo, las aflatoxinas B_1 y B_2 están completamente separadas.

Dejar evaporar los disolventes fuera del alcance de la luz e irradiar a continuación mediante luz ultravioleta, colocando la placa a 10 cm de la lámpara (15(a).2.9.). Las manchas de aflatoxina B_1 dan una fluorescencia azul.

15(a).4.5. Determinaciones cuantitativas

Proceder a las determinaciones bien sea visualmente, o mediante fluorodensitometría según se indica a continuación.

15(a).4.5.1. Medidas visuales

Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del extracto comparando la intensidad de fluorescencia de las manchas del extracto con la de las manchas de la solución patrón. Interpolar si es necesario. La fluorescencia obtenida por superposición del extracto a la solución patrón debe ser más fuerte que la de los 10 microlitros de extracto y únicamente debe dar lugar a la percepción de una sóla mancha. Si la intensidad de fluorescencia dada por los 10 microlitros de extracto es más fuerte que la de los 40 microlitros de solución patrón diluir el extracto 10 ó 100 veces mediante cloroformo (15(a).3.2.) o mediante la mezcla de benceno/acetonitrilo (15(a).3.6.) antes de someterlo a una nueva cromatografía en capa fina.

15(a).4.5.2. Medidas por fluorodensitometría

Medir la intensidad de fluorescencia de las manchas de aflatoxina B_1 en el fluorodensitómetro (15(a). 2.12.) utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 443 nm. Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 de los depósitos del extracto y de la solución patrón.

15(a).4.6. Confirmación de la identidad de aflatoxina B_1

Confirmar la identidad de la aflatoxina B_1 del extracto mediante los siguientes procedimientos:

15(a).4.6.1. Tratamiento por ácido sulfúrico

Pulverizar ácido sulfúrico (15(a).3.13.) sobre el cromatrograma obtenido en (15(a).4.4). La fluorescencia de las manchas de aflatoxina B_1 debe virar del azul al amarillo bajo irradiación ultravioleta.

15(a).4.6.2. Cromatografía bidimensional que implique la formación de aflatoxina B_1- hemiacetal (aflatoxina B_2.

Las operaciones descritas en lo sucesivo deben llevarse a cabo siguiendo el esquema que aparece en la figura 3.

15(a).4.6.2.1. Aplicación de las soluciones

Trazar en una placa (15(a).2.8.) dos rectas paralelas a dos lados contiguos (distantes 6 cm de esos lados), destinadas a delimitar el desplazamiento de los frentes de disolventes. Depositar en una placa, con ayuda de pipetas capilares o de microjeringas, las soluciones indicadas a continuación:

- en el punto A: un volumen de extracto purificado de la muestra obtenida en (15(a).5.3.), que contenga 2,5 nanogramos aproximadamente de aflatoxina B_1;
- en los puntos B y C: 25 microlitros de la solución patrón (15(a)3.16.).

15(a).4.6.2.2. Desarrollo

Desarrollar el cromatrograma en la dirección I con ayuda del disolvente de desarrollo (15(a).3.18.1.) (capa de 1 cm en una cubeta no saturada), fuera del alcance de la luz, hasta que el frente de disolvente alcance la línea de delimitación. Retirar la placa de la cubeta y dejar secar durante cinco minutos fuera del alcance de la luz y a la temperatura ambiente. Pulverizar a continuación ácido clorhídrico (15(a). 3.12.) en una banda de 2,5 cm de altura que abarque los puntos A y B (indicada con trazos rayados en la figura 3), hasta su oscurecimiento, protegiendo el resto de la placa mediante una hoja de vidrio.

Dejar reaccionar durante diez minutos en la oscuridad y secar con ayuda de una corriente de aire a temperatura ambiente.

Desarrollar a continuación el cromatograma en la dirección II con ayuda del disolvente de desarrollo (15(a).3.18) (capa de 1 cm en una cubeta no saturada), fuera del alcance de la luz, hasta que el frente del disolvente alcance la línea de delimitación. Retirar la placa de la cubeta y dejar secar a temperatura ambiente.

15(a).4.6.2.3. Interpretación del cromatograma

Examinar el cromatograma con luz ultravioleta (15(a). 2.9.) y comprobar las observaciones indicadas a continuación:

a) Aparición de una mancha fluorescente azul de aflatoxina B_1 procedente de la solución patrón depositada en C (desplazamiento en la dirección I).

b) Aparición de una mancha fluorescente azul de aflatoxina B_1 (que no ha reaccionado con el ácido clorhídrico) y de una mancha fluorescente azul más intensa de aflatoxina B_1 hemiacetal, procedente de la solución patrón depositada en B (desplazamiento en la dirección II).

c) Aparición de manchas similares a las indicadas en la letra b), procedentes del extracto de la muestra depositado en A. El emplazamiento de estas manchas está definido por la distancia de desplazamiento de la aflatoxina B_1 a a partir del punto A en la dirección I (la misma distancia que la recorrida por la solución patrón depositada en C) seguida de las distancias de desplazamiento recorridas en la dirección II por la aflatoxina B_1 (que no ha reaccionado con el ácido clorhídrico) y por la aflatoxina B_1-hemiacetal (las mismas distancias que las recorridas por la solución patrón depositada en B). Las intensidades de fluorescencia de las manchas de hemiacetal procedentes del extracto y de la solución patrón deberían corresponderse.

15(a).5. Cálculos

15(a).5.1. A partir de medidas visuales

El contenido en microgramos de aflatoxina B_1 por kilogramo de muestra (ppb) viene dado por la fórmula:

$$\text{microgramos de aflatoxina} = \frac{C \cdot V_2 \cdot V}{P \cdot V_1}$$

siendo:

V_1 y V_2 = respectivamente los volúmenes en microlitros de solución patrón de aflatoxina B_1 (15(a).3.16) y del extracto, que tienen una intensidad de fluorescencia semejante;

C = concentración en microgramos de aflatoxina B_1 pr ml de la solución patrón (15(a).3.16.);

V = volumen final del extracto en microlitros, habida cuenta de las eventuales diluciones;

P = peso en gramos de la muestra correspondiente al volumen de extracto sometido a la purificación de la columna.

15(a).5.2. A partir de medidas fluorodensitométricas

El contenido en microgramos de aflatoxina B_1 por kilogramo de muestra (ppb) viene dado por la fórmula:

$$\frac{C \times V}{P \times V_1}$$

siendo:

V_1 = volumen en microlitros del extracto depositado en la placa (10 ó 20 microlitros);

C = cantidad en nanogramos de aflatoxina B_1 del depósito del extracto (habida cuenta del volumen V_2) deducida de las determinaciones;

V = volumen final del extracto en microlitros, teniendo en cuenta las eventuales diluciones;

P = peso en gramos de la muestra correspondiente al volumen del extracto sometido a la purificación en columna.

La diferencia entre los resultados de las dos determinaciones paralelas efectuadas en la misma muestra por el mismo analista no deberá superar:

- el 25 por ciento del resultado más elevado para los contenidos en aflatoxina B_1 de 10 a 20 microgramos/kilogramo.
- 5 microgramos, en valor absoluto, para los contenidos de 20 a 50 microgramos/kilogramo.
- el 10 por ciento del resultado más elevado para los contenidos superiores a 50 microgramos/kilogramo.

15(a).6. Preparación y control de la solución patrón (15(a).3.16)

15(a)6.1. Determinación de la concentración en aflatoxina B_1.

Preparar una solución patrón de aflatoxina B_1 en el cloroformo (15(a).3.2.) o en la mezcla benceno/acetonitrilo (15(a).3.6.) cuya concentración es de 8 a 10 microgramos por mililitro. Determinar el espectro de absorción entre 330 y 370 nm con ayuda de un espectrofotómetro (15(a).2.11.).

Medir la absorbancia (A) a 363 nm en el caso de la solución clorofórmica y a 348 nm en el caso de la solución en la mezcla benceno/acetonitrilo.

Calcular la concentración en microgramos de aflatoxina B_1 por mililitro de solución a partir de las siguientes fórmulas:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ para la solución clorofórmica;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ para la solución en la mezcla benceno/acetonitrilo.

Fuera del alcance de la luz, efectuar las diluciones convenientes para obtener una solución patrón de trabajo cuya concentración en aflatoxina B_1 es de 0,1 microgramos aproximadamente por mililitro. Conservada en el refrigerador, dicha solución permanece estable durante dos semanas.

15(a).6.2. Control de la pureza cromatográfica

Depositar en una placa (15(a).2.8.), 5 microlitros de la solución patrón de 8-10 microgramos de aflatoxina B_1 por mililitro (15(a).6.1.).

Desarrollar el cromatograma según se ha indicado en (15(a).4.4.). Con la luz ultravioleta, la fluorescencia sólo debe dar lugar a la percepción de una sola mancha y no debe percibirse ninguna fluorescencia en la zona del depósito de origen.

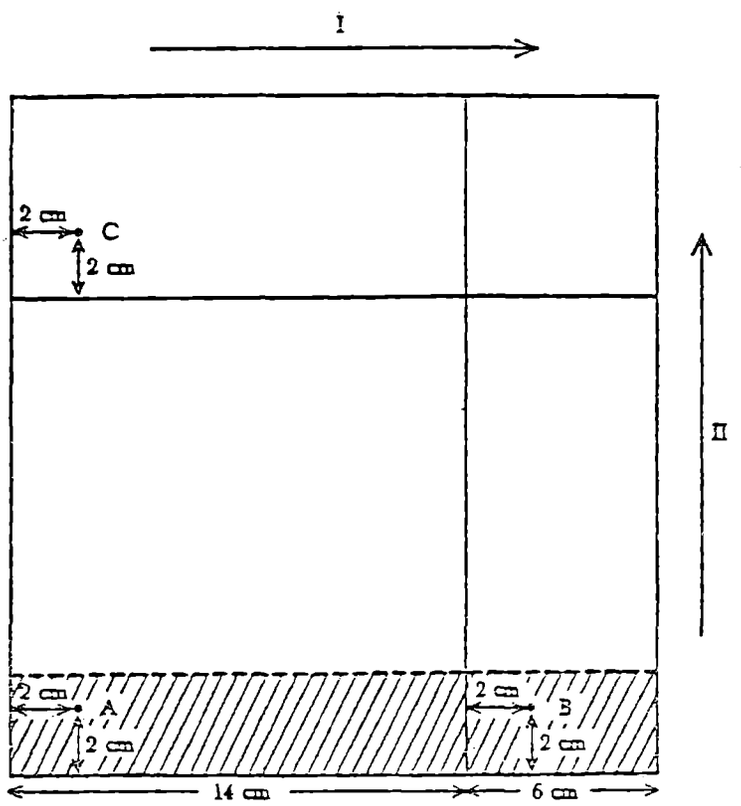


Figura 3

15(b). AFLATOXINA B_1
(Cromatografía bidimensional en capa fina)

15(b).1. PRINCIPIO

La muestra se somete a la extracción mediante cloroformo. Se filtra el extracto y se toma del mismo una parte alicuota que es purificada mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El eluido se evapora y el residuo se vuelve a tomar mediante un volumen determinado de cloroformo o de una mezcla de benceno y acetonitrilo. Una parte alicuota de dicha solución se somete a la cromatografía bidimensional en capa fina. La cantidad de aflatoxina B_1 se determina bajo irradiación ultravioleta del cromatograma, bien sea visualmente, o a través de fluorodensitometría, mediante comparación con cantidades conocidas de aflatoxina B_1 patrón. La identidad de aflatoxina B_1 extraida del pienso o de las materias primas debe confirmarse mediante el procedimiento indicado.

El método permite determinar el contenido en aflatoxina B_1 de los piensos y sus materias primas que no entra dentro del ámbito de aplicación del método a. El límite inferior de detección es de 0,01 mg/kg (10 ppb). El método no es aplicable a piensos que contengan pulpas de agrios.

15(b).2. MATERIAL Y APARATOS

Los mismos que en 15(a).2.

15(b).3. REACTIVOS

15(b).3.1. Acetona.

15(b).3.2. Cloroformo, estabilizado pr 0,5 al 1,0 por ciento de etanol de 96° (v/v).

15(b).3.3. n-Hexano.

15(b).3.4. Metanol.

15(b).3.5. Eter dietílico anhídro exento de peróxidos.

15(b).3.6. Mezcla de benceno y de acetonitrilo: 98/2 (v/v).

15(b).3.7. Mezcla de cloroformo (15(b).3.2.) y de metanol (15(b).3.4.): 97/3 (v/v).

15(b).3.8. Gel de sílice, para cromatografía en columna, granulometría: de 0,05 a 0,20 mm.

15(b).3.9. Algodón hidrófilo, previamente extraído mediante el cloroformo, o lana de vidrio.

15(b).3.10. Sulfato de sodio, anhídro granulado.

15(b).3.11. Gas inerte, por ejemplo: nitrógeno.

15(b).3.12. Acido clorhídrico 1N.

15(b).3.13. Tierra de diatomeas lavada con ácido.

15(b).3.14. Gel de sílice G-HR o equivalente, para cromatografía en capa fina.

15(b).3.15. Disolventes de desarrollo.

15(b).3.15.1. Eter dietílico (15(b).3.5.); metanol (15(b).3.4.); agua: 94/4, 5/1, 5(v/v/v/), cubeta saturada.

15(b).3.15.2. Cloroformo (15(b).3.2.); acetona: 9/1 (v/v), cubeta no saturada.

15(b).3.16. Solución patrón 0,1 microgramos aproximadamente de aflatoxina B_1 por mililitro en el cloroformo (15(b).3.2.) o en la mezcla benceno/acetonitrilo (15(b).3.6.), preparada y controlada como se indica en (15(a).6).

15(b).4. PROCEDIMIENTO

15(b).4.1. Preparación de la muestra

Como en (15(a).4.1.).

15(b).4.2. Extracción

Como en (15(a).4.2.).

15(b).4.3. Purificación en columna

Como en (15(a).4.3.).

15(b).4.4. Cromatografía bidimensional en capa fina

15(b).4.4.1. Aplicación de las soluciones (seguir el espequema que aparece en la figura (1). Trazar en una placa (15(a).2.8.) dos rectas paralelas a dos lados contiguos (a 5 y 6 cm de distancia respectivamente de estos lados), destinadas a delimitar

el desplazamiento de los frentes de disolventes. Depositar en la placa con ayuda de pipetas capilares o de microjeringas las soluciones indicadas a continuación:

- en el punto A, 20 microlitros del extracto purificado de la muestra, obtenido en (15(b).4.3.).
- en el punto B, 20 microlitros de la solución patrón (15(b).3.16.).
- en el pnto C, 10 microlitros de la solución patrón (15(b).3.16.).
- en el punto D, 20 microlitros de la solución patrón (15(b).3.16.).
- en el punto E, 40 microlitros de la solución patrón (15(b).3.16.).

Secar con ayuda de una ligera corriente de aire o con gas inerte (15(b).3.11.). Las manchas obtenidas deben tener un diámetro de alrededor de 5 mm.

15(b).4.4.2. Desarrollo (seguir el esquema que aparece en la figura 1).

Desarrollar el cromatograma en la dirección I con ayuda del disolvente de desarrollo (15(b).3.15.1.) (capa de 1 cm en una cubeta saturada), fuera del alcance de la luz, hasta que el frente del disolvente alcance la línea de delimitación. Retirar la placa de la cubeta y dejar secar, al menos durante quince minutos, fuera del alcance de la luz y a temperatura ambiente.

Revelar a continuación el cromatograma en la dirección II con ayuda del disolvente de revelado (15(b).3.15.2.) (capa de 1 cm en una cubeta no saturada), fuera del alcance de la luz, hasta que el frente del disolvente alcance la línea de delimitación. Retirar la placa de la cubeta y dejar secar, fuera del alcance de la luz y a temperatura ambiente.

15(b).4.4.3. Interpretación del cromatograma (seguir el esquema que aparece en la figura 2).

Irradiar el cromatograma mediante luz ultravioleta colocando la placa a 10 cm de la lámpara (15(a).2.9.). Localizar el emplazamiento de las manchas de fluorescencia azul B, C, D y E de aflatoxina B_1 procedentes de la solución patrón y trazar dos rectas imaginarias que pasen por estas manchas y perpendiculares a las direcciones del desarrollo. El punto de intersección P de estas rectas es el emplazamiento en donde debería encontrarse la mancha de aflatoxina B_1 procedente del extracto de la muestra depositado en A (figura 1).

No obstante, el emplazamiento real de esta mancha puede encontrarse en un punto Q situado en la intersección de dos rectas imaginarias que formen entre sí un ángulo de aproximadamente 100 grados y que pase respectivamente por las manchas B y C. Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del extracto de la muestra según se indica en (15(b).4.5.).

15(b).4.4.4. Cromatografía complementaria

Trazar en una nueva placa (15(a).2.8.) dos rectas paralelas a dos lados contiguos, según se indica en el esquema de la figura 1, y depositar en el punto A (ver figura 1) 20 microlitros del extracto purificado de la muestra obtenida en (15(b).4.3.) y en superposición, 20 microlitros de la solución patrón (15(b).3.16.).

Desarrollar según se indica en (15(b).4.4.2.).

Irradiar el cromatograma mediante luz ultravioleta (15(a).2.9.) y comprobar que:

- Las manchas de aflatoxina B_1 del extracto y de la solución tipo se superponen.
- La fluorescencia de esta mancha es más intensa que la de la mancha de aflatoxina B_1 desarrollada en el punto Q de la primera placa.

15(b).4.5. Determinaciones cuantitativas

Proceder a las determinaciones, bien sea visualmente o mediante fluordensitometría, según se indica a continuación:

15(b).4.5.1. Medidas visuales

Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del extracto comparando la intensidad de fluorescencia de la mancha del extracto con la de las manchas C, D y E de la solución patrón. Interpolar si es necesario. Si la intensidad de la fluorescencia dada por los 20 microlitros del extracto es más fuerte que la de los 40 microlitros de solución tipo, diluir el extracto 10 ó 100 veces mediante cloroformo (15(b).3.2.) o mediante la mezcla de benceno/acetonitrilo (15(b).3.6.) antes de someterlo a una nueva cromatografía en capa fina.

15(b).4.5.2. Medidas por fluordensitometría

Medir la intensidad de fluorescencia de las manchas de aflatoxina B_1 con el fluorodensitómetro (15(a).2.12.) utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de emisión de 443 nm.

Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del depósito del extracto comparando la intensidad de fluorescencia de la mancha del extracto con la de las manchas C, D y E de la solución patrón.

15(b).4.6. Confirmación de la identidad de la aflatoxina B_1

Igual que en 15(a).5.4.6.

15(b).5. CALCULOS

Igual que en 15(a).5.

15(b).6. REFERENCIAS

Séptima Directiva de la Comisión de 1 de marzo de 1976. (76/372/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 102 de 15 de abril de 1976.

ANEXO

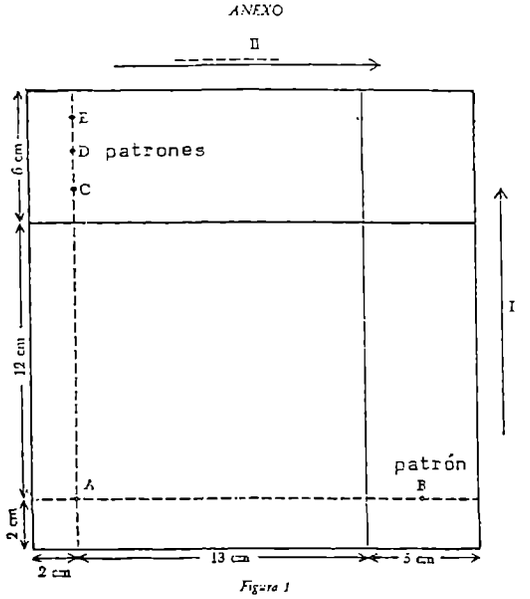


Figure 1

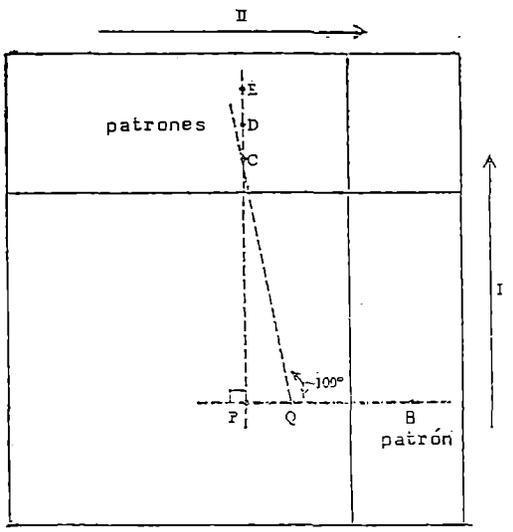


Figura 2

16. INDICE DE PEROXIDOS

Esta determinación será aplicable a aquéllas grasas que se utilicen como materia prima.

El procedimiento será el que figura en el método nº 21 de los métodos oficiales de análisis de Aceites y Grasas aprobados por Orden de 31 de enero de 1977. (B.O.E. de 14 de julio de 1977).

En el caso de que fuera necesario preparar la muestra, se seguirá el procedimiento recogido en el método nº 1 de la mencionada Orden.

17. FOSFORO TOTAL (Método espectrofotométrico)

17.1. PRINCIPIO

Determinación del fósforo de una muestra mineralizada, mediante la transformación de sus compuestos fosforados en ortofosforados.

La mineralización se realiza por vía seca (calcinación) y posterior disolución en ácido, o bien por digestión ácida.

Medida de la absorbancia a 430 nm del complejo formado con el reactivo nitro-molibdo-vanadato.

17.2. MATERIAL Y APARATOS

17.2.1. Espectrofotómetro, capaz de efectuar lecturas de 430 nm, con cubetas de 10 mm de paso de luz.

17.2.2. Crisoles de incineración de cuarzo o porcelana.

17.2.3. Tubos de ensayo de 25 a 30 ml con boca de vidrio esmerilado.

17.2.4. Pipetas de doble enrase de 5, 10, 15, 20, 25 y 50 ml.

17.2.5. Matraces Kjeldahl de 250 a 500 ml de capacidad.

17.2.6. Matraces aforados de 100, 250, 500 y 1000 ml.

17.3. REACTIVOS

17.3.1. Carbonato de calcio.

17.3.2. Acido clorhídrico de d^4_{20} = 1,19 g/ml.

17.3.3. Acido nítrico de d^4_{20} = 1,38 - 1,42 g/ml.

17.3.4. Acido nítrico de d^4_{20} = 1,045 g/ml (10% m/v).

17.3.5. Acido sulfúrico de d^4_{20} = 1,84 g/ml.

17.3.6. Amoníaco concentrado de d^4_{20} = 0,910 g/ml.

17.3.7. Solución de heptamolibdato amónico. Disolver en agua caliente 100 g de heptamolibdato de amonio, tetrahidrato $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}.4H_2O$. Se añaden 10 ml de amoníaco (17.3.6.), se trasvasa a matraz aforado de 1000 ml, y una vez frío se completa con agua hasta el enrase.

17.3.8. Solución de metavanadato amónico. Disolver 2,35 g de metavanadato de amonio (NH_4VO_3) en un erlenmeyer de 500 ml con 400 ml de agua destilada caliente. Añadir lentamente y agitando 20 ml de una solución que contiene 7 ml de ácido nítrico (17.3.3.) y 13 ml de agua destilada. Llevar a matraz aforado de 1000 ml y, una vez frío, enrasar con agua destilada.

17.3.9. Solución de nitro-molibdo-vanadato. En matraz de litro aforado, mezclar 200 ml de solución de heptamolibdato de amonio (17.3.7.) con 200 ml de solución de metavanadato de amonino (17.3.8.) y 134 ml de ácido nítrico (17.3.3.). Completar con agua destilada hasta el enrase.

17.3.10. Solución patrón de fósforo conteniendo 1 mg de fósforo por mililitro. Disolver en matraz aforado de litro 4,387 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (previamente desecado en estufa de 100 °C hasta peso constante) en agua destilada y llevar a enrase.

17.4. PROCEDIMIENTO

17.4.1. Curva de calibrado. En matraz aforado de 100 ml y a partir de la solución patrón de fósforo (17.3.10.) preparar soluciones conteniendo 0, 5, 10, 20, 30 y 40 microgramos de fósforo por mililitro.

En seis erlenmeyer o tubos de ensayo (17.2.3.) tomar con pipetas de doble enrase 10 ml de cada solución patrón de fósforo. Añadir a cada uno de ellos, tambien con pipeta de doble enrase, 10 ml del reactivo de nitro-molibdovanadato (17.3.9.), agitar para homogeneizar y dejar en reposo diez minutos a 20 °C.

Efectuar las lecturas fotométricas a 430 nm, empleando cubetas de 10 mm de paso de luz, utilizando la solución blanco de fósforo como solución de referencia.

Representar gráficamente las absorbancias obtenidas frente a los microgramos/mililitros o a los miligramos de fósforo existentes en cada lectura.

17.4.2. Preparación de la muestra.

17.4.2.1. Mineralización por calcinación (para muestras que contienen sustancias orgánicas libres de fosfatos que den productos insolubles al incinerar).

Pesar 2,5 g de la muestra, con precisión de 1 mg, en cápsulas de cuarzo o porcelana.

Mezclar con 1 g de carbonato de calcio (17.3.1.). Poner en mufla a 550 °C ± 5 °C hasta la obtención de cenizas blancas o grises (una pequeña parte de carbón no interfiere). Transferir las cenizas a un vaso de 150 ml. Añadir 10 ml de agua lavando el crisol con ácido clorhídrico (17.3.2.) hasta que cese la efervescencia. Añadir otros 10 ml de ácido clorhídrico (17.3.2.). Evaporar el ácido clorhídrico en baño de arena a ebullición hasta sequedad. Enfriar y disolver el residuo con 10 ml de ácido nítrico (17.3.4.), hervir en baño de arena durante cinco minutos, sin llegar a sequedad. Filtrar a través de papel sobre matraz aforado de 500 ml, lavar con agua destilada el vaso y enrasar una vez frío.

17.4.2.2. Mineralización por digestión ácida (para compuestos minerales y piensos líquidos). Pesar 1 g de muestra, con precisión de 1 mg, y llevar a matraz Kjeldahl (17.2.5.), añadir 20 ml de ácido sulfúrico (17.3.5.), agitar el matraz circularmente para evitar que la muestra se adhiera a las paredes y hervir durante diez minutos. Dejar enfriar un poco y añadir 2 ml de ácido nítrico (17.3.3), calentar y llevar otra vez al punto de ebullición. Repetir este procedimiento hasta decoloración de la solución. Enfriar, añadir un poco de agua y trasvasar el líquido, filtrando si es necesario, a matraz aforado de 500 ml, lavar el matraz Kjeldahl con agua caliente, y unir los líquidos del lavado si es preciso a través del filtro empleado inicialmente. Una vez frío, añadir agua hasta el enrase.

17.4.3. Desarrollo del color y medida de la absorbancia. Diluir una alícuota del filtrado problema, para conseguir una concentración de fósforo no superior a 40 microgramos/ml.

Transferir 10 ml de esta solución a erlenmeyer o tubo de ensayo (17.2.3.) y añadir 10 ml del reactivo nitro-molibdo-vanadato (17.3.9.). Las dos soluciones tomadas con pipeta de dos enrases. Mezclar bien y dejar diez minutos en reposo. Transferir una alícuota a la célula y medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 430 nm, usando como referencia una solución de 10 ml de solución blanco con 10 ml del reactivo nitro-molibdo-vanadato.

Efectuar siempre un ensayo en blanco con los reactivos utilizados, siguiendo el mismo procedimiento experimental. Usar éste como referencia en cada lectura espectrofotométrica.

17.5. CALCULOS

Determinar la concentración de fósforo en la porción alícuota diluída de la solución problema o de los microgramos/mililitros de dicha solución, por referencia a la curva de calibrado, calculando el porcentaje en peso de fósforo en la muestra.

$$\% P = \frac{S \times C_1 \times C_2 \times .... C_n}{G \times 10.000 \times A_1 \times A_2 \times .. A_n}$$

siendo:

G = peso de la muestra en gramos.

C_1 C_2 ..C_n = diluciones a que se llevaron las alícuotas en mililitros.

A_1 A_2 ..A_n = alícuotas tomadas para las diluciones sucesivas en mililitros.

S = microgramos/mililitros de fósforo medidos de la solución problema con relación a la curva de calibrado.

17.6. OBSERVACIONES

La diferencia entre el resultado de dos determinaciones sucesivas no debe exceder de:

3% (valor relativo), con contenidos de fósforo menor del 5% (m/m).

0,1% (valor absoluto) para contenidos de fósforo igual o mayor que el 5% (m/m).

17.7. REFERENCIAS

Segunda Directiva de la Comisión de 18 de noviembre de 1971. (71/393/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 279 de 20 de diciembre de 1971.

18. PROTEINA BRUTA SOLUBLE EN ACIDO CLORHIDRICO Y PEPSINA

18.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la fracción de las proteinas brutas solubilizadas por la pepsina y el ácido clorhídrico en las condiciones dadas. Es aplicable a las harinas de origen animal.

La muestra se somete a digestión durante 48 horas a 40 °C por una solución clorhídrica de pepsina. La suspensión se filtra o centrifuga y se determina el contenido en nitrógeno del filtrado o del sobrenadante, según el método oficial número 3.

18.2. MATERIAL Y APARATOS

18.2.1. Baño de agua o estufa de incubación regulada a 40 °C ± 1 °C.

18.2.2. Mineralizador y destilador kjeldahl.

18.3. REACTIVOS

18.3.1. Acido clorhídrico (d = 1,125)

18.3.2. Solución de ácido clorhídrico 0,075N.

18.3.3. Pepsina 2,0 U/mg. La actividad debe controlarse según el método oficial nº 19.

18.3.4. Solución preparada recientemente de pepsina 0,02% (p/v) en la solución de ácido clorhídrico (18.3.2.). Actividad 400 U/l.

18.3.5. Antiespumante.

18.3.6. Los que figuran en 3.3.

18.4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con precisión de 1 mg, 2 g de muestra. Introducir la muestra en matraz aforado de 500 ml y añadir 450 ml de solución clorhídrica de pepsina (18.3.4.), previamente llevada a 40 °C. Agitar de forma que se evite la formación de aglomerados. Comprobar que el pH de la suspensión sea inferior a 1,7. Llevar el matraz al baño de agua o a la estufa de incubación (18.2.1.) y mantenerlo durante 48 horas a 40 °C ± 1 °C, agitar a las ocho, veinticuatro y treinta y dos horas. Después de 48 horas añadir 15 ml de ácido clorhídrico (18.3.1.), refrigerar hasta 20 °C, enrasar el matraz con agua y filtrar.

Tomar 250 ml del filtrado e introducirlos en el matraz de digestión kjeldahl y proceder como en el método oficial nº 3. Efectuar una prueba en blanco.

18.5. CALCULOS

El contenido en proteína soluble en clorhídrico y pepsina para 100 g de muestra vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína soluble/100 g muestra} = \frac{2 \times 1,4 \times 6,25}{P} (VN - V'N')$$

Siendo:

P = Peso, en g, de la muestra.

V = Volumen, en ml, de ácido sulfúrico.

N = Normalidad del ácido sulfúrico.

V'= Volumen, en ml, de hidróxido de sodio consumidos en la valoración.

N'= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

18.6. OBSERVACIONES

Los productos cuyo contenido en materias grasas exceda del 10%, deben ser previamente desengrasados por extracción con éter de petróleo.

18.7. REFERENCIAS

Tercera Directiva de la Comisión de 27 de abril de 1972. (72/199/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L, 123 de 29 de mayo de 1972.

19. ACTIVIDAD DE LA PEPSINA

19.1. PRINCIPIO

El método sirve para comprobar la actividad de la pepsina utilizada en la determinación de la proteína soluble en pepsina y ácido clorhídrico.

La hemoglobina se trata en las condiciones definidas con pepsina y ácido clorhídrico. La fracción no hidrolizada de las proteínas se precipita por el ácido tricloroacético. Al filtrado se le añade solución de hidróxido de sodio y reactivo de Folin-Ciocalteu. La absorbancia de esta solución se mide a 750 nm y la cantidad de tirosina correspondiente se lee sobre una curva patrón.

La unidad de pepsina se define como la cantidad de dicha enzima que libera por minuto, en las condiciones del método, una cantidad de compuestos hidroxiarilos cuya coloración por el reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una absorbancia correspondiente a la de un mol de tirosina, en las mismas condiciones.

19.2. MATERIAL Y APARATOS

19.2.1. Baño de agua, regulado a 25 °C ± 0,1 °C por el ultratermostato.

19.2.2. Espectrofotómetro.

19.2.3. Cronómetro; precisión: 1 segundo.

19.2.4. pH-metro.

19.3. REACTIVOS

19.3.1. Acido clorhídrico 0,2N.

19.3.2. Acido clorhídrico 0,26N.

19.3.3. Acido clorhídrico 0,025N.

19.3.4. Solución al 5% (p/v) de ácido tricloroacético.

19.3.5. Solución de hidróxido de sodio 0,5N.

19.3.6. Reactivo de Folin-Ciocalteu. Introducir 100 g de wolframato de sodio dihidrato ($Na_2WO_4.2H_2O$), 25 g de molibdato de sodio dihidrato ($Na_2MO_4.2H_2O$) y 700 ml de agua en un matraz de fondo redondo de 2 litros de cierre esmerilado. Añadir 50 ml de ácido fosfórico (d = 1,71) y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (d = 1,19), ajustar al matraz un refrigerante de reflujo, calentar hasta ebullición y mantener la solución en ebullición suave durante 10 h. Dejar refrigerar, separar el refrigerante de reflujo, añadir 175 g de sulfato de litio dihidrato ($Li_2SO_4.2H_2O$), 50 ml de agua y 1 ml de bromo. Hacer hervir durante 15 minutos para eliminar el exceso de bromo.

Dejar refrigerar, trasvasar la solución en un matraz aforado de 1 litro completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar. El reactivo obtenido no debe presentar coloración verduzca. Antes de su empleo, diluir 1 volumen del reactivo con dos volúmenes de agua.

19.3.7. Solución de hemoglobina: Pesar una cantidad de hemoglobina, sustrato proteico según Anson (2 g aproximadamente) corres-

pondiente a 354 mg de nitrógeno e introducir en un matraz de 200 ml de cierre esmerilado. Determinar el contenido en nitrógeno mediante un semi-microkjeldahl (contenido teórico: 17,7% de nitrógeno). Añadir algunos ml de ácido clorhídrico (19.3.2.) conectar el matraz a la bomba de vacio y agitar hasta disolución completa de hemoglobina. Dejar de hacer el vacio y añadir, agitando constantemente, ácido clorhídrico (19.3.2.) para competar a 100 ml. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

19.3.8. Solución patrón de tirosina: Disolver 181,2 mg de tirosina en ácido clorhídrico (19.3.2.) y completar a 1 litro con el mismo ácido clorhídrico.

19.3.9. Solución patrón de trabajo: Tomar 20,0 ml de la solución (19.3.8.) y diluir a 100 ml con ácido clorhídrico (19.3.1.). Un ml de dicha solución contine 0,2 micromoles de tirosina.

19.4. PROCEDIMIENTO

19.4.1. Preparación de la solución (ver 19.6.1.)

Disolver 150 mg de pepsina en 100 ml de ácido clorhídrico (19.3.2.). Tomar mediante pipeta 2 ml de la solución, introducirlos en un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen mediante ácido clorhídrico (19.3.3.). El pH, controlado por el pHmetro, debe ser de 1,6 ± 0,1. Mantener el matraz en baño de agua a 25 °C (19.2.1.).

19.4.2. Hidrólisis

Introducir mediante pipeta en tubo de ensayo 5,0 ml de solución de hemoglobina (19.3.7.) llevar a 25 °C en el baño de agua (19.2.1.) añadir 1,0 ml de la solución de pepsina obtenida en (19.4.1.) y mezclar, con ayuda de una varilla de cristal ensanchada en un extremo, mediante aproximadamente 10 movimientos de vaivén. Mantener el tubo de ensayo en el baño de agua a 25 °C durante 10 minutos exactamente, contados desde el momento de la adición de la solución de pepsina (la duración y la temperatura deben ser perfectamente respetadas). Añadir a continuación 10,0 ml de solución de ácido tricloroacético (19.3.4.) previamente llevada a 25 °C. Homogeneizar y filtrar sobre un filtro seco.

19.4.3. Desarrollo de la coloración y medición de la absorbancia. Tomar mediante pipeta 5,0 ml del filtrado, introducirlos en un erlenmeyer de 50 ml, añadir 10,0 ml de solución de hidróxido de sodio (19.3.5.) y agitando continuamente, 3,0 ml de reactivo diluído de Folin-Ciocalteu (19.3.6.). Después de 5 a 10 minutos, determinar la absorbancia de la solución a 750 nm en cubetas de 1 cm de espesor, usando como blanco agua.

19.4.4. Prueba en blanco

Para cada determinación, proceder a una prueba en blanco tal como se indica a continuación. Introducir mediante pipeta en un tubo de ensayo 5,0 ml de solución de hemoglobina (19.3.7.), llevar a 25 °C en el baño de agua (19.2.1.), añadir 10,0 ml de solución de ácido tricloroacético (19.3.4.) previamente llevado a 25 °C, homogeneizar y añadir a continuación 1,0 ml de la solución de pepsina obtenida en 19.4.1. Mezclar con la ayuda de una varilla de cristal y mantener el tubo de ensayo 10 minutos exactamente en el baño de agua (19.2.1.) a 25 °C. Homogeneizar y filtrar sobre un filtro seco.

Continuar el método operativo tal como se indica en 19.4.3.

19.4.5. Curva de calibrado

Introducir en erlenmeyers de 50 ml volúmenes de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 ml de solución patrón de tirosina (19.3.9.) correspondientes respectivamente a unas cantidades de tirosina de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; y 1,0 micromoles. Completar la serie mediante un testigo exento de tirosina. Llevar los volúmenes a 5,0 ml con la ayuda del ácido clorhídrico (19.3.1.). Añadir 10,0 ml de solución de hidróxido de sodio (19.3.5.) y agitando constantemente, 3,0 ml del reactivo diluído de Folin-Ciocalteu (19.3.6.). Medir la absorbancia tal como se indica en la última frase del punto 19.4.3. Trazar la curva de calibrado situando las concentraciones de tirosina frente a las absorbancias obtenidas.

19.5. CALCULOS

Leer sobre la curva de calibrado la cantidad de tirosina, en micromoles correspondiente a la absorbancia de la solución coloreada, corregida de la prueba en blanco.

La actividad de la pepsina, en micromoles de tirosina, por mg y por minuto a 25 °C, viene dada por la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades por mg (U/mg)} = \frac{0{,}32 \cdot a}{P}$$

en la que:

a = Cantidad de tirosina en micromoles leída sobre la curva patrón.

p = Peso en mg de la cantidad de pepsina añadida en 19.4.2.

19.6. OBSERVACIONES

19.6.1. La cantidad de pepsina que haya que ponerse en la solución debe ser tal que pueda obtener una absorbancia final de 0,35 ± 0,035.

19.6.2. Dos unidades por mg obtenidas por el presente método corresponden a 3,64 unidades millonésimas Anson/mg (micromoles de tirosina/mg por minuto a 35,5 °C), ó 36.400 unidades comerciales/g (micromol de tirosina/g en 10 minutos a 35,5 °C).

19.7. REFERENCIAS

Tercera Directiva de la Comisión de 27 de abril de 1972. (72/199/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L, 123 de 29 de mayo de 1972.

20. CASEINA TOTAL

20.1. PRINCIPIO

Se basa en precipitar (después de reconstituida la leche en agua tibia), la caseína a su punto isoeléctrico. Por lavado se recoge la caseína pura eliminando el suero y las impurezas. Se determina via kjeldahl su nivel de proteína N x 6,38 y este valor deducido el blanco correspondiente se expresa en caseína.

Este método es aplicable a materias primas lácteas (leche en polvo descremada, entera o semidescremada).

