

373L0046

30. 3. 73

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

Nº L 83/21

CUARTA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 5 de diciembre de 1972

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

(73/46/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos de toma de muestras y de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽¹⁾, modificada por la Directiva 72/275/CEE de 20 de julio de 1972 ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 2,

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

Considerando que las Directivas nº 71/250/CEE, nº 71/393/CEE y nº 72/199/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971 ⁽³⁾, 18 de noviembre de 1971 ⁽⁴⁾ y 27 de abril de 1972 ⁽⁵⁾, respectivamente, han establecido ya determinados métodos de análisis comunitarios; que, habida cuenta del grado de avance de los trabajos efectuados desde entonces, es conveniente establecer una cuarta serie de métodos;

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

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo que se refiere a los contenidos en humedad de las gra-

sas y aceites animales y vegetales, así como a los contenidos en magnesio y en celulosa bruta de los alimentos, se efectuarán según los métodos descritos en el Anexo I de la presente Directiva.

Se aplicará a los métodos descritos en el Anexo I de la presente Directiva las disposiciones generales que figuran en la Parte 1 (introducción) del Anexo de la primera Directiva nº 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971.

*Artículo 2*Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo que se refiere a sus contenidos en retinol (vitamina A), vitamina (aneurina, vitamina B₁), ácido ascórbico y deshidroascórbico (vitamina C), se efectuarán según los métodos descritos en el Anexo II de la presente Directiva.

Se aplicará a los métodos descritos en el Anexo II de la presente Directiva las disposiciones generales que figuran en la Parte 1 (Introducción) del Anexo de la primera Directiva nº 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971, con excepción de la parte relativa a la preparación de la muestra para análisis.

Artículo 3

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

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros,

Hecho en Bruselas, el 5 de diciembre de 1972.

*Por la Comisión**El Presidente*

S. L. MANSHOLT

⁽¹⁾ DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.⁽²⁾ DO nº L 171 de 29. 7. 1972, p. 39.⁽³⁾ DO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.⁽⁴⁾ DO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.⁽⁵⁾ DO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

ANEXO I

1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN LAS GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES**1. Objetivo y campo de aplicación**

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

2. Principio

La muestra se somete a desecación a 103 °C hasta que cese la disminución de la masa. La parte de masa se determina pro pesada.

3. Equipo

- 3.1. Recipiente de fondo plano, de material resistente a la corrosión, diámetro: 8 a 9 cm altura: 3 cm aproximadamente
- 3.2. Termómetro de mercurio, de bulba reforzada, y cámara de dilatación en la extremidad superior, graduado de 80 °C aproximadamente a 110 °C al menos, longitud: 10 cm aproximadamente
- 3.3. Baño de arena o placa calorifera eléctrica
- 3.4. Desecador, conteniendo un deshidratante eficaz
- 3.5. Balanza analítica

4. Método operatorio

Pesar, con precisión de 1 mg, 20 g aproximadamente de la muestra homogeneizada en el recipiente (3.1) seco y tarado, conteniendo el termómetro (3.2). Calentar sobre el baño de arena o la placa calorifera (3.3), agitando constantemente con la ayuda de un termómetro, de forma que la temperatura alcance 90 °C en 7 minutos aproximadamente.

Reducir la intensidad del calentamiento siguiendo la frecuencia con la que ascienden las burbujas desde el fondo del recipiente. La temperatura no debe exceder de 105 °C. Continuar agitando, rozando el fondo del recipiente, hasta que cese la formación de burbujas.

Para garantizar la completa eliminación de la humedad, repetir varias veces e calentamiento a 103 °C ± 2 °C, refrigerando a 93 °C entre los sucesivos calentamientos. Dejar refrigerar a continuación en el desecador (3.4) hasta la temperatura ambiente y pesar. Repetir esta operación hasta que la pérdida de masa entre dos pesadas sucesivas no exceda en más de 2 mg.

N.B. Un aumento de la masa de la muestra después de un calentamiento repetido indica una oxidación de la grasa. En este caso, calcular el resultado a partir de la pesada efectuada inmediatamente antes del comienzo del aumento de masa.

5. Cálculo de los resultados

El contenido en porcentaje de la muestra viene dado por la fórmula:

$$(M_1 - M_2) \cdot \frac{100}{M_0}$$

en la que:

M_0 = masa, en gramos, de la toma de muestra,

M_1 = masa, en gramos, del recipiente con su contenido, antes de calentamiento,

M_2 = masa, en gramos, del recipiente con su contenido, después del calentamiento.

Los resultados inferiores a 0,05 % deben referirse por la mención «menos del 0,05 %».

Repetibilidad

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

2. DETERMINACIÓN DEL MAGNESIO

— por espectrofotometría de absorción atómica —

1. Objetivo y ámbito de aplicación

El método permite determinar el magnesio en la alimentación animal. Está especialmente indicado para determinar los contenidos en magnesio inferiores al 5 %.

2. Principio

La muestra se incinera y se pone en solución en el ácido clorhídrico diluido. Si no contiene sustancias orgánicas, se pone directamente en solución en el ácido clorhídrico. La solución es diluida y el contenido en magnesio se determina por espectrofotometría de absorción atómica a 285,2 nm, por comparación con las soluciones de calibrado.

