

DIRECTIVA 98/64/CE DE LA COMISIÓN

de 3 de septiembre de 1998

por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para determinar la existencia de aminoácidos, de grasa bruta y de olaquinox en los alimentos para animales y se modifica la Directiva 71/393/CEE

(Texto pertinente a los fines del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos para la toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el acta de adhesión de Austria, de Finlandia y de Suecia, y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la Directiva 70/373/CEE establece que los controles oficiales de los alimentos para animales, efectuados con objeto de comprobar que se cumplen las condiciones prescritas por las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas referentes a la calidad y la composición de los piensos, se efectúan siguiendo métodos comunitarios de toma de muestras y de análisis;

Considerando que la Directiva 79/373/CEE del Consejo, de 2 de abril de 1979, relativa a la comercialización de piensos compuestos ⁽²⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 97/47/CE de la Comisión ⁽³⁾, y la Directiva 93/74/CEE del Consejo, de 13 de septiembre de 1993, relativa a los alimentos para animales destinados a objetivos de nutrición específicos ⁽⁴⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 96/25/CE ⁽⁵⁾, establecen que los aminoácidos y la grasa bruta declararse en el etiquetado de los piensos;

Considerando que la Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal ⁽⁶⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 98/19/CE de la Comisión ⁽⁷⁾, dispone que la presencia de olaquinox debe señalarse en el etiquetado cuando se añada esta sustancia a los piensos compuestos;

Considerando que la segunda Directiva 71/393/CEE de la Comisión, de 18 de noviembre de 1971, por la que se establecen métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽⁸⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 84/

4/CEE ⁽⁹⁾, establece los métodos de análisis para determinar, entre otros aspectos, el contenido de grasa bruta; que es oportuno modificar el método descrito;

Considerando que es necesario fijar métodos de análisis comunitarios para el control de estas sustancias;

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

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros ordenarán que los análisis previstos para los controles oficiales de los piensos, respecto a su contenido en aminoácidos, materia grasa bruta y olaquinox se efectúen siguiendo los métodos que se describen en el anexo.

Artículo 2

El punto 4 («Determinación de las materias grasas brutas») del anexo de la Directiva 71/393/CEE de la Comisión se sustituirá por la parte B del anexo de la presente Directiva..

Artículo 3

1. A más tardar el 31 de diciembre de 1998, los Estados miembros adoptarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a la presente Directiva. Informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Aplicarán esas disposiciones a partir del 1 de enero de 1999.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

⁽¹⁾ DO L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

⁽²⁾ DO L 86 de 6. 4. 1979, p. 30.

⁽³⁾ DO L 211 de 5. 8. 1997, p. 45.

⁽⁴⁾ DO L 237 de 22. 9. 1993, p. 23.

⁽⁵⁾ DO L 125 de 23. 5. 1996, p. 35.

⁽⁶⁾ DO L 270 de 14. 12. 1970, p. 1.

⁽⁷⁾ DO L 96 de 28. 3. 1998, p. 39.

⁽⁸⁾ DO L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

⁽⁹⁾ DO L 15 de 18. 1. 1984, p. 28.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones básicas de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la present Directiva.

Artículo 4

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Artículo 5

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 3 de septiembre de 1998.

Por la Comisión

Franz FISCHLER

Miembro de la Comisión

ANEXO

PARTE A

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

1. **Objetivo y ámbito**

Este método sirve para la determinación de aminoácidos libres (sintéticos y naturales) y totales (libres y unidos en péptidos) en los alimentos para animales, utilizando un analizador de aminoácidos. Es aplicable a los siguientes aminoácidos: cistina y cisteína, metionina, lisina, treonina, alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina y valina.

El método no distingue entre las sales de los aminoácidos y tampoco diferencia las formas D y L de los aminoácidos. No es válido para determinar el triptófano ni los análogos hidroxilados de los aminoácidos.

2. **Principio**2.1. *Aminoácidos libres*

Los aminoácidos libres se extraen con ácido clorhídrico diluido. Las macromoléculas nitrogenadas extraídas a la vez se precipitan con ácido sulfosalicílico y se eliminan mediante filtración. El pH de la solución filtrada se ajusta a 2,20. Los aminoácidos se separan por cromatografía de intercambio iónico y determinan mediante reacción con ninhidrina con detección fotométrica a 570 nm.