20.2. MATERIAL Y APARATOS

20.2.1. Material necesario para determinación de proteína bruta.

20.2.2. Baño de agua con termostato para 40 °C.

20.2.3. Centrífuga capaz de alcanzar 4.000 rpm.

20.3. REACTIVOS

20.3.1. Reactivos necesarios para determinación de proteína bruta.

20.3.2. Acido acético. Dilución al 10% (p/v).

20.3.3. Dilución de acetato de sodio 1N.

20.3.4. Papel de filtro Albet nº 240 o similar.

20.4. PROCEDIMIENTO

Pesar 5 g de muestra, con precisión de 1 mg. Disolver en 100 ml de agua desionizada calentada a 40-45 °C. Centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos. Tomar 20 ml de la solución y calentar en baño de agua a 40 °C durante 5 ó 10 minutos. Añadir 5 ml de ácido acético (20.3.2.) y dejar que precipite durante 10 minutos.

Añadir 5 ml de solución de acetato de sodio (20.3.3.) y esperar 10 minutos a que el precipitado de caseína evolucione y se aglomere. Filtrar sobre papel de filtro (20.3.4.).

Lavar con agua acidulada con unas gotas de ácido acético para eliminar el resto de proteínas solubles lácteas o no, hasta conseguir una cuajada de caseína pura.

A continuación determinar el contenido en nitrógeno del precipitado, según el método kjeldahl (método oficial nº 3).

20.5. CALCULO

El contenido en caseína se dará en porcentaje de peso según:

Caseína % = N x 6,38

Siendo:

N = Nitrógeno total del precipitado expresado en % de muestra.

20.6. OBSERVACIONES

El lavado de la cuajada debe hacerse con agua acidulada y con gran cuidado, de un lado para que no resten en ella proteínas séricas, de otro para que no pierda caseína por manipulación indebida.

20.7. REFERECIAS

Métodos Oficiales de Análisis de Leches. Método nº 3.

21. UREA

21.1. PRINCIPIO

Defecación de la muestra y medida de la absorbancia a 420 nm del compuesto formado al añadir p-dimetilaminobenzaldehido.

21.2. MATERIAL Y APARATOS

21.2.1. Mezclador o agitador capaz de efectuar de 35 a 40 vueltas por minuto.

21.2.2. Tubos de ensayo de aproximadamente 160 x 16 mm con tapones de rosca.

21.2.3. Espectrofotómetro.

21.3. REACTIVOS

21.3.1. Solución de p-dimetilaminobenzaldehido (D.M.A.B.). Disolver 1,6 g de (D.M.A.B.) en 100 ml de etanol del 96% y añadir 10 ml de ácido clorhídrico (d = 1,19 g/ml). Este reactivo se conserva hasta un máximo de dos semanas.

21.3.2 Solución Carrez I.- Disolver 24 g de acetato de zinc trihidrato ($Zn(CH_3-COO)_2.3H_2O$) y 3 ml de ácido acético glacial en agua destilada y completar hasta 100 ml.

21.3.3. Solución Carrez II.- Disolver 10,6 g de hexacianoferrato (II) de potasio trihidrato ($K_4Fe(CN)_6.3H_2O$) en agua destilada y completar hasta 100 ml.

21.3.4. Carbón activo que no absorba urea.

21.3.5. Solución patrón de urea al 0,1% (p/v).

21.4. PROCEDIMIENTO

21.4.1. Curva de calibrado. Llevar volúmenes de 1, 2, 4, 5, y 10 ml de la solución patrón de urea (21.3.5.) a matraces aforados de 100 ml y enrasar con agua destilada. Tomar 5 ml de cada solución, llevar a los tubos (21.2.2.) y añadir respectivamente 5 ml de la solución DMAB (21.3.1.). Mezclar y poner los tubos en baño de agua a 20 °C durante 15 minutos. Medir la absorbancia de cada solución a 420 nm frente a un blanco obtenido al tomar 5 ml de agua destilada y siguiendo el mismo procedimiento. Obtener la curva de calibrado.

21.4.2. Preparación de la muestra. Pesar con aproximacion de 1 mg, 2 g de muestra e introducirlos en un matraz aforado de 500 ml y añadir 1 g de carbón activo (21.3.4.). Añadir 400 ml de agua destilada, 5 ml de solución Carrez I y 5 ml de solución Carrez II. Poner el matraz en el agitador (21.2.1.) durante 30 minutos. Enrasar con agua destilada, agitar y filtrar.

21.4.3. Determinación. Tomar 5 ml del filtrado y llevar a los tubos (21.2.2.). Añadir 5 ml de la solución DMAB (21.3.1.) y continuar como en (21.4.1.).

21.5. CALCULOS

Determinar el contenido de urea al comparar las absorbancias obtenidas de la muestra frente a las de la curva de calibrado. Expresar el resultado en porcentaje de muestra.

21.6. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1973.

22. ACIDO CIANHIDRICO

22.1. PRINCIPIO

La muestra se suspende en agua. El ácido cianhídrico se libera bajo la acción de fermentos, se arrastra por destilación en vapor de agua y se recoge en un volumen determinado de solución de nitrato de plata acidificada. El cianuro de plata se separa por filtración y el exceso de nitrato de plata se valora mediante una solución de tiocianato de amonio.

El método permite determinar el contenido en ácido cianhídrico libre y combinado en forma de glucósidos existentes en determinados piensos y, en particular, de los productos de semillas de lino, de harina de mandioca y de determinadas especies de leguminosas.

22.2. MATERIAL Y APARATOS

22.2.1. Estufa provista de un termostato regulado a 38 °C.

22.2.2. Aparato de destilación en corriente de vapor de agua provisto de un refrigerante con alargadera curvada.

22.2.3. Matraces de fondo plano de 100 ml de tapón esmerilado.

22.2.4. Baño de aceite.

22.2.5. Bureta graduada a 1/20 ml.

22.3. REACTIVOS

22.3.1. Suspensión de almendras dulces: triturar 20 almendras dulces peladas en 100 ml de agua a una temperatura de 37 a 40 °C. Comprobar la ausencia de ácido cianhídrico sobre 10 ml de la suspensión, con ayuda de un papel picro-sódico o efectuando una prueba en blanco como se indica en el último apartado de 22.4.

22.3.2. Solución al 10% (p/v) de acetato de sodio, neutro a la fenolftaleína.

22.3.3. Emulsión de antiespuma (silicona, por ejemplo).

22.3.4. Acido nítrico, d = 1,40.

22.3.5. Solución de nitrato de plata 0,02N.

22.3.6. Solución de tiocianato de amonio 0,02N.

22.3.7. Solución saturada de sulfato férrico amónico.

22.3.8. Amoníaco d = 0,958.

22.4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con precisión de 5 mg, 20 g de la muestra, introducirlos en un matraz de 1 litro de fondo plano y añadir 50 ml de agua y 10 ml de suspensión de almendras dulces (22.3.1.). Tapar el matraz y mantenerlo durante dieciseis horas en la estufa a 38 °C. Enfriar a continuación a la temperatura ambiente y añadir 8 ml de agua y 10 ml de solución de acetato de sodio (22.3.2.) y una gota de emulsión antiespuma (22.3.3.).

Conectar el matraz al aparato de destilación al vapor y situarlo en un baño de aceite previamente llevado a una temperatura ligeramente superior a 100 °C. Destilar de 200 a 300 ml de líquido haciendo pasar en el matraz una fuerte corriente de vapor y calentando suavemente el baño de aceite. Recoger el destilado en un erlenmyer situado el resguardo de la luz y que contenga 50 ml exactamente de solución de nitrato de plata 0,02N (22.3.5.) y 1 ml de ácido nítrico (22.3.4.). Asegurarse para que la alargadera del refrigerante quede sumergida en la solución de nitrato de plata.

Trasvasar el contenido del erlenmeyer a un matraz aforado de 500 ml, completar el volumen con agua, agitar y filtrar. Tomar 250 ml del filtrado, añadir 1 ml aproximadamente de solución de sulfato férrico amónico (22.3.7.) y valorar en retroceso el exceso de nitrato de plata por la solución de tiocianato de amonio 0,02N (22.3.6.) suministrada por la bureta graduada a 1/20 ml.

Efectuar en el caso en que fuera necesario un ensayo en blanco aplicando el mismo método operatorio a 10 ml de suspensión de almendras dulces (22.3.1.), en ausencia de la muestra para analizar.

22.5. CALCULOS

Si la prueba en blanco indica un consumo de la solución de nitrato de plata 0,02N, sustraer este valor del volumen consumido por el destilado de la muestra.

1 ml de nitrato de plata 0,02N corresponde a 0,54 de ácido cianhídrico. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

22.6. OBSERVACIONES

Si la muestra contiene una cantidad importante de sulfuros (judías por ej), se forma un precipitado negro de sulfuro de plata que se filtra con el sedimento de cianuro de plata. La formación de este precipitado entraña una pérdida de solución de nitrato de plata 0,02N cuyo volumen debe sustraerse del volumen tomado en consideración para el cálculo del contenido en ácido cianhídrico. Con tal fín, proceder como se indica a continuación:

Tratar el sedimento sobre el filtro con 50 ml de amoníaco (22.3.8.) para disolver el cianuro de plata. Lavar el residuo mediante amoníaco diluído y proceder a la determinación de su contenido en plata. Convertir el valor obtenido en ml de solución de nitrato de plata 0,02N.

El contenido en ácido cianhídrico de la muestra puede determinarse igualmente mediante titulación del filtrado amoniacal acidificado por el ácido nítrico.

22.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

23. DETERMINACION DE LAS CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDOCLORHIDRICO

23.1. PRINCIPIO

El método permite determinar el contenido en materias minerales insolubles en ácido clorhídrico de los piensos y sus materias primas. Se preveen dos procedimientos en función de la naturaleza de la muestra.

23.1.1. Procedimiento A: Aplicable a las materias primas orgánicas y a la mayor parte de los piensos compuestos.

23.1.2. Procedimiento B: Aplicable a mezclas minerales, así como a los piensos compuestos cuyo contenido en insoluble clorhídrico, determinado según el Procedimiento A, sea superior a 1%.

23.1.3. Procedimiento A: Se incinera la muestra, se tratan las cenizas por ebullición en ácido clorhídrico y el residuo insoluble se filtra y se pesa.

23.1.4. Procedimiento B: La mezcla se trata mediante ácido clorhídrico. La solución se filtra, el residuo se incinera y las cenizas obtenidas se tratan como el Procedimiento A.

23.2. MATERIAL Y APARATOS

23.2.1. Placa calefactora.

23.2.2. Horno eléctrico, con termostato.

23.2.3. Crisoles de incineración de platino o de aleación de platino y oro (10% Pt, 90% Au), rectangulares (60 x 40 x 25 mm) o redondos (diámetro: 60 a 75 mm, altura 20 a 25 mm) ó crisoles de otro material capaces de soportar una temperatura de 700 °C.

23.3. REACTIVOS

23.3.1. Acido clorhídrico 3N.

23.3.2. Solución al 20% (p/v) de ácido tricloroacético.

23.3.3. Solución al 1% (p/v) de ácido tricloroacético.

23.4. PROCEDIMIENTO

23.4.1. Procedimiento A.

Incinerar la muestra según el método oficial descrito para la determinación de las cenizas brutas. Se podrán emplear igualmente las cenizas obtenidas al efectuar dicha determinación.
Traspasar las cenizas a un vaso de 250 a 400 ml con 75 ml de ácido clorhídrico 3N (23.3.1.). Llevar el líquido cuidadosamente a ebullición suave y mantener ésta durante quince minutos. Filtrar la solución caliente sobre un papel de filtro sin cenizas y lavar el residuo con agua caliente hasta la desaparición de reacción ácida. Secar el filtro que contiene el residuo e incinerar en un crisol tarado a una temperatura de 550 °C como mínimo y de 700 °C como máximo. Refrigerar en desecador y pesar.

23.4.2. Procedimiento B.

Pesar, con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra e introducirlos en un vaso de 250 a 400 ml. Añadir sucesivamente 25 ml de agua y 25 ml de ácido clorhídrico 3N (23.3.1.), mezclar y esperar al final de la efervescencia.

Añadir 50 ml de ácido clorhídrico 3N (23.3.1.). Si hay un nuevo desprendimiento de gases, esperar a su final y colocar a continuación el vaso en un baño de agua hirviendo y mantenerlo allí durante treinta minutos o más, si fuera necesario, con el fin de hidrolizar completamente el almidón que pueda estar presente. Filtrar en caliente sobre filtro sin cenizas y lavar el filtro mediante 50 ml de agua caliente (23.7). Colocar el filtro que contiene el residuo en un crisol de incineración, secar e incinerar a una temperatura de 550 °C como mínimo y 700 °C como máximo. Continuar tal como se indica en 23.4.1. párrafo segundo.

23.5. CALCULOS

Calcular el peso del residuo deduciendo el peso del crisol vacio. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

23.6. OBSERVACIONES

Si la filtración se mostrara dificil, volver a comenzar la determinación sustituyendo los 50 ml de ácido clorhídrico 3N por 50 ml de ácido tricloroacético al 20% (23.3.2.) y lavando el filtro con ayuda de una solución caliente de ácido tricloroacético al 1% (23.3.3.).

23.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

24. ESENCIA DE MOSTAZA

24.1. PRINCIPIO

La muestra se pone en suspensión en agua. Las esencias de mostaza se liberan bajo la acción de fermentos, se arrastran por destilación en presencia de etanol y se recogen en el amoníaco diluído. La solución se trata en caliente con un volumen determinado de solución de nitrato de plata, refrigerado y filtrado. El exceso de nitrato de plata se titula mediante una solución de tiocianato de amonio.

El método permite determinar el contenido en esencia de mostaza arrastrable por el vapor de agua, expresado en isotiocianato de alilo, de la torta de las especies Brassica y Sinapis y de los piensos compuestos que la contienen.

24.2. MATERIAL Y APARATOS

24.2.1. Matraces de 500 ml de fondo plano y tapón esmerilado.

24.2.2. Aparato de destilar provisto de un refrigerante y de un dispositivo que permita evitar el arrastre de líquido.

24.3. REACTIVOS

24.3.1. Mostaza blanca (Sinapis alba).

24.3.2. Etanol, del 95 al 96% (v/v).

24.3.3. Emulsión de antiespuma (silicona, por ejemplo).

24.3.4. Amoníaco, d = 0,958.

24.3.5. Solución de nitrato de plata 0,1N.

24.3.6. Solución de tiocianato de amonio 0,1N.

24.3.7. Acido nítrico, d = 1,40.

24.3.8. Solución saturada de sulfato férrico amónico.

24.4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de la muestra, introducirlos en un matraz de 500 ml de fondo plano y añadir 2 g de mostaza blanca triturada finalmente (fuente de fermento) (24.3.1.) y 200 ml de agua a 20 °C. Tapar el matraz y mantenerlo durante dos horas aproximadamente a 20 °C agitándolo frecuentemente. Añadir a continuación 40 ml de etanol (24.3.2.) y una gota de emulsión antiespuma (24.3.3.). Destilar 150 ml aproximadamente y recoger el destilado en un matraz aforado de 250 ml que contenga 20 ml de amoníaco (24.3.4) prestando atención para que la extremidad del refrigerante se sumerja en el líquido. Añadir a la solución amoniacal 50 ml de solución de nitrato de plata 0,1N (24.3.5.) (o más si fuera necesario), colocar sobre el matraz aforado un pequeño embudo y calentar la mezcla durante una hora en un baño de agua hirviendo. Dejar enfriar, completar el volumen con agua, agitar y filtrar. Tomar 100 ml del filtrado límpido, añadir 5 ml de ácido nítrico (24.3.7) y 5 ml aproximadamente de solución de sulfato férrico amónico (24.3.8). Valorar por retroceso el exceso de nitrato de plata con la solución de tiocianato de amonio 0,1N (24.3.6.).

Efectuar una prueba en blanco aplicando el mismo método a 2 g de mostaza blanca triturada finalmente.

24.5. CALCULOS

Restar el volumen de solución de nitrato de plata 0,1N consumido en la prueba en blanco del consumido por la solución de la muestra. El valor obtenido da el número de ml de solución de nitrato de plata 0,1N consumidos por la esencia de mostaza de la muestra analizada. 1 ml de nitrato de plata 0,1N corresponde a 4,956 mg de isotiocianato de alilo. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

24.6. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

25. LACTOSA

25.1. PRINCIPIO

El método permite determinar el contenido en lactosa de los piensos que contengan más del 0,5% de este producto.

Los azúcares se disuelven en el agua. La solución se somete a la fermentación por la levadura Saccharomyces cerevisiae, que deja intacta la lactosa. Previa defecación y filtración, el contenido en lactosa del filtrado se determina por el método de Luff-Schoorl.

25.2. MATERIAL Y APARATOS

Baño de agua provisto de termostato, regulado de 38 a 40 °C.

25.3. REACTIVOS

25.3.1. Suspensión de Saccharomyces cerevisiae.

Poner en suspensión 25 g de levadura fresca en 100 ml de agua. La suspensión se conserva una semana como máximo en el refrigerador.

25.3.2. Solución Carrez I. Disolver en agua 24 g de acetato de cinc dihidrato $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ y 3 ml de ácido acético glacial. Completar a 100 ml con agua.

25.3.3. Solución Carrez II. Disolver en agua 10,6 g de hexacianoferrato (II) de potasio $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$. Completar a 100 ml con agua.

25.3.4. Solución de ácido cítrico. Disolver 50 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7H_2O$) en 50 ml de agua.

25.3.5. Solución de carbonato de sodio. Disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro en 300 ml aproximadamente de agua caliente. Dejar enfriar y enrasar a 300 ml.

25.3.6. Solución de sulfato de cobre. Disolver 25 g de sulfato de cobre pentahidrato ($CuSO_4.5H_2O$), exento de hierro, en 100 ml de agua.

25.3.7. Reactivo de Luff-Schoorl. Verter con cuidado la solución de ácido cítrico (25.3.4.) sobre la solución de carbonato de sodio (25.3.5.). Añadir a continuación la solución de sulfato de cobre (25.3.6.) y completar a 1 litro con agua. Dejar reposar una noche y filtrar. Controlar la normalidad del reactivo obtenido (Cu 0,1N; Na_2CO_3 2N). El pH de la solución debe ser aproximadamente 9,4.

25.3.8. Granos de piedra pómez hervidos con ácido clorhídrico, lavados con agua y secados.

25.3.9. Solución al 30% (p/v) de ioduro de potasio.

25.3.10. Solución de ácido sulfúrico 6N.

25.3.11. Solución de tiosulfato de sodio 0,1N.

25.3.12. Solución de almidón. Mezclar 5 g de almidón con 30 ml de agua y añadir 1 litro de agua hirviendo. Hacer hervir durante tres minutos, dejar enfriar. Añadir 10 mg de ioduro de mercurio (II) como conservador.

25.4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con precisión de 1 mg, 1 gramo de muestra en un matraz aforado de 100 ml. Añadir de 25 a 30 ml de agua. Colocar el matraz durante treinta minutos en un baño de agua hirviendo y refrigerar hasta 35 °C aproximadamente. Añadir 5 ml de suspensión de levadura (25.3.1.) y homogeneizar. Dejar reposar el matraz durante dos horas en un baño de agua, a la temperatura de 38 a 40 °C. Refrigerar a continuación hasta 20 °C aproximadamente.

Añadir 2,5 ml de solución de Carrez I (25.3.2.) y agitar durante treinta segundos, añadir 2,5 ml de solución Carrez II y agitar, completar con agua a 100 ml, mezclar y filtrar. Tomar con pipeta un volumen del filtrado que no exceda 25 ml y que contenga entre 40 a 80 mg de lactosa e introducir en un erlenmeyer de 300 ml. Si fuese necesario completar a 25 ml con agua.

Efectuar de igual forma un ensayo en blanco con 5 ml de suspensión de levadura.

Añadir 25 ml exactamente, del reactivo Luff-Schoorl (25.3.7.), dos gránulos de piedra pómez (25.2.8.). Calentar, agitando manualmente, sobre una llama libre de media altura y llevar el líquido a ebullición durante dos minutos aproximadamente. Colocar inmediatamente el erlenmeyer sobre una tela metálica provista de una pantalla de amianto con un agujero de 6 cm de diámetro aproximadamente, bajo la que se ha encendido previamente una llama. Esta se regula de forma que sólo se caliente el fondo del erlenmeyer. Adaptar a continuación un refrigerante a reflujo sobre el erlenmeyer. A partir de este momento, hacer hervir durante diez minutos exactamente. Refrigerar inmediatamente en agua fría y, después de aproximadamente cinco minutos, valorar tal como se indica:

Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (25.3.9.) e inmediatamente después y con cuidado (debido al riesgo de formación de espuma abundante) 25 ml de ácido sulfúrico 6N (25.2.10.). Valorar a continuación con la solución de tiosulfato de sodio 0,1N (25.3.11.) hasta la aparición de una coloración amarilla clara, añadir el indicador (25.3.12.) y terminar la valoración.

Efectuar la misma valoración sobre una mezcla medida con exactitud de 25 ml de reactivo Luff-Schoorl (25.3.7.) y 25 ml de agua, después de haber añadido 10 ml de solución de yoduro de potasio (25.3.9.) y 25 ml de ácido sulfúrico 6N (25.3.10.) sin llevar a ebullición.

25.5. CALCULOS

Establecer mediante la tabla adjunta la cantidad de lactosa en mg que corresponde a la diferencia entre los resultados de las dos valoraciones expresados en ml de tiosulfato de sodio 0,1N.

Expresar los resultados en partes de lactosa anhidro por cada cien de muestra.

25.6. OBSERVACIONES

25.6.1. Para los productos que contengan más del 40 por ciento de los azúcares fermentados, emplear más de 5 ml de suspensión de levadura (25.3.1.).

25.6.2. Efectuar paralelamente un ensayo con una cantidad conocida de lactosa monohidrato.

TABLA DE VALORES PARA 25 ml DE REACTIVO LUFF-SCHOORL

$Na_2S_2O_3$ 0,1N	Glucosa fructosa azúcares invertidos $C_6H_{12}O_6$		Lactosa $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltosa $C_{12}H_{22}O_{11}$	
ml	mg	diferencia	mg	diferencia	mg	difer.
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2		88,0		94,6	

25.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971 (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

26. POTASIO

26.1. PRINCIPIO

La muestra se incinera y las cenizas se recogen en solución de ácido clorhídrico. El contenido en potasio de la solución se determina por fotometría de llama en presencia de cloruro de cesio y de nitrato de aluminio. La adición de dichas sustancias elimina, en una amplia medida, la interferencia de elementos perturbadores.

El método permite determinar el contenido de potasio en piensos.

26.2. MATERIAL Y APARATOS

26.2.1. Crisoles de incineración de platino, cuarzo o porcelana, en su caso provistos de tapaderas.

26.2.2. Horno eléctrico, con termostato.

26.2.3. Fotómetro de llama.

26.3. REACTIVOS

26.3.1. Acido clorhídrico p.a.; d = 1,12.

26.3.2. Cloruro de cesio p.a.

26.3.3. Nitrato de aluminio nona-hidrato $Al(NO_3)_3.9H_2O$ químicamente puro.

26.3.4. Cloruro de potasio p.a. anhidro.

26.3.5. Solución tampón: disolver en agua 50 g de cloruro de cesio (26.3.2.) y 250 g de nitrato de aluminio (26.3.3.), completar a 1 litro con agua y homogeneizar. Conservar en frascos de material plástico.

26.3.6. Solución patrón de potasio: disolver en agua 1,907 g de cloruro de potasio (26.3.4.), añadiendo 5 ml de ácido clorhídrico (26.3.1.), completar a 1 litro con agua y homogeneizar. Conservar en frascos de material plástico. 1 ml de dicha solución contiene 1,00 mg de potasio.

26.4. PROCEDIMIENTO

26.4.1. Determinación

Pesar con precisión de 10 mg, aproximadamente 10 g de la muestra en un crisol de incineración e incinerar a 450 °C durante tres horas. Después de enfriar, trasvasar cuantitativamente el residuo de incineración con la ayuda de 250 a 300 ml de agua, y después con 50 ml de ácido clorhídrico (26.3.1.) a un matraz aforfado de 500 ml. Después de haber cesado el posible desprendimiento de gas carbónico, calentar la solución y mantenerla durante dos horas a una temperatura cercana a 90 °C, agitando de vez en cuando. Dejar enfriar a la temperatura ambiente, enrasar, agitar y filtrar. Introducir en un matraz aforado de 100 ml una parte alícuota del filtrado que contenga como mínimo 1,0 mg de potasio, añadir 10,0 ml de solución tampón (26.3.5.) enrasar con agua y homogeneizar. Para contenidos más altos de potasio, diluir la solución a analizar en la proporción adecuada, antes de la adición de la solución tampón. El cuadro siguiente se da a título indicativo para una toma de muestras de 10 g aproximadamente.

Contenido supuesto de la muestra en potasio (% K)	Factor de dilución	Parte alícuota en ml de la solución
hasta 0,1	-	50
0,1 a 0,5	-	10
0,5 a 1,0	-	5
1,0 a 5,0	1:10	10
5,0 a 10,0	1:10	5
10,0 a 20,0	1:20	5

Efectuar la medición por fotometría de llama a la longitud de onda de 768 nm. Calcular el resultado mediante la cruva de calibrado.

26.4.2. Curva de calibrado

Introducir 10 ml exactamente de la solución patrón (26.3.6.) en un matraz aforado de 250 ml, enrasar con agua y homogeneizar. Introducir en matraces aforados de 100 ml exactamente: 0, 5, 10, 15, 20 y 25 ml de dicha solución, que corresponden respectivamente a cantidades de potasio de 0, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; y 1,0 mg. Añadir en cada matraz 10,0 ml de solución tampón (26.3.5.) enrasar con agua y homogeneizar. Efectuar las medidas como se indica en (26.4.1.). El trazado de la curva de calibrado es lineal generalmente hasta una concentración en potasio de 1 mg en 100 ml de solución.

26.5. CALCULOS

El contenido en potasio se expresará en porcentaje de muestra.

26.6. OBSERVACIONES

La adición de solución tampón (26.3.5.) para eliminar la interferencia de elementos perturbadores no es siempre necesaria.

26.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

27. SODIO

27.1. PRINCIPIO

La muestra se incinera y las cenizas se recogen en solución de ácido clorhídrico. El contenido en sodio de la solución se determina por fotometría de llama en presencia de cloruro de cesio y de nitrato de aluminio. La adición de estas sustancias elimina, en una amplia medida, la interferencia de elementos perturbadores.

El método permite determinar el contenido de sodio en piensos.

27.2. MATERIAL Y APARATOS

27.2.1. Crisoles de incineración de platino, cuarzo o porcelana, en su caso provistos de tapaderas.

27.2.2. Horno eléctrico, con termostato.

27.2.3. Fotómetro de llama.

27.3. REACTIVOS

27.3.1. Acido clorhídrico p.a., d = 1,12.

27.3.2. Cloruro de cesio, p.a.

27.3.3. Nitrato de alumnio nonahidrato, $Al(NO_3)_3.9H_2O$, químicamente puro.

27.3.4. Cloruro de sodio p.a., anhidro.

27.3.5. Solución tampón: disolver en agua 50 g de cloruro de cesio (27.3.2.) y 250 g de nitrato de alumnio (27.3.3.) completar a 1 litro con agua y homogeneizar. Conservar en frascos de material plástico.

27.3.6. Solución patrón de sodio: disolver en agua 2,542 g de cloruro de sodio (27.3.4.) añadiendo 5 ml de ácido clorhídrico (27.3.1.), completar a 1 litro con agua y homogeneizar. Conservar en frascos de material plástico. 1 ml de dicha solución contiene 1,00 mg de sodio.

27.4. PROCEDIMIENTO

27.4.1. Determinación

Pesar, con precisión de 10 mg, aproximadamente 10 g de la muestra en un crisol de incineración (27.2.1.) e incinerar a 450 °C durante tres horas. Evitar proyección e inflamación. Previo enfriamiento, trasvasar cuantitativamente el residuo de incineración con ayuda de 250 a 300 ml de agua, y después con 50 ml de ácido clorhídrico (27.3.1.) a un matraz aforado de 500 ml.

Después de haber cesado el posible desprendimiento de gas carbónico, calentar la solución y mantenerla durante dos horas a una temperatura cercana a 90 °C, agitando de vez en cuando. Dejar enfriar a temperatura ambiente, enrasar con agua, agitar y filtar. Introducir en un matraz aforado de 100 ml una alícuota del filtrado, que contenga como máximo 1,0 mg de sodio, añadir 10,0 ml de solución tampón (27.3.5.), enrasar con agua y homogeneizar. Para contenidos más altos de sodio, diluir la solución a anlizar en la proporción adecuada, antes de la adición de la solución tampón. La tabla siguiente se da a título informativo, para una toma de muestras de 10 g aproximadamente.

Contenido supuesto de la muestra en solución (% Na)	Factor de dilución	Parte alícuota en ml de la solución
hasta 0,1	-	50
0,1 a 0,5	-	10
0,5 a 1,0	-	5
1,0 a 5,0	1:10	10
5,0 a 10,0	1:10	5
10,0 a 20,0	1:20	5

Efectuar la medida mediante fotometría de llama a una longitud de onda de 589 nm.

Calcular el resultado mediante la curva de calibrado.

27.4.2. Curva de calibrado.

Introducir exactamente 10 ml de la solución patrón (27.3.6.) en un matraz aforado de 250 ml, enrasar con agua y homogenizar. En matraces aforados de 100 ml, introducir exactamente 0, 5, 10, 15, 20 y 25 ml de dicha solución que correspondan respectivamente a unas cantidades de sodio de 0, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; y 1,0 mg. Añadir en cada matraz 10,0 ml de solución tampón (27.3.5.) enrasar con agua y homogeneizar. Efectuar las medidas con se indica en 27.4.1. El trazado de la curva de calibrado es lineal generalmente hasta una concentración en sodio de 1 mg en 100 ml de solución.

27.5. CALCULOS

El contenido en sodio se expresará en porcentaje de muestra.

27.6. OBSERVACIONES

27.6.1. Para los productos cuyo contenido en sodio sea superior al 4%, es preferible incinerar la substancia durante dos horas en un crisol provisto de una tapadera. Después de enfriar, añadir agua, poner un residuo en suspensión con ayuda de un hilo de platino, secar e incinerar de nuevo durante dos horas en el crisol provisto de su tapadera.

27.6.2. Si la muestra está constituía únicamente por materiales minerales, proceder a la disolución, sin previa incineración.

27.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

28. MAGNESIO

28.1. PRINCIPIO

Incineración de la muestra y tratamiento de las cenizas con ácido clorhídrico diluido. Si la muestra no contine sustancias orgánicas, se disuelve directamente en ácido clorhídrico. La solución se diluye y el contenido en magnesio se determina por espectrofotometría de absorción atómica a 285,2 nm, por comparación con las soluciones de calibrado.

Está especialmente indicado para determinar los contenidos en magnesio inferiores al 5% en los piensos.

28.2. MATERIAL Y APARATOS

28.2.1. Crisoles de incineración de platino, cuarzo o porcelana.

28.2.2. Horno o mufla en termostato.

28.3. REACTIVOS

28.3.1. Acido clorhídrico de d = 1,16, p.a.

28.3.2. Acido clorhídrico de d = 1,19, p.a.

28.3.3. Magnesio, en cinta o hilo, o sulfato de magnesio heptahidrato, p.a. ($MgSO_4 7H_2O$) secado en vacio a temperatura ambiente.

28.3.4. Solución de sal de estroncio (cloruro o nitrato) p.a. al 2,5% (p/v) de estroncio, p.a. (76,08 g de Cl_2Sr 6 H_2O/litro, ó 60,38 g de $(NO_3)_2$ Sr/litro).

28.3.5. Solución de calibrado de magnesio: pesar con precisión de 1 mg, 1 g de magnesio (28.3.3.), separando previamente y con cuidado la película de óxido, o una cantidad correspondiente de sulfato de magnesio (28.3.3.). Introducirlo en un matraz de 1.000 ml añadir 80 ml de ClH (28.3.1.) disolver y completar a 1000 ml con H_2O desionizada. 1 ml de dicha solución contiene 1.000 mg de magnesio.

28.4. PROCEDIMIENTO

28.4.1. Preparación de la muestra

28.4.1.1. Piensos formados exclusivamente por sustancias minerales:

a) Pesar con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra e introducirlos en un matraz aforado de 500 ml con 250-300 ml de agua desionizada. Añadir 40 ml de ácido clorhídrico (28.3.1.), llevar a ebullición lenta durante 30 minutos. Enfriar, enrasar con agua desionizada, homgeneizar y filtrar en vaso de precipitado con filtro de pliegues. ELiminar los 30 ml primeros del filtrado.

b) En presencia de silice, tratar 5 g de la muestra con una cantidad sufiente (entre 15 y 30 ml) de ácido clorhídrico (28.3.2.) y evaporar a sequedad sobre un baño de agua. Continuar tal y como se indica en (28.4.1.2.) a partir de la tercera fase.

28.4.1.2. Piensos formados esencialmente por sustancias minerales.

Pesar con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra en un crisol e incinerar a 550 °C en horno mufla hasta la obtención de cenizas exentas de partículas carbonosas.

Para eliminar la silice añadir a las cenizas una cantidad suficiente (entre 15 y 30 ml) de ácido clorhídrico (28.3.2.) y evaporar a sequedad sobre un baño de agua. Secar a continuación una hora en la estufa a 105 °C. Recoger el residuo con 10 ml de ácido clorhídrico (28.3.1.) y transvasar con la ayuda de agua desionizada caliente a un matraz aforado de 500 ml. Llevar a ebullición, dejar enfriar y enrasar con agua desionizada. Homogeneizar y filtrar en vaso a través de un filtro de pliegues. Eliminar los 30 ml primeros del filtrado.

28.4.1.3. Piensos formados esencialmente por sustancias orgánicas:

Pesar con precisión, de 1 mg, 5 g de la muestra en crisol (28.2.1.) e incinerar en un horno mufla hasta la obtención de cenizas exentas de partículas carbonosas. Tratar las cenizas con 5 ml de ácido clorhídrico (28.3.2.), evaporar a sequedad en baño de agua y secar a continuación durante una hora en estufa a 105 °C, para insolubilizar la silice.

Recoger el residuo con 5 ml de ácido clorhídrico (28.3.1.) trasvasar con ayuda de agua desionizada caliente a un matraz aforado de 250 ml. Llevar a ebullición, dejar enfriar y enrasar con agua desionizada. Homogeneizar y filtrar en un vaso a través de un filtro de pliegues. Eliminar los 30 ml primeros del filtrado.

28.4.2. Medida de la absorción atómica.

28.4.2.1. Curva de calibrado.

Preparar, diluyendo la solución de calibrado (28.3.5.) con agua desionizada, al menos 5 soluciones de referencia de concentraciones crecientes, escogidas en función de la zona de medida óptima del espectrofotómetro. Añadir a cada solución 10 ml de solución de sal de estroncio (28.3.4.) y completar al volumen de 100 ml con agua desionizada.

28.4.2.2. Preparación de la muestra.

Diluir con agua desionizada una parte alicuota del filtrado obtenido en (28.4.1.1.), (28.4.1.2.) y (28.4.1.3.) de forma que se obtenga una concentración en magnesio comprendida en los límites de concentración de las soluciones de referencia. La concentración en ácido clorhídrico de dicha solución no debe exceder de 0,4N. Añadir 10 ml de la solución de sal del estroncio (28.3.4.) y completar al volumen de 100 ml con agua desionizada.

Medir la absorción de la solución problema y la de las soluciones de referencia a una longitud de onda de 285,2 nm.

28.5. CALCULOS

Calcular la cantidad de magnesio de la muestra a partir de las soluciones de referencia. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

28.6. OBSERVACIONES

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra, no debe de exceder del 5% en valor relativo.

28.7. REFERENCIAS

Cuarta Directiva de la Comisión, de 5 de diciembre de 1972. (73/46/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 83 de 30 de marzo de 1973.

29. HIERRO

29.1. PRINCIPIO

Determinación del oligoelemento hierro en los piensos y sus materias primas. El límite inferior de determinación es de 20 mg/kg. La muestra se disuelve en solución de ácido clorhídrico, previa destrucción de la materia orgánica. El hierro se determina, después de dilución apropiada, por espectrofotometría de absorción atómica.

29.2. MATERIAL Y APARATOS

29.2.1. Horno mufla, de temperatura regulable.

29.2.2. Material de vidrio borosilicato resistente. Se recomendará utilizar un material que sirva exclusivamente para la dosificación del oligoelemento.

29.2.3. Cápsulas de platino y, eventualmente, de cuarzo.

29.2.4. Espectrofotómetro de absorción atómica, que responda a las exigencias del método, en lo que concierne a la sensibilidad y a la precisión requeridas dentro de los límites de utilidad que se emplea.

29.3. REACTIVOS

29.3.1. Acido clorhídrico p.a., d = 1,19.

29.3.2. Acido clorhídrico 6N.

29.3.3. Acido clorhídrico 0,5N.

29.3.4. Acido fluorhídrico de 38-40% (v/v), con un contenido de hierro inferior a 1 mg/l y cuyo residuo de evaporación sea inferior a 10 mg/l (expresado en sulfatos).

29.3.5. Acido sulfúrico p.a. (d = 1,84).

29.3.6. Agua oxigenada de unos 100 volúmenes de oxígeno (30% en peso).

29.3.7. Solución patrón de hierro (1.000 microgramos de hierro/ml): Disolver 1 g de hierro en hilos p.a., en 200 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.) añadir 16 ml de agua oxigenada (29.3.6.) y completar con agua hasta 1 litro.

29.3.8. Solución patrón de trabajo (100 microgramos de hierro/ml): Tomar 10 ml de la solución patrón (29.3.7.) y llevar a 100 ml con agua.

29.3.9. Solución de cloruro de lantano: Disolver 12 g de óxido de lantano en 150 ml de agua, añadir 100 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.) y completar con agua hasta 1 litro.

29.4. PROCEDIMIENTO

29.4.1. Muestra que contenga compuestos orgánicos.

29.4.1.1. Incineración y preparación de la muestra a analizar.

i) Colocar de 5 a 10 g de la muestra pesados con una precisión de 0,2 mg, en una cápsula de cuarzo o de platino (29.2.3.) (ver 29.6.6.), secar en estufa a 105 °C e introducir la cápsula en el horno mufla (29.2.1.) frío. Cerrar el horno (ver 29.6.7.) y elevar progresivamente la temperatura para alcanzar 450 a 475 °C en 90 minutos aproximadamente. Mantener dicha temperatura durante 4 a 6 horas (por ejemplo durante la noche) para eliminar la materia carbonosa, abrir luego el horno y dejar enfriar (ver 29.6.8.).

Humedecer las cenizas con agua, trasvasarlas a un vaso de precipitado de 250 ml. Enjuagar la cápsula con 5 ml de ácido clorhídrico (29.3.1.) y trasvasar, lentamente y con precaución, la solución de enjuague al vaso de precipitado (se podrá producir una reacción violenta por formación de dióxido de carbono). Añadir luego gota a gota ácido clorhídrico (29.3.1.), agitando al mismo tiempo el contenido del vaso de precipitado, hasta que cese la efervescencia. Evaporar a sequedad agitando periódicamente con una varilla de vidrio.

Añadir al residuo 15 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.) y unos 120 ml de agua. Mezclar con la ayuda de una varilla de vidrio, dejar la misma en el vaso de precipitado y cubrir 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 usando un papel de filtro sin cenizas, y recoger el filtrado en un matraz aforado de 250 ml. Lavar el vaso de precipitado y el filtro con 5 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.) caliente y por dos veces con agua hirviendo. Completar con agua hasta enrasar (la concentración en ácido clorhídrico será de 0,5N aproximadamente).

ii) Si el residuo que se queda en el filtro apareciese nego (carbonoso), colocarlo de nuevo en el horno e incinerar de 450 a 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 resíduo en unos 2 ml de ácido clorhídrico (29.3.1.). Evaporar a sequedad y añadir 5 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.). Calentar, filtrar la solución en el matraz aforado y completar con agua hasta enrasar (la concentración en ácido clorhídrico será de 0,5N aproximadamente).

29.4.1.2. Preparación de las soluciones patrón.

Preparar una gama de soluciones patrón a partir de la solución patrón de trabajo (29.3.8) de forma que cada solución patrón tenga una concentración en ácido clorhídrico de 0,5N aproximadamente y una concentración de cloruro de lantano que corresponda a 0,1% de lantano (p/v) (29.3.9.). Las concentraciones escogidas del oligoelemento deberán encontrarse en la zona de sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. El cuadro siguiente dará, a titulo de ejemlo, los tipos de composición de solución patrón; según el tipo y la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado, podrá ser necesario escoger otras concentraciones:

H I E R R O:

µg de Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de solución patrón de trabajo (29.3.8.)							
(1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ml ClH 6N(29.3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de solución de cloruro de lantano (29.3.9.). Completar con agua hasta 100 ml.							