3. Reactivos

- 3.1. Acido clorhídrico p.a., d: 1,16
- 3.2. Acido clorhídrico p.a., d: 1,19
- 3.3. Magnesio, en cinta o hilo, o sulfato de magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ p.a. secado en vacío a la temperatura ambiente.
- 3.4. Solución de sal de estroncio (cloruro o nitrato) al 2,5 por ciento (p/v) de estroncio (= 76,08 g de $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ p. a./1 o 60,38 g de $Sr(NO_3)_2$ p. a. /1)
- 3.5. Solución de calibrado de magnesio: pesar, con precisión de 1 mg, 1 g de magnesio (3.3), separando previamente y con cuidado de su película de óxido, o una cantidad correspondiente de sulfato de magnesio (3.3), introducirlo en un matraz aforado de 1 000 ml, añadir 80 ml de ácido clorhídrico (3.1), dejar disolver y completar a 1 000 ml con agua, 1 ml de dicha solución contiene 1 000 mg de magnesio

4. Equipo

- 4.1. Crusoles de incineración de platino, cuarzo o porcelana
- 4.2. Horno de barro eléctrico, con termostato
- 4.3. Espectrofotómetro de absorción atómica

5. Método operatorio

5.1. Puesta en solución

5.1.1. Alimentos constituidos exclusivamente por sustancias minerales

Pesar con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra e introducirlos en un matraz aforado de 500 ml con 250 a 300 ml de agua. Añadir 40 ml de ácido clorhídrico (3.1), llevar a ebullición y mantener el líquido en ebullición lenta durante 30 minutos. Dejar refrigerar, completar el volumen mediante agua, homogeneizar y filtrar en un vaso seco a través de un filtro de pliegue seco. Rechazar los 30 primeros ml del filtrado.

En presencia de silicio, tratar 5 g de la muestras mediante una cantidad suficiente (15 a 30 ml) de ácido clorhídrico (3.2) y evaporar en seco sobre un baño de agua. Continuar tal como se indica en 5.1.2, a partir de la tercera frase.

5.1.2. Alimentos constituidos esencialmente por sustancias minerales

Pesar, con precisión de 1 mg, 5 mg de la muestra en un crisol de incineración e incinerar a 550 °C en el horno de barro hasta la obtención de cenizas exentas de partículas carbónicas. Para eliminar el silicio, añadir a las cenizas una cantidad suficiente (15 a 30 ml) de ácido clorhídrico (3.2) y evaporar en seco sobre un baño de agua. Secar a continuación durante una hora en la estufa a 105 °C. Volver a tomar el residuo mediante 10 ml de ácido clorhídrico (3.1) y transferir con la ayuda de agua caliente a un matraz aforado de 500 ml. Llevar a ebullición, dejar refrigerar y completar el volumen mediante agua. Homogeneizar y filtrar en un vaso seco a través de un filtro de pliegues seco. Rechazar los 30 primeros ml del filtrado.

5.1.3. Alimentos formados esencialmente por sustancias orgánicas

Pesar, con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra en un crisol de incineración e incinerar en un horno de barro, hasta la obtención de cenizas exentas de partículas carbonosas. Recoger las cenizas mediante 5 ml de ácido clorhídrico (3.2), evaporar en seco sobre un baño de agua y secar a continuación durante una hora en la estufa a 105 °C, para insolubilizar el silicio. Recoger el residuo mediante 5 ml de ácido clorhídrico (3.1), transvasar con ayuda de agua caliente en un matraz aforado de 250 ml, llevar a ebullición, dejar refrigerar y completar el volumen mediante agua. Homogeneizar y filtrar en un vaso seco a través de un filtro de pliegues seco. Rechazar los 30 primeros milímetros del filtrado.

5.2. Medición de la absorción atómica

Preparar, diluyendo la solución de calibrado (3.5) mediante agua, 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 (3.4) y completar a continuación al volumen de 100 ml mediante agua.

Diluir mediante agua una partate alicuota del filtrado obtenido en 5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3 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 0,4 N. Añadir 10 ml de solución de sal de estroncio (3.4) y completar a continuación al volumen a 100 ml mediante agua.

Medir la absorción de la solución que haya de determinarse y de las soluciones de referencia mediante la longitud de onda de 285,2 nm.

6. Cálculos de los resultados

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

Repetibilidad

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

3. DETERMINACIÓN DE LA CELULOSA BRUTA

1. Objetivo y campo de aplicación

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.

2. Principio

La muestra, en su caso desgrasada se trata sucesivamente mediante soluciones en ebullición de ácido sulfúrico y de hidróxido de potasio de concentraciones determinadas. El residuo se separa por filtración sobre amianto, se lava, se seca, se pesa y se calcina a 900 °C. La pérdida de peso resultante de la calcinación corresponde a la celulosa bruta de la toma de muestras.

3. Reactivos

3.1. Acido sulfúrico 0,26 N

3.2. Amianto tratado: añadir a un amianto para crisol de Gooch alrededor de cinco veces su peso de ácido clorhídrico diluido (1 vol. de ácido clorhídrico, de d: 1,19 + 3 vol. de agua). Hacer hervir la mezcla durante 45 minutos aproximadamente, dejar refrigerar, filtrar sobre embudo Büchner. Lavar el residuo primero con agua, hasta la desaparición de ácido clorhídrico en las aguas de lavado, y a continuación a la acetona (3.6). Secar el amianto en la estufa y calcinarla después durante 2 h a 900 °C. Dejar refrigerar y conservar en un frasco tapado. El amianto tratado de esta forma puede ser utilizado varias veces. Debe responder a las disposiciones dadas en 5.1 a propósito de la prueba en blanco.