2.2. *Aminoácidos totales*

El procedimiento elegido depende de los aminoácidos estudiados. La cistina, cisteína y metionina deben oxidarse a ácido cisteico y metionina sulfona antes de la hidrólisis. La tirosina debe determinarse en hidrolizados de muestras no oxidadas. Todos los demás aminoácidos citados en el apartado 1 pueden determinarse tanto en muestras oxidadas como no oxidadas.

La oxidación se realiza a 0 °C con una mezcla de ácido perbórmico/fenol. El exceso de reactivo oxidante se descompone con disulfito sódico. La muestra oxidada o no oxidada se hidroliza con ácido clorhídrico (c = 6 mol/l) durante 23 horas. El pH del hidrolizado se ajusta a 2,20. Los aminoácidos se separan por cromatografía de intercambio iónico y se determinan mediante reacción con ninhidrina utilizando detección fotométrica a 570 nm (440 nm en el caso de la prolina).

3. **Reactivos**

Debe utilizarse agua bidestilada o agua de calidad equivalente (conductividad < 10 µS).

- 3.1. Peróxido de hidrógeno, w = 30 %.
- 3.2. Ácido fórmico, w = 98-100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Disulfito sódico.
- 3.5. Hidróxido sódico.
- 3.6. Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado.
- 3.7. Ácido clorhídrico, densidad aproximada 1,18 g/ml.
- 3.8. Citrato trisódico dihidratado.
- 3.9. 2,2'-Tiodietanol (tiodiglicol).
- 3.10. Cloruro sódico.
- 3.11. Ninhidrina.
- 3.12. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40-60 °C.
- 3.13. Norleucina, u otro compuesto adecuado para utilizarse como patrón interno.
- 3.14. Nitrógeno gas (< 10 ppm de oxígeno).

- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Aminoácidos.
- 3.16.1. Sustancias patrón citadas en el apartado 1. Compuestos puros sin agua de cristalización. Desecar en vacío sobre P_2O_5 o H_2SO_4 durante 1 semana antes de su utilización.
- 3.16.2. Ácido cisteico.
- 3.16.3. Metionina sulfona.
- 3.17. Solución de hidróxido sódico, $c = 7,5$ mol/l:
Disolver 300 g NaOH (3.5) en agua y enrasar a 1 litro.
- 3.18. Solución de hidróxido sódico, $c = 1$ mol/l:
Disolver 40 g NaOH (3.5) en agua y enrasar a 1 litro.
- 3.19. Solución de ácido fórmico y fenol.
Mezclar 889 g de ácido fórmico (3.2) con 111 g de agua y añadir 4,73 g de fenol (3.3).
- 3.20. Mezcla de hidrólisis, $c = 6$ mol de HCl/l con 1 g de fenol/l.
Añadir 1 g de fenol (3.3) a 492 ml de HCl (3.7) y enrasar a 1 litro con agua.
- 3.21. Mezcla de extracción, $c = 0,1$ mol HCl/l con 2 % de tiodiglicol.
Tomar 8,2 ml de HCl (3.7), mezclar en unos 900 ml de agua, añadir 20 ml de tiodiglicol (3.9) y enrasar a 1 litro con agua (no mezclar 3.7 y 3.9 directamente).
- 3.22. Ácido 5-sulfosalicílico, $\beta = 6$ %.
Disolver 60 g de ácido 5-sulfosalicílico (3.6) en agua y enrasar a 1 l con agua.
- 3.23. Mezcla de oxidación (ácido per fórmico y fenol):
Mezclar 0,5 ml de peróxido de hidrógeno (3.1) con 4,5 ml de solución de ácido fórmico y fenol (3.19) en un pequeño vaso. Incubar a 20-30 °C durante 1 hora a fin de que se forme ácido per fórmico, enfriar a continuación sobre baño de hielo y agua (15 min) antes de añadir a la muestra.
Precaución: debe evitarse el contacto con la piel y es obligatorio llevar vestimenta de protección.
- 3.24. Solución tampón de citrato, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, $pH = 2,20$:
Disolver 19,61 g de citrato sódico (3.8), 5 ml de tiodiglicol (3.9), 1 g de fenol (3.3) y 16,50 ml de HCl (3.7) en unos 800 ml de agua. Ajustar el pH a 2,20. Enrasar a 1 litro con agua.
- 3.25. Soluciones tampón de elución, preparadas según las condiciones del analizador utilizado (4.9).
- 3.26. Reactivo de ninhidrina, preparado según las condiciones del analizador utilizado (4.9).
- 3.27. Soluciones patrón de aminoácidos. Estas soluciones deben conservarse a temperatura inferior a 5 °C.
- 3.27.1. Solución patrón madre de aminoácidos (3.16.1) $c = 2,5$ μ mol/ml de cada uno en ácido clorhídrico. Puede obtenerse en el comercio.
- 3.27.2. Solución patrón madre de ácido cisteico y metionina sulfona, $c = 1,25$ μ mol/ml.
Disolver 0,2115 g de ácido cisteico (3.16.2) y 0,2265 g de metionina sulfona (3.16.3) en solución tampón de citrato (3.24) en un matraz aforado de 1 l y enrasar con solución tampón de citrato. Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 12 meses. Esta solución no se utiliza si la solución patrón madre (3.27.1) contiene ácido cisteico y metionina sulfona.
- 3.27.3. Solución patrón madre del patrón interno, por ejemplo, norleucina, $c = 20$ μ mol/ml.
Disolver 0,6560 g de norleucina (3.13) en solución tampón de citrato (3.24) en un matraz aforado y enrasar a 250,0 ml con solución tampón de citrato. Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 6 meses.