Si la muestra tuviese una relación ponderal

$$\frac{Ca + Mg}{P} > 2$$

, se podrá omitir la adición de la solución de cloruro de lantano (29.3.9).

29.4.1.2.2. Preparación de la solución a analizar.

Introducir con pipeta una alícuota de la solución preparada según (29.4.1.1.) en un matraz aforado de 100 ml; añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (29.3.9.). Completar con ácido clorhídrico 0,5N (29.3.3.).

Si la muestra tuviese una relación ponderal

$$\frac{Ca + Mg}{P} > 2$$

, se podrá omitir la adición de la solución de cloruro de lantano (29.3.9.).

29.4.1.2.3. Prueba en blanco:

Realizar una prueba en blanco que comprenda todas las etapas prescritas del procedimiento operativo, sin la presencia de la muestra. No se deberá utilizar la solución patrón "0" para la prueba en blanco.

29.4.1.2.4. Medida por absorción atómica:

Medir la absorbancia de las soluciones patrón y de la solución a analizar, utilizando una llama oxidante de aire-acetileno a la longitud de onda de: 248,3 nm. Realizar 4 veces cada medida.

29.4.2. Compuestos minerales:

En ausencia de materia orgánica, sera inútil la incineración previa. Aplicar el procedimiento operativo a partir del punto (29.4.1.1.,i) segundo apartado (ver 29.6.6.).

29.5. CALCULOS

Calcular la concentración del oligoelemento en la solución a analizar mediante una curva de calibrado y expresar el resultado en mg de oligoelemento por Kg de muestra (ppm).

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

- 5 mg/kg en valor absoluto, para el contenido en el oligoelemento 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.

29.6. OBSERVACIONES

29.6.1. El agua empleada para la preparación de reactivos y de las soluciones requeridas durante el análisis, deberá estar exenta del catión a determinar. Se obtendrá, bien por doble destilación en un aparato de borosilicato o de cuarzo, bien por doble permutación en resina intercabiadora de iones.

29.6.2. Los reactivos deberán ser, al menos, de la calidad "para análisis" (p.a.). La ausencia del elemento a determinar,

deberá controlarse por un ensayo en blanco. Si fuese necesario, se someterán los reactivos a una purificación más profunda.

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

29.6.4. Los forrajes verdes (frescos o deshidratados) pueden contener grandes cantidades de sílice vegetal que puedan retener el oligoelemento y que se deberán eliminar. Se someterán las muestras de dichos piensos al siguiente tratamiento: Efectuar la operación (29.4.1.1.) hasta la fase de filtración. Lavar el papel de filtro, que contenga el residuo insoluble, por dos veces con agua hirviendo y colocarlo en una cápsula de platino (29.2.3.). Incinerar en el horno mufla (29.2.1.) a una temperatura inferior a 550 °C hasta que toda la materia carbonosa haya desaparecido por completo. Dejar enfriar, añadir algunas gotas de agua y de 10 a 15 ml de ácido fluorhídrico (29.3.4.). Evaporar a sequedad a 150 °C aproximadamente. Si el resíduo contiene aún sílice, disolver la misma en algunos ml de ácido fluorhídrico (29.3.4.) y evaporar a sequedad. Añadir 5 gotas de ácido sulfúrico (29.3.5.) y calentar hasta desaparición de los humos blancos. Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.) y 30 ml aproximadamente de agua, calentar, filtrar la solución en un matraz aforado de 250 ml y completar hasta enrasar (La concentración de ácido clorhídrico será de 0,5N aproximadamente). Proseguir el procedimiento a partir del punto (29.4.1.2.).

29.6.5. Al determinar el oligoelemento será oportuno llamar la atención en cuanto a los riesgos de contaminación. Por ello, los instrumentos utilizados para la preparación de las muestras deberán estar exentos de dicho metal.

Para reducir los riesgos de contaminación, convendrá trabajar en atmósferas exentas de polvo, con un material rigurosamente limpio y aparatos de vidrio cuidadosamente lavados.

29.6.6. Calcular el peso de la muestra en función del contenido aproximado en el pienso del oligoelemento a valorar y de la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. Para determinados piensos pobres en el oligoelemento, podrá ser necesario extraer una muestra de 10 a 20 g y limitar el volúmen de la solución final a 100 ml.

29.6.7. Incinerar en un horno cerrado sin inyección de aire o de oxígeno.

29.6.8. La temperatura no deberá sobrepasar los 475 °C.

29.7. REFERENCIAS

Octava Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1978. (78/633/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 206 de 29 de julio de 1978.

30. COBRE

30.1. PRINCIPIO

Determinación del oligoelemento cobre en los piensos y sus materias primas. El límite inferior de determinación es de 10 mg/kg. La muestra se disuelve en solución de ácido clorhídrico, previa destrucción de la materia orgánica. El cobre se determina, después de dilución apropiada, por espectrometría de absorción atómica.

30.2. MATERIAL Y APARATOS

Idem 29.2.

30.3. REACTIVOS

Idem 29.3. hasta 29.3.6. inclusive.

30.3.7. Solución patrón de cobre (1000 microgramos de cobre/ml). Disolver 1 g de cobre en polvo p.a. en 25 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.), añadir 5 ml de agua oxigenada (29.3.6.) y completar con agua hasta 1 l.

30.3.8. Solución patrón de trabajo (10 microgramos de cobre/ml). Tomar 10 ml de la solución patrón (30.3.7.) y llevar a 1000 ml con agua.

30.4. PROCEDIMIENTO

Idem 29.4. hasta 29.4.1.2.

30.4.1.2. Determinación espectrofotométrica.

30.4.1.2.1. Preparación de las soluciones patrón.

Preparar una gama de soluciones patrón a partir de la solución de trabajo (30.3.8.) de forma que cada solución patrón tenga una concentración de ácido clorhídrico de 0,5N aproximadamente. Las concentraciones escogidas del oligoelemento deberán encontrarse en la zona de sensibilidad del espectrofotómetro utilizado.

El cuadro siguiente dará, a título de información, los tipos de composición de la solución patrón; según el tipo y la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado, podrá ser necesario escoger otras concentraciones:

C O B R E:

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solución patrón de trabajo (30.3.8.)							
(1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml ClH 6N (29.3.2)	8	8	8	8	8	8	8
completar con agua hasta 100 ml							

30.4.1.2.2. Preparación de la solución a analizar.

La solución preparada según (29.4.1.1.), podrá, como norma general, utilizarse directamente. Si fuese necesario llevar su concentración a la gama de las concentraciones de las soluciones patrón, se podrá introducir con pipeta una alícuota en un matraz aforado de 100 ml y completar con ácido clorhídrico 0,5N (29.3.3.) hasta enrasar.

30.4.1.2.3. Prueba en blanco. Idem 29.4.1.2.3.

30.4.1.2.4. Medida por absorción atómica.

Medir la absorbancia de las soluciones patrón y de la solución a analizar, utilizando una llama oxidante de aire-acetileno, con una longitud de onda de 324,8 nm. Realizar cuatro veces cada medida.

30.4.2. Compuestos minerales. Idem 29.4.2.

30.5 CALCULOS

Idem 29.5.

30.6. OBSERVACIONES

Idem 29.6.

30.7. REFERENCIAS

Idem 29.7.

31. MANGANESO

31.1. PRINCIPIO

Determinación del oligoelemento manganeso en los piensos y sus materias primas. El límite inferior de determinación será de 20 mg/kg. La muestra se disuelve en solución de ácido clorhídrico, previa destrucción de la materia orgánica. El manganeso se determina, después de dilución apropiada, por espectrofotometría de absorción atómica.

31.2. MATERIAL Y APARATOS

Idem 29.2.

31.3. REACTIVOS

Idem 29.3 hasta 29.3.6. inclusive.

31.3.7. Solución patrón de manganeso (1000 microgramos Mn/ml): Disolver 1 g de manganeso polvo p.a. en 25 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.) y completar con agua hasta 1 litro.

31.3.8. Solución patrón de trabajo (10 microgramos Mn/ml): Tomar 10 ml de la solución patrón (31.3.7.) y llevar a 1000 ml con agua.

31.3.9. Idem 29.3.9.

31.4. PROCEDIMIENTO

Idem 29.4. hasta 29.4.1.2.3. inclusive, a excepción del cuadro de los tipos de composición de la solución patrón.

MANGANESO

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
ml de solución patrón (31.3.8.) de trabajo							
(1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml ClH 6N (29.3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solución de cloruro de lantano (29.3.9.), completar con agua hasta 100 ml.

31.4.1. Medida por absorción atómica.

Medir la absorbancia de las soluciones patrón y de la solución a analizar, utilizando una llama oxidante aire-acetileno con una longitud de onda de 279,5 nm. Realizar 4 veces cada medida.

31.4.2. Idem 29.4.2.

31.5. CALCULOS

Idem 29.5.

31.6. OBSERVACIONES

Idem 29.6.

31.7. REFERENCIAS

Idem 29.7.

32. CINC

32.1. PRINCIPIO

Determinación del oligoelemento cinc en los piensos y sus materias primas. El límite inferior de determinación será de 20 mg/kg. La muestra se disuelve en solución de ácido clorhídrico, previa destrucción de la materia orgánica. El cinc se determina, después de dilución apropiada, por espectrofotometría de absorción atómica.

32.2. MATERIAL Y APARATOS

Idem 29.2.

32.3. REACTIVOS

Idem 29.3. hasta 29.3.6. inclusive.

32.3.7. Solución patrón de cinc (1000 microgramos Zn/ml): Disolver 1 g de cinc en cinta o placa, p.a., en 25 ml de ácido clorhídrico 6N (29.3.2.) y completar con agua hasta 1 litro.

32.3.8. Solución patrón de trabajo (10 microgramos Zn/ml): Tomar 10 ml de la solución patrón (32.3.7.) y llevar a 1000 ml con agua.

32.3.9. Idem 29.3.9.

32.4. PROCEDIMIENTO

Idem 29.4. hasta 29.4.1.2.3. inclusive, a excepción del cuadro de los tipos de composición de la solución patrón.

CINC

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de solución patrón de trabajo (32.3.8)							
(1 ml = 10 µg Zn)	0	0,05	1	2	4	6	8
+ ml ClH 6N (29.3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solución de cloruro de lantano (29.3.9.); completar con agua hasta 100 ml.

32.4.1. Medida por absorción atómica.

Medir la absorbancia de las soluciones patrón y de la solución analizar, utilizando una llama oxidante aire-acetileno con una longitud de onda de 213,8 nm. Realizar 4 veces cada medida.

32.4.2. Idem 29.4.2.

32.5. CALCULOS

Idem 29.5.

32.6. OBSERVACIONES

Idem 29.6.

Además tener en cuenta (29.6.5.) que la determinación del cinc es especialmente sensible a las cotaminaciones procedentes de los aparatos de vidrio, de los reactivos, del polvo y de otros elementos perturbadores.

32.7. REFERENCIAS

Idem 29.7.

33. HUMEDAD EN LAS GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES

33.1. PRINCIPIO

La muestra se somete a desecación a 103 °C hasta peso constante.

Este método permite determinar el contenido en humedad (agua y otras materias volátiles) de las grasas y aceites animales y vegetales.

33.2. MATERIAL Y APARATOS

33.2.1. Recipientes de fondo plano, de material resistente a la corrosión con diámetro de 8-9 cm y altura de aproximadamente 3 cm.

33.2.2. Termómetro de mercurio, de bulbo reforzado y cámara de dilatación en el extremo superior, graduado de 80 a 110 °C como mínimo y de una longitud de 10 cm aproximadamente.

33.2.3. Baño de arena o placa calefactora eléctrica.

33.2.4. Desecador conteniendo un deshidratante eficaz.

33.2.5. Balanza analítica.

33.3. PROCEDIMIENTO

Pesar, con precisión de 1 mg, 20 g aproximadamente de la muestra homogeneizada, en el recipiente (33.2.1.), seco y tarado, conteniendo el termómetro (33.2.2.). Calentar sobre baño de arena o placa calefactora (33.2.3.), agitando constantemente con la ayuda del termómetro, de forma que la temperatura llegue a 90 °C en 7 minutos aproximadamente.

Elevar la temperatura lentamente, sin superar los 105 °C, agitando con el termómetro hasta el cese de burbujas.

Para garantizar la completa eliminación de la humedad, repetir varias veces el calentamiento a 103 °C ± 2 °C, enfriar a continuación en desecador (33.2.4.) hasta temperatura ambiente y pesar. Repetir esta operación hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no exceda en más de 2 mg.

33.4. CALCULOS

El contenido en humedad de la muestra, en %, viene dado por la fórmula:

$$(P_1 - P_2) \times \frac{100}{P_0}$$

Siendo:

P_0 = Peso en gramos de la muestra.

P_1 = Peso en gramos del recipiente con su contenido, antes del calentamiento.

P_2 = Peso en gramos, del recipiente con su contenido, después del calentamiento.

Los resultados por debajo del 0,05% deben expresarse como "menos del 0,05%".

33.5. OBSERVACIONES

33.5.1. Un incremento del peso de la muestra después de un calentamiento repetido indica una oxidación de la grasa. En este caso hacer el cálculo a partir de la pesada efectuada inmediatamente antes de aparecer este incremento de peso.

33.5.2. La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder del 0,05% en valor absoluto.

33.6. REFERENCIAS

Cuarta Directiva de la Comisión de 5 de diciembre de 1972. (73/46/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 83, de 30 de marzo de 1973.

34(a). ALMIDON
(Método polarimétrico)

34(a).1. PRINCIPIO

El método comprende una doble determinación. En la primera, la muestra se trata en caliente mediante ácido clorhídrico diluído. Previa defecación y filtración, se medirá mediante un polarímetro el poder rotatorio de la solución.

En el segundo, la muestra se extrae mediante etanol al 40%. Tras la acidificación del filtrado por el ácido clorhídrico, defecación y filtración, se mide el poder rotatorio en las mismas condiciones que en la primera determinación.

La diferencia entre los dos multiplicada por un factor común dá como resultado el contenido en almidón de la muestra.

El método permite determinar el contenido en almidón y sus productos de degradación de alto peso molecular en los piensos, excepto de aquellos que contienenen peladuras, pulpas, hojas o cuellos secos de remolacha, pulpa de patata, levadura deshidratada, productos ricos en inulina (por ejemplo, peladuras y harina de chufas) o chicharrones.

34(a).2. MATERIAL Y APARATOS

34(a).2.1. Erlenmeyer de 250 ml de boca esmerilada, con refrigerante de reflujo.

34(a).2.2. Polarímetro o sacarímetro.

34(a).3. REACTIVOS

34(a).3.1. Acido clorhídrico al 25% (p/p), d = 1,126.

34(a).3.2. Acido clorhídrico al 1,128% (p/v)

La concentración debe comprobarse mediante valoración con la ayuda de una solución de hidróxido de sodio 0,1N en presencia de rojo de metilo al 0,1% (p/v) en etanol al 94% (v/v) (10 ml = 30,94 ml de NaOH 0,1N).

34(a).3.3. Solución de Carrez I: Disolver en agua 21,9 g de acetato de cinc dihidrato ($Zn(CH_3 - COO)_2 .2H_2O$) y 3 g de ácido acético glacial. Completar a 100 ml con agua.

34(a).3.4. Solución de Carrez II: Disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio trihidrato ($K_4 Fe(CN)_6 . 3H_2O$). Completar con agua.

34(a).3.5. Etanol al 40% (v/v), d= 0,948 a 20 °C.

34(a).4. PROCEDIMIENTO

34(a).4.1. Preparación de la muestra.

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

34(a).4.2. Determinación del poder rotatorio total (P o S) (v. observaciones (34.(a)6.1).

Pesar, con precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra molida e introducir en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 25 ml de ácido clorhídrico 34(a).3.2, agitar para obtener un buen reparto de la muestra y añadir de nuevo 25 ml de ácido clorhídrico 34(a).3.2. Sumergir el matraz en un baño de agua hirviendo y, durante los 3 primeros minutos siguientes agitar enérgicamente y con regularidad para evitar la formación de aglomerados. La cantidad de agua del baño debe ser suficiente para permitir mantener el baño en ebullición cuando el matraz esté sumergido en él. Este no podrá ser retirado del baño a lo largo de la agitación. Después de 15 minutos exactamente, retirar el matraz del baño, añadir 30 ml de agua fría y enfriar inmediatamente hasta 20 °C.

Añadir 5 ml de la solución de Carrez I (34(a).3.3.) y agitar durante un minuto. Añadir a continuación 5 ml de solución de Carrez II (34(a).3.4.) y agitar de nuevo, durante un minuto. Completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar. Si el filtrado no está perfectamente limpido (lo que es poco frecuente), volver a comenzar el análisis empleando una cantidad mayor de las soluciones de Carrez I y II, por ejemplo 10 ml.

Medir a continuación el poder rotatorio de la solución en un tubo de 200 mm mediante un polarímetro o un sacarímetro.

34(a).4.3. Determinación del poder rotatorio (P' o S') de las sustancias solubles en el etanol al 40%.

Pesar, con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra, introducirlos en un matraz aforado de 100 ml y añadir 80 ml aproximadamente de etanol (34(a).3.5) (v. observaciones 34(a).6.2). Dejar el matraz en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente; a lo largo de este lapso de tiempo, proceder 5 veces a una agitación enérgica de forma que la toma de muestra esté bien mezclada con el etanol. Llevar después a volúmen con el etanol (34(a).3.5), homogeneizar y filtrar.

Introducir mediante pipeta 50 ml del filtrado (=2,5 g de la muestra) en un erlenmeyer de 250 ml. Añadir 2,1 ml. Añadir 2,1 ml de ácido clorhídrico (34(a).3.1) y agitar energicamente. Ajustar un refrigerante a reflujo al erlenmeyer y sumergirlo en un baño de agua hirviendo. Después de 15 minutos exactamente, retirar el erlenmeyer del baño, trasvasar su contenido a un matraz aforado de 100 ml lavando con un poco de agua fría y enfriar hasta 20 °C. Defecar a continuación con ayuda de las soluciones de Carrez I (34(a).3.3.) y Carrez II (34(a).3.4), completar a volumen con agua, homogeneizar, filtrar y medir el poder rotatorio como se indica en 34(a).4.2., párrafos segundo y tercero.

34(a).5. CALCULOS

El contenido en almidón en % de muestra se obtiene mediante las siguientes fórmulas:

34(a).5.1. Mediciones efectuadas con polarímetro.

$$\% \text{ de almidón} = \frac{2000\ (P - P')}{(\alpha)_D^{20°}}$$

siendo:

P = poder rotatorio total en grados de arco.

P' = poder rotatorio en grados de arco para las sustancias solubles en etanol al 40%.

$(\alpha)_D^{20°}$ = poder rotatorio específico del almidón puro. Los valores convencionales admitidos para dicho factor son los siguientes:

+ 185,9°: almidón de arroz.
+ 185,4°: almidón de patata.
+ 184,6°: almidón de maíz.
+ 182,7°: almidón de trigo.
+ 181,5°: almidón de cebada.
+ 181,3°: almidón de avena.
+ 184,0°: otros tipos de almidón, así como mezclas de almidones de los piensos compuestos.

34(a).5.2. Mediciones efectuadas mediante sacarímetro.

$$\% \text{ de almidón} = \frac{2000}{(\alpha)_D^{20°}} \cdot \frac{(2N \times 0{,}665)\ (S-S')}{100} = \frac{26{,}6N\ (S-S')}{(\alpha)_D^{20\ °C}}$$

siendo:

S = poder rotatorio total en grados sacarímetros.

S' = poder rotatorio en grados sacarimétricos dado por las sustancias solubles en el etanol al 40%.

N = peso en g de sacarosa en 100 ml de agua dando, bajo un espesor de 200 mm, un poder rotatorio de 100° sacarimétricos.

16,29 para los sacarímetros franceses.
26,00 para los sacarímetros alemanes.
20,00 para los sacarímetros mixtos.

$(\alpha)_D^{20°}$ = poder rotatorio específico del almidón puro (34(a).5.1)

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder del 0,4 en valor absoluto para los contenidos en almidón inferiores al 40%; 1,1% en valor relativo para los contenidos en almidón iguales o superiores al 40%.

34(a).6. OBSERVACIONES

34(a).6.1. Cuando la muestra contenga más del 6% de carbonatos calculados en carbonato de calcio, éstos deben ser destruídos mediante un tratamiento con ayuda de una cantidad exactamente apropiada de ácido sulfúrico diluído, antes de la determinación del poder rotatorio total.

34(a).6.2. En el caso de los productos de elevado contenido en lactosa, tales como el polvo de suero láctico o de leche descremada, proceder como sigue después de la adición de los 80 ml de etanol (34(a).3.5). Ajustar al matraz un refrigerante de reflujo, sumergir el matraz durante 30 minutos en un baño de agua a 50 °C. Dejar a continuación enfriar y seguir con el análisis tal como se indica en (34(a).3.5).

34(a).7. REFERENCIAS

Tercera Directiva de la Comisión de 27 de abril de 1972. (72/199 /CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 123 de 29 de mayo de 1972.

34(b). ALMIDON
(Método de la pancreatina)

34(b).1. PRINCIPIO

Los azúcares presentes en la muestra son eliminados por extracción con etanol. El almidón del residuo de extracción es sacarificado por la pancreatina. Los azúcares son hidrolizados por el acido clorhídrico, y la glucosa formada es valorada por el método de Luff-Schoorl. La cantidad de glucosa obtenida multiplicada por un factor constante dá el contenido en almidón de la muestra.

El método permite determinar el contenido en almidón y productos de su degradación de elevado peso molecular en los alimentos que contienen peladuras, pulpa, hojas o cuellos desecados de remolacha, pulpa de patata, levaduras deshidratadas, productos ricos en inulina (por ejemplo fracciones y harina de chufas o de patacas). La valoración debe ser realizada sólamente cuando el exámen microscópico indica la presencia en la muestra de cantidades apreciables de almidón.

34(b).2. MATERIAL Y APARATOS

34(b).2.1. Extractor (Ver Figura nº 1) que se compone de:

34(b).2.1.1. Matraz erlenmeyer de 500 ml de cuello largo.

34(b).2.1.2. Refrigerante de reflujo adaptado al matraz erlenmeyer.

34(b).2.1.3. Varilla corrediza situada en el tubo central del refrigerante provista de un gancho en su extremidad inferior y una pinza para fijar la varilla.

34(b).2.1.4. Cestillo metálico, destinado a ser suspendido del gancho de la varilla (34(b).2.1.3.) y a soportar el crisol filtrante (34(b).2.1.5.).

34(b).2.1.5. Crisol de placa filtrante, dimensión máxima del poro: 90-150 micrometro (por ejemplo G 1), de aproximadamente 30 ml de capacidad.

34(b).2.1.6. Filtros de papel de formato adecuado al crisol filtrante (34(b)2.1.5.).

34(b).2.2. Estufa de incubación regulada a 38 °C.

34(b).2.3. Matraces aforados de 200 ml con boca esmerilada normalizada y refrigerante de reflujo.

34(b).2.4. Matraces aforados 100 ml con boca esmerilada normalizada y refrigerante de reflujo.

34(b).3. REACTIVOS

34(b).3.1. Etanol 90% (V/V) neutro a la fenolftaleína.

34(b).3.2. Alcohol n-amílico p.a.

34(b).3.3. Tolueno p.a.

34(b).3.4. Solución tampón: Disolver en agua 9,078 g de fosfato monopotásico KPO_4H_2 y 11,876 g de fosfato disódico dihidrato $Na_2PO_4H \cdot 2H_2O$. Completar a un litro con agua.

34(b).3.5. Solución de cloruro de sodio: 0,2N.

34(b).3.6. Solución de Carrez I: Disolver en agua 21,9 g de acetato de cinc dihidrato $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ y 3 g de ácido acético glacial. Completar a 100 ml con agua.

34(b).3.7. Solución de Carrez II: Disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro potásico trihidrato $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$. Completar a 100 ml con agua.

34(b).3.8. Acido clorhídrico 1N.

34(b).3.9. Acido clorhídrico p.a. aproximadamente 8N, (d=1,125).

34(b).3.10. Solución de hidróxido de sodio p.a. aproximadamente 10N (d= 1,33).

34(b).3.11. Indicador. Solución de naranja de metilo al 0,1% (P/V).

34(b).3.12. Pancreatina pulverulenta respondiendo a las prescripciones dadas en (34(b).6.3.). Conservar en recipientes cerrados, protegidos de la luz y de la humedad.

34(b).3.13. Reactivo de Luff Schoorl: Verter agitando cuidadosamente la solución de ácido cítrico (34(b).3.13.2.) en la solución de carbonato de sodio (34(b).3.13.3.). Añadir a continuación la solución de sulfato de cobre (34(b).3.13.1.) y completar hasta un litro con agua. Dejar reposar una noche y filtrar. Controlar la normalidad del reactivo así obtenida (0,1N Cu, 2N Na_2CO_3). El pH será de 9,4 aproximadamente.

34(b).3.13.1. Solución de sulfato de cobre:

Disolver 25 g de sulfato de cobre pentahidrato p.a. $CuSO_4.5H_2O$ en 100 ml de agua.

34(b).3.13.2. Solución de ácido cítrico:

Disolver 50 g de ácido cítrico monohidrato p.a. $C_6H_8O_7.H_2O$ en 50 ml de agua.

34(b).3.13.3. Solución de carbonato de sodio:

Disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro p.a. en 300 ml aproximadamente de agua caliente. Dejar enfriar.

34(b).3.14. Gránulos de piedra pómez hervidos con ácido clorhídrico lavados con agua y desecados.

34(b).3.15. Solución al 30% (P/V) de yoduro de potasio p.a.

34(b).3.16. Acido sulfúrico aproximadamente 6N (d= 1,18).

34(b).3.17. Solución de tiosulfato de sodio 0,1N.

34(b).3.18. Solución de almidón: Añadir una mezcla de 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua, a 1 litro de agua hirviendo. Hervir durante 3 minutos y luego dejar enfriar. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

34(b).4. PROCEDIMIENTO

34(b).4.1. Preparación de la muestra:

Moler la muestra de manera que pase totalmente a través de un tamiz de mallas de 0,5 mm.

34(b).4.2. Extracción:

Pesar, con la precisión de 1 mg, 2 g de muestra e introducirlos en un crisol filtrante (34(b).2.1.5.), cuyo fondo ha sido previamente recubierto con papel de filtro (34(b)2.1.6.) humedecido con etanol (34(b).3.1.). Introducir en el matraz erlenmeyer (34(b).2.1.1.) 55 ml de etanol (35(b).3.1.) y algunos gránulos de piedra pómez (34(b).3.14.). Situar el crisol filtrante en el cestillo metálico (34(b).2.1.4.). y suspenderlo del gancho de la varilla (34(b).2.1.3.). Situar el refrigerante sobre el matraz erlenmeyer y bajar la varilla de forma que el fondo del crisol sobresalga de la superficie del etanol. Fijar la varilla a esta altura con la ayuda de la pinza. Llevar el etanol a ebullición y mantenerlo durante 3 horas. Dejar enfriar a continuación y elevar la varilla (34(b).2.1.3.) de forma que se eleve el crisol tan alto como sea posible en el matraz erlenmeyer. Destaparlo con cuidado y dejar caer 45 ml de agua a lo largo de la pared del erlenmeyer. Colocar de nuevo el refrigerante sobre el matraz y mantener el crisol filtrante a 10 cm del nivel del líquido. Llevar este líquido a ebullición y mantenerlo así 3 horas. Enfriar inmediatamente, abrir el matraz y retirar el crisol del cestillo.

34(b).4.3. Sacarificación o hidrólisis:

Situar el crisol filtrante en un recipiente vacío y desecar por aspiración. Depositar el residuo de extracción en un mortero y triturar finamente. Trasvasar cuantitativamente el polvo con ayuda de 60 ml de agua aproximadamente a un matraz redondo aforado de 200 ml esmerilado normalizado y añadir algunas go-

tas de alcohol amílico (34(b).3.2.). Ajustar al recipiente un refrigerante de reflujo. Calentar a ebullición y mantener así durante una hora. A continuación enfriar y desconectar el refrigerante. Añadir 25 ml de solución tampón (34(b).3.4.) y 250 mg de pancratina (34(b).3.12.) 2,5 ml de solución de cloruro sódico (34(b).3.5.) de 10 gotas de tolueno. Agitar durante dos minutos, situar el recipiente en la estufa de incubación (34(b).2.2.) y mantenerlo durante 21 horas, agitando de vez en cuando. A continuación dejar enfriar a temperatura ambiente.

Añadir 5 ml de solución de Carrez I (34(b).3.6.) y agitar durante 1 minuto. Añadir a continuación 5 ml de solución Carrez II (34(b).3.7.) agitar de nuevo durante un minuto. Completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar. Tomar con pipeta 50 ml de filtrado y llevarlos a un recipiente aforado de 100 ml. Añadir algunas gotas del indicador (34(b).3.11.) y acidificar con ácido clorhídrico 8N (34(b).3.9. hasta que vire a rojo. Añadir a continuación 6,25 ml de ácido clorhídrico 8N, en exceso (12,5 ml si se actúa sobre 100 ml de filtrado). Acoplar el refrigerante de reflujo al recipiente, poner la solución a ebullición y mantenerla durante una hora. Dejar enfriar, neutralizar con la solución de hidróxido sódico 10N (34(b).3.10.) hasta que vire a amarillo el indicador. Acidificar a continuación ligeramente añadiendo un poco de ácido clorhídrico 1N (34(b).3.3.), completar el volumen con agua y homogeneizar. Determinar el contenido en glucosa con el método de Luff-Schoorl como se indica en (34(b).4.4.).

34(b).4.4. Valoración según Luff Schoorl:

Tomar con pipeta, 25 ml de reactivo Luff-Schoorl (34(b).3.13.) y llevarlo a un erlenmeyer de 300 ml; añadir 25 ml, exactamente medidos, de la solución obtenida en (34(b).4.3.) conteniendo un máximo de 60 mg de glucosa. Añadir dos trocitos de piedra pómez (34(b).3.14.), calentar, agitando a mano, sobre una llama libre de una altura media, hasta que el líquido esté sometido a ebullición en dos minutos aproximadamente. Situar inmediatamente el erlenmeyer sobre una tela metálica con disco en amianto donde se ha hecho una abertura de aproximadamente 6 cm de diámetro, debajo de la cual se ha encendido previamente una llama. Esta se regula de forma que solamente se caliente el fondo del matraz. A continuación adaptar un refrigerante de reflujo al matraz. A partir de este momento someterlo a ebullición durante diez minutos exactamente. Enfriar inmediatamente en agua fría y después de cinco minutos aproximadamente, valorar como sigue:

Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (34(b) 3.15) e inmediatamente con precaución (en razón del riesgo de formación de espuma abundante), añadir 25 ml de ácido sulfúrico 6N (34(b).3.16). Valorar a continuación con solución de tiosulfato de sodio 0,1N (34(b).3.17), hasta la aparición de una coloración amarilla suave; añadir como indicador la solución de almidón (34(b).3.18) y realizar la valoración hasta el final.

Efectuar la misma valoración sobre una mezcla exactamente medida de 25 ml de reactivo Luff-Schoorl (34(b).3.13) y 25 ml de agua, después añadir 10 ml de solución de yoduro potásico (34(b).3.15) y 25 ml de ácido sulfúrico 6N (34(b).3.16) sin poner a ebullición.

34(b).4.5. Ensayo en blanco:

Efectuar un ensayo en blanco aplicando el modo operativo descrito en 34(b).4.3. y 34(b).4.4. en ausencia de la muestra.

34(b).5. CALCULOS

Establecer con la ayuda de la tabla adjunta la cantidad de glucosa en mg correspondiente a la diferencia entre los resultados de las dos valoraciones (expresadas en ml de tiosulfato de sodio 0,1N) que se refieren tanto a la muestra como al ensayo en blanco.

El contenido en almidón expresado en porcentaje de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$0{,}72\ (a - b)$$

En la que:

a = mg de glucosa en la muestra.

b = mg de glucosa en el ensayo en blanco (Ver observación 34(b).6.2).

34(b).6. OBSERVACIONES

34(b).6.1. La presencia simultánea en la muestra de almidón parcialmente dextrinado y de lactosa pueden dar lugar a un resultado con un exceso de 0,5 a 3% de almidón. En este caso, el contenido real en almidón se obtiene como sigue:

a) Determinar el contenido en azúcares reductores del extracto etanólico obtenido en (34(b).4.2) y expresar el resultado en porcentaje de glucosa.

b) Determinar el contenido en la muestra de azúcares reductores, solubles en agua y expresar el resultado en % de glucosa.

c) Restar el resultado obtenido en a) del obtenido en b) y multiplicar la diferencia por 0,9.

d) Restar el valor obtenido en c) del contenido en almidón obtenido por la aplicación del método y calcularlo como se indica en (34(b).5).

34(b).6.2. La cantidad de glucosa en el ensayo en blanco es normalmente de 0,25 mg y no puede ser superior a 0,50 mg.

34(b).6.3. Prescripciones concernientes a la Pancreatina.

Aspecto físico: Polvo blanco amarillo, amorfo.

Contenido en glucosa: La cantidad de glucosa del ensayo en blanco (ver 34(b).4.5) normalmente es de 0,25 mg. Un resultado superior a 0,50 indica que la pancreatina no se puede utilizar.

Control de consumo de iodo: Poner en suspensión 62,5 mg de pancreatina en 50 ml de agua y llevar a 25-30 °C. Añadir 1 ml de solución de iodo 0,1N. Remover durante 2 minutos. Valorar con una solución de tiosulfato de sodio 0,1N (34(b).3.17.) en presencia del indicador de almidón. El consumo de solución de iodo por la pancreatina no debe pasar de 0,5 ml.

Control de la actividad amilolítica: Mezclar 100 ml de solución de almidón (34(b).3.18.), 5 ml de la solución tampón (34(b).3.4.), 0,5 ml de la solución de cloruro sódico (34(b).3.5.) y 62,5 mg de pancreatina. La mezcla se calienta a 25-30 °C y se remueve durante 2 minutos. Luego se añade 1 ml de solución de iodo 0,1N. La coloración azul debe desaparecer antes de los 15 minutos que siguen a la adición de la solución de iodo.

34(b).7. REFERENCIAS

Quinta Directiva de la Comisión de 25 de marzo de 1974. (74/203/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 108/7 de 22 de abril de 1974.

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

ml de $Na_2S_2O_3$ 0,1N, 2 minutos de calentamiento, 10 minutos de ebullición

$Na_2S_2O_3$ 0,1N	Glucosa, fructosa, azúcares invertidos $C_6H_{12}O_6$		Lactosa $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltosa $C_{12}H_{22}O_{11}$	
ml	mg	diferencia	mg	diferencia	mg	difer.
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2		88,0		94,6	

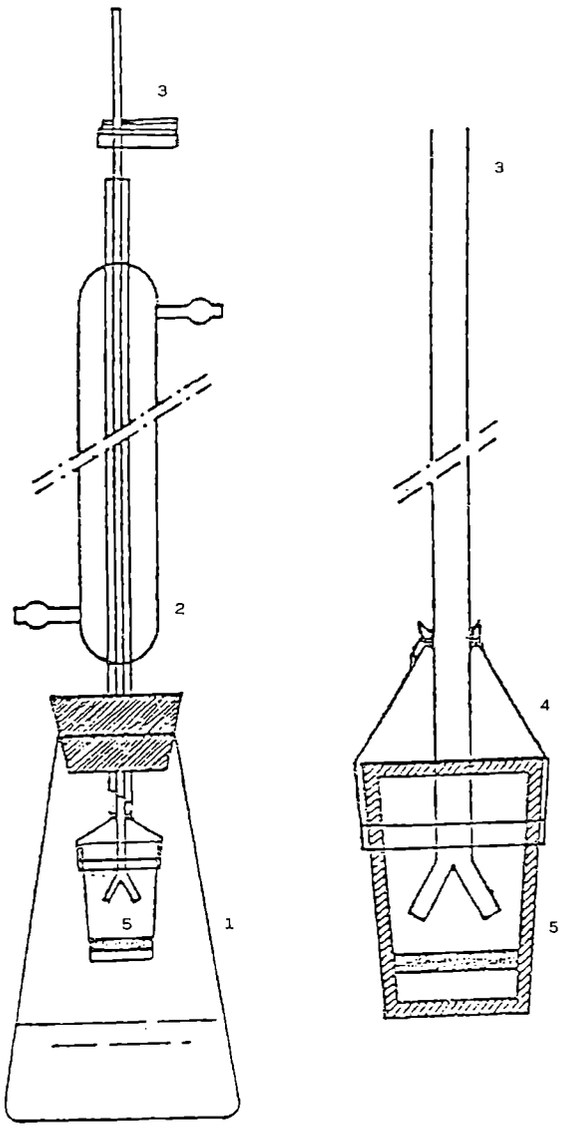


Figura nº 1 (34(b).2.1)

35. ACTIVIDAD UREASICA DE PRODUCTOS DERIVADOS DE LA SOJA

35.1. PRINCIPIO

La prueba permite determinar la actividad de ureasa de los productos derivados de la soja y poner en consecuencia de manifiesto la cocción insuficiente de dichos productos.

La actividad ureásica se determina por la cantidad de nitrógeno amoniacal liberado por 1 g de producto en un minuto, a 30 °C, a partir de una solución de urea.

35.2. MATERIAL Y APARATOS

35.2.1. Aparato de valoración potenciométrica o pH-metro muy sensible (0,02 pH), con agitador magnético.

35.2.2. Baño de agua provisto de un termostato regulado a 30 °C exactamente.

35.2.3. Tubos de ensayo de 150 x 18 mm, con tapones esmerilados.

35.3. REACTIVOS

35.3.1. Acido clorhídrico 0,1N.

35.3.2. Solución de hidróxido de sodio 0,1N.

35.3.3. Solución tampón de fosfatos 0,05 M conteniendo 4,45 g de hidrógeno fosfato de sodio dihidrato ($Na_2HPO_4 . 2H_2O$) y 3,40 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) en 1.000 ml.

35.3.4. Solución tamponada de urea, preparada recientemente, conteniendo 30,0 g de urea por 1.000 ml de solución tampón; pH 6,9 - 7,0.

35.4. PROCEDIMIENTO

Moler 10 g aproximadamente de la muestra, de forma que pase a través de un tamiz de mallas de 0,2 mm. En un tubo de ensayo (35.2.3) pesar, con precisión de 1 mg, 0,2 g de la muestra molida y añadir 10 ml de la solución (35.3.4). Tapar inmediatamente y agitar vigorosamente. Llevar el tubo al baño de agua (35.2.2) y dejarlo durante treinta minutos exactamente. Inmediatamente después, añadir 10 ml de ácido clorhídrico 0,1N (35.3.1), enfriar rápidamente a 20 °C trasvasar cuantitativamente el contenido del tubo a un recipiente de valoración, lavando dos veces con 5 ml de agua. Valorar inmediatamente y con rapidez por medio de una solución de hidróxido de sodio 0,1N (35.3.2) por potenciómetro, utilizando electrodo de vidrio hasta pH 4,7. Efectuar una prueba en blanco, operando como se indica a continuación:

Introducir rápida y sucesivamente en un tubo (35.2.3.) una alicuota de la muestra de 0,2 g, pesada con precisión de 1 mg, 10 ml de ácido clorhídrico 0,1N (35.3.1.) y 10 ml de solución tamponada de urea (35.3.4.). Enfriar inmediatamente el tubo en agua helada y dejarlo treinta minutos. Trasvasar a continuación, en las condiciones indicadas anteriormente, el contenido del tubo al recipiente y valorar por medio de la solución de hidróxido de sodio 0,1N (35.3.2.) hasta un pH 4,7.

35.5. CALCULOS

La actividad ureásica viene dada por la fórmula:

$$\frac{\text{mg N}}{\text{g minuto}} \text{ a 30 °C} = \frac{1{,}4\ (V_2 - V_1)}{30 \cdot P}$$

Siendo:

V_1 = Volumen, en ml, de solución de hidróxido de sodio 0,1N consumidos en el análisis.