- 3.3. Emulsión de antiespuma (silicona, por ej.)
- 3.4. Solución de hidróxido de potasio 0,23 N
- 3.5. Acido clorhídrico 0,5 N
- 3.6. Acetona, pura
- 3.7. Eter dietílico, puro

4. Equipo

- 4.1. Vasos de 600 ml al menos, marcados con puntos de referencia al nivel de 200 ml
- 4.2. Discos de porcelana, diámetro: 80 mm aproximadamente, espesor: 4 mm aproximadamente, perforados por 32 agujeros de 4 mm aproximadamente de diámetro
- 4.3. Matraces de vacío de 2 l aproximadamente, de tapón de caucho, marcados con puntos de referencia al nivel de los 800 ml y provistos de un embudo de cristal de 120 mm de diámetro
- 4.4. Placas filtrantes, diámetro 40 mm aproximadamente, espesor: 4 mm aproximadamente, con el borde oblicuo adaptado al cono del embudo (4.3) perforados por alrededor de 16 agujeros de 4 mm aproximadamente de diámetro y recubiertos por una red metálica de mallas de 1 mm aproximadamente de lado. Las placas y rejillas metálicas deben ser inalterables a los ácidos y a los alcalinos
- 4.5. Crisoles de incineración de platino o de cuarzo
- 4.6. Horno de barro eléctrico, con termostato
- 4.7. Desecador
- 4.8. Filtro de amianto: poner en suspensión 2 g de amianto (3.2) en 100 ml de agua. Filtra en vacío sobre una placa filtrante recubierta de una rejilla metálica (4.4) y situada en el embudo de un matraz de vacío (4.3). Recoger el filtrado y filtrar de nuevo sobre el mismo filtro. Eliminar el filtrado

5. Método operatorio

Pesar 3 g de la muestra, con precisión de 1 mg, y 2 g de amianto tratado (3.2) en un vaso (4.1), añadir 200 ml de ácido sulfúrico (3.1) y algunas gotas de emulsión de antiespuma (3.3). Llevar rápidamente a ebullición y dejar hervir durante 30 minutos exactamente. 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 aire frío. Interrumpir la ebullición añadiendo 50 ml aproximadamente de agua fría y filtrar inmediatamente en vacío sobre un filtro de amianto previamente preparado como se indica en 4.8.

Lavar el residuo mediante 5 porciones de 100 ml aproximadamente de agua muy caliente para obtener un volumen final de filtrado de 800 ml. Transferir cuantitativamente el residuo en un vaso (4.1) previamente provisto de un disco de porcelana (4.2) para regularizar la ebullición. Añadir 200 ml de solución de hidróxido de potasio (3.4). Llevar rápidamente a ebullición y dejar hervir durante 30 minutos exactamente. Añadir 50 ml aproximadamente de agua fría y filtrar inmediatamente en vacío sobre un nuevo filtro de amianto previamente preparado como se indica en 4.8. Lavar el residuo con ayuda de agua muy caliente hasta neutralidad de las aguas de lavado (prueba con papel de tornasol), después en tres ocasiones mediante la acetona (3.6) (en total 100 ml aproximadamente de acetona).

Transferir cuantitativamente el residuo a un crisol de incineración (4.5), dilacerarlo, si fuera necesario, y secar en la estufa a 130 °C hasta peso constante.

Dejar refrigerar en desecador y pesar rápidamente. Introducir a continuación el crisol en el horno de barro (4.6) y dejar calcinar durante 30 minutos a 900 °C. Dejar refrigerar en desecador y pesar rápidamente.

Efectuar una *prueba en blanco* aplicando el mismo método operatorio al amianto tratado (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.

6. Cálculo de los resultados

El contenido en celulosa bruta en porcentaje de la muestra lo da la fórmula:

$$\frac{(a - b) \cdot 100}{3}$$

en la que:

a = pérdida de peso en la calcinación, cuando la determinación,

b = pérdida de peso en la calcinación, cuando la prueba en blanco.

Repetibilidad

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

0,3 en valor absoluto, para los contenidos en celulosa bruta inferiores al 10 %;

3 %, en valor relativo, para los contenidos en celulosa bruta iguales o superiores al 10 %.

7. Observaciones

7.1. Los alimentos que contengan más del 10 % de materias grasas deben ser desgrasados previamente la análisis mediante éter dietílico. Con tal fin, situar la toma de muestras (3 g pesados con precisión de 1 mg) sobre un filtro de amianto (4.8). Cubrir 3 veces con aproximadamente 50 ml de éter dietílico (3.7) y filtrar cada vez en vacío con precaución. Transvasar cuantitativamente la toma de muestras desgrasada y el amianto a un vaso (4.1) y continuar el análisis como se indica en 5.

7.2. Los alimentos que contengan materias grasas no directamente extraíbles deben ser desgrasados, como se indica en 7.1, y sometidos, además, a un nuevo desgrasado tras el lavado del residuo del ataque ácido.

Con tal fin, lavar el residuo de dicho ataque tres veces con acetona (3.6) (en total 100 ml, luego 3 veces 50 ml de éter dietílico (3.7). Transvasar a continuación cuantitativamente el residuo a un vaso (4.1) y continuar el análisis como se indica en 5 apartado segundo (tratamiento por la solución de hidróxido de potasio).

7.3. En el caso de alimentos ricos en calcio (más de 2 % de calcio), colocar la toma muestra (3 g pesados con precisión de 1 mg) en un vaso (4.1) con 100 ml de ácido clorhídrico 0,5 N (3.5) y dejar reposar en frío durante 5 minutos. Filtrar inmediatamente y lavar con agua fría. Utilizar como adyuvante de filtración los 2 g de amianto previstos para la ebullición con el ácido sulfúrico. Si la filtración se mostrara como difícil, diluir la suspensión con acetona. Proceder seguidamente como se indica en 5.