Véanse asimismo las observaciones del punto 9.1.
- 3.27.4. Solución de calibración de los aminoácidos patrón para utilizar con los hidrolizados, $c = 5$ nmol/50 μ l de ácido cisteico y metionina sulfona y $c = 10$ nmol/50 μ l de los demás aminoácidos.

Disolver 2,2 g de cloruro sódico (3.10) en un vaso de 100 ml con 30 ml de solución tampón de citrato (3.24). Añadir 4,00 ml de solución patrón madre de aminoácidos (3.27.1), 4,00 ml de solución patrón madre de ácido cisteico y metionina sulfona (3.27.2) y 0,50 ml de solución patrón madre de patrón interno (3.27.3) si se utilizan. Ajustar el pH a 2,20 con hidróxido sódico (3.18).

Pasar cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con solución tampón de citrato (3.24) y homogeneizar.

Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 3 meses.

Zie ook opmerking 9.1.

- 3.27.5. Solución de calibración de los aminoácidos patrón para utilizar con los hidrolizados preparados según el apartado 5.3.3.1 y para utilizar con los extractos (5.2). La solución de calibración se prepara con arreglo a 3.27.4 pero omitiendo el cloruro sódico.

Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 3 meses.

4. Equipo

- 4.1. Matraz redondo de 100 o 250 ml con condensador de reflujo.
- 4.2. Frasco de vidrio borosilicatado de 100 ml con tapón de rosca con junta de goma/teflón (por ejemplo Duran, Schott) para utilizar en estufa.
- 4.3. Estufa con ventilación forzada y con una regulación de la temperatura que presente una precisión superior a ± 2 °C.
- 4.4. pH-metro (lectura con tres decimales).
- 4.5. Filtro de membrana (0,2 μm).
- 4.6. Centrífuga.
- 4.7. Evaporador rotatorio de vacío.
- 4.8. Agitador mecánico o magnético.
- 4.9. Analizador de aminoácidos o equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución con columna de intercambio de iones con sistemaresimas de derivación post columna con ninhidrina y detector fotométrico.

La columna se rellena con resinas de poliestireno sulfonado capaces de separar los aminoácidos entre sí y de otros materiales que reaccionen con la ninhidrina. El flujo de la solución tampón y de la solución de ninhidrina se regula mediante bombas con una estabilidad del flujo de $\pm 0,5$ %, en el período que abarca tanto la fase de calibración del patrón como el análisis de la muestra.

Con algunos analizadores de aminoácidos pueden utilizarse métodos de hidrólisis en que el hidrolizado presenta una concentración de sodio de $c = 0,8$ mol/l y contiene todo el ácido fórmico residual de la fase de oxidación. Otros no proporcionan una separación satisfactoria de determinados aminoácidos si el hidrolizado contiene ácido fórmico en exceso o elevadas concentraciones de ión sodio. En este caso, el volumen de ácido se reduce por evaporación hasta aprox. 5 ml después de la hidrólisis y antes del ajuste del pH. La evaporación debe realizarse en vacío a 40 °C. como máximo.

5. Procedimiento

5.1. Preparación de la muestra

La muestra se tritura hasta pasar por un tamiz de 0,5 mm. Las muestras con humedad elevada deben secarse al aire a una temperatura no superior a 50 °C o bien liofilizarse antes de la trituración. Las muestras con un elevado contenido en grasas deben someterse a extracción con éter de petróleo (3.12) antes de la trituración.