V_2 = Volumen, en ml, de solución de hidróxido de sodio 0,1N consumidos por la prueba en blanco.

P = Peso de la muestra en g.

35.6. OBSERVACIONES

35.6.1. El método es adecuado para una actividad ureásica que pueda alcanzar 1 mg de N/g por minuto a 30 °C. Para productos más activos, la alícuota de la muestra puede reducirse hasta 50 mg.

35.6.2. Los productos cuyo contenido en materias grasas brutas sobrepase el 10% deben haber sido desengrasados previamente en frío.

35.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

36. GOSIPOL LIBRE Y TOTAL

36.1. PRINCIPIO

El método permite determinar el gosipol libre, el gosipol total y las substancias de constitución químicamente parecidas derivadas del gosipol, presentes en las semillas, harinas y tortas de algodón, así como en los piensos que los contengan. El límite inferior de la determinación es de 20 mg/kg.

El gosipol se extrae en presencia de 3-amino-1-propanol, ya sea mediante una mezcla de iso-propanol y de hexano para la determinación del gosipol libre, ya sea por la dimetilformamida para la determinación del gosipol total. El gosipol se transforma mediante anilina en gosipol-dianilina, cuya absorbancia se mide a 440 nm.

36.2. MATERIAL Y APARATOS

36.2.1. Agitador (de vaiven): alrededor de 35 oscilaciones por minuto.

36.2.2. Espectrofotómetro.

36.3. REACTIVOS

36.3.1. Mezcla isopropanol-hexano: mezclar 60 partes en volumen de isopropanol con 40 partes en volumen de n-hexano.

36.3.2. Disolvente A: Depositar en un matraz aforado de 1 litro, 500 ml aproximadamente de la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1.), 2 ml de 3-amino-1-propanol, 8 ml de ácido acético glacial y 50 ml de agua. Completar el volumen mediante la mezcla de isopropanol-hexano (36.3.1.). Dicho reactivo es estable durante una semana.

36.3.3. Disolvente B: Depositar mediante pipeta en un matraz aforado en 100 ml, 2 ml de 3-amino-1-propanol y 10 ml de ácido acético glacial. Enfriar a la temperatura ambiente y com-

pletar al volumen mediante la N,N-dimetilformamida. Dicho reactivo es estable durante una semana.

36.3.4. Anilina: Si la absorbancia de la prueba en blanco excede de 0,022 destilar la anilina sobre polvo de cinc eliminando las fracciones primera y última del 10% del destilado. Este reactivo en frasco tapado de vidrio topacio y en el refrigerador, se conserva varios meses.

36.3.5. Solución patrón A de gosipol: Colocar en un matraz aforado de 250 ml, 27,9 mg de acetato de gosipol. Disolver y completar al volumen por el disolvente A (36.3.2.). Introducir con pipeta 50 ml de dicha solución en un matraz aforado de 250 ml y completar a volumen con el disolvente A. La concentración en gosipol de dicha solución es de 0,02 mg/ml. Dejar reposar durante 1 h a la temperatura ambiente, antes de su empleo.

36.3.6. Solución patrón B de gosipol: Colocar en un matraz aforado de 50 ml, 27,9 mg de acetato de gosipol. Disolver y completar a volumen mediante el disolvente B (36.3.3.). La concentración en gosipol de dicha solución es de 0,5 mg/ml.

Conservadas al abrigo de la luz las soluciones patrón A y B de gosipol se mantienen estables durante 24 horas.

36.4. PROCEDIMIENTO

36.4.1. Toma de muestras.

La toma de muestras está en relación con el supuesto contenido en gosipol de la muestra. Es preferible operar sobre una pequeña toma de muestras y sobre una parte alícuota del filtrado relativamente importante, de forma que se obtenga una cantidad de gosipol suficiente para efectuar una medición fotométrica precisa. Para la determinación del gosipol libre en las semillas, harinas y tortas de algodón, la toma de muestras no debe exceder de 1 g; para los piensos compuestos podrá alcanzar los 5 g. Una parte alícuota de 10 ml de filtrado es suficiente en la mayoría de los casos; deberá contener de 50 a 100 microgramos de gosipol. Para la determinación del gosipol total, la toma de muestras podrá variar de 0,5 a 5 g con el fín de que una parte alícuota de 2 ml de filtrado contenga de 40 a 200 microgramos de gosipol.

El análisis debe efectuarse a una temperatura ambiente cercana a los 20 °C.

36.4.2. Determinación del gosipol libre.

Introducir la muestra en um matraz de boca esmerilada de 250 ml, cuyo fondo esté recubierto de perlas de vidrio. Añadir con pipeta 50 ml de disolvente A (36.3.2.), tapar el matraz y mezclar durante 1 h en el agitador. Filtrar en seco y recoger el filtrado en un pequeño matraz de cuello esmerilado. A lo largo de la filtración, recubrir el embudo con un vidrio de reloj. Introducir con pipeta respectivamente en dos matraces aforados de 25 ml (A y B) unas partes alícuotas idénticas de filtrado que contengan de 50 a 100 microgramos de gosipol. Completar si fuera necesario, el volumen a 10 ml con la ayuda del disolvente A (36.3.2.) completar seguidamente al volumen el contenido del matraz (A) mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1.). Dicha solución se empleará como solución de referencia para la medición de la solución de la muestra.

Introducir con pipeta 10 ml del disolvente A (36.3.2.) respectivamente en otros dos matraces aforados de 25 ml (C y D). Completar a volumen el contenido del matraz (C) mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1.). Dicha solución se empleará como solución de referencia para la medición de la solución de la prueba en blanco.

Añadir 2 ml de anilina (36.3.4.) respectivamente en los matraces (D) y (B). Calentar durante 30 minutos sobre un baño de agua hirviendo para desarrollar el color. Refrigerar a la temperatura ambiente, completar a volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1.), homogeneizar y dejar reposar durante 1 h.

Determinar mediante el espectrofotómetro a 440 nm en cubetas de 1 cm la absorbancia de la solución de la prueba en blanco (D) en comparación con la solución de referencia (C) y la absorbancia de la solución de la muestra (B) en comparación con la solución de referencia (A).

Restar el valor de la absorbancia de la solución de la prueba en blanco de la solución de la muestra (absorbancia corregida). Calcular a partir de dicho valor el contenido en gosipol libre tal como se indica en 36.5.

36.4.3. Determinación del gosipol total.

Introducir una muestra que contenga de 1 a 5 mg de gosipol en un matraz aforado de 50 ml y añadir 10 ml de disolvente B (36.3.3.). Preparar simultáneamente una prueba en blanco introduciendo 10 ml de disolvente B (36.3.3.) en otro matraz aforado de 50 ml. Calentar ambos matraces durante 30 minutos sobre un baño de agua hirviendo. Refrigerar a la temperatura ambiente y completar el contenido de cada matraz a volumen con la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1.). Homogeneizar y dejar reposar durante 10 a 15 minutos; filtrar a continuación y recoger los filtrados en matraces de boca esmerilada.

Llevar mediante pipeta 2 ml de filtrado de la muestra respectivamente a dos matraces aforados de 25 ml y 2 ml del filtrado de la prueba en blanco respectivamente a otros dos matraces de 25 ml. Tomar un matraz de cada serie y completar los contenidos respectivos a 25 ml mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1.). Estas soluciones se emplearán como soluciones de referencia.

Añadir 2 ml de anilina (36.3.4.) respectivamente en los otros dos matraces. Calentar durante 30 minutos en baño de agua hirviendo para desarrollar el color. Refrigerar a temperatura ambiente, completar a 25 ml mediante la mezcla de isopropanol-hexano (36.3.1.), homogeneizar y dejar reposar durante 1 h.

Determinar la absorbancia tal como se indica en 36.4.2. para el gosipol libre. Calcular a partir de dicho valor el contenido en gosipol total como se indica en 36.5.

36.5. CALCULOS

El cálculo de los resultados puede hacerse a partir de la absorbancia específica (36.5.1.) o refiriéndose a una curva de calibrado (36.5.2.).

36.5.1. A partir de las absorbancias específicas.

En las condiciones descritas, las absorbancias específicas son las siguientes:

$$\text{gosipol libre: } E^{1\%}_{1\ cm} \approx 625$$

$$\text{gosipol total: } E^{1\%}_{1\ cm} \approx 600$$

El contenido en gosipol libre o total de la muestra está dado por la siguiente fórmula:

$$\text{gosipol } \% = \frac{A \cdot 1250}{E^{1\%}_{1\ cm} \cdot p \cdot a}$$

en la que:

A = Absorbancia corregida, determinada como se indica en 36.4.2.

p = Peso de la muestra en g.

a = Parte alícuota del filtrado en ml.

36.5.2. A partir de una curva de calibrado.

36.5.2.1. Gosipol libre.

Preparar 2 series de 5 matraces aforados de 25 ml.

En cada serie, introducir mediante pipeta en los matraces unos volúmenes respectivos de 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 y 10,0 ml de la solución patrón A de gosipol (36.3.5), completar a 10 ml con el disolvente A. Completar cada serie mediante un blanco constituído por un matraz aforado de 25 ml que contenga únicamente 10 ml de disolvente A (36.3.2).

Completar a 25 ml el volumen de los matraces de la primera serie (incluído el blanco) mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1) (serie de referencia).

Añadir 2 ml de anilina (36.3.4) en cada matraz de la segunda serie (incluyendo el blanco. Calentar durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo para desarrollar el color. Refrigerar a temperatura ambiente, completar el volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1), homogeneizar y dejar reposar durante 1 h (serie patrón).

Determinar en las condiciones indicadas en 36.4.2 la absorbancia de las soluciones de la serie patrón en comparación con las soluciones correspondientes de la serie de referencia. Trazar gráficamente la curva de calibrado poniendo las absorbancias en relación con las cantidades de gosipol (en microgramos).

36.5.2.2. Gosipol total

Preparar 6 matraces aforados de 50 ml. Introducir en el primer matraz 10 ml de disolvente B (36.3.3) y en los otros, respectivamente 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 y 10,0 ml de la solución patron B de gosipol (36.3.5). Completar el contenido de cada matraz hasta 10 ml con la ayuda del disolvente B (36.3.3). Calentar durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo. Refrigerar a temperatura ambiente, completar a volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1) y homogeneizar.

Introducir 2,0 ml de dichas soluciones respectivamente en dos series de 6 matraces aforados de 25 ml. Completar a 25 ml el contenido de los matraces de la primera serie mediante la mezcla de isopropanol-hexano (36.3.1) (serie de referencia).

Añadir 2 ml de anilina (36.3.4) en cada matraz de la segunda serie. Calentar durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo. Refrigerar a temperatura ambiente, completar a volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (36.3.1), homogeneizar y dejar reposar durante 1 h (serie patrón).

Determinar en las condiciones indicadas en 36.4.2 la absorbancia de las soluciones de la serie patrón en comparación con las soluciones correspondientes de la serie de referencia. Trazar gráficamente la curva de calibrado poniendo las absorbancias en relación con las cantidades de gosipol en microgramos.

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

- del 15 %, en valor relativo, para los contenidos en gosipol inferiores a 500 mg/kg.
- de 75 mg/kg en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 500 y 750 mg/kg.
- del 10 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 750 mg/kg.

36.6. REFERENCIAS

Tercera Directiva de la Comisión, de 27 de abril de 1972. (72/199 /CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L, 123, de 29 de mayo de 1972.

37. TEOBROMINA

37.1. PRINCIPIO

El método permite determinar el contenido en teobromina de los subproductos de transformación de semillas de cacao. La teobromina se extrae mediante cloroformo. El extracto se evapora a sequedad, se pone en solución acuosa y se trata con un volumen determinado de solución de nitrato de plata. El ácido nítrico liberado se titula por una solución de hidróxido de sodio.

37.2. MATERIAL Y APARATOS

Matraces de 500 ml de fondo plano y tapón esmerilado.

37.3. REACTIVOS

37.3.1. Cloroformo p.a.

37.3.2. Amoníaco, d: 0,958.

37.3.3. Sulfato de sodio p.a., anhidro.

37.3.4. Solución de hidróxido de sodio 0,1N.

37.3.5. Solución de nitrato de plata 0,1N.

37.3.6. Solución etanólica al 1% (p/v) de rojo de fenol.

37.3.7. Eter dietílico.

37.4. PROCEDIMIENTO

Pesar, con precisión de 1 mg, una alícuota de 10 g como máximo, que no contenga más de 80 mg de teobromina. Introducirla en un matraz de 500 ml de fondo plano y tapón esmerilado, añadir 270 ml de cloroformo (37.3.1.) y 10 ml de amoniaco (37.3.2.). Tapar el matraz y agitar enérgicamente durante cinco minutos. Añadir a continuación 12 g de sulfato de sodio anhidro (37.3.3.), agitar de nuevo y dejar reposar hasta el día siguiente. Filtrar en un erlenmeyer de 500 ml y lavar el residuo con 100 ml de cloroformo (37.3.1.). Destilar el disolvente y eliminar los últimos restos en un baño de agua hirviendo. Recoger el extracto en 50 ml de agua y llevar a ebullición.

Refrigerar, neutralizar exactamente con la solución de hidróxido de sodio (37.3.4.) en presencia de 0,5 ml de solución de rojo de fenol (37.3.6.). Añadir a continuación 20 ml de solución de nitrato de plata (37.3.5.). Valorar el ácido nítrico liberado con la solución de hidróxido de sodio (37.3.4.) hasta viraje del indicador (pH 7,4).

37.5. CALCULOS

1 ml de NaOH 0,1N corresponde a 18 mg de teobromina. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

37.6. OBSERVACIONES

Los productos cuyo contenido en materias grasas brutas exceda de 8% deben ser previamente desgrasados por extracción durante seis horas con éter de petróleo (Eb. 40 °C).

37.7. REFERENCIAS

Primera Directiva de la Comisión de 15 de junio de 1971. (71/250/ CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 155 de 12 de julio de 1971.

38. RETINOL (VITAMINA A)

38.1. PRINCIPIO

El método permite determinar el contenido en retinol (Vitamina A) en piensos, concentrados y premezclas. El límiete inferior de detección es de 10.000 UI/kg (1 UI igual a 0,3 microgramos de retinol) para los piensos fuertemente pigmentados y de 4.000 UI/kg para los demás productos. Los productos se clasifican según su contenido supuesto en retinol en dos grupos:

Grupo A: contenidos inferiores a 200.000 UI/kg.

Grupo B: contenidos iguales o superiores a 200.000 UI/kg.

La muestra se hidroliza en caliente mediante hidróxido de potasio en medio etanólico y en presencia de un antioxidante o en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se somete a extracción con 1,2-dicloroetano. El extracto se evapora a sequedad y se redisuelve en éter de petróleo. La solución se cromatografía en columna de óxido de aluminio (para los productos del Grupo B, la cromatografía sólo es necesaria en ciertos casos). El retinol se determina por espectrofotometría a 610 nm después de la obtención de un comlejo coloreado según la reacción Carr-Price, en el caso de los productos del Grupo A; por espectrofotometría U.V. a 325 nm en el caso de los productos del Grupo B.

38.2. MATERIAL Y APARATOS

38.2.1. Baño de agua.

38.2.2. Evaporador rotativo a vacío con matraces redondos de diferentes capacidades.

38.2.3. Columnas de vidrio para cromatografía (longitud: 300 mm; diámetro interior: 13 mm aprox.).

38.2.4. Espectrofotómetro con cubetas de 10 mm de espesor (de cuarzo para medidas en U.V.).

38.2.5. Lámpara U.V. de 365 nm.

38.3. REACTIVOS

38.3.a) Utilizados para el análisis de los productos de los Grupos A y B.

38.3.a.1. Etanol del 96% (v/v).

38.3.a.2. Solución al 10% (p/v) de ascorbato de sodio p.a. ó (38.3.a.3.).

38.3.a.3. Nitrógeno purificado.

38.3.a.4. Solución al 50% (p/v) de hidróxido de potasio p.a.

38.3.a.5. Solución de hidróxido de potasio 1N.

38.3.a.6. Solución de hidróxido de potasio 0,5N.

38.3.a.7. 1,2-dicloroetano p.a.

38.3.a.8. Eter de petróleo, puro, intervalo de ebullición 30 - 50 °C. Si es necesario, purificarlo como sigue:

Agitar 1.000 ml de éter de petróleo con porciones de 20 ml de ácido sulfúrico concentrado hasta que el ácido permanezca incoloro.

Eliminar el ácido y lavar el éter sucesivamente con 500 ml de agua, dos veces con 250 ml de una solución al 10% de hidróxido de sodio, y tres veces con 500 ml de agua. Eliminar la capa acuosa, secar el éter durante una hora sobre carbón activo y sulfato de sodio anhidro, filtrar y destilar.

38.3.a.9. Oxido de aluminio estandarizado según Brockmann.

Calcinar durante 8 horas a 750 °C, enfriar en desecador y conservar en frasco de vidrio color ámbar, de tapón de rosca. Antes de utilizarlo en la cromatografía, humedecer como sigue: Introducir en un matraz de vidrio color ámbar 10 g de óxido de aluminio y 0,7 ml de agua, tapar herméticamente, calentar 5 minutos en un baño de agua hirviendo agitando enérgicamente. Dejar enfriar agitando. Comprobar la actividad del óxido de aluminio así preparado, analizando según 38.4.2. y 38.4.3. una cantidad conocida de retinol patrón (38.3.b.4.).

38.3.a.10. Oxido de aluminio básico, grado de actividad 1.

38.3.a.11. Eter dietílico puro. Eliminar los peróxidos y las trazas de agua por cromatografía en columna de óxido de aluminio básico (38.3.a.10.) (25 g de óxido de aluminio para 250 ml de éter dietílico).

38.3.a.12. Soluciones de éter de petróleo (38.3.a.8.) con 4,8,12,16 y 20% (v/v) de éter dietílico (38.3.a.11.).

38.3.a.13. Solución de sulfuro de sodio 0,5 M en glicerina del 70%, preparada a partir de sulfuro de sodio p.a.

38.3.b) Utilizados exclusivamente para el análisis de los productos del Grupo A.

38.3.b.1. Benceno p.a. cristalizable.

38.3.b.2. Clororformo p.a. Eliminar el etanol, el fosgeno y las trazas de agua por cromatografía en columna de óxido de aluminio básico (38.3.a.10.) (50 g de óxido de aluminio por cada 200 ml de cloroformo); conviene cromatografíar por segunda vez los 50 primeros ml del eluído.

38.3.b.3. Reactivo según Carr-Price: Agitar 25 g aproximadamente de tricloruro de antimonio p.a. (conservado en desecador) con 100 ml de cloroformo (38.3.b.2.) hasta saturación de la solución. Un pequeño depósito de tricloruro de antimonio no altera. Añadir 2 ml de anhidrido acético p.a. Conservar en congelador en un frasco de vidrio ámbar con tapón de rosca. Este reactivo así conservado es estable durante varias semanas.

38.3.b.4. Retinol patrón controlado por espectrofotometría.

38.3.c) Utilizados exclusivamente para el análisis de los productos del Grupo B.

38.3.c.1. Isopropanol para cromatografía.

38.4. PROCEDIMIENTO

38.4.1. Hidrólisis y extracción.

Tomar una porción de la muestra finamente dividida, proporcional al contenido supuesto de vitamina A:

- 0,1 a 1,0 g para los concentrados (contenidos superiores a 20.000 UI/g).
- 3,0 a 5,0 g para las premezclas (contenidos comprendidos entre 400 y 20.000 UI/g).
- 10 a 20 g para las mezclas minerales.
- 30 g para los productos del Grupo A.

Introducirla inmediatamente en un matraz de 500 ml de tapón esmerilado.

Añadir sucesivamente 40 ml de etanol (38.3.a.1.), 2 ml de solución de ascorbato de sodio (38.3.a.2.) 10 ml de solución de hidróxido de potasio al 50% (38.3.a.4.) y 2 ml de solución de sulfuro de sodio 0,5 M (38.3.a.13.). Calentar durante 30 minutos a 70-80 °C bajo refrigerante de reflujo y enfriar al grifo. Añadir 50 ml de etanol (38.3.a.1.) y 100 ml (tomados con pipeta) de 1,2-dicloroetano (38.3.a.7.).

Agitar enérgicamente y decantar el líquido sobrenadante en embudo de decantación y añadir 150 ml de solución de hidróxido de potasio 1N (38.3.a.5.), agitar durante 10 segundos y dejar reposar hasta la separación de las fases. Recoger la fase inferior de dicloroetano en otro embudo de decantación, añadir 40 ml de solución de hidróxido de potasio 0,5N (38.3.a.6.), agitar durante 10 segundos y dejar reposar hasta la separación de las fases. Recoger la fase de dicloroetano en otro embudo de decantación y lavar 6 u 8 veces con porciones de 40 ml de agua hasta la ausencia de álcali en el agua de lavado (ensayo con fenolftaleína). Recoger la fase de dicloroetano y eliminar las últimas trazas de agua mediante bandas de papel de filtro.

Evaporar a sequedad a vacío y en baño de agua a 40 °C, una alícuota de la solución. Redisolver rápidamente el residuo con 5 ml de éter de petróleo (38.3.a.8.).

Para los productos del Grupo A, cromatografiar como se indica en 38.4.2.1.

Para los productos del Grupo B, transferir la solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con éter de petróleo (38.3.a.8.), homogeneizar y medir la absorbancia como se indica en 38.4.3.

38.4.2. Cromatografía.

38.4.2.1. Productos del Grupo A.

Llenar la columna para cromatografía (38.2.3.) hasta una altura de 200 mm de óxido de alumnio (38.3.a.9.), previamente impregnado de éter de petróleo (38.3.a.8.). Introducir en la columna la solución obtenida en 38.4.1. y añadir inmediatamente 20 ml de éter de petróleo (38.3.a.8.). Eluir sucesivamente con porciones de 10 ml de las soluciones de éter de petróleo con 4, 8, 12, 16 y 20% de éter dietílico (38.3.a.12.) a vacío parcial o a presión; la velocidad de elución debe ser de 2 a 3 gotas por segundo.

El caroteno es eluído en primer lugar. (El contenido en caroteno de esta fracción puede ser determinado por la medida de la absorbancia a 450 nm; $E^{1\%}_{1\ cm}$ = 2.600).

38.4.2.2. Productos del Grupo B.

La cromatografía no debe ser efectuada a menos que las medidas de la absorbancia obtenidas en 38.4.3.2. no estén conformes con las prescripciones indicadas en 38.4.3.2.

Si la cromatografía fuera necesaria, introducir en la columna cromatográfica una alícuota de la solución en éter de petróleo obtenida en 38.4.1. que contenga aproximadamente 500 UI de retinol y cromatografiar como se indica en 38.4.2.1.

38.4.3. Medida de absorbancia.

38.4.3.1. Evaporar a sequedad, a vacío, la fracción cromatográfica que contiene el retinol obtenida en 38.4.2.1. Redisolver el resíduo con 2 ml de benceno (38.3.b.1.). Tomar 0,3 ml de esta solución y añadir 3 ml del reactivo de Carr-Price (38.3.b.3.). Se desarrolla una coloración azul. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 610 nm exactamente a los 30 segundos del comienzo de la reacción.

Determinar el contenido en retinol mediante una curva patrón obtenida a partir de las soluciones bencénicas de concentraciones crecientes en retinol patrón tratadas por el reactivo de Carr-Price (de 2 a 16 UI de vitamina A patrón) (38.3.b.4.) con 0,3 ml de benceno (38.3.b.1.) más 3 ml del reactivo de Carr-Price (38.3.b.3.).

La curva patrón debe ser comprobada regularmente y en breves intervalos de tiempo mediante una solución recientemente preparada del reactivo de Carr-Price.

38.4.3.2. Productos del Grupo B.

Tomar una alícuota de la solución en éter de petróleo obtenida en 38.4.1., que contenga aproximadamente 200 UI de retinol. Evaporar a sequedad en vacío y redisolver el residuo con 25 ml de isopropanol (38.3.c.1) Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 334, 325 y 310 nm. El máximo de absorción está situado a 325 nm. El contenido en retinol de la solución se calcula como sigue:

A_{325} x 18,30 = UI de retinol

No obstante, las relaciones entre absorbancias A_{310}/A_{325} y A_{334}/A_{325} deben ser de 6/7 = 0,857.

Si una de estas relaciones se separa sensiblemente de este valor (menor de 0,830 ó mayor de 0,880), la medida de las absorbancias debe ser precedida de una cromatografía según el procedimiento indicado en 38.4.2. Si la medida de las absorbancias efectuadas después de la cromatografía indica que las relaciones antes mencionadas se separan todavía sensiblemente del valor 0,857 (menor de 0,830 ó mayor de 0,880), la determinación debe ser efectuada según el procedimiento indicado para los productos del Grupo A.

38.5. CALCULOS

Calcular el contenido en retinol de la muestra teniendo en cuenta el peso de partida y las diluciones efectuadas a lo largo del análisis.

Expresar el resultado en UI de retinol por kg. La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe pasar de:

- 20% en valor relativo para los contenidos en retinol inferiores a 75.000 UI/kg.
- 15.000 UI para los contenidos en retinol comprendidos entre 75.000 y 150.000 UI/kg.
- 10% en valor relativo para los contenidos comprendidos entre 150.000 y 250.000 UI/kg.
- 25.000 para los contenidos comprendidos entre 250.000 y 500.000 UI/kg.
- 5% en valor relativo para los contenidos superiores a 500.000 UI/kg.

38.6. OBSERVACIONES

38.6.1. Todas las manipulaciones deben hacerse en ausencia de luz directa y si es posible en material de vidrio de color ámbar.

38.6.2. La adición de ascorbato no es necesaria si la hidrólisis se realiza en corriente de nitrógeno (38.4.1).

38.6.3. Para los piensos de lactancia y los productos con tendencia a hincharse, doblar la cantidad de los reactivos indicados en 38.4.1., etanol (38.3.a.1), solución de ascorbato de sodio (38.3.a.2), solución de hidróxido de potasio (38.3.a.4) y solución de sulfuro de sodio (38.3.a.13.).

38.6.4. Guardar las precauciones debidas a la peligrosidad de los reactivos (especialmente benceno).

38.7. REFERENCIAS

Cuarta Directiva de la Comisión de 5 de diciembre de 1972. 73/46/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 83/21 de 30 de marzo de 1973.

39. TIAMINA (ANEURINA, Vitamina B_1)

39.1. PRINCIPIO

La muestra se trata en caliente con ácido sulfúrico diluído y se hidroliza a continuación por vía enzimática.

La solución obtenida se somete a oxidación alcalina. El tiocromo formado se extrae con isobutanol y se determina por fluorimetría.

El método permite determinar la tiamina (aneurina, vitamina B_1) en piensos, concentrados y premezclas. El límite de detección es de 5 ppm.

39.2. MATERIAL Y APARATOS

39.2.1. Baño de agua.

39.2.2. Centrífuga (3.500 rpm) con tubos de 30 a 50 ml, provistos de tapón de rosca.

39.2.3. Fluorímetro.

39.3. REACTIVOS

39.3.1. Solución patrón de tiamina de 100 microgramos/ml.

Disolver 112,3 mg de clorhidrato de tiamina, calidad patrón, previamente desecado a vacío hasta peso constante, en 1000 ml de ácido sulfúrico 0,2N (39.3.2). En frío y en oscuridad esta solución es estable durante un mes.

39.3.2. Acido sulfúrico 0,2N.

39.3.3. Metabisulfito de sodio, $Na_2S_2O_5$ puro.

39.3.4. Solución al 20% (p/v) de hexacianoferrato (III) de potasio p.a.

39.3.5. Solución al 25% (p/v) de hidróxido de potasio p.a.

39.3.6. Mezcla oxidante: mezclar 2 ml de solución de hexacianoferrato (III) de potasio (39.3.4) con 48 ml de solución de hidróxido de potasio (39.3.5). Esta mezcla no se conserva más de 4 h.

39.3.7. Isobutanol p.a.

39.3.8. Solución de acetato de sodio 2,5N.

39.3.9. Preparación multienzimática conteniendo proteasa, fosfatasa y amilasa (por ejemplo clarasa).

39.3.10. Estanol del 96% (v/v).

39.4. PROCEDIMIENTO

39.4.1. Hidrólisis enzimática.

Introducir en dos matraces aforados A y B de 250 ml, cantidades idénticas de muestra finamente molida, conteniendo 100 microgramos de tiamina y 125 ml de ácido sulfúrico (39.3.2). Añadir solamente al matraz A 1,0 ml de solución patrón (39.3.1) (patrón interno).

Agitar vigorosamente, llevar los matraces a un baño de agua hirviendo y mantenerlos durante 15 minutos agitando de vez en cuando. Dejar enfriar hasta 45 °C aproximadamente. Añadir a cada matraz 20 ml de solución de acetato de sodio (39.3.8) y 0,5 g de preparación multienzimática (39.3.9), dejar reposar a continuación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Añadir 20 ml de solución de acetato de sodio y completar a volumen con agua, homogeneizar y filtrar. Recoger los filtrados A y B después de haber eliminado los 15 primeros ml. Preparar las soluciones siguientes:

39.4.1.1. Solución testigo T.

Introducir en un tubo de centrífuga (39.2.2), 5 ml del filtrado A y 10 mg aproximadamente de metabisulfito de sodio (39.3.3.). Sumergir el tubo durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo y dejar enfriar a continuación hasta temperatura ambiente.

39.4.1.2. Solución A (patrón interno) y B (muestra).

Introducir 5 ml de filtrado A en un tubo de centrífuga (39.2.2.) y 5 ml del filtrado B en otro tubo de centrífuga (39.2.2.).

39.4.2. Oxidación

Añadir a las soluciones T, A y B, 5 ml de la mezcla oxidante (39.3.6.) y después de un minuto, 10 ml de isobutanol (39.3.7.). Tapar los tubos y agitar vigorosamente durante 5 segundos. Dejar reposar durante un minuto y centrifugar para separar las fases. Tomar, de cada tubo, 5 ml de la fase isobutanólica sobrenadante, introducirlos respectivamente en los matraces aforados de 25 ml, completar a volumen con etanol (39.3.10.) y homogeneizar. Esto da lugar a los extractos T, A y B.

39.4.3. Medida de la fluorescencia.

Efectuar las medidas a la longitud de onda a la cual el fluorímetro da una respuesta óptima para la fluorescencia del tiocromo. Irradiar a 365 nm aproximadamente.

Ajustar el instrumento a cero con el extracto T. Medir la intensidad de fluorescencia de los extractos A y B.

39.5. CALCULOS

El contenido en microgramos de tiamina por kg de muestra viene dado por la fórmula:

$$\frac{d \times b}{(a - b) \times c}$$

Siendo:

a = Intensidad de la fluorescencia del extracto A (patrón interno).

b = Intensidad de la fluorescencia del extracto B (muestra).

c = Peso, en gramos, de la muestra.

d = Cantidad de tiamina en microgramos añadida a la muestra (patrón interno).

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

- 10% en valor relativo para los contenidos inferiores a 500 ppm y
- 5% en valor relativo para los contenidos iguales o superiores a 500 ppm.

39.6. REFERENCIAS

Cuarta Directiva de la Comisión de 5 de diciembre de 1972. 73/46/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 83/21 de 30 de marzo de 1973.

40. ACIDO ASCORBICO Y ACIDO DEHIDROASCORBICO (VITAMINA C)

40.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la suma de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico (Vitamina C) en piensos, concentrados y premezclas. El límite de detección es de 5 ppm. Los productos son clasificados en dos grupos según su contenido supuesto en Vitamina C:

Grupo A: Contenidos inferiores a 10 g/kg.

Grupo B: Contenidos iguales o superiores a 10 g/kg.

La muestra, puesta en suspensión en una solución diluída de ácido metafosfórico, se somete a extracción con cloroformo. La fase acuosa se trata con una solución de 2,6-diclorofenol-indofenol para transformar el ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico, y a continuación por una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina. La hidrazona formada se extrae mediante una mezcla de acetato de etilo, ácido acético glacial y acetona. La solución se cromatografía en columna de gel de sílice, el eluído se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en ácido sulfúrico diluído. La absorbancia de la solución se mide en el espectrofotómetro a 509 nm.

Para los productos del gurpo A, el eluído procedente de la cromatografía en columna se somete a una cromatografía en capa fina para aislar la hidrazona.

40.2. MATERIAL Y APARATOS

40.2.1. Baño de agua regulado a la temperatura de 20 °C mediante termostato.

40.2.2. Centrífuga (3.500 r.p.m.) con tubos de 40 a 50 ml provistos de tapones de rosca.

40.2.3. Evaporador rotatorio a vacío con matraces de 250 ml.

40.2.4. Columnas de vidrio para cromatografía (longitud: 100 mm diámetro interior: 20 mm) con placa de vidrio fritado (por ejemplo tubos de Allihn).

40.2.5. Espectrofotómetro o colorímetro de filtros con cubetas de 10 mm de espesor.

40.2.6. Material para cromatografía en capa fina con placas de gel de sílice H (40.3.12.), espesor de capa: 0,5 a 0,6 mm. Secar las placas de 2 horas 30 minutos a 3 horas en estufa a 120-130 °C. Dejar enfriar y consevar en desecador durante 24 horas antes de su empleo.

40.2.7. Estufa regulada a 120-130 °C.

40.3. REACTIVOS

40.3.1. Solución patrón del 0,05% de ácido L-ascórbico: disolver 50 mg de ácido L-ascórbico p.a. en 20 ml aproximadamente de ácido metafosfórico (40.3.2.) y completar a 100 ml con agua. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

40.3.2. Solución al 10% de ácido metafosfórico: disolver en agua 200 g de ácido metafosfórico p.a. triturados en mortero, y completar a 2.000 ml con agua. Conservar a 4 °C. Renovar al cabo de una semana.

40.3.3. Cloroformo p.a.

40.3.4. Solución al 0,5% (p/v) de 2,6-diclorofenol-indofenol p.a. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

40.3.5. Auxiliar de filtración (S y S nº 121 o equivalente).

40.3.6. Solución ácida al 2% (p/v)de 2,4-dinitrofenilhidrazina: disolver 2 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina en 100 ml de ácido sulfúrico diluído (25 ml de ácido sulfúrico p.a. d=1,84, diluídos hasta 100 ml con agua). En frío esta solución se conserva durante una semana.

40.3.7. Nitrógeno ó (40.3.8.).

40.3.8. Anhídrido carbónico.

40.3.9. Mezcla de acetato de etilo p.a./ácido acético glacial/acetona p.a.: 96/2/2 en volumen.

40.3.10. Mezcla de diclorometano p.a./ácido acético glacial: 97/3 en volumen.

40.3.11. Gel de sílice, granulometría: 0,05 a 0,2 mm.

40.3.12. Gel de sílice H según Stahl, para cromatografía en capa fina.

40.3.13. Acido sulfúrico diluído: introducir 105 ml de agua en un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con ácido sulfúrico p.a., d= 1,84.

40.3.14. Disolvente de elución para la cromatografía en capa fina: Mezclar 75 ml de éter dietílico p.a., 25 ml de acetato de etilo p.a., y 4,0 ml de ácido acético del 96% p/v, p.a. Renovar después de dos o tres cromatografías.

40.4. PROCEDIMIENTO

40.4.1. Extracción

Introducir en dos matraces aforados A y B, de 250 ml, cantidades idénticas de la muestra finamente molida, que contengan 200 microgramos aproximadamente de vitamina C. Añadir sólamente al matraz A, 0,4 ml de solución patrón (40.3.1.) y homogeneizar agitando suavemente (patrón interno). Añadir a cada matraz 30 ml de cloroformo (40.3.3.) y 25 ml de solución de ácido metafosfórico (40.3.2.) a 4 °C. Agitar ligeramente y dejar reposar de 10 a 15 minutos. Añadir 25 ml de agua, tapar los matraces, agitar vigorosamente durante 10 segundos y dejar reposar de 10 a 15 minutos en baño de agua (40.2.1.). Centrifugar para separar la fase acuosa de la fase clorofórmica. Realizar las operaciones siguientes simultáneamente sobre los extractos acuosos A (patrón interno) y B.

40.4.2. Oxidación.

Tomar mediante pipeta 40 ml de la solución acuosa sobrenadante (ligeramente turbia) obtenida en (40.4.1.), introducirla en un tubo de reacción de tapón de rosca, añadir de 0,5 a 1 ml de solución de 2,6-diclorofenol-indofenol (40.3.4.) y homogeneizar. Se forma una coloración que debe persistir 15 minutos al menos. Añadir a continuación 300 mg aproximadamente de auxiliar de filtración (40.3.5.), agitar y filtrar sobre un filtro de pliegues seco. El filtrado no debe ser necesariamente transparente.

40.4.3. Reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina y extracción de la hidrazona.

Tomar mediante pipeta 10 ml del filtrado obtenido en (40.4.2.), introducirlos en un tubo de centrífuga (40.2.2), añadir 2 ml de solución de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (40.3.6.) y homogeneizar. Hacer pasar rápidamente por el tubo una corriente de nitrógeno (40.3.7.) ó de anhidrido carbónico (40.3.8.), tapar el tubo y sumergirlo durante 15 horas aproximadamente (una noche) en el baño de agua (40.2.1.). Añadir a continuación 3 ml de agua, 20 ml de la mezcla de acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (40.3.9.) y 800 mg aproximadamente de auxiliar de filtración (40.3.5.). Tapar el tubo, agitar vigorosamente durante 30 segundos y centrifugar. Introducir 15 ml de la fase sobrenadante en un matraz de evaporación y evaporar a presión reducida en el evaporador rotativo (40.2.3.) hasta la obtención de un residuo oleoso. Disolver el resíduo en 2 ml de la mezcla de acetato de etilo/ácido acetico glacial/acetona (40.3.9.) calentando a 50 °C, dejar enfriar, añadir 10 ml de la mezcla diclorometano/ácido acético glacial (40.3.10) y homogeneizar.

40.4.4. Cromatografía en columna.

Llenar la columna cromatografica (40.2.4.) hasta una altura de 30 mm con la mezcla diclorometano/ácido acético glacial (40.3.10.). Poner en suspensión (agitando vigorosamente) 5 g de gel de sílice (40.3.11.) en 30 ml de la mezcla diclorometano/ácido acético glacial (40.3.10.) y verter la suspensión en la columna. Dejar depositar y comprimir bajo débil presión de nitrógeno (40.3.7.).

Trasvasar a la columna cromatográfica la solución obtenida en 40.4.3., lavar el matraz con una pequeña cantidad de mezcla diclorometano/ácido acético glacial (40.3.10.) y trasvasar a la columna, llenar con la mezcla (40.3.10.) y continuar el lavado de la columna con la misma mezcla (3 ó 4 porciones de 5 ml aproximadamente), hasta la obtención de un eluído incoloro. Eliminar la fracción eluída coloreada de amarillo.

Eluír la zona rojiza en la cabeza de la columna mediante la

mezcla acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (40.3.9.), recoger el eluído y evaporar a sequedad.

40.4.4.1. Para los productos del grupo A (contenidos en vitamina C inferiores a 10 g/kg) disolver el residuo en 2,0 ml de la mezcla acetato de etilo/ácido ácetico glacial/acetona (40.3.9.) y proceder inmediatamente a la cromatografía en capa fina como se indica en 40.4.5.

40.4.4.2. Para los productos del grupo B (contenidos en vitamina C iguales o superiores a 10 g/kg), redisolver el residuo oleoso en 4,0 ml de ácido sulfúrico diluído (40.3.13.), agitar vigorosamente para disolver completamente el resíduo y proceder a la medida de la absorbancia como se indica en 40.4.6.

40.4.5. Cromatografía en capa fina.

Efectuar las operaciones indicadas a partir de aquí por duplicado.

Depositar en forma de banda sobre la placa de cromatografía en capa fina (40.2.6.) 0,5 ml de la solución obtenida en 40.4.4.1. Desarrollar durante 20 minutos por lo menos mediante el eluyente (40.3.14.) en cámara saturada hasta separación clara de la zona de la hidrazona, coloreada de rosa. Dejar secar al aire. Delimitar la zona rosa, rasparla con una espátula y transferir cuantitativamente la masa pulverulenta a una columna de cromatografía (40.2.4.).