ANEXO II

1. DETERMINACIÓN DEL RETINOL (VITAMINA A)

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar el retinol (vitamina A) en los alimentos, los concentrados y los premezclas. El límite inferior de la determinación es de 10 000 UI/kg para los alimentos altamente pigmentados y de 4 000 UI/kg para el resto de los productos (*). Los productos se clasificarán aquí en dos grupos, según su contenido supuesto en retinol:

Grupo A: contenido inferiores a 200 000 UI/kg,

Grupo B: contenidos iguales o superiores a 200 000 UI/kg.

2. Principio

La muestra se hidroliza en caliente mediante una solución de hidróxido de potasio en medio etanólico y en presencia de un antioxidante o en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se somete a la extracción por 1,2-dicloroetano. El extracto se evapora en seco y se recoge por el éter de petróleo. La solución se

(*) 1 UI = 0,3 µg de retinol.

cromatografía sobre columna de óxido de aluminio (para los productos del grupo B, la cromatografía sólo se requiere en determinados casos). El retinol se determina mediante espectrofotometría a 610 nm tras el desarrollo de un complejo coloreado según la reacción de Carr-Price, en el caso de los productos del grupo A; por espectrofotometría en l'UV a 325 nm en el caso de los productos del grupo B.

3. Reactivos

a) empleados para el análisis de los productos de los grupos A y B

- 3.1. Etanol al 96 % (v/v)
- 3.2. Solución al 10 % (p/v) de ascorbato de sodio p.a., o
- 3.3. Azote, purificado
- 3.4. Solución al 50 % (p/v) de hidróxido de potasio p.a.
- 3.5. Solución de hidróxido de potasio 1 N
- 3.6. Solución de hidróxido de potasio 0,5 N
- 3.7. 1,2-dicloroetano p.a.
- 3.8. Eter de petróleo, puro, ebullición 30-50 °C. Si fuera necesario, purificar como se indica. Agitar 1 000 ml de éter de petróleo con porciones de 20 ml ácido sulfúrico concentrado hasta que el ácido se mantenga 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 500 ml de agua. Eliminar la capa acuosa, secar el éter durante 1 hora sobre carbón activo y sulfato de sodio de aluminio, filtrar y destilar.
- 3.9. Óxido de aluminio, estandarizado según Brockmann: calcinar durante 8 h a 750 °C, refrigerar en desecador y conservar en frasco de cristal marrón, de tapón esmerilado. Antes del empleo en cromatografía, humedecer como se indica: introducir en un frasco de cristal marrón 10 g de óxido de aluminio y 0,7 ml de agua, tapar herméticamente, volver a calentar durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo siempre con energía. Dejar refrigerar agitándolo. Comprobar la actividad del óxido de aluminio así preparado sometiendo al análisis según 5.3 y 5.4 una cantidad conocida de retinol de calibrado patrón muestra (3.17)
- 3.10. Óxido de aluminio básico, grado de actividad I
- 3.11. Eter dietílico, puro. Eliminar los peróxidos y los restos de agua mediante cromatografía sobre columna de óxido de aluminio básico (3.10) (25 g de óxido de aluminio para 250 ml de éter dietílico)
- 3.12. Soluciones de éter de petróleo (3.8) al 4, 8, 12, 16 y 20 % (v/v) de éter dietílico (3.11)
- 3.13. Solución de sulfuro de sodio 0,5 moles en la glicerina al 70 % (v/v) preparada a partir del sulfuro de sodio p.a.

b) utilizados exclusivamente para el análisis de los productos del grupo A

- 3.14. Benceno p.a., cristalizable
- 3.15. Cloroformo p.a. Eliminar el etanol, el fosgeno y los restos de agua mediante cromatografía sobre columna de óxido de aluminio básico (3.10) (50 g de óxido de aluminio para 200 ml de cloroformo) conviene cromatografiar una segunda vez los 50 primeros ml del eluido)
- 3.16. Reactivo según Carr-Price. Agitar 25 g aproximadamente de tricloruro de antimonio p.a. (conservado en desecador) con 100 ml de cloroformo (3.15) hasta la saturación de la solución. Un paso débil de tricloruro no estorba. Añadir 2 ml de anhídrido acético p.a. Conservar en el frigorífico en un frasco de cristal marrón con tapón esmerilado. Período de conservación: varias semanas
- 3.17. Retinol de muestra patrón, controlado por espectrofotometría

c) utilizados exclusivamente para el análisis de los productos del grupo B

- 3.18. Isopropanol, para cromatografía

4. Equipo

- 4.1. Baño de agua
- 4.2. Aparato rotativo de evaporación en vacío, con matraces redondos de diferentes capacidades
- 4.3. Tubos para cromatografía, de cristal (longitud: 300 mm, diámetro interior: 13 mm aproximadamente)
- 4.4. Espectrofotómetro con cubetas de 10 mm de espesor (de cuarzo para mediciones en l'UV)
- 4.5. Lámpara UV, 365 nm

5. Método operatorio

N.B. Las manipulaciones no deben hacerse bajo la luz directa, si fuera necesario en un aparato de cristal marrón

5.1. Toma de muestras

Efectuar una toma de muestras de la muestra finamente dividida, proporcional al contenido supuesto en vitamina A, o sea:

- 0,1 a 1,0 g para las concentraciones (contenidos superiores a 20 000 UI/kg),
- 3,0 a 5,0 g para las premezclas (contenidos comprendidos entre 400 y 20 000 UI/g),
- 10 a 20 sg para las mezclas minerales,
- 30 g para los productos del grupo A.

Introducir inmediatamente la toma de muestras en un matraz de 500 ml de tapón esmerilado.

5.2. Hidrólisis y extracción ⁽¹⁾

Añadir sucesivamente a la toma de muestras 40 ml de etanol (3.1.), 2 ml de solución de ascorbato de sodio (3.2) ⁽¹⁾, 10 ml de solución de hidróxido de potasio (3.4.) y 2 ml de solución de sulfuro de sodio (3.13).

Calentar durante 30 minutos a 70-80 °C bajo refrigerante de reflujo y dejar refrigerar a continuación bajo corriente de agua. Añadir 50 ml de etanol (3.1) y 100 ml (tomados con la pipeta) de 1,2-dicloroetano (3.7). Agitar enérgicamente y decantar el líquido sobrenadante en una ampolla de decantación. Añadir en la ampolla 150 ml de solución de hidróxido de potasio (3.5), agitar durante 10 segundos y dejar reposar hasta la separación de las fases. Recoger la fase de dicloroetano (fase inferior) en una ampolla de decantación, añadir 40 ml de solución de hidróxido de potasio (3.6), agitar durante 10 segundos y dejar reposar hasta la separación de las fases. Recoger la fase dicloroetano en una ampolla de decantación y lavar 6 a 8 veces con ayuda de porciones de 40 ml de agua, hasta la ausencia de álcali (prueba de fenoltaleína). Recoger la fase dicloroetano y eliminar los últimos restos de agua con ayuda de bandas de papel filtro.

Evaporar en seco una parte alícuota de la solución, en vacío y sobre baño de agua a la temperatura de 40 °C. Recoger rápidamente el residuo con 5 ml de éter de petróleo (3.8).

Para los productos del grupo A, cromatografiar como se indica en 5.3.1.

Para los productos del grupo B, transvasar la solución a un matraz aforado de 50 ml, completar al volumen con éter de petróleo (3.8) homogeneizar y medir la densidad óptica como se indica en 5.4.2.

5.3. Cromatografía

5.3.1. Productos del grupo A

Llenar un tubo para cromatografía (4.3.), hasta una altura de 200 mm, de óxido de aluminio (3.9) previamente impregnado de éter de petróleo (3.8). Introducir en el tubo la solución en 5.2 y añadir inmediatamente 20 ml de éter de petróleo (3.8). Eluir sucesivamente por porcio-

⁽¹⁾ Para los alimentos de lactancia y los productos que tienen tendencia a aglomerarse o a hincharse, *duplicar* la cantidad de reactivos indicados en 5.2 primer y segundo párrafo.

⁽²⁾ La adición de ascorbato de sodio no es necesaria cuando la hidrólisis se efectúe en atmósfera de nitrógeno.

nes de 10 ml de las soluciones de éter de petróleo al 4, 8, 12, 16 y 20 por ciento de éter dietílico (3.12), en vacío parcial o bajo presión, la velocidad de salida habrá de ser de 2 a 3 gotas por segundo.

El caroteno se eluirá en primer lugar (¹). El retinol se eluye generalmente por la solución de éter de petróleo al 20 por ciento de éter dietílico (3.12). La elusión se controla bajo luz UV (breve irradiación de la columna por una lámpara de mercurio). La banda fluorescente del retinol se separa netamente de las bandas amarillas de xantófila que la siguen. Recoger la fracción del eluido que contiene el retinol en un erlenmeyer.

5.3.2. *Productos del grupo B*

La cromatografía sólo debe efectuarse cuando las mediciones de la densidad óptica obtenidas en 5.4.2 no sean conformes con las disposiciones indicadas en 5.4.2.

Si se hiciese patente la cromatografía, introducir en la columna cromatográfica una parte alícuota de la solución en el éter de petróleo obtenido en 5.2, con un contenido de aproximadamente 500 UI de retinol, y cromatografiar como se indica en 5.3.1.

5.4. *Medición de la densidad óptica*

5.4.1. *Productos del grupo A*

Evaporar en seco, en vacío, el eluado que contiene el retinol, obtenido en 5.3.1. Recoger el residuo con 2 ml de benceno (3.14). Tomar 0,3 ml de dicha solución y añadir 3 ml del reactivo según Carr-Price (3.16). Se desarrolla una coloración azul. Medir la densidad óptica mediante el espectrómetro a 610 nm, 30 segundos exactamente después del principio de reacción. Determinar el contenido en retinol, refiriéndose a una curva de calibrado obtenida a partir de soluciones bencénicas de concentraciones crecientes en retinol de patrón tratados con el reactivo según Carr-Price [de 2 a 16 UI de vitamina A de patrón (3.17) con 0,3 ml de benceno (3.14) + 3 ml de reactivo según Carr-Price (3.16)]. La curva de calibrado debe controlarse regularmente y durante breves intervalos de tiempo con la ayuda de la muestra y de una solución recién preparada del reactivo según Carr-Price.

5.4.2. *Productos del grupo B*

Tomar la parte alícuota de la solución en el éter de petróleo obtenido en 5.2, con un contenido aproximado de 200 UI de retinol. Evaporar en seco, en vacío, y recoger el residuo con 25 ml de isopropanol (3.18). Medir la densidad óptica con el espectrofotómetro a 325, 310 y 334 nm. El máximo de absorción se sitúa a 325 nm. El contenido en retino A de la solución se calcula tal como sigue:

$$E_{325} \cdot 18,30 = \text{UI de retinol}$$

Sin embargo, las relaciones de las densidades ópticas

$$E_{310} : E_{325} \text{ y } E_{334} : E_{325}$$

deben ser de 6 : 7 = 0,857.