Eluír sucesivamente una vez con 2 ml y dos veces con 1,5 ml de la mezcla acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (40.3.9.). Recoger el eluído en un matraz pequeño (la última fracción debe ser incolora). Evaporar a sequedad, redisolver el residuo oleoso en 4,0 ml de ácido sulfúrico diluído (40.3.13.), agitar vigorosamente para disolver completamente el resíduo y proceder a la medida de la absorbancia.

40.4.6. Medida de la absorbancia.

Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 509 nm de 20 a 30 minutos deade la puesta en disolución del resíduo en ácido sulfúrico diluído (40.3.13.).

Efectuar las medidas por comparación con ácido sulfúrico diluído (40.3.13.).

40.4.7. Prueba en blanco.

Efectuar paralelamente un ensayo en blanco aplicando el mismo método operativo.

40.5. CALCULOS

El contenido en g de vitamina C por kg de muestra viene dado por la fórmula:

$$\frac{(c - a) \times 2}{(b - c) \times 10\ d}$$

donde:

a = Absorbancia del blanco.

b = Absorbancia de la solución de patrón interno.

c = Absorbancia de la solución de muestra.

d = Peso, en g, de la muestra.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe pasar del 10% en valor relativo para los contenidos en vitamina C inferiores a 10 g/kg y de 5% en valor relativo para los contenidos iguales o superiores a 10 g/kg.

40.6. REFERENCIAS

Cuarta Directiva de la Comisión de 5 de diciembre de 1972. (73/46 /CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 83/21, de 30 de marzo de 1973.

41. MENADIONA (Vitamina K_3)

41.1. PRINCIPIO

La muestra se somete a extracción mediante etanol diluído. La mezcla se defeca con solución de tanino y se centrifuga. El extracto se trata con solución de carbonato de sodio. La menadiona liberada se extrae con 1,2-dicloroetano. El extracto en dicloroetano se trata, según su contenido en menadiona, directamente o previa evaporación, con 2,4-dinitrofenilhidrazina en solución en etanol acidificado por ácido clorhídrico. La hidrazona obtenida da lugar, al añadirle un exceso de amoniaco, a un complejo de color azul-verdoso cuya absorbancia se mide a 635 nm. El método permite determinar la menadiona (vitamina K_3) en piensos, concentrados y premezclas. El límite inferior de detección es de 1 ppm.

41.2. MATERIAL Y APARATOS

41.2.1. Agitador mecánico.

41.2.2. Centrífuga (3.000 a 5.000 rpm).

41.2.3. Embudos de decantación de 100 y 250 ml, con tapón esmerilado.

41.2.4. Evaporador rotativo a vacío con matraces de 250 ml.

41.2.5. Baño de agua.

41.2.6. Espectrofotómetro con cubetas de 10 mm de espesor.

41.3. REACTIVOS

41.3.1. Etanol al 96% (v/v).

41.3.2. Etanol (41.3.1) diluído al 40% con agua.

41.3.3. Solución al 10% (p/v) de tanino, obtenida a partir de tanino puro en polvo.

41.3.4. 1,2, dicloroetano p.a.

41.3.5. Solución al 10% (p/v) de carbonato de sodio anhidro p.a.

41.3.6. Acido clorhídrico al 37% (p/p), de= 1,19.

41.3.7. Etanol absoluto.

41.3.8. Reactivo de 2,4-dinotrofenilhidrazina: disolver 40 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina p.a. en 40 ml aproximadamente de etanol absoluto (41.3.7) hirviendo. Dejar enfriar y trasvasar a un matraz aforado de 50 ml. Añadir 1 ml de ácido clohídrico (41.3.6) y completar a volumen con etanol absoluto (41.3.7). Preparar inmediatamente antes de su empleo.

41.3.9. Hidróxio de amonio al 25% (p/p), d= 0,91.

41.3.10. Solución amoniacal de etanol: mezclar un volumen de etanol (41.3.7) y un volumen de hidróxido de amonio (41.3.9).

41.3.11. Soluciones patrón de menadiona: disolver 20 mg de menadiona (vitamina K_3) en el 1,2-dicloroetano (41.3.4) y completar a 200 ml. Diluír partes alícuotas de esta solución mediante el 1,2-dicloroetano (41.3.4) para obtener una serie de soluciones patrón cuyas concentraciones en menadiona estén comprendidas entre 2 y 10 microgramos por mililitro. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

41.4. PROCEDIMIENTO

41.4.1. Extracción.

Tomar una porción de muestra finamente molida y proporcional al contenido supuesto de menadiona:

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

Introducirla inmediatamente en un matraz de 250 ml con tapón esmerilado. Añadir 96 ml exactamente de etanol diluído (41.3.2) y agitar mecánicamente durante 15 minutos a la temperatura ambiente. Añadir 4,0 ml de solución de tanino (41.3.3), mezclar, trasvasar el extracto a un tuvo de centrífuga, centrifugar (3.000 a 5.000 rpm) y decantar.

Introducir 20 a 40 ml excatamente medidos del extracto en un embudo de decantación de 250 ml, añadir mediante pipeta 50 ml de 1,2-dicloroetano (41.3.4), mezclar y añadir mediante pipeta 20 ml de solución de carbonato de sodio (41.3.5). Agitar enérgicamente durante 30 segundos y recoger a continuación la fase de dicloroetano en un embudo de decantación de 100 ml. Añadir 20 ml de agua, agitar durante 15 segundos, recoger la fase del dicloroetano y eliminar las trazas de agua mediante tiras de papel de filtro.

Para concentrados y premezclas, tomar una alícuota de extracto y diluír con 1,2-dicloroetano (41.3.4) para obtener una concentración en menadiona de 2 a 10 microgramos por mililitro. Para los piensos, evaporar a sequedad a 40 °C, bajo presión reducida y en atmósfera de nitrógeno, una alícuota del extracto. Redisolver el resíduo en la cantidad adecuada de 1,2-dicloroetano (41.3.4) para obtener una solución que contenga de 2 a 10 microgramos de menadiona por ml.

41.4.2. Formación de la hidrazona.

Llevar 2,0 ml del extracto en dicloroetano obtenido en 41.4.1 a un matraz aforado de 10 ml y añadir 3,0 ml del

reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina (41.3.8). Tapar el matraz herméticamente de forma que se evite toda evaporación y calentar durante 2 horas a 70 °C sobre baño de agua. Dejar enfriar, añadir 3,0 ml de solución amoniacal de etanol (41.3.10), mezclar, completar a volumen con etanol absoluto (41.3.7) y mezclar de nuevo.

41.4.3. Medida de la absorbancia.

Medir la absorbancia del complejo coloreado azul verdoso en espectrofotómetro a 635 nm por comparación con un blanco de reactivos obtenido tratando 2,0 ml de 1,2-dicloroetano (41.3.4) como se indica en 41.4.2. Determinar la cantidad de menadiona mediante la curva de calibrado establecida para cada serie de análisis.

41.4.4. Curva de calibrado.

Tratar 2,0 ml de cada solución patrón de menadiona (41.3.11) como se indica en 41.4.2. Medir la absorbancia como se indica en 41.4.3. Trazar la curva de calibrado llevando a ordenadas los valores de la absorbancia y en abcisas las cantidades correspondientes de menadiona en microgramos.

41.5. CALCULOS

Calcular el contenido en menadiona de la muestra tenido en cuenta el peso de la muestra y las diluciones efectuadas en el curso del análisis. Expresar el resultado en mg de menadiona por Kg.

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

- 20% en valor relativo para los contenidos en menadiona inferiores a 10 mg/kg.
- 2 mg en valor absoluto para los contenidos en menadiona comprendidos entre 10 y 14 mg/kg.
- 15% en valor relativo para los contenidos comprendidos entre 14 y 100 mg/kg.
- 15 mg/kg en valor absoluto para los contenidos comprendidos entre 100 y 150 mg/kg.
- 10% en valor relativo para los contenidos superiores a 150 mg/kg.

41.6. OBSERVACIONES

Todas las manipulaciones deben hacerse en ausencia de luz directa y si es posible en material de vidrio color ámbar.

41.7. REFERENCIAS

Quinta Directiva de la Comisión de 25 de marzo de 1974. 74/203/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº 108/7 de 22 de abril de 1974.

42. VIRGINIAMICINA

(por difusión en agar)

42.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la virginiamicina en piensos y en las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 2 mg/kg. 1 mg de virginiamicina equivale a 1000 unidades UK.

Se somete la muestra a extracción mediante solución metanólica de Tween 80. El extracto se decanta o centrifuga, y se diluye después. Su actividad antibiótica se determina por medición de la difusión de la virginiamicina en un medio de agar sembrado con Micrococus luteus. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición de microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración de antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

42.2. REACTIVOS

42.2.1. Microorganismo: "Micrococus luteus" ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553).

42.2.1.1. Mantenimiento de la cepa.- Sembrar el medio de cultivo (42.2.2.1) en tubos inclinados, con Micrococus luteus. Incubar durante 24 horas a 30 °C, conservar en frigorífico a unos 4 °C y renovar la siembra cada 15 días.

42.2.1.2. Preparación de la suspensión bacteriana. Recoger los gérmenes de un tubo de agar (42.2.1.1) de preparación reciente, con ayuda de 2 a 3 ml de solución de cloruro de sodio (42.2.2.3). Sembrar con esta suspensión 250 ml del medio de cultivo (42.2.2.1) en un frasco de Roux e incubar durante 18 a 20 horas a 30 °C. Recoger los gérmenes en 25 ml de solución de cloruro de sodio (42.2.2.3) y homogeneizar.

Diluir la suspensión al 1/10 con ayuda de la solución de cloruro de sodio (42.2.2.3). La transmisión luminosa de la suspensión, medida a 650 nm bajo un espesor de 1 cm, por comparación con la solución de cloruro de sodio (42.2.2.3), debe ser de alrededor del 75%. Esta suspensión puede conservarse una semana a unos 4 °C. Pueden utilizarse otros métodos, siempre que esté demostrado que producen suspensiones bacterianas análogas.

42.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

42.2.2.1. Medio de mantenimiento de la cepa y de base para la determinación. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismo resultados.

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
Agar	10,0 a 20,0 g
Agua	1000 ml

pH 6,5 (tras esterilización)

42.2.2.2. Tampón fosfato pH 6

Hidrógenofosfato de potasio K_2HPO_4	2 g
Dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4	8 g
Agua hasta	1000 ml

42.2.2.3. Solución al 0,8% (p/v) de cloruro de sodio:

Disolver en agua 8 g de cloruro de sodio, diluir hasta 1.000 ml y esterilizar

42.2.2.4. Metanol.

42.2.2.5. Mezcla de tampón fosfato (42.2.2.2) y de metanol (42.2.2.4): 80/20 (v/v).

42.2.2.6. Solución en metanol al 0,5% (p/v) de Tween 80: disolver 5 g de Tween 80 en metanol (42.2.2.4) y diluir hasta 1.000 ml con metanol.

42.2.2.7. Sustancia de referencia: virginiamicina de actividad conocida.

42.3. PROCEDIMIENTO

42.3.1. Soluciones de referencia.- Disolver una cantidad pesada exactamente de la sustancia de referencia (42.2.2.7) en metanol (42.2.24) y diluir con metanol (42.2.2.4) para obtener una solución madre de 1000 microgramos de virginiamicina/ml. Conservada en frasco tapado, a 4 °C, esta solución es estable durante 5 días. Preparar a partir de esta solución y mediante diluciones suscesivas con la mezcla (42.2.2.5), las soluciones siguientes:

S_8	1	microgramo/ml
S_4	0,5	microgramo/ml
S_2	0,25	microgramo/ml
S_1	0,125	microgramo/ml

42.3.2. Preparación del extracto y de las soluciones.

42.3.2.1. Extracción.

42.3.2.1.1. Productos cuyo contenido en virginiamicina no excede de 100 mg/kg.

Pesar una cantidad de muestra de 50 g. Añadir 200 ml de solución (42.2.2.6), agitar durante 30 minutos y dejar luego sedimentar o centrifugar. Recoger 20 ml de la solución sobrenadante y evaporar hasta 5 ml en un evaporador rotativo a una temperatura que no exceda de 40 °C. Disolver el residuo con ayuda de la mezcla (42.2.2.5) para obtener una concentración supuesta de virginiamicina de 1 microgramo/ml (= U_8).

42.3.2.1.2. Productos cuyo contenido en virginiamicina es superior a 100 mg/kg.

Pesar una cantidad de muestra que no exceda de 10,0 g y que contenga de 1 a 50 mg de virginiamicina. Añadir 100

ml de solución (42.2.2.6), agitar durante 30 minutos, y dejar sedimentar luego o centrifugar. Diluir la solución sobrenadante con ayuda de la mezcla (42.2.2.5) para obtener una concentración de virginiamicina de 1 microgramo/ml (= U_8).

42.3.2.2. Soluciones del extracto.- Preparar, a partir de la solución U_8 y por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la mezcla (42.2.2.5), las soluciones U_4 (concentración supuesta = 0,5 microgramo/ml), U_2 (concentración supuesta = 0,25 microgramo/ml) y U_1 (concentración supuesta = 0,125 microgramo/ml).

42.3.3. Modalidades de la determinación.

42.3.3.1. Inoculación del medio de cultivo.- Sembrar a unos 50 °C el medio de base de la determinación (42.2.2.1) con la suspensión bacteriana (42.2.1.2). Mediante ensayos preliminares sobre placas con el medio (42.2.2.1), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permite obtener para las diferentes concentraciones de virginiamicina zonas inhibición lo mas amplias posibles sin dejar de ser nítidas.

42.3.3.2. Preparación de las cajas.- La difusión en agar se efectúa en cajas con las cuatro concentraciones de la solución de referencia (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones de referencia y del extracto. A tal fin, hay que elegir las dimensiones de las cajas de forma que se puedan excavar en el medio de agar por lo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten menos de 30 mm. Pueden emplearse 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 (42.2.2.1), sembrado tal como se indica en (42.3.3.1), que permita obtener una capa de unos 2 mm de grosor (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, excavar las cavidades y depositar en ellas volúmenes exactamente medidos de las soluciones de referencia y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad según diámetro). Repetir por lo menos 4 veces cada concentración, de forma que cada determinación comprenda la valoración de 32 zonas de inhibición.

42.3.3.3. Incubación.- Incubar las cajas durante dieciseís a dieciocho horas a 30 °C ± 2 °C.

42.4. CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con un error no superior a 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico, trasladando el logaritmo de las concentraciones en relación con los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución de referencia y para el extracto, por ejemplo, mediante el procedimiento siguiente:

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución de referencia (SL) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar el punto más apropiado del nivel más alto de la solución de referencia (SH) con ayuda de la fórmula:

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

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

Consignar los valores SL y SH en la misma gráfica. Al unir los dos puntos, se obtiene la recta más ajustada para la solución de referencia. Se sigue el mismo método para UL y UH, y se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

Si no hubiere ninguna interferencia, las rectas se consideran paralelas cuando (SH-SL) y (UH-UL) no difieren en más de un 10% de su media.

Si las rectas no son paralelas, pueden eliminarse U_1 y S_1 o U_8 y S_8. Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces con ayuda de las fórmulas siguientes:

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

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

y de fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa obliga a respetar los mismos criterios de paralelismo.

En el boletín analítico debe mencionarse la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando las rectas se consideren paralelas, hay que calcular el logaritmo de la actividad relativa (log A), mediante una de las fórmulas siguientes, según el número de niveles (4 ó 3) utilizados para la valoración del paralelismo.

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:

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

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

Actividad del extracto de la muesta = actividad de la referencia correspondiente x A, es decir = S_8 x A

Si la actividad relativa no se encuentra en la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, ha de repetirse la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o, en su caso, de las soluciones de referencia. Cuando esta actividad no pueda encuadrarse en la gama de los valores exigidos, el resultado se considerará aproximado y así se hará constar en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideren paralelas, se repetirá la determinación. Si tampoco ahora se logra el paralelismo, la determinación se considerará insatisfactoria.

Expresar el resultado en miligramos de virginiamicina por kilogramo de pienso.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas con la misma muestra por el mismo analista no deben exceder de:

2 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de virginiamicina inferiores a 10 mg/kg.

20 por 100 del resultado más alto, para los contenidos de 10 a 25 mg/kg.

5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg.

10 por 100 del resultado más alto, para los contenidos superiores a 50 mg/kg.

42.5. REFERENCIAS

Directiva de la Comisión de 20 de diciembre de 1983, que modifica las Directivas 71/393, 72/199 y 78/633, (84/4/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 18 de enero de 1984, nº L 15/28, Anexo II.

43. BACITRACINA -CINC

(Por difusión en agar)

43.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la bacitracina - cinc en los piensos y premezclas. El límite inferior de la determinación es de 5 mg/kg. 1 mg de bacitracina cinc (calidad para piensos) equivale a 42 unidades internacionales (UI).

Se extrae la muestra a pH 2 mediante una mezcla de etanol, agua y ácido clorhídrico y una solución de sulfuro de sodio. El sulfuro de sodio permite precipitar las sales de cobre solubles que pudieran obstaculizar la determinación. El extracto, llevado a pH 6,5 se concentra (en caso necesario) y diluye. Su actividad antibiótica se determina por medio de la difusión de la bacitracina cinc en un medio de agar, sembrado con Micrococus luteus (flavus). La difusión se manifiesta mediante formación de

zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera proporcional directamente al logaritmo de la concentración de antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

43.2. REACTIVOS

43.2.1. Microorganismo: Micrococcus luteus (flavus) ATCC 10240.

43.2.1.1. Mantenimiento de la cepa.- Sembrar el medio de cultivo (43.2.2.1) en tubos inclinados, con Micrococcus luteus (flavus). Incubar durante 24 horas a 30 °C, conservar en frigorífico a unos 4 °C y renovar la siembra cada 15 días.

43.2.1.2. Preparación de la suspensión bacteriana.- Recoger los gérmenes de un tubo de agar (43.2.1.1) de preparación reciente con la ayuda de 2 a 3 ml de la solución de cloruro de sodio (43.2.2.3). Sembrar con esta suspensión 250 ml del medio de cultivo (43.2.2.1) en un frasco de Roux e incubar durante dieciocho a veinte horas a 30 °C. Recoger los gérmenes en 25 ml de solución de cloruro de sodio (43.2.2.3) y homogeneizar.

Diluir la suspensión al 1/10 con ayuda de la solución de cloruro de sodio (43.2.2.3). La transmisión luminosa de la solución, medida a 650 nm bajo un espesor de 1 cm por comparación con la solución de cloruro de sodio (43.2.2.3), debe ser alrededor del 75%. Esta suspensión puede conservarse una semana a unos 4 °C. Pueden utilizarse otros métodos siempre que esté demostrado que producen suspensiones bacterianas análogas.

43.2.2. Medios de cultivo y reactivos.-

43.2.2.1. *Medio de mantenimiento de la cepa.*

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
Agar	10,0 a 20,0 g
Agua	1000 ml
pH 6,5 a 6,6 (tras esterilización)	

Puede utilizarse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga, que dé los mismos resultados.

43.2.2.2. Medio de base de la determinación.

Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar	10,0 a 20,0 g
Tween 80	1 ml
Agua	1000 ml
pH 6,5 (tras esterilización)	

Puede utilizarse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga, que dé los mismos resultados.

43.2.2.3. Solución al 0,8% p/v de cloruro de sodio: disolver 8 g de cloruro de sodio en agua, diluir a 1000 ml y sterilizar.

43.2.2.4. Mezcla de metanol/agua/ácido clohídrico (43.2.2.6): 80/17,5/2,5 (v/v/v).

43.2.2.5. Tampón fosfato pH 6,5

Hidrógeno fosfato de potasio K_2HPO_4	22,15 g
Dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4	27,85 g
Agua hasta	1000 ml

43.2.2.6. Acido clohídrico, d= 1,18 - 1,19

43.2.2.7. Acido clohídrico, 0,1 M.

43.2.2.8. Solución de hidróxido de sodio 1 M.

43.2.2.9. Solución de sulfuro de sodio 0,5 M aproximadamente.

43.2.2.10. Solución de púrpura de bromocresol al 0,04% (p/v) Disolver 0,1 g de púrpura de bromocresol en 18,5 ml de solución 0,01 M de hidróxido de sodio. Completar hasta 250 ml con agua y homogeneizar.

43.2.2.11. Sustancia de referencia: bacitracina cinc de actividad conocida (en UI).

43.3. PROCEDIMIENTO

43.3.1. Soluciones de referencia.- Pesar una cantidad de sustancia de referencia (43.2.2.11) correspondiente a 1050 UI (según la actividad indicada). Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 0,1 M (43.2.2.7) y dejar reposar 15 minutos. Añadir 30 ml de agua, ajustar el pH a 4,5 con tampón fosfato (43.2.2.5) (unos 4 ml), completar hasta 50 ml con agua y homogeneizar (1 ml = 21 UI).

Preparar a partir de esta solución y mediante diluciones sucesivas con ayuda de tampón fosfato pH 6,5 (43.2.2.5), las soluciones siguientes:

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

43.3.2. Preparación del extracto.

43.3.2.1. Extracción.

43.3.2.1.1. Premezclas y correctores minerales.-

Pesar una cantidad de muestra de 2,0 a 5,0 g, añadir 29,0 ml de la mezcla (43.2.2.4) y 0,1 ml de la solución de sulfuro de sodio (43.2.2.9); agitar brevemente. Comprobar que el pH es *aproximadamente 2. Agitar durante 10* minutos, añadir 30 ml de tampón fosfato (43.2.2.5), agitar durante 15 minutos y centrifugar. Tomar una parte alícuota de la solución sobrenadante y ajustar el pH a 6,5 con solución de hidróxido de sodio 1 M (43.2.2.8) utilizando un *pH-metro o* la solución de púrpura de bromocresol como indicador (43.2.2.10).

Diluír con tampón fosfato (43.2.2.5) para obtener una concentración supuesta en bacitracina cinc de 0,42 UI/ml (=U_8).

43.3.2.1.2. Concentrados proteícos.- Pesar una cantidad de muestra de 10,0 g, añadir 49,0 ml de mezcla (43.2.2.4) y 1,0 ml de la solución de sulfuro de sodio (43.2.2.9); agitar brevemente. Comprobar que el pH es aproximadamente 2. Agitar durante 10 minutos, añadir 50 ml de tampón fosfato (43.2.2.5), agitar durante 15 minutos y centrifugar. Tomar una parte alícuota de la solución sobrenadante y ajustar el pH a 6,5 con la solución de hidroxido de bromocresol como indicador (43.2.2.10).

Evaporar aproximadamente la mitad del volumen en un evaporador rotativo a una temperatura que no exceda de 35 °C. Diluir con tampón fosfato (43.2.2.5) para obtener una concentración supuesta de bacitracina de cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

43.3.2.1.3. Otros piensos.-

Pesar una cantidad de muestra de 10 g (20,0 o para una concentración supuesta de bacitracina cinc de 5 mg/kg). Añadir 24,0 ml de mezcla (43.2.2.4) y 1,0 ml de la solución de sulfuro de sodio (43.2.2.9); homogeneizar durante 10 minutos. Añadir 25 ml de tampón fosfato (43.2.2.5), agitar durante 15 minutos, y centrifu*gar. Tomar 20 ml de la solución so*brenadante y ajustar el pH a 6,5 con solución de hidróxido de sodio (43.2.2.8), utilizando un pH neutro o la solución de púrpura de bromocresol (43.2.2.10) como indicador. Evaporar hasta 4 ml aproximadamente en un evaporador rotativo *a una temperatura* que no exceda de 35 °C. Diluir el residuo con tampón fosfato (43.2.2.5) para obtener una concentración supuesta de bacitracina cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

43.3.2.2. Soluciones del extracto.

Preparar, a partir de la solución U_8 y por diluciones sucesivas (1 + 1) con tampón fosfato

(43.2.2.5) las soluciones U_4 (concentración supuesta = 0,21 UI/ml), U_2 (concentración supuesta = 0,105 UI/ml) y U_1 (concentración supuesta = 0,0525 UI/ml).

43.3.3. Modalidades de determinación.-

43.3.3.1. Incoculación del medio de cultivo.-

Sembrar a unos 50 °C el medio de base de la determinación (43.2.2.2) con la suspensión bacteriana (43.2.1.2). Mediante ensayos preliminares en placas con el medio (43.2.2.2), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permite obtener para las diferentes concentraciones de bacitracina cinc zonas de inhibición lo más amplias posibles sin dejar de ser nítidas.

43.3.3.2. Preparación de las cajas.-

La difusión en agar se efectúa en cajas con las cuatro concentraciones de las solución de referencia (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones de referencia y del extracto. A tal fin hay que elegir la dimensión de las cajas de tal forma que se puedan excabar en el medio de agar por lo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten menos de 30 mm. Pueden emplearse 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 (43.2.2.2), sembrado tal como se indica en 43.3.3.1, que permita obtener una capa de unos 2 mm de grosor (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, excavar las cavidades, y depositar en ellas volúmenes exactamente medidos de las soluciones de referencia y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según el diámetro). Repetir por lo menos cuatro veces cada concentración, de forma que cada determinación sea la evaluación de 32 zonas de inhibición.

43.3.3.3. Incubación.-

Incubar las cajas durante dieciseís a dieciocho horas a 30 °C ± 2 °C.

43.4. CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con un error no superior a 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico, trasladando el logaritmo de las concentraciones en relación con los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución de referencia y para el extracto, por ejemplo, mediante el procedimiento siguiente:

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución de referencia (SL) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar el punto más apropiado del nivel más alto de la solución de referencia (SH) con ayuda de la fórmula:

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

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

Consignar los valores SL y SH en la misma gráfica. Al unir los dos puntos, se obtiene la recta más ajustada para la solución de referencia. Si se sigue el mismo método para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

Si no hubiere ninguna interferencia, las rectas serían paralelas. En la práctica se considerán paralelas cuando (SH-SL) y (UH-UL) no difieren más de un 10% de su media.

Si las rectas no son paralelas, pueden eliminarse U_1 y S_1 o U_8 y S_8. Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener rectas más ajustadas, se calculan entonces con ayuda de las fórmulas siguientes:

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

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

y de fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa obliga a respectar los mismos criterios de paralelismo. En el boletín analítico debe mencionarse la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando las rectas se consideren paralelas, hay que calcular el logaritmo de la actividad relativa (log A) mediante una de las fórmulas siguientes, según el número de niveles (4 ó 3) utilizados para la valoración del paralelismo.

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 del extracto de la muestra = actividad de la referencia correspondiente x A, es decir $U_8 = S_8 \times A$

Si la actividad relativa no se encuentra en la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, ha de repetirse la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o, en su caso, de las soluciones de referencia. Cuando esta actividad no pueda encuadrarse en la gama de los valores exigidos, el resultado se considerará aproximado y así se hará constar en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideren paralelas, se repetirá la determinación. Si tampoco ahora se lograse el paralelismo, la determinación se considerará insatisfactoria.

Expresar el resultado en miligramos de bacitracina cinc por kilogramo de pienso.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas con la misma muestra por el mismo analista no deben exceder de:

- 2 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de bacitracina cinc inferiores a 10 mg/kg.
- 20% del resultado más alto, para los contenidos de 10 a 25 mg/kg.
- 5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg.
- 10% del resultado más alto, para los contenidos superiores a 50 mg/kg.

43.5. REFERENCIAS

Directiva de la Comisión de 20 de diciembre de 1983, modificando las Directivas 71/393, 72/199 y 78/633, (Directiva 84/4/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 18 de enero de 1984, nº L 15/28, Anexo III.

44. FLAVOFOSFOLIPOL

(por difusión en agar)

44.1. PRINCIPIO

El método permite dosificar el flavofosfolipol en los piensos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de dosificación es de 1 mg/kg.

Se somete la muestra a extracción por metanol diluído, mediante calentamiento a reflujo. El extracto se centrifuga, se purifica, si es necesario, en resinas intercambiadoras de iones, y se diluye. Se determina la actividad antibiótica por medida de la difusión del flavofosfolipol en un medio de agar, sembrado con Staphylococcus aureus. La difusión se pone de manifiesto por la formación de zonas de inhibición de microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de las concentraciones utilizadas.

44.2. REACTIVOS

44.2.1. Microorganismo: Staphylococcus aureus ATCC 6538 P.

44.2.1.1. Mantenimiento de la cepa.- Sembrar el medio de cultivo (44.2.2.1) en tubos inclinados, con Staphylococcus aureus. Incubar durante 24 horas a 37 °C, conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente, y renovar la siembra cada mes.

44.2.1.2. Preparación de la suspensión bacteriana.-

Tomar dos tubos que contengan el cultivomadre (4.2.2.1) y renovar la siembra cada semana. Incu-

bar 24 horas a 37 °C y conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente.

24 horas antes de la dosificación, sembrar mediante dichos cultivos, de dos a cuatro tubos inclinados que contengan medio de cultivo (44.2.2.1).

Incubar de 16 a 18 horas a 37 °C. Poner luego los gérmenes en suspensión en la solución de cloruro de sodio (44.2.2.3). 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. Se podrán utilizar otros métodos si demuestran que producen una suspensión bacteriana análoga.

44.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

44.2.2.1. Medio de mantenimiento de la cepa.

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
Agar	15,0 g
Agua	1000 ml

pH = 6,5 después de la esterilización

Se podrá utilizar cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados, por ejemplo Oxoid Antibiotic Medium (CM 327) agregado a agar Oxoid nº 3 (L 13).

44.2.2.2. Medio de base de la dosificación.

44.2.2.2.1. Capa inferior.

Peptona de carne	6,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Agar	10,0 g
Agua	1000 ml

pH = 6,5 después de la esterilización

Se podrá utilizar cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados, por ejemplo Oxoid Antibiotic Medium 2(CM 335) agregado a agar Oxoid nº 3 (L 13).

44.2.2.2.2. Capa a sembrar.- Medir (4.2.2.1) con 2 g de emulsión antiespumante de silicona. Por ejemplo SE 2 de Wacker Chemie Gmon, Munich.

44.2.2.3. Solución al 0,4% (p/v) de cloruro de sodio:

Disolver en agua 4 g de cloruro de sodio p.a., diluir hasta 1000 ml y esterilizar.

44.2.2.4. Metanol puro.

44.2.2.5. Metanol al 50% (v/v). Diluir 500 ml de metanol con 500 ml de agua.

44.2.2.6. Metanol al 80% (v/v). Diluir 800 ml de metanol (44.2.2.4) con 200 ml de agua

44.2.2.7. Tris (hidroximetil) aminometano p.a.

44.2.2.8. Solución metanólica al 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 (44.2.2.4.).

44.2.2.9. Intercambiador de cationes: Dowex 50 WX8, 20-25 mesh, forma Na (cat. Serva nº 41600) o equivalente.

44.2.2.10. Intercambiador de aniones: Dowex 1X2, 50 100 mesh, forma Cl/cat. Serva nº 41010) o equivalente. Antes de utilizarlo, mantener el producto durante 12 a 14 horas en metanol al 80% (44.2.2.6).

44.2.2.11. Lana de vidrio.

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

44.2.2.13. Acido ascórbico.

44.2.2.14. Sustancia patrón. Flavofosfolipol de actividad conocida.

44.3. MATERIAL Y APARATOS

44.3.1. Tubo para cromatografía, de vidrio, diámetro interior: 9 mm, longitud 150 a 200 mm, provisto de llave en el estrechamiento inferior y de esmerilado normalizado (para empalme del embudo) en la parte superior.

44.3.2. Embudo con depósito de 250 ml, con llave esmerilada, normalizado.

44.3.3. Erlenmeyer de 250 ml, de esmerilado normalizado.

44.3.4. Refrigerante de reflujo, de esmerilado normalizado.

44.4. PROCEDIMIENTO

44.4.1. Soluciones patrón. Disolver una cantidad exactamente pesada de sustancia patrón (44.2.2.14) en metanol al 50% (44.2.2.5) y diluir para obtener una solución madre de flovofosfolipol de 100 microgramos/ml. Conservada en frasco tapado, a 4 °C, dicha solución es estable durante dos meses.

Preparar a partir de dicha solución, y por diluciones sucesivas, mediante metanol al 50% (44.2.2.5) las soluciones siguientes:

S_8	0,2	microgramo/ml
S_4	0,1	microgramo/ml
S_2	0,05	microgramo/ml
S_1	0,025	microgramo/ml

44.4.2. Preparación del extracto.

44.4.2.1. Extracción.

44.4.2.1.1. Concentrados, premezclas y correctores minerales.

Pesar una cantidad de muestra de 2 a 5 g y añadir unos 150 mg de ácido ascórbico (44.2.2.13). Mezclar con 150 ml de metanol al 50% (44.2.2.5) en un erlenmeyer (44.2.3.3) y ajustar el pH a 8,1-8,2 mediante unos 400 mg de tris (hidroximetil) aminometano (44.2.2.7). Controlar el pH mediante papel indicador (44.2.2.12). Dejar macerar 15 minutos, ajustar de nuevo el pH a 8,1-8,2, mediante tris (hidroximetil) aminometano (44.2.2.7), y luego hervir durante 10 minutos con refrigerante a reflujo (44.2.3.4), agitando constantemente. Dejar enfriar, centrifugar y decantar el extracto.

44.4.2.1.2. Otros piensos.

Pesar una cantidad de muestra de 5 a 30 g que contenga al menos 30 microgramos de flavofosfolipol. Mezclar a 150 ml de metanol al 50% (44.2.2.5) en un erlenmeyer (44.2.3.3) y ajustar el pH a 8,1-8,2 con 400 mg aproximadamente de tris (hidroximetil) aminometano (4.2.2.7). Controlar el pH mediante papel indicador. Dejar macerar 15 minutos, ajustar de nuevo el pH a 8,1-8,2 con tris (hidroximetil) aminometano y luego hervir durante 10 minutos con refrigerante de reflujo (44.2.3.4) agitando constantemente. Dejar enfriar, centrifugar y decantar el extracto.

44.4.2.2. Purificación.

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

Mezclar 110 ml del extracto con 11 g de intercambiador de cationes (44.2.2.9), hervir durante un minuto con refrigerante a reflujo (44.2.3.4) agitando constantemente. Separar el intercambiador de cationes por centrifugación o filtración. Mezclar 100 ml del extracto con 150 ml de metanol (44.2.2.4) y dejar reposar la solución de 12 a 15 horas a 4 °C. Eliminar la materia floculada por filtración en frío.

Poner en el extremo inferior de un tubo (44.2.3.1) un tapón de lana de vidrio (44.2.2.11), verter en el tubo 5 ml de intercambiador de aniones (44.2.2.10) y lavar la columna con 100 ml de metanol al 80% (44.2.2.6). Luego trasvasar a la columna a través del embudo

(44.2.3.2) un volumen de filtrado de 100 ml que se supone contiene por lo menos 16 microgramos de flavofosfolipol (200 ml para una muestra de 30 g de pienso a 1 ppm). Si fuere necesario, diluir el filtrado antes de trasvasarlo a la columna con metanol al 80% (44.2.2.6) para obtener una presunta concentración en flavofosfolipol de 16 microgramos en 100 ml. Regular el caudal de salida del líquido a 2 ml aproximadamente por minuto. Eliminar la totalidad del filtrado. Lavar luego la columna con 50 ml de metanol al 80% (44.2.2.6) y eliminar el filtrado.

Eluir el flavofosfolipol mediante la solución metanólica de cloruro de potasio (44.2.2.8) manteniendo el caudal de goteo aproximadamente de 2 ml por minuto. Recoger 50 ml de la elución en un matraz aforado, añadir 30 ml de agua y homogeneizar. Esta disolución debe tener un contenido en flavofosfolipol de 0,2 microgramo/ml (= U_8).

44.4.2.3. Soluciones del extracto.

Si fuera necesario, (en particular en los casos en que se hubiera omitido la purificación) diluir el extracto obtenido en (44.4.2.1.1) con metanol al 50% (44.2.2.5) para obtener una supuesta concentración en flavofosfolipol de 0,2 microgramo/ml (= U_8).

Preparar a partir de la solución U_8 por diluciones sucesivas (1 + 1) mediante metanol al 50% (44.2.2.5) las soluciones U_4 (concentración supuesta = 0,1 microgramo/ml), U_2 (concentración supuesta = 0,05 microgramo/ml) y U_1 (concentración supuesta = 0,025 microgramo/ml).

44.4.3. Modalidades de la dosificación.

44.4.3.1. Inoculación del medio de cultivo.

Sembrar a 50 °C aproximadamente el medio de base de la dosificación (44.2.2.2.2) con la suspensión bacteriana (44.2.1.2). Mediante ensayos preliminares en capas con el medio (44.2.2.2.2) 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).

44.4.3.2. Preparación de la cajas.

La difusión en agar se realiza en cajas con las cuatro concentraciones de la solución patrón (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y 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 forma tal que se puedan ahuecar en el medio de agar al menos 8 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 (44.2.2.2.1) 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 (44.2.2.2.2), sembrado como se indica en el punto 44.3.3.1, 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 los volúmenes exactamente medidos de las soluciones patrón y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según diámetro).

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

43.4.3.3. Incubación.-

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

44.5 CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una aproximación de 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas en papel semilogarítmico 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:

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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 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 supuesta x actividad relativa.

Cuando las rectas no 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 aproximado y será procedente mencionarlo en el boletín de análisis.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas en la misma muestra por el mismo analista no debera 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 elevadoo, para los contenidos superiores a 50 mg/kg.

44.6. REFERENCIAS

Octava Directiva de la Comisión, de 15 de junio de 1978 (78/633/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas Nº L 206, de 29 de julio de 1978, pag. 43, pag. 5 a 9 del Anexo.

45. TILOSINA

(por difusión en agar)

45.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la tilosina en los piensos, los concentrados y en las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 2 mg/kg.

La muestra se trata mediante solución tampón fosfato de pH 8, previamente llevada a 80 °C, y se somete a contínción a extracción por metanol. Previa centrifugación, el extracto se diluye y su actividad antibiótica se determina por la medida de la difusión de la tilosina en medio de agar sembrado con Sarcina lutea. La difusión queda indicada por la formación de zonas de inhibición en presencia del microorganismo. El diámetro de dichas zonas es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico.

45.2. REACTIVOS

45.2.1. Microorganismo: Sarcina lutea ATCC nº 9341.

45.2.1.1. Mantenimiento de la cepa.-

Sembrar Sarcina lutea en tubo de agar inclinado con el medio de cultivo (45.2.2.1) ajustado a pH 7,0. Incubar durante una noche a 35 °C aproximadamente. Conservar el cultivo en refrigerador y resembrar todos los meses sobre agar inclinado.

45.2.1.2. Preparación de la suspensión de gérmenes.-

Recoger los gérmenes de un tubo de agar inclinado (45.2.1.1) de reciente preparación, con 2 a 3 ml de suero fisiológico (45.2.2.4). Sembrar con dicha suspensión un frasco de Roux que contenga 250 ml del medio de cultivo (45.2.2.1), ajustado a pH 7,0. Incubar durante 24 horas a 35 °C, recoger los gérmenes con 25 ml de suero fisiológico (45.2.2.4). Homogeneizar y diluír dicha suspensión para obtener una transmisión luminosa del 75% aproximadamente a 650 nm.

Conservada en refrigerador, dicha suspensión es utilizable durante una semana.

Mediante unos ensayos preliminares sobre placas con el medio de base de la determinación (45.2.2.1), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener, para las diferentes concentraciones de tilosina empleadas, zonas de inhibición tan extensas como sea posible que además estén nítidas. La inoculación del medio de cultivo se hace a 48-50 °C.

45.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

45.2.2.1. Medio de base para la determinación.

Glucosa	1,0 g
Peptona tríptica	10,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3,0 g
Agar según calidad	10,0 a 20,0 g
Agua destilada hasta	1000 ml

Ajustar en el momento de empleo a pH 7,0 para el mantenimiento de la cepa y la preparación de la suspensión de gérmenes y a pH 2,0 para la determinación.

Cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados, puede ser empleado.