Cuando una de dichas relaciones se separe sensiblemente de dicho valor ((0,830 u) 0,880), la medición de las densidades ópticas debe precederse por una cromatografía, según el procedimiento indicado en 5.3.2. Si la medición de las densidades ópticas efectuada tras la cromatografía indica que las relaciones antes mencionadas se separan todavía de forma sensible del valor 0,857 ((0,830 ó) 0,880), la determinación debe efectuarse según el procedimiento indicado para los productos del grupo A.

6. *Cálculo de los resultados*

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

(¹) El contenido de caroteno puede determinarse por la medida de la densidad óptica a 450 nm; $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 2 600$.

Repetibilidad

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

- del 20 %, en valor relativo, para los contenidos en retinol inferiores a 75 000 UI/kg,
- de 15 000 UI para los contenidos comprendidos entre 75 000 y 150 000 UI/kg,
- del 10 %, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre 150 000 y 250 000 UI/kg,
- de 25 000 UI para los contenidos comprendidos entre 250 000 y 500 000 UI/kg,
- del 5 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 500 000 UI/kg.

2. DETERMINACIÓN DE LA TIAMINA (ANEURINA, VITAMINA B₁)

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar la tiamina (aneurina, vitamina B₁) en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 5 ppm.

2. Principio

La muestra se trata en caliente con ácido sulfúrico diluido e hidrolizado a continuación por vía enzimática. La solución obtenida se somete a una oxidación alcalina. El tiocromo formado se extrae por el isobutanol y se determina por fluorimetría.

3. Reactivos

- 3.1. Solución de patrón de tiamina a 100 µg/ml: disolver 112,3 mg de clorhidrato de tiamina muy puro, previamente desecado en vacío hasta llegar a peso constante, en 1 000 ml de ácido sulfúrico 0,2 N (3.2). En frío y en la oscuridad, dicha solución se mantiene estable durante un mes.
- 3.2. Ácido sulfúrico 0,2 N
- 3.3. Metabisulfito de sodio, Na₂S₂O₃, puro
- 3.4. Solución al 20 % (p/v) de ferricianuro de potasio p.a.
- 3.5. Solución al 25 por ciento (p/v) de hidróxido de potasio p.a.
- 3.6. Mezcla oxidante: mezclar 2 ml de solución de ferricianuro de potasio (3.4) con 48 ml de solución de hidróxido de potasio (3.5). Dicha mezcla no se conserva más de 4 horas
- 3.7. Isobutanol, p.a.
- 3.8. Solución de acetato de sodio 2,5 N
- 3.9. Preparación multienzimática con contenido en proteasa, fosfatasa y amilasa (por ejemplo clorasa)
- 3.10. Etanol de 96 % (v/v)

4. Equipo

- 4.1. Baño de agua
- 4.2. Centrifugadora (3 500 t/m) con tubos de 30 a 50 ml, provistos de tapones esmerilados
- 4.3. Fluorímetro

5. Método operatorio

5.1. Hidrólisis enzimática

Introducir en dos matraces aforados A y B de 250 ml unas cantidades idénticas de la muestra finamente dividida, con un contenido de 100 µg aproximadamente de tiamina y 125 ml de ácido sulfúrico (3.2). Añadir además, *en el matraz A solamente*, 1,0 ml de solución de muestra (3.1) (muestra interna).

Agitar vigorosamente, llevar a los matraces sobre un baño de agua hirviendo y mantenerlos allí durante 15 minutos agitándolo de vez en cuando. Dejar refrigerar hasta 45 °C aproximadamente. Añadir en cada matraz 20 ml de solución de acetato de sodio (3.8) y 0,5 g de preparación multienzimática (3.9), dejar reposar a continuación durante 20 minutos a la temperatura ambiente. Añadir 20 ml de solución de acetato de sodio (3.8), completar al volumen de agua, homogeneizar y filtrar. Recoger los filtrados A y B tras haber eliminado de ellos los 15 primeros ml. Preparar las soluciones siguientes.

5.1.1. Solución testigo T

Introducir en un tubo de centrifugar (4.2), 5 ml del filtrado A y 10 mg aproximadamente de metabisulfito de sodio (3.3). Sumergir el tubo durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo y dejar a continuación refrigerar hasta la temperatura ambiente.

5.1.2. Soluciones A (patrón interno) y B (muestra)

Introducir 5 ml del filtrado A en un tubo de centrifugar (4.2) y 5 ml del filtrado B en otro tubo de centrifugar (4.2).

5.2. Oxidación

Añadir a las soluciones T, A y B 5 ml de la mezcla oxidante (3.6) y, tras un minuto, 10 ml de isobutanol (3.7). Tapar los tubos y agitar vigorosamente durante 5 segundos. Dejar reposar durante un minuto y centrifugar para separar las fases. Tomar en cada tubo 5 ml de la fase isobutanólica sobrenadante, introducirlos respectivamente en matraces aforados de 25 ml, completar al volumen con etanol (3.10) y homogeneizar (= extractos T, A y B).

5.3. Medición de la fluorescencia

Efectuar las mediciones a la longitud de onda para lo cual da el fluorímetro una respuesta óptima a la fluorescencia del tiocromo. Irradiar a 365 nm aproximadamente.