45.2.2.2. Tampón fosfato pH 8.

Dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Hidrógeno fosfato de potasio K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Agua destilada hasta	1000 ml

45.2.2.3. Tampón fosfato pH 7.

Dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Hidrógeno fosfato de potasio K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Agua destilada hasta	1000 ml

45.2.2.4. Suero fisiológico estéril.

45.2.2.5. Metanol puro.

45.2.2.6. Metanol al 10% (v/v).

45.2.2.7. Mezcla de tampón fosfato (45.2.2.2)/metanol puro (60/40 v/v).

45.2.2.8. Sustancia de referencia: Tilosina conocida.

45.3. PROCEDIMIENTO

45.3.1. Soluciones de referencia.-

Secar la solución de referencia (45.2.2.8) durante 3 horas a 60 °C en una estufa de vacío (5 mm de mercurio). Pasar 10 a 50 mg a un matraz aforado, disolverlos en 5 ml de metanol (45.2.2.5) y diluir la solución mediante el tampón fosfato pH 7 (45.2.2.3) para obtener una concentración en tilosina base de 1.000 microgramos/ml.

A partir de dicha solución-madre, preparar diluyendo mediante la mezcla (45.2.2.7) una solución de trabajo de referencia que contenga 2 microgramos de tilosina base por ml.

Preparar a continuación por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la mezcla (45.2.2.7), las concentraciones siguientes:

S_4	1	microgramo/ml
S_2	0,5	microgramo/ml
S_1	0,25	microgramo/ml

45.3.2. Extracción.

Tomar para los productos muy concentrados en tilosina una porción de muestra de 10 g; para las premezclas y piensos una porción de muestra de 20 g. Añadir 60 ml de tampón fosfato pH 8 (45.2.2.2), previamente calentado a 80 °C, y homogeneizar durante 2 minutos (electrodomésticos Ultra-turrax etc.)

Dejar reposar durante 10 minutos, añadir 40 ml de metanol (45.2.2.5) y homogeneizar durante 5 minutos. Centrifugar, tomar una parte alícuota de extracto y diluír mediante la solución (45.2.2.7) para obtener una concentración supuesta en tilosina de 2 microgramos/ml (= U_8). Preparar a continuación las concentraciones U_4, U_2 y U_1 por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la solución (45.2.2.7).

Para los contenidos inferiores a 10 mg/kg evaporar el extracto en seco en un evaporador rotativo a 35 °C y recoger el residuo mediante metanol al 40% (45.2.2.6).

45.3.3. Modalidades de la determinación.

45.3.3.1. Siembra del medio de cultivo.-

Sembrar a 48 - 50 °C el medio de base de la determinación (45.2.2.1), ajustado a pH 8, con la suspensión de gérmenes (45.2.1.2).

45.3.3.2. Preparación de las cajas.-

La difusión sobre agar se efectúa en unas cajas con las 4 concentraciones de la solución de referencia (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las 4 concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1). Cada caja deberá recibir necesariamente las 4 concentraciones de referencia y del extracto.

A tal fin, escoger las dimensiones de las cajas de tal forma que se puedan practicar en el medio de agar al menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro. Calcular la cantidad del medio de cultivo sembrado (45.3.3.1) que habrá de emplearse de modo que se prueda obtener un recubrimiento uniforme de 2 mm aproximadamente de espesor. Es preferible emplear como cajas, placas de vidrio planas, provistas de un anillo de aluminio o de material plástico perfectamente plano de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las cavidades mediante pipeta cantidades exactamente medidas de solución de antibiótico comprendidas entre 0,10 y 0,15 ml, según diámetro.

Para cada muestra, hacer al menos 4 repeticiones de difusión con cada concentración, de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

45.3.3.3. Incubación.-

Incubar las cajas durante una noche a 35 ± 37 °C.

45.4. CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición, preferentemente por proyección. Representar las medidas sobre papel semilogarítmico, llevando

el logaritmo de las concentraciones con relación a los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas de solución de referencia y del extracto. En ausencia de interferencias, las dos rectas deberán ser paralelas.

El logaritmo de la actividad relativa está calculado por la siguiente fórmula:

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

Actividad real = actividad supuesta x actividad relativa.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra, no debe sobrepasar el 10%, en valor relativo.

45.5. REFERENCIAS

Tercera Directiva de la Comisión de 27 de abril de 1972, (72/199/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 123/6, de 29 de mayo de 1972.

46. ESPIRAMICINA

(Método por difusión sobre agar)

46.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la espiramicina en piensos y premezclas. El límite inferior de detección es de 1 ppm (1 mg de espiramicina equivale a 3200 unidades internacionales). La muestra se somete a extracción con una mezcla de metanol y de tampón fosfato-hidrogenocarbonato a pH 8. El extracto se decanta o centrifuga, y después se diluye. La actividad antibiótica del extracto se determina midiendo la difusión de la espiramicina en un medio de agar, sembrado con Micrococus luteus. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración de antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

46.2. REACTIVOS

46.2.1. Microorganismo: "Micrococus luteus" ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553).

46.2.2. Mantenimiento de la cepa.- Sembrar el medio de cultivo (46.2.4) en tubos inclinados, con Micrococus luteus. Incubar durante 24 horas a 30 °C, conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente y renovar la siembra cada 15 días.

46.2.3. Preparación de la suspensión bacteriana (46.5.1). Recoger los gérmenes en un tubo de agar (46.2.2) de reciente preparación, con ayuda de 2 a 3 ml de solución de cloruro de sodio (46.2.6). Sembrar con esta suspensión 250 ml de medio de cultivo (46.2.4) en un matraz de Roux e incubar durante 18 a 20 horas a 30 °C. Recoger los gérmenes en 25 ml de solución de cloruro de sodio (46.2.6) y homogeneizar. Diluir la suspensión hasta 1/10 con ayuda de la solución de cloruro de sodio (46.2.6). La transmisión luminosa de la suspensión, medida a 650 nm, bajo un espesor de 1 cm por comparación con la solución de cloruro de sodio (46.2.6), deberá ser de 75% aproximadamente. Esta suspensión puede conservarse una semana a 4 °C aproximadamente.

46.2.4. Medios de cultivo de mantenimiento de la cepa (46.5.2).

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
Agar	10,0 a 20,0 g
Agua	1000 ml

pH 6,5 - 6,6 (después de la esterilización)

46.2.5. Medio de cultivo de base de la determinación (46.5.2).

Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	4,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Agar	10,0 a 20,0 g
Agua	1000 ml

pH 8,0 (después de la esterilización)

46.2.6. Solución al 0,8% (p/v) de cloruro de sodio.

Disolver en agua 8 g de cloruro de sodio, diluir en 1000 ml y esterilizar.

46.2.7. Tampón fosfato-hidrogenocarbonato, pH 8,0.

Hidrógenofosfato de potasio K_2HPO_4	16,7 g
Dihidrógenofosfato de potasio KH_2PO_4	0,5 g
Hidrógeno carbontato de sodio $NaHCO_3$	20,0 g
Agua hasta	1000 ml

46.2.8. Mezcla de metanol y de tampón fosfato-bicarbonato (46.2.7). 50/50 (v/v).

46.2.9. Sustancia patrón. Espiramicina de actividad conocida (UI).

46.2.10. Solución patrón. Disolver una cantidad exactamente pesada de la sustancia patrón (46.2.9) en la mezcla (46.2.8) y diluir con la misma mezcla para obtener una solución madre de 1000 UI de espiramicina/ml.

Conservada en frasco con tapón esmerilado a 4 °C, esta solución es estable durante 5 días.

Preparar a partir de esta solución y por diluciones sucesivas con ayuda de la mezcla (46.2.8) las soluciones siguientes:

S_8	1	UI/ml
S_4	0,5	UI/ml
S_2	0,25	UI/ml
S_1	0,125	UI/ml

46.3. PROCEDIMIENTO

46.3.1. Extracción. Pesar una cantidad de muestra de 20,0 g para los piensos y de 1,0 a 20,0 g para las premezclas. Añadir 100 ml de mezcla (46.2.8), y agitar durante 30 minutos.

Centrifugar o decantar, diluir después la solución que flota en la superficie con ayuda de la mezcla (46.2.8) para obtener una concentración supuesta en espiramicina de 1 UI/ml (U_8).

Para los contenidos en espiramicina inferiores a 2,5 mg/kg de pienso, efectuar la extracción como sigue. Pesar una cantidad de muestra de 20,0 g. Añadir 100 ml de mezcla (46.2.8), agitar durante 30 minutos, centrifugar después durante unos minutos. Tomar 50 ml de la solución sobrenadante y evaporar hasta 4 ml aproximadamente bajo presión reducida en un rotavapor a una temperatura que no sobrepase los 40 °C. Diluir el resíduo con ayuda de la mezcla (46.2.8), para obtener una concentración supuesta en espiramicina 1 UI/ml (U_8).

Partiendo de la solución U_8, preparar por diluciones sucesivas (1 + 1), con ayuda de la mezcla (46.2.8), las soluciones cuyas concentraciones supuestas sean: U_4 (0,5 UI/ml) U_2 (0,25 UI/ml) y U_1 (0,125 UI/ml).

46.3.2. Inoculación del medio de cultivo. Sembrar a unos 50 °C aproximadamente el medio de base de la determinación (46.2.5) con la suspensión bacteriana (46.2.3). Mediante ensayos preliminares en placas con el medio (46.2.5), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permita obtener para las diferentes concentraciones de espiramicina, zonas de inhibición lo más extensas posibles y que estén todavía limpias.

46.3.3. Preparación de las placas. La difusión en agar se efectúa en unas placas con cuatro concentraciones de la solución patrón (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1). Cada placa debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones del patrón y del extracto. A tal efecto, hay que elegir las dimensiones de las placas de forma que se puedan efectuar en el agar por lo menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros se hallen a una distancia de por lo menos 30 mm. Como placas pueden utilizarse 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 placas una cantidad del medio (46.2.5), sembrado tal como se indica en (46.3.2), que permita obtener una capa de 2 mm de espesor (60 ml para una placa de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, efectuar las cavidades y depositar volúmenes exactamente medidos de soluciones del patrón y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según diámetro). Realizar por lo menos 4 repeticiones de cada concentración, de modo que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición. Incubar las placas de 16 a 18 horas a 30 °C $\pm$ 2 °C.

46.4. CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una precisión de 0,1 mm. Para cada concentración, registrar los valores medios en papel semilogarítmico, llevando los logaritmos de las concentraciones sobre los

diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución patrón y para el extracto procediendo, por ejemplo, como sigue:

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

$$(a) \quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Determinar el punto más apropiado del nivel más alto de la solución de patrón (SH) con ayuda de la fórmula:

$$(b) \quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Determinar de la misma manera los puntos más apropiados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más alto (UH) sustituyendo s_1, s_2, s_4 y s_8 en las fórmulas antes citadas por u_1, u_2, u_4 y u_8. Siendo las letras minúsculas "s" y "u" los diámetros de las zonas de inhibición.

Llevar los valores SL y SH a la misma gráfica. Uniendo los dos puntos se obtiene la recta más ajustada para la solución patrón. Procediendo del mismo modo para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

Si no hay interferencia, las rectas serán paralelas. En la práctica, se las considera paralelas cuando (SH-SL) y (UH-UL) no difieren en más de un 10% de su medio.

Si las rectas no son paralelas, se pueden eliminar ya sea u_1 y s_1 o u_8 y s_8. Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces con ayuda de las fórmulas siguientes:

$$(a')SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \text{ ó } \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b')SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \text{ ó } \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

y fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa obliga a que sean respetados los mismos criterios de paralelismo. La obtención de un resultado procedente de tres niveles debe mencionarse en el boletín de análisis.

Cuando las rectas se consideran paralelas, calcular el logaritmo de la actividad relativa (log. A) mediante una de las fórmulas que siguen, según el número de niveles (4 ó 3) utilizados para la evaluación del paralelismo.

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:

$$(d) \log. A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1} \text{ ó}$$

$$(d') \log. A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Actividad del extracto de la muestra = Actividad del patrón correspondiente x A

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Si la actividad relativa no se encuentra en la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0 repetir la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o, eventualmente, de las soluciones patrón. Cuando esta actividad no pueda trasladarse a la gama de los valores requeridos, el resultado deberá considerarse aproximado y esta indicación habrá de anotarse en el boletín de análisis.

Cuando las rectas se consideren no paralelas, repetir la determinación. Si el paralelismo no se alcanza nunca, la determinación deberá considerase insactisfactoria.

Expresar el resultado en mg de espiramicina base por kg de pienso.

Las diferencias de los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra por la misma persona no debe superar:

- 2 mg/kg, en valor absoluto, para contenidos de espiramicina base inferiores a 10 mg/kg.
- el 20% del resultado más alto para contenidos de 10 a 25 mg/kg.
- 5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg.
- el 10% del resultado más alto para los contenidos superiores a 50 mg/kg.

46.5. OBSERVACIONES

46.5.1. Pueden utilizarse otros métodos, siempre que esté demostrado que producen suspensiones bacterianas análogas.

46.5.2. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga que dé los mismos resultados.

46.6. REFERENCIAS

Directiva Comunitaria nº 10, 84/425, de 25 de julio 1984. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 238/34 de 6 de septiembre de 1984.

47. MONENSINA SODICA

(Método por difusión sobre agar)

47.1. PRINCIPIO

El método permite determinar monensina sódica en piensos y premezclas. El límite inferior de detección es de 10 mg/kg (1 mg de monensina sódica equivale a 1000 U, "UK").

La muestra se extrae con metanol al 90%. Al extracto se le aplica los tratamientos apropiados según el contenido de monensina sódica de la muestra. Su actividad antibiótica se determina por medida de la difusión de monensina sódica en medio de agar sembrado con Bacillus subtilis. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición de microorganismo. El diámetro de estas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración en antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas. La sensibilidad de este método se reduce en presencia de iones sodio.

47.2. MATERIAL Y APARATOS

47.2.1. Evaporador rotativo, con matraz de fondo redondo de 250 ml.

47.2.2. Columnas de vidrio para cromatografía, diámetro interior: 25 mm, longitud: 400 mm, con un diámetro de 2 mm en el extremo inferior.

47.2.3. Columna de vidrio para cromatografía, diámetro interior: 11 mm, longitud: 300 mm aproximadamente, con un diámetro de 2 mm en el extremo inferior.

47.3. REACTIVOS

47.3.1. Microorganismo: Bacillus subtilis ATCC 6633 (NCIB 8054).

47.3.2. Conservación de la cepa.-

Sembrar el medio de cultivo (47.3.4), en tubos inclinados y con Bacillus subtilis. Incubar durante una noche a 30 °C, conservar en frigorífico a 4 °C y renovar la siembra todos los meses.

47.3.3. Preparación de la suspensión de esporas (47.6.1). Recoger los gérmenes de un tubo de agar (47.3.2) de reciente preparación, con ayuda de 2 a 3 ml de agua estéril. Sembrar con esta suspensión 300 ml de medio de cultivo (47.3.4) en un frasco de Roux e incubar de 3 a 5 días a 30 °C. Después de controlar la esporulación al microscopio, recoger las esporas en 15 ml de etanol (47.3.6.) y homogeneizar. Esta suspensión puede conservarse 5 meses a 4 °C aproximadamente.

47.3.4. Medio de cultivo de mantenimiento de la cepa (47.6.2).

Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar (según calidad)	10,0 a 20,0 g
Agua	1000 ml

pH 6,5 (después de la esterilización)

47.3.5. Medio de cultivo base para la determinación.

Glucosa	10,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Hidrógenofosfato de potasio (K_2HPO_4)	0,69 g
Dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4)	0,45 g
Agar (según calidad)	10,0 a 20,0 g
Agua	1000 ml

pH 6,0 (después de la esterilización)

47.3.6. Etanol al 20% (v/v). Diluir 200 ml de etanol con 800 ml de agua.

47.3.7. Metanol anhidro.

47.3.8. Metanol al 90% (v/v). Diluir 900 ml de metanol (47.3.7) con 100 ml de agua.

47.3.9. Metanol al 50% (v/v). Diluir 500 ml de metanol (47.3.7) con 500 ml de agua.

47.3.10. Oxido de aluminio granulado (alcoa F,20 mesh: Activated Alumina UG_1:F. Lancester and Co., o equivalente).

47.3.11. Sustancia patrón: monensina sódica de actividad conocida (disponible en Internacional Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey Kt15 3 NB, Gran Bretaña).

47.3.12. Soluciones de patrón. Disolver una cantidad exactamente pesada de la sustancia patron (47.3.11) en metanol (47.3.7), diluir para obtener una solución madre de monensina sódica de 800 microgramos/ml. Conservar en frasco tapado a 4 °C, esta solución es estable durante dos semanas.

Preparar a partir de esta solución y por diluciones suscesivas con metanol al 50% (47.3.9), las siguientes soluciones:

S_8	8 microgramos/ml
S_4	4 microgramos/ml
S_2	2 microgramos/ml
S_1	1 microgramo/ml

47.4. PROCEDIMIENTO

47.4.1. Extracción. Premezclas.

Pesar 2,0 g de muestra, añadir 100 ml de metanol al 90% (47.3.8), homogeneizar y centrifugar a continuación durante algunos minutos. Diluir la solución sobrenadante con metanol al 50% (47.3.9) para obtener una concentración aproximada en monensina sódica de 8 microgramos/ml (U_8).

47.4.2. Extracción. Piensos en los que el contenido en monensina sódica no sea inferior a 50 mg/kg.

Pesar de 10,0 a 20,0 g de muestra, añadir 100 ml de metanol al 90% (47.3.8), homogeneizar durante 15 minutos y dejar reposar.

Introducir un tapón de algodón en el extremo inferior de la columna de vidrio (47.2.2), añadir el óxido de aluminio (47.3.10), dando ligeras sacudidas a la columna, hasta que el relleno tenga de 75 a 80 mm de altura.

Decantar el extracto en la columna de óxido de aluminio y recoger el filtrado. Diluir 30 ml del filtrado a 50 ml con agua.

Diluir enseguida con metanol al 50% (47.3.9) para obtener una concentración aproximada en monensina sódica de 8 microgramos/ml (U_8).

47.4.3. Extracción. Piensos en los que el contenido en monensina sódica es inferior a 50 mg/kg (hasta el límite de 10 mg/kg).

Pesar de 10,0 a 20,0 g de muestra, añadir 100 ml de metanol al 90% (47.3.8), homogeneizar durante 15 minutos. Centrifugar para obtener un extracto limpio.

Tomar 40 ml de líquido sobrenadante para una muestra cuyo contenido en monensina sódica sea de 20 mg/kg 80 ml para una muestra cuyo contenido sea de 10 mg/kg. Evaporar al vacío con rotavapor hasta sequedad (47.2.1) a una temperatura no superior a 40 °C. Disolver el resíduo con 10 ml de metanol al 90% (47.3.8).

Introducir un tapón de algodón en el extremo inferior de la columna de vidrio (47.2.3), añadir el óxido de aluminio (47.3.10), dando ligeras sacudidas a la columna, hasta que el relleno tenga de 75 a 80 mm de altura.

Decantar la solución metanólica del resíduo sobre la columna de óxido de aluminio y recoger el filtrado. Lavar la columna con 10 ml de metanol al 90% (47.3.8) y unir al filtrado anterior.

Evaporar la solución al vacío en rotavapor a sequedad (47.2.1) una temperatura inferior a 40 °C. Disolver el resíduo con 10 ml de metanol anhidro (47.3.7) y completar a 20 ml con agua.

Centrifugar a 4.000 rpm durante 5 minutos como mínimo. Diluir a continuación con metanol al 50% (47.3.9) para obtener una concentración aproximada en monensina sódica de 8 microgramos/ml (U_8).

47.4.4. Soluciones del extracto.

Preparar, a partir de la solución U_8 y por diluciones sucesivas (1 + 1) con metanol al 50% (47.3.9) las soluciones cuyas concentraciones supuestas sean U_4 (4 microgramos/ml), U_2 (2 microgramos/ml) y U_1 (1 microgramo/ml).

47.4.5. Modalidades de la determinación.

Sembrar a 50-60 °C el medio de cultivo base para la determinación (47.3.5) con la suspensión de las esporas (47.3.3). Mediante ensayos preliminares sobre placas con el medio (47.3.5), determinar la cantidad de inóculo que permite obtener las zonas de inhibición más amplias y que además sean nítidas para las diferentes concentraciones de monensina sódica.

47.4.6. Preparación de las placas.

La difusión sobre agar se efectúa en las placas con las cuatro concentraciones de la solución patrón (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1). Cada placa debe necesariamente recibir las cuatro concentraciones de patrón y de extracto. A tal efecto, es necesario escoger la dimensión de las placas para que se puedan practicar en el medio de agar por lo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten entre sí menos de 30 mm. Pueden utilizarse como placas, láminas planas de vidrio, coronadas por un anillo de aluminio o de plástico de 200 mm, de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las placas una cantidad del medio (47.3.5), sembrado como indica (47.4.5), de forma que se obtenga una capa de unos 2 mm de espesor (60 ml para una placa de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, abrir las cavidades y depositar volúmenes exactamente medidos de soluciones patrón y extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según diámetro).

Efectuar como mínimo cuatro repeticiones de cada concentración, de modo que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

47.4.7. Incubación.- Incubar las nueve placas durante 18 horas aproximadamente a 35 - 37 °C.

47.5. CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una precisión de 0,1 mm. Para cada concentración, anotar los valores medios en papel semilogarítmico representando el logaritmo de las concentraciones frente al diámetro de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución patrón y para el extracto procediendo, por ejemplo, como sigue:

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

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

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

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

Determinar igualmente los puntos más apropiados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más alto (UH) sustituyendo S_1, S_2, S_4 y S_8 por U_1, U_2, U_4 y U_8 en las fórmulas anteriores.

Inscribir los valores SL y SH sobre la misma gráfica. Uniendo los dos puntos se obtiene la recta más ajustada para la solución patrón. Procediendo de la misma forma para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

En ausencia de interferencias, las rectas deberían ser paralelas. En la práctica se las considera paralelas cuando (SH-SL) y (UH-UL) no difieren más del 10% de su media.

Si las rectas no son paralelas, puede eliminarse U_1 y S_1 ó U_8 y S_8. Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan mediante las siguientes fórmulas:

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

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

y con fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa impone que se respeten los mismos criterios de paralelismo. La obtención de un resultado procedente de tres niveles debe ser mencionada en el boletín de análisis.

Una vez consideradas las rectas paralelas, calcular el logaritmo de la actividad relativa (log. A) mediante una de las siguientes fórmulas:

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:

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

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

La actividad real = actividad supuesta x actividad relativa.

Si la actividad relativa es inferior a los valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, repetir la determinación efectuando los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o si es necesario, de las soluciones patrón. Si la actividad no puede llevarse entre los dos valores anteriores, el resultado debe considerarse aproximado y este debe de señalarse en el boletín de análisis.

Si las rectas se considera que no son paralelas, repetir la determinación. Si no se consigue el paralelismo, la determinación debe considerarse insatisfactoria.

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

- 20% del resultado más elevado para contenidos en monensina sódica entre 10 y 25 mg/kg.
- 5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos entre 25 y 50 mg/kg.
- 10% del resultado más elevado para contenidos superiores a 50 mg/kg.

47.6. OBSERVACIONES

47.6.1. Pueden utilizarse otros métodos en la medida que esté probado que producen suspensiones de esporas análogas.

47.6.2. Puede utilizarse todo medio de cultivo comercial de composición parecida y que dé los mismos resultados.

47.7. REFERENCIAS

Novena Directiva de la Comisión de 31 de julio de 1981. 81/715/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 257/9 del 10 de septiembre de 1981.

48. AVOPARCINA

(Por difusión sobre agar)

48.1. PRINCIPIO

El método permite la determinación de avoparcina en piensos y premezclas. El límite inferior de detección es de 2 mg/kg. Los antibióticos polieteres interfieren en la determinación.

La muestra se somete a una extracción con una mezcla de acetona/agua/ácido clorhídrico. La actividad antibiótica del extracto se determina midiendo la difusión de la avoparcina en un medio de agar, sembrado con Bacillus subtilis. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición de microorganismo. El diámetro de estas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración de antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

48.2. REACTIVOS

48.2.1. Microorganismo.

Bacillus subtilis ATCC 6633 (NCIB 8054).

48.2.2. Conservación de la cepa.

Sembrar el medio de cultivo (48.2.4), en tubos inclinados, con Bacillus subtilis. Incubar durante una noche a 30 °C, conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente y renovar la siembra todos los meses.

48.2.3. Preparación de la suspensión de esporas. (Ver 48.5.1). Recoger los gérmenes de un tubo de agar (48.2.2) de reciente preparación, con ayuda de 2 ó 3 ml de agua estéril. Sembrar con esta suspensión 300 ml del medio de cultivo (48.2.4) en un frasco de Roux e incubar de 3 a 5 días a 30 °C. Después de controlar la esporulación al microscopio, recoger las esporas con 15 ml de etanol (48.2.5.) y homogeneizar. Esta suspensión puede conservarse hasta cinco meses a 4 °C aproximadamente.

48.2.4. Medio de mantenimiento de la cepa (48.5.2.)

Peptona	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1000 ml

pH 6,5 (después de esterilizar)

48.2.5. Etanol al 20% (v/v). Diluír 200 ml de etanol con 800 ml de agua.

48.2.6. Acido Clohídrico, d = 1,18 - 1,19.

48.2.7. Solución de hidróxido de sodio 2 M.

48.2.8. Tampón fosfato 0,1 M. Pesar 13,6 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) y diluír hasta 1.000 ml con agua y ajustar a pH 4,5.

48.2.9. Mezcla acetona/agua/ácido clorhídrico (48.2.6): 65/32,5/2,5 (v/v/v).

48.2.10. Sustancia patrón. Sulfato de avoparcina de actividad conocida.

48.2.11. Solución patrón. Disolver 10 mg, exactamente pesados, de sustancia patrón (48.2.10) en tampón fosfato (48.2.8) y diluír con este tampón para obtener una solución patrón de avoparcina de 100 microgramos/ml. Conservar en frasco tapado a 4 °C como máximo 7 días.

48.2.12. Soluciones patrón para las premezclas. Preparar a partir de la solución (48.2.11) y por diluciones sucesivas con tampón fosfato (48.2.8) las siguientes soluciones:

S_8	4 microgramos/ml
S_4	2 microgramos/ml
S_2	1 microgramo/ml
S_1	0,5 microgramo/ml

48.2.13. Soluciones patrones para los piensos. Prepara a partir de la solución (42.2.11) y por diluciones sucesivas con tampón fosfato (48.2.8) las siguientes soluciones:

S_8	2 microgramos/ml
S_4	1 microgramo/ml
S_2	0,5 microgramo/ml
S_1	0,25 microgramo/ml

48.3. PROCEDIMIENTO

48.3.1. Preparación del extracto y de las soluciones. Premezclas.

Pesar, con precisión de 10 mg, una cantidad de muestra que contenga de 10 a 100 mg de avoparcina, transferir a matraz aforado de 100 ml, añadir 60 ml de mezcla (48.2.9) y agitar durante 15 minutos con agitador mecánico. Verificar el pH y ajustarlo a pH = 2, si es necesario, con ácido clohídrico (48.2.6). Completar al volumen con la mezcla (48.2.9) y homogeneizar. Filtrar una parte sobre papel Whatman nº 1 ó similar y eliminar los primeros 5 ml. Tomar una alícuota y ajustar el pH a 4,5 con solución de hidróxido de sodio (48.2.7). Diluir esta solución con tampón fosfato (48.2.8) para obtener una concentración presumible de 4 microgramos/ml (U_8) de avoparcina.

Preparar a partir de esta solución y por diluciones sucesivas (1 + 1) con tampón fosfato (48.2.8), las soluciones supuestas U_4 (2 microgramos/ml), U_2 (1 microgramo/ml) y U_1 (0,5 microgramo/ml).

48.3.2. Preparación del extracto y de las soluciones. Piensos.

Pesar una cantidad de muestra de 50 g, añadir 100 ml de mezcla (48.2.9) y agitar durante 30 minutos con agitador mecánico. Clarificar por centrifugación el extracto (en tubos tapados), tomar una alícuota del extracto limpio (ver tabla) y ajustar a pH 4,5 con solución de hidróxido de sodio (48.2.7). Diluir esta solución con tampón fosfato (48.4.8) para obtener la solución U_8 (ver tabla).

Preparar a partir de esta solución y por diluciones sucesivas (1 + 1) con tampón fosfato (48.2.8) las soluciones supuestas U_4 (1,0 microgramo/ml), U_2 (0,5 microgramo/ml) y U_1 (0,25 microgramo/ml).

TABLA

Contenido supuesto en avoparcina (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Peso de muestra en g (± 0,1 g)	50	50	50	50	50	50
Volumen de mezcla (ml) (48.2.9)	100	100	100	100	100	100
Volumen de extracto limpio (ml)	20	15	20	15	20	10
Volumen final (ml): U_8	25	25	50	50	100	100
Concentración supuesta U_8 en microgramos/ml	2	2 aprox	2	2 aprox	2	2

48.3.3. Determinación. Inoculación del medio de cultivo.

Sembrar a 50-60 °C el medio base de la determinación (48.2.4) con la suspensión de esporas (48.2.3). Mediante ensayos preliminares sobre placas con el medio (48.2.4), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener las zonas inhibición más amplias y que además sean nítidas, para las diferentes concentraciones de avoparcina.

48.3.4. Determinación. Preparación de las placas.

La difusión sobre agar se efectúa en placas con las cuatro concentraciones de la solución patrón (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1).

Cada placa debe necesariamente recibir las cuatro concentraciones de patrón y extracto. A tal efecto, escoger las dimensiones de las placas de forma que se puedan practicar en el medio agar por lo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten entre sí menos de 30 mm. Pueden utilizarse como placas, láminas planas de vidrio, coronadas de un anillo de aluminio o de materia plástica de 200 mm de diámetro y de 20 mm de altura.

Introducir en las placas una cantidad del medio (48.2.4), sembrado como indica en (48.3.3), que permita obtener una capa aproximadamente de 2 mm de espesor (60 ml para una placa de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, abrir las cavidades y depositar volúmenes exactamente medidos de soluciones patrón y extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según el diámetro). Efectuar *como mínimo 4 repeticiones* de cada concentración, de modo que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

48.3.5. Incubación.

Incubar las placas entre 16 y 18 horas a 30 °C

48.4. CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una precisión de 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias sobre papel semi-logarítmico, representando el logaritmo de las concentraciones frente a los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución patrón y para el extracto procediendo, por ejemplo, como sigue:

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

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

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

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

Determinar de igual forma los puntos más apropiados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más alto (UH) sustituyendo S_1, S_2, S_4 y S_8 en las fórmulas por U_1, U_2, U_4 y U_8.

Llevar los valores SL y SH sobre la misma gráfica. Uniendo los dos puntos se obtiene la recta más ajustada para la solución patrón. Procediendo del mismo modo para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

En ausencia de toda interferencia, las rectas deberían ser paralelas cuando (SH-SL) y (UH-UL) no difieren más del 10% de su media.

Si las rectas no son paralelas, se puede eliminar bien U_1 y S_1 o bien U_8 y S_8. Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan según:

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

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

y las fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa impone que se respeten los mismos criterios de paralelismo. La obtención de un resultado procedente de tres niveles debe ser mencionada en el boletín de análisis.

Cuando las rectas se consideran paralelas, calcular el logaritmo de la actividad relativa (log. A) como sigue:

Para cuatro 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 tres niveles:

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

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

La actividad real = actividad supuesta x actividad relativa. Si la actividad relativa se encuentra por debajo de los valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, repetir la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o, eventualmente, de las soluciones patrones. Si esta actividad no puede incluirse entre estos valores, el resultado debe considerarse aproximado y esto debe figurar en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideran paralelas, repetir la determinación. Si *no se consigue el paralelismo, la determinación debe considerarse* como insatisfactoria.

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

- 2 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de avoparcina de 2 a 10 mg/kg.
- 20% del resultado más alto para contenidos entre 10 y 25 mg/kg.
- 5 mg/kg en valor absoluto, para contenidos entre 25 y 50 mg/kg.
- 10% del resultado más alto para contenidos superiores a 50 mg/kg.

48.5. OBSERVACIONES

48.5.1. Pueden utilizarse otros métodos en la medida que estén comprobados que producen análogas suspensiones de esporas.

48.5.2. Puede utilizarse otro medio de cultivo comercial que tenga una composición análoga y dé los mismos resultados.

48.6. REFERENCIAS

Novena Directiva de la Comisión de 31 de julio de 1981. 81/715/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 257/38 de 10 de septiembre de 1.981.

49. ANTIBIOTICOS DEL GRUPO DE LAS TETRACICLINAS

49.1. DETECCION E IDENTIFICACION.

49.1.1. PRINCIPIO.

El método permite detectar e identificar los antibióticos del grupo de las tetraciclinas en los piensos que contengan al menos 0,1 mg/kg de ellas, en concentrados y en premezclas.

La muestra se somete a extracción mediante una mezcla de metanol y de ácido clorhídrico. El extracto se cromatografía sobre papel por vía ascendente comparativamente a sus soluciones de referencia. Los antibióticos se detectan e identifican en comparación con sus valores Rf con los de las sustancias patrón, sea por fluorescencia de luz UV (elevados contenidos en antibiótico), ya sea por medio de bioautografía sobre medio de agar sembrando con B. cereus.

49.1.2. REACTIVOS.

49.1.2.1. Tampón, pH 3,5

Acido cítrico monohidrato p.a.	10,256 g
Monohidrogenofosfato de sodio dihidrato ($Na_2HPO_4.2H_2O$) p.a.	7,45 g
Acetona p.a.	300 ml
Agua destilada hasta	1000 ml

49.1.2.2. Tampón fosfato, pH 5,5

Dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4) p.a.	130,86 g
Monohidrogenofosfato de sodio dihidrato ($Na_2HPO_4.2H_2O$) p.a.	6,947 g
Agua destilada hasta	1000 ml

49.1.2.3. Eluyente I: Mezcla nitrometano p.a./cloroformo p.a./alfa diclorhidrina: 20/10/1,5 en volumen. Preparar en el momento de su empleo.

49.1.2.4. Eluyente II: Mezcla nitrometrano p.a./cloroformo p.a./alfa picolinio (20/10/3 en volumen). Preparar en el momento de su empleo.

49.1.2.5. Mezcla metanol p.a./ácido clohídrico (d = 1,98/2 en volumen).

49.1.2.6. Acido clorhídrico 0,1N.

49.1.2.7. Amóniaco, d= 0,91

49.1.2.8. Sustancias patrón: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, cuya actividad se expresa en clorhidrato.

49.1.2.9. Microorganismo: B. Cereus ATCC nº 11.778.

Mantenimiento de la cepa, preparación de la suspensión de esporas e inoculación del medio de cultivo. Aplicar las disposiciones (49.2.2.1) y (49.2.2.2) del método de determinación de la clorotetraciclina, de la oxitetraciclina y de la tetraciclina, por difusión sobre agar, objeto de la parte (49.2).

49.1.2.10. Medio de cultivo. (ver 41.15.1)

Glucosa	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta	1000 ml

Ajustar el pH a 5,8 en el momento de su empleo

49.1.2.11. Solución al 0,1% (p/v) de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio y 5% (p/v) de glucosa.

49.1.3. MATERIAL.

49.1.3.1. Equipo para cromatografía ascendente sobre papel, (altura del papel 25 cm). Papeles Schleicher y Schüll 20040 b ó 20043 b o equivalente.

49.1.3.2. Centrífuga.

49.1.3.3. Estufa de incubación, regulada a 30 °C.

49.1.3.4. Lámpara UV para detección de la fluorescencia.

49.1.3.5. Placas de vidrio de 20 x 30 cm aproximadamente que permitan el montaje de una caja plana para la bioautobiografía.

49.1.4. PROCEDIMIENTO.

49.1.4.1. Soluciones de calibrado.

49.1.4.1.1. Soluciones patrón. Preparar a partir de las sustancias de calibrado (49.1.2.8) y con ayuda de ácido clorhídrico (49.1.2.6) unas soluciones cuya concentración corresponda respectivamente a 500 microgramos de clortetraciclina-HCl o de oxitetraciclina-HCl o de tetraciclina-HCl por ml.

49.1.4.1.2. Soluciones de referencia para la detección en luz UV. Diluír las soluciones (49.1.4.1.1) con tampón de fosfato (49.1.2.2.) para obtener unas soluciones cuya concentración corresponda a 100 microgramos de clortetraciclina-HCl o de oxitetraciclina-HCl o de tetraciclina-HCl por ml.

49.1.4.1.3. Soluciones de referencia para la detección por bioautografía. Diluir las soluciones (49.1.4.1.1) con tampón fosfato (49.1.2.2.) para obtener unas soluciones cuya concentración corresponda a 5 microgramos de clortetraciclina-HCl, o de oxitetraciclina-HCl o de tetraciclina-HCl por ml.

49.1.4.2. Extracción.

Cuando el contenido supuesto del antibiótico sea inferior a 10 mg/kg, se podrá emplear la muestra homogeneizada o la fracción más fina separada mediante tamizado, dado que los antibióticos se encontrarán preferentemente en dicha fracción.

Poner la muestra en suspensión en la mezcla (49.1.2.5) y centrifugar. Recoger el líquido sobrenadante para emplearlo tal como esté o diluirlo, si fuera necesario, por medio de la mezcla (49.1.2.5.) para obtener unas concentraciones de antibiótico de 100 microgramos/ml (49.1.4.2.1) y de 5 microgramos/ml (49.1.4.2.2) aproximadamente.

49.1.4.3. Detección e identificación.

49.1.4.3.1. Cromatografía. Sumergir el papel en la solución tampón, pH 3,5 (49.1.2.1). Eliminar el exceso de líquido comprimiendo el papel entre unas hojas de papel de filtro seco. Depositar a continuación sobre el papel unos volúmenes de 0,01 ml de las soluciones de referencia (49.1.4.1.2 y 49.1.4.1.3) y del extracto (49.1.4.2 y 48.1.4.2.2). Para obtener una buena separación, el contenido apropiado en humedad del papel es determinante; en su caso, dejar secar ligeramente.

Desarrollar por cromatografía ascendente. Emplear el eluyente I (49.1.2.3.) para la detección por bioautografía, el eluyente II (49.1.2.4.) para la detección en luz UV. Cuando el frente del disolvente alcance de 15 a 20 cm de alto (aproximadamente 1 h 30 minutos) interrumpir la cromatografía y secar el papel.

49.1.4.3.2. Detección de luz ultravioleta.- Cuando el contenido en antibiótico sea superior a 1 microgramo/cm^2, se pueden percibir manchas fluorescentes amarillas o por irradiación bajo la lámpara de UV (49.1.3.4) previo tratamiento del cromatograma mediante vapores amoniacales (49.1.2.7).

49.1.4.3.3. Detección por bioautografía.- Verter el medio de cultivo (49.1.2.10) previamente sembrado con B. cereus (49.1.2.9) sobre unas placas de vidrio (49.1.3.5) y colocar el papel sobre el medio de cultivo. Tras cinco minutos de contacto, apartar el papel y colocarlo sobre un lugar distinto del medio de cultivo donde se le mantendrá durante el período de incubación, incubar durante una noche en estufa a 30 °C. La presencia de un antibiótico del grupo de las tetraciclinas se marca por zonas de inhibición claras en el medio de cultivo turbio.

Para fijar el cromatograma, vaporizar la solución (49.1.2.11) sobre el papel, previa incubación.

49.1.4.3.4. Identificación.- Los valores RF relativos a los antibióticos del grupo de tetraciclinas se dan a continuación. Dichos valores podrán variar ligeramente según la calidad del papel y su contenido en humedad.

Clortetraciclina (CTC)	0,60
Tetraciclina (TC)	0,40
Oxitetraciclina (OTC)	0,20
4 - epi - CTC	0,15
4 - epi - TC	0,13
4 - epi - OTC	0,10

Los compuestos "epi" tienen una actividad antibiótica inferior a la de los compuestos normales.

49.1.5. OBSERVACIONES

49.1.5.1. Podrá ser empleado cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

49.2. CLORTETRACICLINA, OXITETRACICLINA Y TETRACICLINA

49.2.A. Por difusión sobre agar.

49.2.A.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la clortetraciclina, (CTC), la oxitetraciclina (OTC) y la tetraciclina (TC) en los piensos, concentrados y premezclas. El límite inferior de la determinación es de 5 mg/kg. Los contenidos inferiores a 5 mg/kg pueden estimarse por interpolación gráfica.

Para los contenidos iguales o inferiores a 50 mg/kg, la muestra se someterá a extracción por formanida diluída. Para los contenidos superiores a 50 mg/kg, se somete a extracción mediante una mezcla de acetona, de agua y de ácido clorhídrico para la determinación de la CTC, y por una mezcla de metanol y de ácido clorhídrico para la determinación de la OTC y de la TC.