Ajustar el instrumento a cero con ayuda del extracto T. Medir la intensidad de la fluorescencia de los extractos A y B.

6. Cálculo de los resultados

El contenido en µg de tiamina por kg de muestra viene dado por la fórmula:

$$\frac{d \cdot b}{(a - b) c}$$

en la cual:

a = intensidad de la fluorescencia del extracto A (patrón interno)

b = intensidad de la fluorescencia del extracto B (muestra)

c = peso de la toma de muestras en g

d = cantidad de tiamina en µg añadida a la toma de muestras (patrón interno).

Repetibilidad

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

del 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.

3. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y DEL ÁCIDO DESHIDROASCÓRBICO (VITAMINA C)

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite determinar la suma de los ácidos ascórbicos y deshidroascórbico (vitamina C) en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 5 ppm. Los productos se clasificarán aquí en dos grupos, según su supuesto contenido en vitamina C:

Grupo A: contenidos inferiores a 10 g/kg

Grupo B: contenidos iguales o superiores a 10 g/kg.

2. Principio

La muestra, puesta en suspensión en una solución diluida de ácido metafosfórico, se somete a la extracción mediante cloroformo. La fase acuosa se trata mediante una solución de 2,6-diclorofenol-indofenol, para transformar el ácido ascórbico en ácido deshidroascórbico, y a continuación mediante una solución de 2,4-dinitrofenilhidracina. La hidrazona formada se extrae mediante una mezcla de acetato de etilo, de ácido acético glacial o de acetona. La solución se cromatografía sobre una columna de gel de silicio, el eluido se evapora en seco y el residuo se disuelve en el ácido sulfúrico diluido. La densidad óptica de la solución se mide mediante el fotómetro de 509 nm.

Para productos del grupo A, el eluido, salido de la cromatografía sobre columna, está sometido, además, a una cromatografía sobre capa delgada para aislar la hidrazona.

3. Reactivos

- 3.1. Solución patrón al 0,05 por ciento de ácido L-ascórbico: disolver 50 mg de ácido L-ascórbico p.a. en 20 ml aproximadamente de solución de ácido metafosfórico (3.2) y completar a 100 ml con agua. Preparar inmediatamente antes de su empleo
- 3.2. Solución al 10 % (p/v) de ácido metafosfórico: disolver en el agua 200 g de ácido metafosfórico p.a., triturados en un mortero y completar a 2 000 ml con agua. Conservar a 4 °C. Renovar después de una semana
- 3.3. Cloroformo p.a.
- 3.4. Solución al 0,5 % (p/v) de 2,6-diclorofenol-indofenol p.a. Preparar inmediatamente antes de su empleo
- 3.5. Auxiliar de filtración (S. y S. n° 121 o equivalente)
- 3.6. Solución ácida al 2 % (p/v) de 2,4-dinitrofenilhidracina: disolver 2 g de 2,4-dinitrofenilhidracina en 100 ml de ácido sulfúrico diluido (25 ml de ácido sulfúrico p.a., d: 1,84, diluidos en 100 ml por el agua). En frío, dicha solución se conserva durante una semana
- 3.7. Nitrógeno, o
- 3.8. Anhídrido carbónico
- 3.9. Mezcla de acetato de etilo p.a./ácido acético glacial/acetona p.a.: 96/2/2 en vol
- 3.10. Mezcla de diclorometano p.a./ácido acético glacial: 97/3 en vol
- 3.11. Gel de silicio, granulometría: 0,05 a 0,2 mm
- 3.12. Gel de silicio H, según Stahl, para cromatografía en capa delgada
- 3.13. Acido sulfúrico diluido: introducir 105 ml de agua en un matraz aforado de 200 ml, completar al volumen mediante ácido sulfúrico p.a., d: 1,84
- 3.14. Disolvente de elución para cromatografía en capa delgada: mezclar 75 ml de éter dietílico p.a., 25 ml de acetato de etilo p.a. y 4,0 ml de ácido acético al 96 % (p/v) p.a. Renovar después de 2 o 3 cromatografías

4. Equipo

- 4.1. Baño de agua regulado a 20 °C por el ultratermostato
- 4.2. Centrifugadora (3 500 t/m) con tubos de 40 a 50 ml, provistos de tapones esmerilados.
- 4.3. Aparato rotativo, de evaporación en vacío, con matraces de 250 ml
- 4.4. Tubos para cromatografía, de cristal (magnitud: 100 mm, diámetro interior: 20 mm), con placa de vidrio poroso (por ejemplo tubos de Allihn)
- 4.5. Espectrofotometría o calorímetro de filtros, con cubetas de 10 mm de espesor
- 4.6. Equipo para cromatografía en capa fina, con placas de gel de silicio (3.12), espesor de capa: 0,5 a 0,6 mm (conviene emplear placas preparadas para su utilización). Secar las placas durante 2,30 h a 3 h en la estufa a 120-130 °C. Dejar refrigerar y conservar a continuación en desecador durante una hora al menos antes del empleo
- 4.7. Estufa, regulada a 120-130 °C.

5. Método operatorio

5.1. Extracción

Introducir en dos matraces aforados, A y B, de 250 ml de tapón esmerilado, unas cantidades idénticas de la muestra dividida finamente, con un contenido de 200 µg aproximadamente de vitamina C. Añadir, *en el matraz A sólo*, 0,4 ml de solución patrón (3.1) y homogeneizar sacudiendo ligeramente (patrón interno).