Los extractos se diluiran a continuación y su actividad antibiótica se determinará por la medida de la difusión de la CTC o de la OTC o de la TC en medio a agar sembrado con B. cereus. La difusión se indica por la formación de zonas de inhibición en presencia del microorganismo. El diámetro de dichas zonas es directamente proporcional al logaritmo de la concentración de antibiótico.

49.2.A.2. REACTIVOS

49.2.A.2.1. Microorganismos: B. cereus ATCC nº 11.778.

49.2.A.2.1.1. Mantenimiento de la cepa.- Sembrar B. cereus en tubo de agar inclinado constituído por el medio de cultivo (49.2.A.3.1) exento de azul de metileno y de ácido bórico. Incubar durante una noche a 30 °C aproximadamente. Conservar el cultivo en refrigerador y resembrar cada 14 días sobre agar inclinado.

49.2.A.2.1.2. Preparación de la suspensión de esporas.- Recoger los gérmenes de un tubo de agar inclinado (49.2.A.2.1.1) con ayuda de 2 a 3 ml de suero fisiológico (49.2.A.2.2.5.). Sembrar con dicha suspensión un frasco de Roux que contenga 300 ml del medio de cultivo (49.2.A.2.2.1), exento de azul de metileno y de ácido bórico, cuya concentración en agar sea del 3 al 4%. Incubar 3 a 5 días a 28-30 °C, recoger a continuación las esporas en 15 ml de etanol (49.2.A.2.2.6), tras haber comprobado la esporulación bajo el microscopio, y homogeneizar. Dicha suspensión puede conservarse en refrigerador 5 meses al menos.

Por unos ensayos preliminares sobre placas con el medio de base de la determinación (49.2.A.2.2.1), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener para las diferentes concentraciones de antibiótico empleadas, unas zonas de inhibición tan extensas como sea posible, y que sean claras. Dicha cantidad es generalmente de 0,2 a 0,3 ml/1000 ml. La siembra del medio de cultivo se realiza entre 50 y 60 °C.

49.2.A.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

49.2.A.2.2.1. Medio de base de la determinación (ver 49.2.A.5.1).

Glucosa	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g
Agar, según calidad	10 a 20 g
Tween 80	1 ml
Tampón fosfato, pH 5,5 (49.2.A.2.2.2)	10 ml
Solución al 5% (p/v) de ácido bórico	15 ml
Solución etanólica al 0,5% de azul de metileno	4 ml
Agua destilada hasta	1000 ml

Ajustar a pH 5,8 antes de su empleo

49.2.A.2.2.2. Tampón fosfato pH 5,5.

Dihidrógeno-fosfato de potasio (KH_2PO_4) p.a.	130,86 g
Monohidrógeno-fosfato de sodio dihidrato ($Na_2HPO_4.2H_2O$) p.a.	6,947 g
Agua destilada hasta	1000 ml

49.2.A.2.2.3. Tampón fosfato, pH 5,5, diluído al 1/10.

49.2.A.2.2.4. Tampón fosfato, pH 8.

Dihidrógeno-fosfato de potasio (KH_2PO_4) p.a.	1,407 g
Monohidrógeno-fosfato de sodio dihidrato ($Na_2HPO_4.2H_2O$) p.a.	57,539 g
Agua destilada hasta	1000 ml

49.2.A.2.2.5. Suero fisiológico estéril.

49.2.A.2.2.6. Etanol a 20% (v/v)

49.2.A.2.2.7. Acido clorhídrico 0,1N

49.2.A.2.2.8. Formamida al 70% (v/v). Preparar en fresco antes del empleo y ajustar el pH 4,5 con ayuda de ácido sulfúrico 2 N aproximadamente.

49.2.A.2.2.9. Mezcla acetona p.a./agua/ácido clorhídrico, (d= 1,19) (65/33/2 en volumen).

49.2.A.2.2.10. Mezcla metanol p.a./ácido clohídrico, (d= 1,19) (98/2 v/v).

49.2.A.2.2.11. Sustancias patrones: CTC, OTC, TC cuya actividad se expresa en clorhidrato.

49.2.A.3. PROCEDIMIENTO

49.2.A.3.1. Soluciones patrones.

49.2.A.3.1.1. Clortetraciclina. Preparar a partir de la sustancia patrón (49.2.A.2.2.11) y con la ayuda de ácido clorhídrico (49.2.A.2.2.7), una solución patrón cuyá concentración corresponda a 500 microgramos/ml de clortetraciclina-HCl. Dicha solución se conserva una semana en refrigerador.

A partir de dicha solución patrón preparar una solución de calibrado de trabajo S_8 cuya concentración corresponda a 0,2 microgramos/ml de clortetraciclina-HCl. La dilución se hace con la ayuda del tampón fosfato, pH 5,5 diluído al 1/10 (49.2.A.2.2.3.), con adicción del 0,01% de negro amido (ver 49.2.A.5.2.).

Preparar a continuación por sucesivas diluciones (1+1) con ayuda del tampón (49.2.A.2.2.3.), las concentraciones siguientes:

S_4	0,1 microgramos/ml
S_2	0,05 microgramos/ml
S_1	0,025 microgramos/ml

49.2.A.3.1.2. Oxitetraciclina. Procediendo como se indica en (49.2.A.3.1.1.) preparar, a partir de una solución patrón cuya concentración corresponde a 400 microgramos/ml de oxitetraciclina-HCl, una solución patrón de trabajo S_8 de 1,6 microgramos/ml de oxitetraciclina-HCl y las concentraciones siguientes:

S_4	0,8 microgramos/ml
S_2	0,4 microgramos/ml
S_1	0,2 microgramos/ml

49.2.A.3.1.3. Tetraciclina. Procediendo tal como se indica en (49.2.A.3.1.1.), preparar, a partir de una solución patrón cuya concentración corresponda a 500 microgramos/ml de tetraciclina-HCl, una solución patrón de trabajo S_8 de 1,0 microgramos/ml de tetracilcina-HCl y las siguientes concentraciones:

S_4	0,5 microgramos/ml
S_2	0,25 microgramos/ml
S_1	0,125 microgramos/ml

49.2.A.3.2. Extracción.

49.2.A.3.2.1. Contenidos iguales o inferiores a 50 mg/kg . Tratar la muestra por la formamida (49.2.A.2.2.8.), según las indicaciones que se dan a continuación en el cuadro. Agitar durante 30 minutos en agitador. Diluír inmediatamente después con ayuda del tampón fosfato (49.2.A.2.3.), según las indicaciones dadas a continuación en el cuadro, para obtener la concentración U_8. La concentración de formamida en dicha solución no debe exceder del 40%. Centrifugar o dejar decantar de manera que se obtenga una solución límpida.

Preparar a continuación las concentraciones U_4, U_2 y U_1, por diluciones sucesivas (1+1) con ayuda del tampón fosfato (49.2.A.2.3.).

Antibiótico	CTC		DTC		TC	
Contenido supuesto en mg/kg	10	50	10	50	10	50
Muestra en g	10	10	24	9,6	20	10
ml de formamida (49.2.A.2.2.8.)	100	100	80	100	80	100
ml de tampón fosfato (49.2.A.2.2.3.)	dil 1/5 (a)	dil 1/25 (b)	70	200	120	dil 1/5 (a)
Concentración U_8 en microgramos/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) Tomar 20 ml de extracto y completar a 100 ml con el tampón en un matraz aforado.

(b) Tomar 4 ml de extracto y completar a 100 ml con el tampón en un matraz aforado.

49.2.A.3.2.2. Contenidos superiores a 50 mg/kg.

49.2.A.3.2.2.1. Clortetraciclina. Tratar, según el contenido supuesto de antibiótico de la muestra o su garantía de fabricación, una muestra de 1 a 10 gramos, por 20 veces su volumen con la mezcla (49.2.A.2.2.9.). Agitar durante 30 minutos con agitador.

Comprobar que el pH permanece por debajo de 3 a lo largo de la extracción; si fuera necesario ajustar a pH 3 (para los compuestos minerales, con ayuda de ácido acético al 10%). Tomar una parte alícuota del extracto y ajustar el pH a 5,5 con ayuda del tampón fosfato, pH 8 (49.2.A.2.2.4.), en presencia del verde de bromocresol (viraje del amarillo al azul). Diluir con ayuda del tampón fosfato, pH 5,5, diluído a 1/10 (49.2.A.2.2.3.) para obtener la concentración U_8 (49.2.A.3.2.1.).

Preparar seguidamente las concentraciones U_4, U_2 y U_1 por diluciones sucesivas (1+1) con ayuda del tampón fosfato (49.2.A.2.2.3.).

49.2.A.3.2.2.2. Oxitetraciclina y tetraciclina. Proceder como se indica en (49.2.A.3.2.2.2.) sustituyendo la mezcla (49.2.A.2.2.9.) por la mezcla (49.2.A.2.2.10.).

49.2.A.3.3. Modalidades de la determinación.

49.2.A.3.3.1. Siembra del medio de cultivo. Sembrar a 50-60 °C el medio de base para la determinación (49.2.A.2.2.1.) con la suspensión de esporas (49.2.A.2.1.2.).

49.2.A.3.3.2. Preparación de las cajas. La difusión sobre agar se efectúa en cajas, con las cuatro concentraciones patrón (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones de patrón y del extracto.

A tal fín, escoger las dimensiones de las cajas de tal forma que se pueda practicar en el medio gelosado al menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro. Calcular la cantidad de medio de cultivo inoculado (49.2.A.3.3.1.) que habrá de utilizarse de forma que se pueda obtener un recubrimiento uniforme de 2 mm aproximadamente de espesor. Es preferible emplear como cajas unas placas de vidrio planas provistas de un anillo de aluminio o de material plástico perfectamente plano, de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir mediante la pipeta en las cavidades unas cantidades de solución de antibiótico, exactamente medidas, comprendidas entre 0,10 y 0,15 ml, según el diámetro.

Para cada muestra hacer al menos cuatro repeticiones de difusión con cada concentración, de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

49.2.A.3.3.3. Incubación. Incubar las cajas durante 18 horas aproximadamente a 28-30 °C.

49.2.A.4. CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición, preferentemente por proyección. Registrar las medidas sobre papel semilogarítmico, representando el logaritmo de las concentraciones frente a los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas de la solución de calibrado y del extracto. A falta de interferencias, las dos rectas deberán ser paralelas.

El logaritmo de la actividad relativa se calcula por la siguiente fórmula:

$$\frac{U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Actividad real= actividad supuesta x actividad relativa.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder del 10% en valor relativo.

49.2.A.5. OBSERVACIONES

49.2.A.5.1. Podrá emplearse cualquier medio de cultivo comercial de análoga composición y que dé los mismos resultados.

49.2.A.5.2. El negro amido sirve para caracterizar las zonas de inhibición de las soluciones de calibrado (anillos azules).

49.2.B. Por turbidimetría.

49.2.B.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la clortetraciclina (CTC), la oxitetraciclina (OTC) y la tetraciclina (TC) en las concentraciones superiores a 1 g/kg, en la medida en que ninguna otra sustancia interfiera, dando lugar a unos extractos turbios. Dicho método es más rápido que el método por difusión sobre agar.

La muestra se somete a extracción por mezcla de acetona, agua y ácido clorhídrico para la determinación de la CTC, y por una mezcla de metanol y de ácido clorhídrico para la determinación de la OTC y de la TC.

Los extractos se diluyen a continuación y su efecto antibiótico se determina por la medida de la transmisión luminosa de un medio de cultivo sembrado con Staphylococcus aureus y con antibiótico añadido. La transmisión luminosa es función de la concentración del antibiótico.

49.2.B.2. REACTIVOS

49.2.B.2.1. Microorganismo: Staphylococcus aureus K 141. Ver (49.2.B.5.1.).

49.2.B.2.1.1. Mantenimiento de la cepa. Sembrar S. aureus sobre tubo de agar inclinado constituído por el *medio de cultivo* (49.2.B.2.2.1.), adicionado de 1,5 a 3% de agar (según la calidad). Incubar durante una noche a 37 °C. Conservar el cultivo en refrigerador y resembrar cada cuatro semanas sobre agar inclinado. Preparar simultáneamente unos subcultivos para el empleo de laboratorio.

49.2.B.2.1.2. Preparación del inócuo. 24 horas antes de su empleo, resembrar un subcultivo sobre agar inclinado e incubar durante una noche a 37 °C. Poner en suspensión la totalidad del cultivo de un tubo de agar en 2 ml aproximadamente del medio de base (49.2.B.2.2.1.) y trasvasar a continuación la suspensión en unas condiciones estériles en 100 ml aproximadamente del mismo medio de base (49.2.B.2.2.1.). Incubar en baño de agua a 37 °C hasta que el crecimiento de la cepa entre en su fase logarítmica (1 h 30 minutos a 2 h).

49.2.B.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

49.2.B.2.2.1. Medio de base de la determinación (Ver 49.2.B.5.2.).

Peptona	5 g
Extracto de levadura	1,5 g
Extracto de carne	1,5 g
Cloruro de sodio	3,5 g
Glucosa	1 g
Dihidrógeno-fosfato de potasio (KH_2PO_4)p.a.	1,32 g
Monohidrógeno-fosfato de potasio (K_2HPO_4)p.a.	3,68 g
Agua destilada hasta	1000 ml
pH tras esterilizar	6,8 a 7

49.2.B.2.2.2. Tampón fosfato pH 4,5.

Dihidrógeno-fosfato de potasio (KH_2PO_4)p.a.	13,6 g
Agua destilada hasta	1.000 ml

49.2.B.2.2.3. Acido clorhídrico 0,1N.

49.2.B.2.2.4. Mezcla acetona p.a./agua/ácido clorhídrico (d= 1,19) (65/33/2 en volumen).

49.2.B.2.2.5. Mezcla metanol p.a./ácido clorhídrico (d= 1,19) (98/2 *en volumen*).

49.2.B.2.2.6. Solución al 10% aproximadamente (p/v) de formaldehido.

49.2.B.2.2.7. Sustancias patrón: OTC, CTC, CT, cuya actividad se exprese en clorhídrato.

49.2.B.2.3. Solución patrón. Preparar, a partir de la sustancia patrón (49.2.B.2.2.7.) y con ayuda de ácido clorhídrico (49.2.B.2.2.3.) una solución patrón cuya concentración tenga 400 a 500 microgramos/ml de CTC-HCl, OTC-HCl o TC-HCl. Dicha solución se conserva una semana en refrigerador.

49.2.B.3. PROCEDIMIENTO

49.2.B.3.1. Extracción.

49.2.B.3.1.1. Clortetraciclina. Introducir en un matraz aforado de 200 ó 250 ml, una muestra de 1 a 2 gramos. Añadir 100 ml aproximadamente de la mezcla (49.2.B.2.2.4.) y agitar durante 30 minutos con agitador. Completar el volumen con el tampón fosfato, pH 4,5 (49.2.B.2.2.2.). Homogeneizar y dejar que se deposite.

49.2.B.3.1.2. Oxitetraciclina y tetraciclina. Introducir en un matraz aforado de 200 a 250 ml una *muestra de 1 a 2 gramos*. Añadir 100 ml aproximadamente de la mezcla (49.2.B.2.2.5.) y agitar durante 30 minutos con agitador. Completar el volumen por el tampón de fosfato, pH 4,5 (49.2.B.2.2.2). Homogeneizar y dejar que se deposite.

49.2.B.3.2. Modalidades de determinación.

49.2.B.3.2.1. Preparación de series patrón y del extracto. Diluír de forma apropiada con ayuda del tampón de fosfato, pH 4,5 (49.2.B.2.2.2.) la solución patrón (49.2.B.2.3.) y el extracto (49.2.B.3.1.), de forma que se obtengan una serie de concentraciones que permitan establecer, para cada determinación, una curva de calibrado, y la interpolación sobre dicha curva de al menos dos valores relativos al extracto. Las diluciones deben escogerse en función de las condiciones de crecimiento de la cepa, que pueden variar de un laboratorio a otro. Se procede generalmente de la siguiente forma:

49.2.B.3.2.1.1. Clortetraciclina. Diluír la solución patrón (49.2.B.2.3.) con ayuda del tampón fosfato (49.2.B.2.2.2.) para obtener una solución patrón cuya concentración corresponde a 0,2 microgramos/ml de CTC-HCl. Preparar a continuación con ayuda de un tampón de fosfato (49.2.B.2.2.2.), como se indica a continuación, y en unos tubos destinados a la determinación, 6 diluciones con una repetición de cada dilución.

ml de solución de patrón de trabajo	ml de tampón fosfato (49.2.B.2.2.2.)	Concentración en CTC-HCl (µg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Diluír el extracto (49.2.B.3.1.1.) con ayuda del tampón de fosfato (49.2.B.2.2.2.) para obtener una concentración supuesta en CTC-HCl de 0,12 microgramos/ml. Introducir 1 ml de dicha solución en dos tubos y 0,75 ml (= 0,09 *microgramos*) en otros dos tubos. Completar el volumen de los dos últimos tubos a 1 ml con el tampón de fosfato (49.2.B.2.2.2.).

49.2.B.3.2.1.2. Oxitetraciclina y tetraciclina. Diluír la solucin de calibrado (49.2.B.2.3.) con ayuda del tampón de fosfato (49.2.B.2.2.2.) para obtener una solución patrón de trabajo cuya concentración corresponda a 0,6 microgramos/ml de OTC-HCl o de TC-HCl. Preparar a continuación con ayuda del tampón fosfato (49.2.B.2.2.2.) como se indica a continuación y en los tubos destinados a la determinación, 7 diluciones con una repetición de cada dilución.

ml de solución patrón de trabajo	ml de tampón fosfato (49.2.B.2.2.2.)	Concentración en OTC-HCl o CT-HCl (microgramos/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Diluír el extracto (49.2.B.3.1.2.) con el tampón de fosfato (49.2.B.2.2.2.) para obtener una concentración supuesta en OTC-HCl o TC-HCl de 0,48 *microgramos/ml*. Introducir 1 ml de dicha solución en dos tubos y 0,5 ml (=0,24 micrograa-

mos) en otros dos tubos. Completar el volumen de los dos últimos tubos a 1 ml por el tampón de fosfato (49.2.B.2.2.2.).

49.2.B.3.2.2. Inoculación del medio de cultivo. Sembrar el medio de base de la determinación (49.B.2.2.1.) con el inóculo (49.2.B.2.1.2.) de forma que se pueda obtener mediante el fotómetro a 590 nm una transmisión luminosa del 85% en una cubeta de 5 cm o del 92% en una cubeta de 2 cm, estando el aparato regulado al 100% de transmisión sobre el medio de base (49.2.B.2.2.1.) no inoculado.

49.2.B.3.2.3. Siembra. Introducir en cada tubo (49.2.B.3.2.1.1.) ó (49.2.B.3.2.1.2.) 9 ml del medio de cultivo inoculado (49.2.B.3.2.2.). La operación de relleno de los tubos deberá hacerse de modo adecuado, pero no necesariamente en condiciones estériles.

49.2.B.3.2.4. Incubación. La incubación debe hacerse obligatoriamente en un baño de agua cuya temperatura se mantenga homogénea a 37 °C ± 0,1 °C por agitación. El tiempo de incubación debe ser escogido de forma que se puedan trazar unas curvas de transmisión cuya inclinación sea apropiada a unas medidas precisas (generalmente 2 h 30 minutos a 3 h). Bloquear a continuación el crecimiento introduciendo rápidamente 1 ml de solución de formaldehido (49.2.B.2.2.6.) en cada tubo.

49.2.B.3.2.5. Medida del crecimiento. Medir las transmisiones mediante el fotómetro a 590 nm, regulando el aparato al 100% de transmisión sobre la solución de calibrado más límpida (la que corresponda al contenido más elevado de antibiótico). Debido a las pequeñas diferencias de turbiedad presentadas por los distintos tubos, se recomienda utilizar cubetas de 2 cm al menos, y preferiblemente de 5 cm.

49.2.B.4.- CALCULOS

Trazar gráficamente la curva de calibrado sobre papel milimetrado, poniendo las transmisiones fotométricas en relación con las concentraciones de antibiótico. Interpolar sobre la curva las transmisiones relativas al extracto. Calcular el contenido en antibiótico de la muestra.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder del 10%, en valor relativo.

49.2.B.5.- OBSERVACIONES

49.2.B.5.1. Esta cepa, aislada por la LUFA en Kiel, acusa un crecimiento más rápido que el S. aureus ATCC 6538 P.

49.2.B.5.2. Puede emplearse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

49.2.B.6. REFERENCIAS

Tercera DIrectiva de la Comisión de 27 de abril de 1972. 72/199/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L, 123/6, de 29 de mayo de 1972.

50.- OLEANDOMICINA (por difusión sobre agar)

50.1. PRINCIPIO

El método permite determinar la oleandomicina en los piensos, concentrados y premezclas, incluso en presencia de tetraciclinas. El límite inferior de la determinación es 0,5 mg/kg.

La muestra se somete a extracción por una solución metanólica diluída de tris (hidroximetil) aminometano. Previa centrifugación, el extracto se diluye y su actividad antibiótica se determina por la medida de la difusión de la oleandomicina en un medio de agar sembrado de B.cereus. La difusión estará indicada por la formación de zonas de inhibición en presencia del microorganismo. El diámetro de dichas zonas es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico.

50.2. REACTIVOS

50.2.1. Microorganismo: B. cereus K 205 TR (Ver 50.5.1.) (resistente a las tetraciclinas).

50.2.1.1. Mantenimiento de la cepa.

Sembrar B. cereus sobre agar en tubo inclinado con el medio de cultivo (50.3.2.2.1.) con la adición de 100 microgramos de oxitetraciclina por 5 ml. Incubar durante una noche a 30 °C aproximadamente. Conservar el cultivo en el refrigerador y resembrar cada 4 semanas sobre agar inclinado.

50.2.1.2. Preparación de la suspensión de esporas.

Recoger los gérmenes de un tubo de agar inclinado (50.2.1.1.) con ayuda de 3 ml aproximadamente de suero fisiológico (50.2.2.3.). Sembrar con dicha suspensión un frasco de Roux que contenga 300 ml del medio de cultivo (50.2.2.1.) cuya concentración de agar es del 3 al 4%. Incubar 3 a 5 días a 28 - 30 °C, recoger a continuación las esporas en 15 ml de etanol (50.2.2.4.), después de haber comprobado la esporulación bajo el microscopio, y homogeneizar. Dicha suspensión puede conservarse en el refrigerador al menos durante 5 meses.

Mediante ensayos previos sobre placas con el medio de base para la determinación (50.2.2.2.) determinar la cantidad de inóculo que permita obtener para las distintas concentraciones de oleandomicina empleadas, unas zonas de inhibición tan extensas como sea posible y que sean claras. Dicha cantidad es generalmente de 0,1 a 0,2 ml/1000 ml. La siembra del medio de cultivo se hará a 60 °C.

50.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

50.2.2.1. Medio de mantenimiento de la cepa (Ver 50.5.2.).

Glucosa	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g
Agar, según la calidad	10 a 20 g
Agua destilada hasta	1000 ml

Ajustar el pH a 6,5 en el momento de su empleo.

50.2.2.2. Medio de base de la determinación (Ver 50.5.2.). Medio (50.2.2.1.) ajustado a pH 8,8.

50.2.2.3. Suero fisiológico estéril.

50.2.2.4. Etanol al 20% (v/v).

50.2.2.5. Metanol p.a.

50.2.2.6. Solución al 0,5% (p/v) de tris (hidroximetil) amino metano p.a.

50.2.2.7. Solución de extracción.

Metanol puro	50 ml
Agua destilada	50 ml
Tris(hidroximetil) amino metano p.a.	0,5 g

50.2.2.8. Sustancia patrón: oleandomicina de actividad conocida.

50.3.- PROCEDIMIENTO

50.3.1. Solución patrón.

Disolver sustancia patrón (50.2.2.8.) en 5 ml de metanol (50.2.2.5.) y diluír con la solución (50.2.2.6.) para obtener una concentración en oleandomicina de 100 microgramos/ml.

A partir de dicha solución patrón, preparar diluyendo mediante la solución (50.2.2.6.) una solución patrón de trabajo S_8 que contenga 0,1 microgramos/ml de oleandomicina.

Preparar a continuación por diluciones sucesivas (1+1) con ayuda de la solución (50.2.2.6.) las siguientes concentraciones:

S_4	0,05 microgramos/ml
S_2	0,025 microgramos/ml
S_1	0,0125 microgramos/ml

50.3.2. Extracción.

Tomar según el contenido supuesto de oleandomicina de la muestra, una cantidad de 2 a 10 gramos, añadir 100 ml de la solución (50.2.2.7.) y agitar durante 30 minutos con agitador.

Centrifugar, tomar una alícuota del extracto y diluír mediante la solución (50.2.2.6.) para obtener una concentración supuesta en oleandomicina de 0,1 microgramos/ml (U_8). Preparar a continuación las concentraciones U_4, U_2 y U_1 por diluciones sucesivas (1+1) con ayuda de la solución (50.2.2.6.).

50.3.3. Modalidades de la determinación.

50.3.3.1. Siembra del medio de cultivo.

Sembrar a 60 °C el medio de base de la determinación (50.2.2.2.) con la suspensión de esporas (50.2.1.2.).

50.3.3.2. Preparación de las cajas.

La difusión sobre agar se verifica en unas cajas con las cuatro concentraciones de la solución de calibrado (S_8, S_4, S_2 y S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2 y U_1). Cada caja deberá recibir necesariamente las cuatro concentraciones de calibrado y del extracto.

A tal fin, escoger las dimensiones de las cajas de tal forma que se puedan efectuar en el medio gelosado al menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro. Calcular la cantidad de medio de cultivo sembrado (50.3.3.1.) que debe emplearse para obtener un recubrimiento uniforme de 2 mm aproximadamente de espesor. Es preferible emplear como cajas unas placas de vidrio planas provistas de un anillo de aluminio o de material plástico perfectamente plano de 200 mm de diámetro y de 20 mm de altura.

Introducir con la pipeta en las cavidades unas cantidades exactamente medidas de solución antibiótica comprendidas entre 0,10 y 0,15 ml según el diámetro.

Para cada muestra, hacer por lo menos cuatro repeticiones de difusión con cada concentración, de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

50.3.3.3. Incubación.

Incubar las cajas durante 18 horas aproximadamente a 28 - 30 °C.

50.4.- CALCULOS

Medir el diámetro de las zonas de inhibición, preferentemente por proyección. Registrar las medidas sobre papel semilogarítmico, representando el logaritmo de las concentraciones frente a los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas de la solución de calibrado y del extracto. A falta de interferencias, las dos rectas deben de ser paralelas.

El logaritmo de la actividad relativa se calculará por medio de la siguiente fórmula:

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

Actividad real = actividad supuesta x actividad relativa.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder del 10% en valor relativo.

50.5.- OBSERVACIONES

50.5.1. Cepa aislada por la LUFA en kiel.

50.5.2. Puede ser empleado cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

50.6.- REFERENCIAS

Tercera Directiva de la Comisión de 27 de abril de 1972. 72/199/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 123/6, de 29 de mayo de 1972. Anexo II.

51.- AMPROLIO

51.1.- PRINCIPIO

El método permite determinar el amprolio en los piensos, concentrados y premezclas. El límite inferior de la detección es de 40 mg/kg.

La muestra se somete a extracción mediante metanol diluído. El extracto se purifica sobre columna de óxido de aluminio y se trata mediante una solución metanólica de 2,7-dihidroxinaftaleno, hexaciano ferrato (III) de potasio, cianuro de potasio e hidróxido de sodio. Se desarrolla una coloración púrpura. El amprolio se determina por espectrofotometría a 530 nm.

51.2.- MATERIAL Y APARATOS

51.2.1. Erlenmeyer de 50, 250 y 500 ml de tapón de rosca.

51.2.2. Agitador.

51.2.3. Crisol filtrante, porosidad G 3, diámetro: 60 mm.

51.2.4. Columna de vidrio para cromatografía (diámetro interior: 9 mm, longitud: 400 a 500 mm).

51.2.5. Centrífuga, con tubos de 25 ml de tapón de rosca.

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

51.3.- REACTIVOS

51.3.1. Metanol p.a.

51.3.2. Metanol diluído. Mezclar 2 volúmenes de metanol (51.3.1.) y un volúmen de agua.

51.3.3. Solución al 0,2% (p/v) de hexacianoferrato (III) de potasio (K_3 $Fe(CN)_6$) p.a. Dicha solución se mantiene estable durante dos semanas.

51.3.4. Solución al 1% (p/v) de cianuro de potasio p.a. Dicha solución se mantiene estable durante dos semanas.

51.3.5. Solución al 1,125% (p/v) de hidróxido de sodio p.a.

51.3.6. Solución metanólica de hidróxido de sodio. Tomar 15 ml de la solución (51.3.5.) y completar a 200 ml mediante metanol (51.3.1.).

51.3.7. Solución al 0,0025% (p/v) de 2,7-dihidroxinaftaleno. Disolver 25 mg de 2,7-dihidroxinaftaleno p.a. en metanol (51.3.1.) y completar a 1.000 ml mediante metanol (51.3.1.).

51.3.8. Reactivo de coloración. Introducir 90 ml de solución de 2,7-dihidroxinaftaleno (51.3.7.) en un erlenmeyer de 250 ml (51.2.1.), añadir 5 ml de solución de hexanocianoferrato (III) de potasio (51.3.3.) y homogeneizar. Añadir a continuación 5 ml de solución de cianuro de potasio (51.3.4.), tapar y homogeneizar. Dejar reposar durante 30 a 35 minutos, añadir 100 ml de solución metanólica de hidróxido de sodio (51.3.6.), homogeneizar y filtrar sobre un crisol filtrante (51.2.3.). Utilizar dicho reactivo en los 75 minutos que siguen a la filtración.

51.3.9. Oxido de aluminio para cromatografía de 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 (51.3.1.) cada vez, secar por aspiración, dejar reposar una noche y secar durante 2 h a 100 °C en una estufa de vacío. Dejar enfriar en desecador. Controlar la actividad analizando, a partir del punto (51.4.2.), una cantidad determinada de solución patrón (51.3.11.). El índice de recuparación del amprolio debe ser del 100% ± 4%.

51.3.10. Sustancia patrón. Amprolio puro que responda a las características definidas a continuación.

- Punto de fusión (descomposición): 248 °C.
- Coeficiente de extinción molecular a 265 y 235 nm en el agua destilada: $11{,}0 \times 10^3$.

51.3.11. Solución patrón. Pesar, con precisión de 0,1 mg, 50 mg de sustancia patrón (51.3.10). Disolver con metanol diluído (51.3.2.) en un matraz aforado de 500 ml, completar a volumen por el mismo disolvente y homogeneizar. Tomar 10,0 ml completar a 50 ml mediante metanol diluído (51.3.2.) en un matraz aforado y homogeneizar 1 ml de dicha solución contiene 20 microgramos de amprolio.

51.4.- PROCEDIMIENTO

51.4.1. Extracción y purificación.

51.4.1.1. Piensos y premezclas.

Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de muestra finamente dividida y homogeneizada. Para las premezclas, pesar de 3 a 6 g, con precisión de 1 mg. Introducir la muestra en un erlenmeyer de 250 ml (51.2.1.) y añadir 100 ml exactamente de metanol diluído (51.3.2.). Agitar durante 60 minutos y filtrar. Diluír, si fuera necesario mediante metanol diluído (51.3.2.) para obtener una solución que contenga de 5 a 15 microgramos de amprolio por ml. Introducir en una columna para cromatografía (51.2.4.) previamente provista en su extremidad inferior de un tapón de algodón, 5 g de óxido de aluminio (51.3.9.) y a continuación 25,0 ml del extracto. Dejar pasar el líquido, eliminar los 5 primeros ml y recoger los 12 ml siguientes en una probeta graduada.

51.4.1.2. Concentrados.

Pesar, con precisión de 1 mg, 0,5 g de muestra finamente dividida y homogeneizada, introducirlos en un erlenmeyer de 500 ml (51.2.1.). añadir 250 ml de metanol diluído (51.3.2.), agitar durante 60 minutos y filtrar. Tomar 5,0 ml del filtrado y completar a 200 ml mediante metanol diluído (51.3.2.) en un matraz aforado.

51.4.2. Desarrollo de la coloración y medida de la absorbancia.

Tomar 5,0 ml de la solución obtenida en (51.4.1.1.) ó (51.4.1.2.) en introducirlos en un tubo de centrífuga A (51.2.5.). Introducir 5,0 ml de metanol diluído (51.3.2.) en un tubo de centrífuge B (51.2.5.). Añadir en cada tubo 10,0 ml del reactivo de coloración (51.3.8.), tapar los tubos, homogeneizar y dejar reposar durante 18 minutos. Centrifugar a continuación durante 3 minutos para obtener soluciones límpidas y decantar las soluciones A y B en los erlenmeyer de 50 ml (51.2.1.).

Medir inmediatamente en el espectrofotómetro a 530 nm la absorbancia de la solución A, utilizando como blanco la solución B. Determinar la cantidad de amprolio refiriéndose a la curva de calibrado (51.4.3.).

51.4.3. Curva de calibrado.

Introducir en los tubos de centrífuga (51.2.5.) volúmenes respectivos de 1,0 - 2,0 - 3,0 - 4,0 y 5,0 ml de solución patrón (51.3.11.). Completar el volumen de los cuatro primeros tubos hasta 5,0 ml con metanol diluído (51.3.2.). Añadir en los cinco tubos 10,0 ml de reactivo de coloración (51.3.8.), tapar los tubos, homogeneizar y dejar reposar durante 18 minutos. Centrifugar a continuación durante 3 minutos y decantar las soluciones en erlenmeyer de 50 ml (51.2.1).

Medir inmediatamente en el espectrofotómetro a 530 nm la absorbancia de las soluciones, utilizando como blanco una mezcla de 5 ml de metanol diluído (51.3.2.) y 10 ml del reactivo de coloración (51.3.8.). Trazar la curva de calibrado llevando a la ordenada los valores de las absorbancias y a la abscisa las cantidades correspondientes de amprolio en mg.

51.5.- CALCULOS

51.5.1. Piensos y premezclas.

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

$$\frac{A}{P} \times F \times 20.000$$

Siendo:

A = Cantidad, en mg, de amprolio determinada mediante la medición espectrofotométrica.

P = Peso, en g, de la muestra.

F = Coeficiente de dilución (efectuado si se diera el caso en 51.4.1.1.).

51.5.2. Concentrados.

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

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

Siendo:

A = Cantidad, en mg, de amprolio determinada por la medición espectrofotométrica.

P = Peso, en g, de la toma de muestras.

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

- 10 mg/kg en valor absoluto, para los contenidos en amprolio inferiores a 100 mg/kg.
- 10%, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre 100 y 5.000 mg/kg.
- 500 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5.000 y 10.000 mg/kg.
- 5%, en valor relativo, para los contenidos superiores a 10.000 mg/kg.

51.6.- REFERENCIAS

Quinta Directiva de la Comisión de 25 de marzo de 1974. (74/203/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 108/7 de 22 de abril de 1974.

52.- ETOPABATO
(Metil-4-acetamido-2-etoxibenzoato)

52.1.- PRINCIPIO

El método permite determinar el etopabato en los piensos, concentrados y premezclas. El límite inferior de detección es de 2 mg/kg.

La muestra se somete a extracción por metanol diluído. La solución se acidifica y se extrae con 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 diluído. El derivado aminado así formado se diazota y se copula con la N-(1-naftil) etilendiamina. El complejo coloreado se extrae mediante el butanol y la abosrbancia de la solución se mide a 555 nm.

52.2.- MATERIAL Y APARATOS

52.2.1. Erelenmeyer de 250 ml, con tapón de rosca.

52.2.2. Embudos de decantación de 100 ml, con tapón esmerilado.

52.2.3. Agitador.

52.2.4. Evaporador rotativo a vacío con matraces de 250 ml.

52.2.5. Baño de agua.

52.2.6. Centrífuga, con tubos de 15 y 50 ml, de esmerilado normalizado.

52.2.7. Refrigerante de aire, con boca esmerilada.

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

52.3..- REACTIVOS

52.3.1. Metanol p.a.

52.3.2. Metanol al 50% (v/v). Mezclar volúmenes iguales de metanol (52.3.1.) y de agua.

52.3.3. Acido clorhídrico p.a., (d= 1,19).

52.3.4. Acido clorhídrico diluído a 1/10. Tomar 10,0 ml de ácido clorhídrico (52.3.3.), completar a 100 ml con agua.

52.3.5. Acido clorhídrico 0,3N aproximadamente. Tomar 25,0 ml de ácido clorhídrico (52.3.3.), completar a 1000 ml con agua.

52.3.6. Cloroformo p.a.

52.3.7. Solución al 4% (p/v) de carbonato de sodio. Disolver 40 g de carbonato de sodio anhidro p.a. en agua y completar a 1000 ml con agua.

52.3.8. Solución al 0,2% (p/v) de nitrito de sodio.

Disolver en agua 100 mg de nitrito de sodio p.a. y completar a 50 ml con agua en un matraz aforado. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

52.3.9. Solución al 1,0% (p/v) de sulfamato de amonio.

Disolver en agua 500 mg de sulfamato de amonio p.a. y completar a 50 ml con agua en un matraz aforado. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

52.3.10. Solución al 0,2% (p/v) de N-(1-naftil)etilendiamina.

Disolver en agua 100 mg de N-(1-naftil)etilendiamina p.a. y completar a 50 ml con agua en un matraz aforado. Preparar inmediatamente antes de su empleo.

52.3.11. Cloruro de sodio anhidro, p.a.

52.3.12. N-butanol p.a.

52.3.13. Sustancia patrón. Etopabato puro.

52.3.14. Solución patrón.

52.3.14.1. Solución de 0,040 mg de etopabato por ml.

Pesar con precisión de 0,1 mg, 40 g de sustancia patrón (52.3.13.). Disolver con metanol diluído (52.3.2.) en matraz aforado de 100 ml. Completar a volumen mediante el mismo disolvente y homogeneizar. Tomar 10,0 ml, completar a 100 ml con metanol (52.3.2.) en un matraz aforado y homogeneizar. Dicha solución se mantiene estable durante un mes.

52.3.14.2. Solución de 0,016 mg de etopabato en 20 ml.

Tomar 5,0 ml de la solución (52.3.14.1.) completar a 250 ml con metanol diluído (52.3.2.) en un matraz aforado y homogeneizar. Preparar antes de su empleo.

52.4.- PROCEDIMIENTO

52.4.1. Extracción.

Pesar, con precisión de 1 mg, una cantidad de muestra finamente dividida y homogeneizada que contenga 80 microgramos aproximadamente de etopabato. Introducir la muestra en un erlenmeyer de 250 ml (52.2.1.) y añadir 100,0 ml de metanol diluído (52.3.2.). Mezclar, cerrar el erlenmeyer y agitar durante 1 hora mediante el agitador (52.3.4.). Dejar decantar, filtrar y eliminar los primeros ml del filtrado.

52.4.2. Purificación.

Todas las operaciones descritas en este punto deben efectuarse rápidamente.

Introducir 20,0 ml del extracto límpido en un embudo de decantación de 100 ml (52.2.2.), añadir 5,0 ml de ácido clorhídrico diluído al 1/10 (52.3.4.) y 20,0 ml de cloroformo (52.3.6.). Agitar primero con pruedencia y después vigorosamente durante 3 minutos. Dejar reposar hasta la separación de las fases y recoger la fase clorofórmica en un segundo embudo de decantación de 100 ml (52.2.2).

Extraer la fase ácida dos veces sucesivas mediante 20,0 ml de cloroformo (52.3.6.) cada vez. Reunir los extractos clorofórmicos en el segundo embudo de decantación y eliminar la fase ácida. Añadir a la solución clorofórmica 10 ml de solución de carbonato de sodio (52.3.7.), agitar durante 3 minutos y dejar reposar hasta la separación de las fases. Recoger la fase clorofórmica en un tercer embudo de decantación de 100 ml (52.2.2.) y eliminar la fase acuosa. Añadir a la solución clorofórmica 10 ml de solución de carbonato de sodio (52.3.7.), agitar durante 3 minutos y dejar reposar hasta la separación de las fases.

Recoger la fase clorofórmica en un cuarto embudo de decantación de 100 ml (52.2.2.), 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 (52.2.4.). Reunir las fases acuosas, lavar los embudos de decantación vacíos mediante algunos ml de cloroformo (52.3.6.) lavar a continuación la fase acuosa mediante dicho cloroformo. Separar la fase clorofórmica y añadirla al extracto recogido en un matraz.

52.4.3. Hidrólisis.

Evaporar el Extracto clorofórmico hasta 2 ml aproximadamente sobre un baño de agua a 50 °C en el evaporador rotativo al vacío (52.2.4.). Disolver el residuo con 2 ó 3 ml de metanol (52.3.1.). Trasvasar cuantitativamente la solución a un tubo de centrífuga de 50 ml (52.2.6.) con dos porciones de 10 ml y una porción de 5 ml de ácido clorhídrico 0,3N (52.3.5.). Añadir algunos fragmentos de piedra pómez, homogeneizar y acoplar al tubo un refrigerante de aire (52.2.7.). Sumergir el tubo en un baño de agua hirviendo y mantenerlo durante 45 minutos. Dejar enfriar a continuación bajo una corriente de agua fria.

52.4.4. Desarrollo de la coloración y medida de la absorbancia.

Añadir 1,0 ml de solución de nitrito de sodio (52.3.8.), agitar y dejar reposar 2 minutos. Añadir 1,0 ml de solución de sulfamato de amonio (52.3.9.), agitar y dejar reposar 2 minutos. Añadir 1,0 ml de solución de N-(1-naftil) etilendiamina (52.3.10.), agitar y dejar reposar 10 minutos. Añadir 5,0 g de cloruro de sodio (52.3.11.) y 10,0 ml de n-butanol (52.3.12.), agitar vigorosamente hasta la disolución completa del cloruro de sodio.

Trasvasar la capa butanólica sobrenadante con ayuda de una pipeta, a un tubo de centrifuga de 15 ml (52.2.6.) y centrifugar. Medir a continuación la absorbancia A_A en espectofotómetro a 555 nm por comparación con el n-butanol (52.3.12.).

52.4.5. Prueba en blanco.

Efectuar una prueba en blanco aplicando el mismo método operatorio, a partir del punto 52.4.2. con 20,0 ml de metanol diluído (52.3.2.). Medir la absorbancia A_B a 555 nm por comparación con el n-butanol (52.3.12.).

52.4.6. Prueba patrón.

Efectuar una prueba aplicando el mismo método operatorio, a partir del punto 52.4.2., con 20,0 ml de solución patrón (52.3.14.2.). Medir la absorbancia A_C a 555 nm por comparación con el n-butanol (52.3.12.).

52.5.- CALCULOS

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

$$\frac{A_A - A_B}{A_C - A_B} \times \frac{80}{P}$$

Siendo:

A_A = Absorbancia de la solución procedente de la muestra.

A_B = Absorbancia de la solución resultante de la prueba en blanco.

A_C = Absorbancia de la solución resultante de la prueba patrón.

P = Peso en gramos de la muestra.

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 mg/kg.
- del 1,5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 7,5 y 10 mg/kg.
- del 15%, en valor relativo, para los contenidos superiores a 10 mg/kg.

52.6.- REFERENCIAS

Quinta Directiva de la Comisión de 25 de marzo de 1974. (74/203/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 108/7 de 22 de abril de 1974.

53.- DINITOLMIDA (DOT ó ZOALENE) (3,5-dinitro- o -toluamida)

53.1.- PRINCIPIO

El método permite determinar la dinitolmida (DOT) en los piensos, concentrados y premezclas. Los derivados del nitrofurano interfieren. El límite inferior de detección es de 40 mg/kg.

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

53.2.- MATERIAL Y APARATOS

53.2.1. Erlenmeyer de 250 ml, de esmerilado normalizado.

53.2.2. Refrigerante de reflujo, de esmerilado normalizado.

53.2.3. Crisol filtrante, porosidad G 3, diámetro 60 mm.

53.2.4. Aparato de filtración a vacío (por ejemplo aparato de Witt).

53.2.5. Baño de agua, regulado a 50 °C.

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

53.3.- REACTIVOS

53.3.1. 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 que destila entre 75 y 77 °C.

53.3.2. Oxido de aluminio para cromatografía en columna. Calcinar durante 2 horas al menos a 750 °C, enfriar en desecador y conservar en frasco de vidrio topacio de tapón esmerilado. Antes de su utilización, humedecer tal como se indica: introducir en un frasco de vidrio topacio 10 g de óxido de aluminio y 0,7 ml de agua, tapar herméticamente y calentar durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, agitando durante todo el tiempo con energía. Dejar enfriar agitándolo. Controlar la actividad sometiendo al análisis, a partir del punto (53.4.1.), una cantidad determinada de solución patrón (53.3.6.). La recuperación de la dinitolmida debe ser del 100% ± 2%.

53.3.3. N,N-dimetilformamida al 95% (v/v): mezclar 95,0 ml de N,N-dimetilformamida p.a. y 5,0 ml de agua.

53.3.4. Etilendiamina p.a., contenido máximo en agua 2,0%.

53.3.5. Sustancia 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 acetonitrilo: $13,1 \times 10^3$.

Coeficiente de extinción molecular a 266 nm en N,N-dimetilformamida: $10,1 \times 10^3$.

53.3.6. Solución patrón. Pesar, con precisión de 0,1 mg, 40 mg de sustancia patrón (53.3.5.). Disolver con acetonitrilo (53.3.1.) en un matraz aforado de 200 ml. Completar a volumen con el mismo disolvente y homogeneizar. Tomar 20,0 ml, completar a 100 ml con acetonitrilo (53.3.1.) en un matraz aforado y homogeneizar. 1 ml de dicha solución contiene 40 microgramos de dinitolmida.

53.4.- PROCEDIMIENTO

53.4.1. Extracción y purificación.

Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de muestra finamente dividida y homogeneizada. Para los concentrados y premezclas, pesar con precisión de 1 mg, 1 g. Introducir la muestra en un erlenmeyer de 250 ml (53.2.1.) y añadir 65 ml de acetonitrilo (53.3.1.). Mezclar, acoplar al erlenmeyer el refrigerante de reflujo (53.2.2.) y calentar en el baño de agua (53.2.5.) durante 30 minutos agitándolo continuamente. Dejar enfriar con corriente de agua fría. Añadir 20 g de óxido de aluminio (53.3.2.), agitar durante 3 minutos y dejar decantar.

Colocar un matraz aforado de 100 ml en el aparato de filtración (53.2.4.), ajustar el crisol filtrante (53.2.3.) y filtrar el líquido aspirando. Trasvasar a continuación el sedimento al crisol con unos ml de acetonitrilo (53.3.1.) y aspirar. Cortar el vacío, volver a poner el sedimento en suspensión con unos ml de acetonitrilo (53.3.1.) y aspirar de nuevo. Repetir estas últimas operaciones hasta que el volúmen del filtrado alcance 95 ml aproximadamente. Completar el volúmen a 100 ml mediante el acetonitrilo (53.3.1.) y homogeneizar.

Si fuera necesario, tomar una parte alícuota y diluír mediante acetonitrilo (53.3.1.) para obtener una solución que contenga de 5 a 15 microgramos de dinitolmida por ml.

53.4.2. Desarrollo de la coloración y medida de la absorbancia.

Introducir respectivamente en tres vasos de 50 ml, A, B y C, 4.0 ml de la solución obtenida en (53.4.1.). Añadir solamente al vaso C, 1,0 ml de solución patrón (53.3.6.). Llevar los tres vasos sobre el baño de agua (53.2.5.) situado bajo una campana de gases bien ventilada y evaporar a sequedad bajo corriente de aire. Dejar enfriar hasta la temperatura ambiente.

Añadir 10,0 ml de N,N-demetilformamida (53.3.3.) al vaso A y 2,0 ml respectivamente a 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 (53.3.4) en los vasos B y C y homogeneizar. Medir, cinco minutos exactamente después de la adición de etilendiamina, la absorbancia de las tres soluciones mediante el espectrofotómetro (53.2.6) a 560 nm, empleando como blanco la N,N-dimetilformamida (53.3.3).

53.5.- CALCULOS

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

$$\frac{A_B - A_A}{A_C - A_B} \times \frac{F}{P} \times 1000$$

Siendo:

A_A = Absorbancia de la solución A (testigo)

A_B = Absorbancia de la solución B (muestra)

A_C = Absorbancia de la solución C (patrón interno)

P = Peso en gramos de la muestra.

F = Coeficiente de dilución (efectuado si se diera el caso (53.4.1.).

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

- de 10 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos en dinitolmida inferiores a 100 mg/kg.
- del 10%, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre 100 y 5.000 mg/kg.
- de 500 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5.000 y 10.000 mg/kg.
- del 5%, en valor relativo, para los contenidos superiores a 10.000 mg/kg.

53.6.- REFERENCIAS

Quinta Directiva de la Comisión de 25 de marzo de 1974. (74/203/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 108/7 de 22 de abril de 1974.

54.- NICARBAZINA
(Mezcla equimolecular de 4,4-dinitrocarbanilida y 2-hidroxy-4,6-dimetil pirimidina)

54.1.- PRINCIPIO

El método permite determinar nicarbazina en los piensos, concentrados y premezclas que no contengan más de 5% de harinas forrajeras. Los derivados del nitrofurano, el acetilenheptina y el carbadox interfieren. El límite de detección es de 20 mg/kg.

La muestra se somete a extracción con N,N-dimetilformamida. El extracto se purifica en columna cromatográfica de óxido de aluminio: la nicarbazina se eluye con etanol. El eluato se trata con una solución etanólica de hidróxido de sodio: se desarrolla una coloración amarilla. La nicarbazina se determina espectrofotométricamente a 430 nm.

54.2.- MATERIAL Y APARATOS

54.2.1. Erlenmeyer de 250 ml con boca normalizada.

54.2.2. Refrigerante de reflujo, con boca normalizada.

54.2.3. Baño de agua hirviendo.

54.2.4. Centrífuga con tubos de 120 ml.

54.2.5. Columna cromatográfica de vidrio (diámetro interior: 25 mm, longitud 300 mm).

54.2.6. Espectrofotómetro con cubetas de 10 mm de espesor.

54.2.7. Buretas graduadas a 1/10 ml.

54.3.- REACTIVOS

54.3.1. N,N-dimetilformamida p.a.

54.3.2. Oxido de aluminio para cromatografía de columna. Calcinar durante 2 horas al menos a 750 °C, enfriar en desecador y conservar en frasco de vidrio topacio con tapón. Antes de utilizarlo, controlar su actividad sometiendo a análisis a partir del punto (54.4.2), una cantidad determinada de patrón (54.3.8.3). La recuperación de nicarbazina debe ser de 100% ± 2%.

54.3.3. Alcohol etílico de 95% (v/v).

54.3.4. Alcohol etílico de 80% (v/v).

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

54.3.6. Solución etanólica al 1% (p/v) de hidróxido de sodio. Tomar 1 ml de la solución (54.3.5) en un matraz aforado de 50 ml y enrasar con etanol del 80% (54.3.4). Preparar en el momento de empleo.

54.3.7. Sustancia patrón. Nicarbazina pura, coeficiente de extinción molecular a 362 nm en N,N-dimetilformamida es de 37,8 x 10^3.

54.3.8. Solución patrón.

54.3.8.1. Solución de 1,25 mg de nicarbazina por ml. Pesar con una precisión de 0,1 mg, 125 mg de sustancia patrón (54.3.7.). Disolver en 75 ml de N,N-dimetilformamida (54.3.4.) en un matraz aforado de 100 ml calentando ligeramente. Dejar enfriar, completar a volúmen con el mismo solvente y homogeneizar. Conservar al abrigo de la luz.

54.3.8.2. Solución de 0,125 mg de nicarbazina por ml. Tomar 10 ml de la solución (54.3.8.1.) y completar a 100 ml con N,N-dimetilformamida (54.3.1.) en un matraz aforado y homogeneizar.

54.3.8.3. Solución de 0,025 mg de nicarbazina por ml. Tomar 20 ml de la solución (54.3.8.2.), completar a 100 ml con N,N-dimetilformamida (54.3.1.) en un matraz aforado y homogeneizar.

54.4.- PROCEDIMIENTO

54.4.1. Extracción.

Pesar, con precisión de 1 mg, 10 g de muestra finamente dividida y homogénea. Para concentrados y premezclas pesar 1 g con la precisión de 1 mg, introducir la muestra en un erlenmeyer de 250 ml (54.2.1.) y añadir 100 ml exactamente de N,N-dimetilformamida (54.3.1.). Mezclar, acoplar a un refrigerante de reflujo (54.2.2.) y calentar en baño de agua (54.2.3.) durante 15 minutos agitando de vez en cuando. Dejar enfriar bajo corriente de agua fría.

Trasvasar a continuación el líquido sobrenadante a un tubo de centrífuga (54.2.4.) y centrifugar durante tres minutos aproximadamente.

Si fuera necesario pipetear 25 ml del sobrenadante y diluir con N,N-dimetilformamida (54.3.1.) para obtener una solución que contenga de 2 a 10 microgramos de nicarbazina por ml.

54.4.2. Cromatografía.

Introducir en una columna cromatográfica (54.2.5.) 30 g de óxido de aluminio (54.3.2.) en suspensión en N,N-dimetilformamida (54.3.1.). Dejar descender el líquido hasta 1 cm por encima de la columna de óxido de aluminio e introducir en seguida en la columna, 25 ml del extracto obtenido en (53.4.1.). Dejar pasar el líquido evitando dejar la columna seca y lavar tres veces la columna con 10 ml de N,N-dimetilformamida (54.3.1.) cada vez. Eluír enseguida con 70 ml de etanol al 95% (54.3.3.). Eliminar los 10 primeros ml del eluato y recoger el resto en fracciones como sigue:

- 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) no presenten coloración amarilla por la adición de solución etanólica de hidróxido de sodio (54.3.6.). Proseguir las operaciones sobre la fracción b) como se indica en (54.4.3.).

54.4.3. Desarrollo de la coloración y medida de la absorbancia.

Introducir respectivamente 20 ml de la fracción b) en dos matraces aforados A y B de 25 ml. Añadir al matraz A 5,0 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio (54.3.6.) y al matraz B 5,0 ml de etanol de 95% (54.3.3.). Homogeneizar.

Medir en los primeros cinco minutos la absorbancia de las soluciones a 430 nm utilizando como blanco una mezcla de 20,0 ml de etanol del 95% (54.3.3.) y 5 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio (54.3.6.).

La diferencia de las absorbancias entre la solución B y A se interpola en la curva de calibrado (54.4.4.) para obtener la cantidad de nicarbazina.

54.4.4. Curva de calibrado.

Tratar 25 ml de la solución patrón (54.3.8.3.) por cromatografía como se indica en (54.4.2.). Trasvasar a una bureta graduada (54.2.7.) la fracción b) del eluato y pipetear en matraces secos de 25 ml respectivamente los siguientes volúmenes: 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 y 10,0 ml (correspondiendo a 0,025 - 0,050 - 0,075 - 0,100 y 0,125 mg de nicarbazina). Añadir a cada matraz 5,0 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio (54.3.6.) enrasar con etanol de 95% (54.3.3.) y homogeneizar.

Medir en los primeros 5 minutos la absorbancia de las soluciones a 430 nm, utilizando como blanco una mezcla de 20 ml de etanol del 95% (54.3.3.) y 5,0 ml de solución etanólica de hidróxido de sodio. Trazar la curva patrón representando en ordenadas el valor de la absorbancia y en abscisas las cantidades correspondientes de nicarbazina en mg.

54.5.- CALCULOS

La cantidad de nicarbazina en mg por kg de muestra viene dada por la fórmula:

$$\frac{A}{P} \times F \times 10.000$$

Siendo:

A = Cantidad, en mg, de nicarbazina determinada por medida espectrofotométrica.

P = Peso, en g, de la muestra.

F = Coeficiente de dilución (efectuado eventualmente en 54.4.1.).

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

- 10 mg/kg, en valor absoluto, para contenidos en nicarbazina inferiores a 100 mg/kg.
- 10%, en valor relativo, para contenidos comprendidos entre 100 y 5.000 mg/kg.
- 500 mg/kg, en valor absoluto, para contenidos comprendidos entre 5.000 y 10.000 mg/kg.
- 5%, en valor relativo, para contenidos superiores a 10.000 mg/kg.

54.6.- REFERENCIAS

Quinta Directiva de la Comisión de 25 de marzo de 1974. (74/203/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 108/7 de 22 de abril de 1974.

55.- BUQUINOLATO
(Carboxilato de etil-4-hidroxi-6,7 diiso-butoxi-3-quinoleína)

55.1.- PRINCIPIO

El método permite la determinación de buquinolato en los piensos, concentrados y premezclas. El límite inferior de detección es de 10 mg/kg. El decoquinato interfiere en la dosificación.

El buquinolato se extrae de la muestra con cloroformo. El extracto se evapora a sequedad, el residuo se recoge con cloroformo y la solución se cromatografía en capa fina. El buqinolato es eluído por etanol y determinado espectrofluorimétricamente por comparación con soluciones patrón.

55.2.- MATERIAL Y APARATOS

55.2.1. Erlenmeyers de 50 y 250 ml con tapón de rosca.

55.2.2. Agitador.

55.2.3. Centrífuga con tubos de 15 ml con tapón de rosca.

55.2.4. Baño de agua termorregulado a 50 °C.

55.2.5. Equipo para cromatografía en capa fina.

55.2.6. Placas de vidrio para cromatografía en capa fina de 200 x 200 mm, preparadas como sigue: extender uniformemente sobre las placas una capa de 0,5 mm de espesor gel de sílice G (55.3.5.) (55.6.1.). Se dejan secar durante 15 minutos al aire. Después se introducen durante 2 horas a 110 °C en la estufa (55.2.11.). Se enfrían en desecador que contenga gel de sílice como deshidratante.

Se pueden emplear placas equivalentes ya preparadas.

55.2.7. Micropipetas de 0,50 ml.

55.2.8. Colector de zonas para cromatografía en capa fina.

55.2.9. Lámpara de ultravioleta de onda corta.

55.2.10. Espectrofluorímetro equipado con una lámpara de xenon y de dos monocromadores.

55.2.11. Estufa de aire forzado y temperatura regulable de 0° a 150 °C.

55.2.12. Aparato rotativo de evaporación al vacío con matraz de 250 ml.

53.3.- REACTIVOS

55.3.1. Cloroformo p.a.

55.3.2. Etanol 96% (v/v) p.a.

55.3.3. Mezcla cloroformo-etanol. Mezclar 10 volúmenes de cloroformo (55.3.1.) y un volumen de etanol (55.3.2.).

55.3.4. Etanol 80% (v/v) p.a.

55.3.5. Gel de sílice G para cromatografía en capa fina.

55.3.6. Buquinolato calidad patrón.

55.3.7. Soluciones patrón:

55.3.7.1. Soluciones patrón 0,2 mg/ml de buquinolato.

Pesar 50 mg de sustancia patrón (55.3.6.) con la precisión de 0,1 mg. Disolver en cloroformo (55.3.1.) y en caliente, en un baño de agua a 50 °C. Trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Completar con cloroformo (55.3.1.) hasta el aforo y homogeneizar.

55.3.7.2. Soluciones patrón de trabajo. Pipetear en matraces aforados de 25 ml; 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 y 25,0 ml de la solución patrón (55.3.7.1.). Completar hasta el aforo con cloroformo (55.3.1.) y homogeneizar. Preparar en el momento de su utilización. Estas soluciones contienen respectivamente 0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 y 0,20 mg/ml de buquinolato.

55.4.- PROCEDIMIENTO

55.4.1. Preparación de la muestra.

Moler la muestra de tal manera que pase a través de un tamiz de 1 mm (conforme a las recomendaciones ISO R 565).

55.4.2. Extracción.

Pesar con precisión de 1 mg una cantidad muestra preparada según (55.4.1.) que contenga aproximadamente 1,25 mg de buquinolato e introducirla cuantitativamente en un erlenmeyer de 250 ml (55.2.1.). Añadir 100,0 ml de cloroformo (55.3.1.). Mezclar, tapar y agitar durante una hora en el agitador (55.2.2). Dejar decantar, filtrar y despreciar los primeros ml del filtrado.

Introducir 80 ml del filtrado límpido en el matraz del rotavapor (55.2.12.). Evaporar casi hasta sequedad sobre un baño de agua (55.2.4.). Trasvasar cuantitativamente el residuo oleoso a un matraz de 10 ml con ayuda de cloroformo y a través de un embudo de vástago estrecho. Completar el volumen con cloroformo (55.3.1.) y si la solución no es límpida, centrigugar durante 3 minutos a 3.000 rpm en tubo cerrado.

55.4.3. Cromatografía en capa fina.

Depositar puntualmente sobre una placa de cromatografía (55.2.6.) con ayuda de una micropipeta (55.2.7.) y a una distancia respectiva de 2 cm, volúmenes de 0,25 ml del extracto obtenido en (55.4.2.) y de las 5 soluciones de patrón (55.3.7.2.).

Eluír el cromatograma en la cámara de desarrollo utilizando cloroformo (55.3.1.) como eluyente hasta que el frente del solvente llegue al borde superior de la placa. Secar con ayuda de una corriente de aire. Volver a colocar la placa en la cámara de desarrollo, utilizando como eluyente la mezcla de cloroformo/etanol (55.3.3.) hasta que el frente del solvente haya avanzado unos 12 cm. Sacar la placa de la cámara. Dejar evaporar el solvente. Examinar la placa bajo la luz ultravioleta de onda corta (55.2.9.) y delimitar las manchas de buquinolato (valor de Rf 0,4 a 0,6) con la ayuda de una aguja.

55.4.4. Elución.

Recoger la sílice de cada zona delimitada con la ayuda de un colector de zonas (55.2.8.) en un tubo de centrífuga (55.2.3.). Añadir a cada tubo 10 ml de etanol (55.3.4.), agitar durante 20 minutos y después centrifugár durante 5 minutos a 3.000 rpm. Decantar las soluciones límpidas en los erlenmeyer de 50 ml (55.2.1.).

55.4.5. Medida de la fluorescencia.

Ajustar a 100 la escala del espectrofluorímetro (55.2.10.) con la ayuda del eluato (55.4.4.) obtenida de la solución patrón más concentrada. Utilizar para la excitación la longitud de onda comprendida entre 200 y 280 nm que dé la fluorescencia más intensa y para la emisión la longitud de onda de 375.

Medir en estas condiciones la intensidad de fluorescencia de los otros eluatos (55.4.4.). Determinar a partir de los valores encontrados la cantidad (C) de buquinolato en mg contenida en los 10 ml del eluato de la muestra.

55.5.- CALCULO DE RESULTADOS

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

$$\frac{C}{P} \times 50.000$$

Siendo:

C = Cantidad en mg de buquinolato determinado por la medida espectrofluorimétrica.

P = Peso en gramos de la muestra tomada para el análisis.

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

- 50% del resultado más elevado para los valores de buquinolato comprendidos entre 10 y 20 mg/kg.
- 10 mg/kg en valor absoluto para los valores comprendidos entre 20 y 100 mg/kg.
- 10% del resultado más elevado para los valores comprendidos entre 100 y 5.000 mg/kg.
- 500 mg/kg en valor absoluto para los valores comprendidos entre 5.000 y 10.000 mg/kg.
- 5% del resultado más elevado para los valores superiores a 10.000 mg/kg.

55.6.- OBSERVACIONES

55.6.1. La preparación de las placas es como sigue: Mezclar 60 g de gel de sílice G (55.3.5.) con 120 ml de agua destilada, en un erlenmeyer de 250 ml con tapón, agitando vigorosamente durante 30 a 45 segundos. La suspensión una vez bien homogeneizada, se vuelca rápidamente en el aplicador y se extiende uniformemente sobre las placas, una capa de 0,5 mm de espesor. Se dejan secar durante 15 minutos al aire; después se introducen en la estufa (55.2.11.) durante 2 horas a 110 °C. Se enfrían en desecador que contenga gel de sílice como deshidratante.

55.7.- REFERENCIAS

6ª Directiva de la Comisión de 20-diciembre-1974 (75/84/CEE).- Diario Oficial nº L 32/26 de 5 de febrero de 1975.

56.- SULFAQUINOXALINA
(2 Sulfanilamidoquinoxalina)

56.1.- PRINCIPIO

El método permite la determinación de sulfaquinoxalina en los piensos compuestos, concentrados y premezclas. El límite inferior de la determinación es de 20 mg/kg. Interfieren otras sulfonamidas y el ácido arsanílico.

La sulfaquinoxalina se extrae de la muestra con dimetilformamida y cloroformo. Se hidroliza en medio alcalino. Después de la neutralización el derivado aminado se diazota y copula con la N-(1-naftil)etilendiamina. La absorbancia de la solución se mide a 545 nm.

56.2.- APARATOS

56.2.1. Erlenmeyers de 250 ml con boca normalizada y tapón de vidrio.

56.2.2. Agitador.

56.2.3. Crisoles filtrantes de porosidad 3, diámetro 80 mm, con kitasatos.

56.2.4. Embudos de decantación de 250 ml.

56.2.5. Matraces aforados de 50, 100, 250 y 500 ml.

56.2.6. Tubos de ensayo de 150 mm x 25 mm.

56.2.7. Baño de agua hirviente.

56.2.8. Espectrofotómetro con cubetas de 20 mm de camino óptico.

56.3.- REACTIVOS

56.3.1. N, N. Dimetilformamida p.a.

56.3.2. Cloroformo p.a.

56.3.3. Etanol absoluto.

56.3.4. Solución alcalina. Disolver en agua destilada 10 g de hidróxido de sodio p.a. y 25 g de cloruro de sodio p.a. Completar hasta 500 ml con agua destilada y homogeneizar.

56.3.5. Acido clorhídrico concentrado p.a. (d = 1,18).

56.3.6. Solución 0,1% (p/v) de nitrito de sodio. Disolver en agua destilada 100 mg de nitrito de sodio p.a., completar con agua destilada hasta 100 ml y homogeneizar. Preparar inmediatamente antes de usar.

56.3.7. Solución 0,5% (p/v) de sulfamato amónico. Disolver en agua destilada 500 mg de sulfamato amónico p.a. completar hasta 100 ml con agua destilada y homogeneizar. Preparar inmediatamente antes de usar.

56.3.8. Solución 0,1% (p/v) de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina. Disolver en ácido clorhídrico p.a. 0,1% (v/v) 100 mg de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina p.a. completar hasta 100 ml con el mismo ácido y homogeneizar. Preparar inmediatamente antes de usar.

56.3.9. Sustancia patrón. Sulfaquinoxalina pura.

56.3.10. Solución patrón. Pesar con precisión de 0,1 mg, 250 mg de sustancia patrón (56.3.9.). Disolver en unos 50 ml de una solución de hidróxido de sodio (25 ml de una solución de hidróxido de sodio 0,1 N + 25 ml de agua), completar hasta 500 ml con agua destilada. Tomar 5 ml de esta solución y diluir a 100 ml con agua destilada. 1 ml de esta solución contiene 25 microgramos de sulfaquinoxalina.

56.4.- PROCEDIMIENTO

56.4.1. Preparación de la muestra.

Moler la muestra de tal manera que pase en su totalidad a través de una malla de 1 mm (Conforme a la recomendación ISO R. 565).

56.4.2. Extracción.

Pesar con la exactitud de mg una cantidad de muestra que contenga entre 0,25 a 1,25 mg de sulfaquinoxalina. Introducir cuantitativamente en un erlenmeyer de 250 ml (56.2.1.) y añadir 20 ml de N, N, dimetilformamida (56.3.1.). Mezclar y calentar durante 20 minutos sobre baño de agua (56.2.7.). Dejar enfriar bajo corriente de agua fría. Añadir 60 ml de cloroformo (56.3.2.) tapar el erlenmeyer y agitar durante 30 minutos con ayuda del agitador (56.2.2.).

Filtrar el líquido sobre el crisol filtrante (56.2.3.) colocado en un kitasatos y aspirar ligeramente. Lavar el erlenmeyer con cuatro porciones de 5 ml de cloroformo (56.3.2.) y trasvasar sucesivamente los líquidos al crisol. Trasvasar rapidamente a continuación el filtrado a un embudo de decantación (56.2.4.), lavar el kitasatos con la ayuda de aproximadamente 15 ml de cloroformo (56.3.2.) y trasvasar el líquido al embudo de decantación.

56.4.3. Hidrólisis.

Añadir al embudo de decantación 50 ml de solución alcalina (56.3.4.) y 5 ml de etanol (56.3.3.). Mezclar bien evitando la formación de emulsión, bien sea invirtiendo el embudo unas 20 veces o bien agitando horizontalmente. Dejar reposar hasta la separación de las dos fases (la separación se completa generalmente alrededor de los 15 minutos).

Trasvasar la fase superior (fase acuosa) a un matraz aforado de 250 ml (56.2.5.). Extraer de nuevo de la fase cloroformica con tres porciones de la solución alcalina (56.3.4.) y trasvasar el extracto acuoso después de cada extracción, al matraz aforado (56.2.5.). Completar hasta el aforo con agua destilada y homogeneizar.

Introducir 25,0 ml de la solución en un matraz aforado de 50 ml (56.2.5.), añadir 5,0 ml de ácido clorhídrico (56.3.5.). Completar hasta el aforo con agua destilada y homogeneizar. Filtrar, si fuese necesario y eliminar los primeros 15 ml del filtrado. Introducir 10 ml de la solución, en dos tubos de ensayo (56.2.6.) A y B respectivamente.

56.4.4. Desarrollo de color y medida de la absorbancia.

Añadir a cada tubo 2,0 ml de solución de nitrito de sodio (56.3.6.) agitar y dejar reposar 3 miutos. Añadir 2,0 ml de solución de sulfamato amónico (56.3.7.), agitar y dejar reposar 2 minutos. Añadir a continuación 1,0 ml de solución de diclorhidrato de N(1-naftil)etilendiamina (56.3.8.) en el tubo A y 1,0 ml de agua destilada en el tubo B. Mezclar bien el contenido de cada tubo. Conectar los tubos a una trompa de agua con la ayuda de juntas de goma y aplicar un pequeño vacío para eliminar el nitrógeno disuelto.

Medir después de 10 minutos la absorbancia Aa y Ab, de las soluciones en el espectrofotómetro (56.2.8.) a 545 nm tomando el agua destilada como blanco. Determinar a partir del valor Aa - Ab la cantidad (C) de sulfaquinoxalina presente en la solución de la muestra refiriéndose a la curva patrón (56.4.5.) hecha previamente.

56.4.5. Curva patrón.

Introducir en los matraces aforados de 100 ml (56.2.5.), volúmenes de 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 y 10,0 ml de la solución patrón (56.3.10.) correspondientes a 50, 100, 150, 200 y 250 microgramos de sulfaquinoxalina. Añadir 8 ml de ácido clorhídrico (56.3.5.) en cada matraz completando el volumen con agua destilada y homogeneizando.

Tomar 10 ml de cada solución, que corresponden respectivamente a 5, 10, 15, 20, y 25 microgramos de sulfaquinoxalina, e introducirlos en tubos de ensayo (56.2.6.). Desarrollar el color como se indica en (56.4.4. primer párrafo). Medir a continuación la absorbancia a 545 nm empleando agua destilada como blanco. Trazar la curva patrón poniendo en ordenadas el valor de la absorbancia y en abscisas la cantidad correspondiente de sulfaquinoxalina expresada en microgramos.

56.5.- CALCULOS

La cantidad en mg de sulfaquinoxalina por kg de muestra viene dada por la siguiente fórmula:

$$\text{Sulfaquinoxalina mg/kg} = \frac{C}{P} \times 50$$

Siendo:

C = Cantidad de sulfaquinoxalina en microgramos deteminada por medida espectrofotométrica.

P = Peso en gramos de la muestra tomada para el ensayo.

La diferencia entre los resultados de dos detemrinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no deben ser mayores de:

- 10 mg/kg en valor absoluto para contenidos de sulfaquinoxalina comprendida entre 20 y 100 mg/kg.
- 10% del resultado más elevado para contenidos comprendidos entre 100 y 5.000 mg/kg.
- 500 mg/kg en valor absoluto para los contenidos comprendidos entre 5.000 y 10.000 mg/kg.
- 5% del resultado más elevado para los contenidos superiores a 10.000 mg/kg.

56.6.- REFERENCIAS

6ª Directiva de la Comisión de 20 de diciembre de 1974 (75/84/CEE). Diario Oficial nº L 32/26 de 5 de Febrero de 1975.

57.- FURAZOLIDONA
(N-(5-nitro-2-furfuriliden)-3-amino-2-oxazolidona)

57.1.- PRINCIPIO

El método permite la determinación de furazolidona en los piensos, concentrados y premezclas. El límite inferior de la determinación es de 10 mg/kg.

La furazolidona es extraída con acetona después de que la muestra ha sido previamente desengrasada con éter de petróleo. El extracto es purificado en una columna cromatográfica de óxido de aluminio y la furazolidona se eluye con la acetona. El eluato se evapora a sequedad, y el residuo se recoge en alcohol amílico. La furazolidona es extraída con una solución de urea y la absorbancia del extracto es medida a 375 nm.

57.2.- MATERIAL Y APARATOS

57.2.1. Matraces aforados de vidrio color topacio de 100 y 250 ml.

57.2.2. Embudos de decantación de vidrio color topacio de 100 ml.

57.2.3. Aparto de extracción Soxhlet o Twisselman.

57.2.4. Cartuchos de extracción 25 x 80 ó 28 x 100 mm.

57.2.5. Columna de vidrio para cromatografía, de diámetro interior 10 mm y longitud 300 mm.

57.2.6. Baño de agua termorregulado hasta 150 °C.

57.2.7. Espectrofotómetro con cubetas de 10 mm de espesor.

57.3.- REACTIVOS

57.3.1. Acetona p.a.

57.3.2. Oxido de aluminio neutro para cromatografía. Granulometría 100 a 240 mesh preparada como sigue. Mezclar 500 g de óxido de aluminio con 1000 ml de agua destilada caliente y decantar a continuación el líquido sobrenadante. Repetir dos veces esta operación y filtrar seguidamente a través de un filtro Büchner. Secar el óxido de alumnio a 105 °C hasta peso constante.

57.3.3. Acetato de amílo p.a.

57.3.4. Alcohol amílico. Conviene mezcla de isómeros.

57.3.5. Eter de petróleo, p. eb 40-60 °C.

57.3.6. Solución de urea. Mezclar 90 g de urea p.a. con 100 ml de agua destilada, calentar ligeramente para facilitar la disolución.

57.3.7. Sustancia patrón. Furazolidona pura.

57.3.8. Soluciones patron. Pesar con precisión de 0,1 mg unos 25 mg de sustancia patrón (57.3.7.). Introducirla cuantitativamente en un matraz afordo de 250 ml (57.2.1.) completar hasta el aforo con acetona (57.3.1.) y homogeneizar (1 ml de esta solución contiene 100 microgramos de furazolidona).

57.4.- PROCEDIMIENTO

Todas las manipulaciones deben efectuarse evitando la luz directa:

57.4.1. Preparación de la muestra.

Moler la muestra de tal manera que pase a través de un tamiz de mallas de 1 mm, conforme a la recomendación ISO R 565.

57.4.2. Extracción.

Pesar con exactitud de 1 mg, de 5 a 20 g de muestra bien homogeneizada (conteniendo como máximo 1 mg de furazolidona) en un cartucho de extracción (57.2.4.). Colocarlo en el aparato de extracción (57.2.3.) y extraer con éter de petróleo (57.3.5.). Para el aparto Soxhelt son necesarios de 13 a 17 ciclos de solvente, para otros aparatos la duración de la extracción no debe ser inferior a 30 minutos. Retirar a continuación el cartucho del aparato, eliminar el solvente residual secando el cartucho y su contenido con ayuda de una corriente de aire caliente.

Para la extracción, propiamente dicha, colocar de nuevo el cartucho en el aparato de extracción y extraer con la acetona (57.3.1.). Para el aparato Soxhlet al menos son necesarios 25 ciclos de solvente; para otros aparatos, las condiciones necesarias para la obtención de una extracción completa deberán ser determinadas previamente. Evaporar el extracto acetónico sobre el baño de agua (57.2.6.) hasta un volumen de 5 a 10 ml y dejar enfriar hasta temperatura ambiente.

57.4.3. Cromatografía.

Introducir un pequeño tapón de lana de vidrio en el extremo inferior de la columna cromatográfica (57.2.5.) y apretar el tapón con la ayuda de una varilla, para obtener un espesor de 2 a 3 mm. Preparar una suspensión de óxido de aluminio (57.3.2.) en acetona (57.3.1.). Introducir la suspensión en la columna cromatográfica (57.2.5.) y dejar reposar. La columna así obtenida debe de tener una altura de 200 mm aproximadamente. Dejar descender la acetona (57.3.1.) hasta la superficie superior de la columna.

Trasvasar el extracto obtenido en (57.4.2.) sobre la columna, lavar el matraz varias veces con acetona (57.3.1.) y trasvasar los líquidos sobre la columna. Colocar un matraz apropiado debajo de la columna y eluír la furazolidona con la acetona (57.3.1.).

El volumen total de la acetona usada, incluído el usado para el lavado, no debe ser superior a 150 ml.

57.4.4. Extracción y medida de la absorbancia.

Evaporar el eluído obtenido en (57.4.3.) hasta sequedad en baño de agua (57.2.6.) (Ver 57.6.1.). Disolver el residuo en 10 ml de alcohol amílico (57.3.4.) y trasvasar la solución a un embudo de decantación (57.2.2.). Lavar el matraz con porciones sucesivas de 10 ml de acetato de amilo (57.3.3.) y 10 ml de la solución de urea (57.3.6.). Trasvasar estas soluciones a un embudo de decantación (57.2.2.) y agitar vigorosamente durante 2 minutos.

Dejar reposar durante 3 a 4 minutos y recoger la fase acuosa en un matraz aforado de 100 ml (57.2.1.). Repetir el lavado y la extracción con la ayuda de cuatro porciones de 10 ml de solución de urea (57.3.6.) y recoger cada vez la fase acuosa en el matraz aforado. Completar el contenido del matraz hasta 100 ml con la solución de urea (57.3.6.) y homogeneizar. Medir la absorbancia de la solución en el espectrofotómetro (57.2.7.) a 375 nm tomando como blanco la solución de urea (57.3.6.). Determinar la cantidad de furazolidona refiriéndose a la curva patrón (57.4.5.).

57.4.5. Curva patrón.

Preparar cuatro columnas cromatográficas (57.2.5.) según el modelo operatorio indicado (57.4.3. primer párrafo). Introducir en la columna volúmenes de 2,5 - 5,0 - 7,5 y 10 ml de solución patrón (57.3.8.).

Eluír cada columna con 150 ml de acetona (57.3.1.) y continuar el modo operatorio como se indica en (57.4.4.). Trazar la curva patrón poniendo en ordenadas la absorbancia y en abscisas las cantidades correspondientes de furazolidona en microgramos.

57.5.- CALCULOS

El valor en miligramos de furazolidona por kg de muestra está dado por la siguiente fórmula:

$$\frac{C}{P}$$

Siendo:

C = Cantidad en microgramos de furazolidona determinada por la medida fotométrica.

P = Peso en gramos de la muestra tomada para el análisis.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones hechas en paralelo y efectuadas sobre la misma muestra, no deben diferir de:

- 50% del resultado más elevado para los valores de furazolidona comprendidos entre 10 y 20 mg/kg.
- 10 mg/kg en valor absoluto para los valores comprendidos entre 20 y 100 mg/kg.
- 10% del resultado más elevado para los valores comprendidos entre 100 y 5.000 mg/kg.
- 500 mg/kg en valor absoluto para los valores comprendidos entre 5.000 y 10.000 mg/kg.
- 5% del resultado más elevado para los valores superiores a 10.000 mg/kg.

57.6.- OBSERVACIONES

57.6.1. Ocasionalmente se obtiene una pequeña cantidad de diacetona - alcohol, producida por condenseación de la acetona sobre el óxido de aluminio, que no obstaculiza las extracciones posteriores.

57.7.- REFERENCIAS

Sexta Directiva de la Comisión de 20 de diciembre de 1974. 75/84/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 32/26 de 5 de febrero de 1975.