Añadir en cada matraz 30 ml de cloroformo (3.3) y 25 ml de solución de ácido metafosfórico (3.2) a 40 °C. Agitar brevemente y dejar reposar a continuación durante 10 o 15 minutos. Añadir 25 ml de agua, tapar los matraces, agitar vigorosamente durante 10 segundos y dejar reposar 10 a 15 minutos en el baño de agua (4.1). Centrifugar para separar la fase acuosa de la fase clorofórmica. Proseguir las operaciones simultáneamente sobre los extractos acuosos A (patrón interno) y B, como se indica a continuación.

5.2. Oxidación

Tomar con la pipeta 40 ml de la solución acuosa sobrenadante (ligeramente turbia) obtenida en 5.1, introducirlos en un tubo de reacción de tapón esmerilado, añadir 0,5 a 1 ml de solución de 2,6-diclorofenol-indofenol (3.4) y homogeneizar. Se forma una coloración roja que debe persistir 15 minutos al menos. Añadir a continuación 300 mg aproximadamente de auxiliar de filtración (3.5), agitar y filtrar sobre un filtro de pliegues seco. El filtrado no debe ser límpido necesariamente.

5.3. Reacción con la 2,4-dinitrofenilhidracina y extracción del hidrazono

Tomar con la pipeta 40 ml del filtrado obtenido en 5.2, introducirlos en un tubo de centrifugar (4.2), añadir 2 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidracina (3.6) y homogeneizar. Hacer pasar rápidamente una corriente de nitrógeno (3.7) o de ácido carbónico (3.8), tapar el tubo y sumergirlo durante 15 horas alrededor (una noche) en el baño de agua (4.1). Añadir a continuación 3 ml de agua, 20 ml de la mezcla acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9) y 800 mg aproximadamente de auxiliar de filtración (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 bajo presión reducida en el evaporador rotativo (4.3) hasta obtención de un residuo aceitoso. Disolver el residuo en 2 ml de la mezcla acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9) volviendo a calentar a 30 °C, dejar refrigerar, añadir 10 ml de la mezcla diclorometano/ácido acético glacial (3.10) y homogeneizar.

5.4. Cromatografía sobre columna

Llenar un tubo para cromatografía (4.4) hasta una altura de 30 mm, de la mezcla diclorometano/ácido acético glacial (3.10). Poner en suspensión (agitando vigorosamente) 5 g de gel de silicio (3.11) a 30 ml de la mezcla diclorometano/ácido acético glacial (3.10), verter la suspensión en el tubo. Dejar que se deposite y agitarlo después bajo una débil presión de nitrógeno (3.7).

Transvasar al tubo la solución obtenida en 5.3, lavar el matraz con una pequeña cantidad de la mezcla diclorometano/ácido acético glacial (3.10) y transvasar al tubo, rellenar éste a continuación con la mezcla (3.10) y proseguir el lavado de la columna con la misma mezcla (3 a 4 porciones de 5 ml aproximadamente) hasta la obtención de un eluido incoloro. Eliminar la fracción del eluido coloreado en amarillo.

Eluir la zona rojiza en la cabeza de la columna mediante la mezcla acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9), recoger el eluido y evaporarlo en seco.

5.4.1. *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 acético glacial/acetona (3.9) y proceder inmediatamente a la cromatografía en capa fina como se indica en el punto 5.5.

5.4.2. *Para los productos del grupo B (contenidos en vitamina C iguales o superiores a 10 g/kg)*, recoger el residuo aceitoso con 4,0 ml de ácido sulfúrico diluido (3.13), agitar vigorosamente para disolver completamente el residuo y proceder a la medición de la densidad óptica indicada en 5.6.

5.5. *Cromatografía en capa fina*

Efectuar las operaciones indicadas a continuación por duplicado. Dejar que se deposite en forma de marca sobre la placa de cromatografía en capa fina (4.6) 0,5 ml de solución obtenida en 5.4.1. Desarrollar durante 20 minutos como mínimo en el ácido del disolvente de elución (3.14), en cubeta saturada, hasta la separación clara de la zona del hidrozono de color rosa. Dejar secar al aire. Delimitar la zona rosa, rasparla con una espátula y transvasar cuantitativamente la masa pulverizada a un tubo para cromatografía (4.4).

Eluir sucesivamente una vez mediante 2 ml y dos veces mediante 1,5 ml de la mezcla acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9). Recoger el eluido en un pequeño matraz (la última fracción debe ser incolora). Evaporar en seco, recoger el residuo aceitoso mediante 4,0 ml de ácido sulfúrico diluido (3.13), agitar vigorosamente para disolver completamente el residuo y proceder a la medición de la densidad óptica.

5.6. *Medición de la densidad óptica*

Medir la densidad óptica mediante el fotómetro a 509 nm, 20 o 30 minutos después de haberse puesto en solución el residuo en el ácido sulfúrico. Efectuar las mediciones por comparación con el ácido sulfúrico diluido (3.13).

5.7. *Prueba en blanco*

Efectuar una prueba en blanco aplicando el mismo método operatorio no existiendo muestra.

6. **Cálculo de los resultados**

El contenido en g de vitamina C por kg de muestra está dado por la fórmula:

$$\frac{(c - a) \cdot 2}{(b - c) \cdot 10 d}$$

en la que:

- a = densidad óptica del blanco
- b = densidad óptica de la solución del patrón interno
- c = densidad óptica de la solución de la muestra
- d = peso en gramos de la toma de muestras

Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder del 10 % en valor relativo, para los contenidos en vitamina C inferiores a 10 g/kg y del 5 % en valor relativo, para todos los contenidos iguales o superiores a 10 g/kg.