5.2. Determinación de los aminoácidos libres en alimentos para animales y premezclas

Pesar con precisión de 0,2 mg una cantidad adecuada (1-5 g) de la muestra preparada (5.1), en un matraz cónico y añadir 100,0 ml de mezcla de extracción (3.21). Agitar la mezcla durante 60 min utilizando un agitador mecánico o magnético (4.8). Dejar que sedimente y pasar con pipeta 10,0 ml de la solución sobrenadante a un vaso de 100 ml.

Añadir 5,0 ml de solución de ácido sulfosalicílico (3.22), agitando y prolongando la agitación con agitador magnético durante 5 min. Filtrar o centrifugar el sobrenadante para eliminar el posible precipitado. Poner 10,0 ml de la solución resultante en un vaso de 100 ml y ajustar el pH a 2,20 con solución de hidróxido sódico (3.18), pasar a un matraz aforado de volumen adecuado con solución tampón de citrato (3.24) y enrasar con esta misma solución tampón.

Si se utiliza un patrón interno, añadir 1,00 ml de patrón interno (3.27.3) por cada 100 ml de solución final y enrasar con la solución tampón (3.24).

Pasar a la fase de cromatografía según el punto 5.4.

Si los extractos no se someten a cromatografía el mismo día, deben conservarse a menos de 5 °C.

5.3. *Determinación de los aminoácidos totales*

5.3.1. Oxidación

Pesar con precisión de 0,2 mg entre 0,1 y 1 g de la muestra preparada (5.1) en:

- un matraz redondo de 100 ml (4.1) para hidrólisis abierta (5.3.2.3), o
- un matraz redondo de 250 ml (4.1) si se requiere una baja concentración de sodio (5.3.3.1), o bien
- un frasco de 100 ml con tapón de rosca (4.2) para hidrólisis cerrada (5.3.2.4).

La muestra pesada debe tener un contenido en nitrógeno de unos 10 mg y un contenido en agua no superior a 100 mg.

Colocar el frasco o el matraz en un baño de hielo y agua a 0 °C, añadir 5 ml de mezcla de oxidación (3.23) y mezclar con una espátula de vidrio con el extremo doblado. Cerrar el frasco/matraz, con la espátula dentro, mediante una película impermeable al aire, colocar el baño de hielo y agua con el recipiente cerrado en un frigorífico a 0 °C y dejar durante 16 horas. Después de este tiempo, sacar del frigorífico y descomponer el exceso de reactivo de oxidación mediante la adición de 0,84 g de disulfito sódico (3.4).

Pasar 5.3.2.1.

5.3.2. Hidrólisis

5.3.2.1. Hidrólisis de las muestras oxidadas

Añadir 25 ml de mezcla de hidrólisis (3.20) a la muestra oxidada preparada según 5.3.1, procurando arrastrar cualquier residuo de muestra que hubiera quedado adherido a las paredes del recipiente y a la espátula. Según el procedimiento de hidrólisis utilizado, pasar a 5.3.2.3 o a 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hidrólisis de muestras no oxidadas

Pesar en un matraz redondo de 100 ml o 250 ml (4.1) o en un frasco de 100 ml con tapón de rosca (4.2), con precisión de 0,2 mg, entre 0,1 y 1 g de la muestra preparada (5.1). La porción pesada de la muestra debe tener un contenido en nitrógeno de unos 10 mg. Añadir cuidadosamente 25 ml de la mezcla de hidrólisis (3.20) y homogeneizar con la muestra. Pasar al punto 5.3.2.3 o al 5.3.2.4, según proceda.

5.3.2.3. Hidrólisis abierta:

Añadir 3 perlas de vidrio a la mezcla del matraz (preparada según 5.3.2.1 o 5.3.2.2) y llevar a ebullición con borboteo continuo y reflujo durante 23 horas. Al terminar la hidrólisis, lavar el condensador con 5 ml de solución tampón de citrato (3.24). Desconectar el matraz y enfriarlo en un baño de hielo. Pasar a 5.3.3.

5.3.2.4. Hidrólisis cerrada

Colocar el frasco con la mezcla preparada según 5.3.2.1 o el 5.3.2.2 en una estufa (4.3) a 110 °C. Durante la primera hora, a fin de evitar que se genere presión (debido a la producción de sustancias gaseosas) y haya peligro de explosión, poner el tapón de rosca encima del recipiente, *sin cerrarlo*. Al cabo de una hora cerrar el frasco con el tapón y dejar en la estufa (4.3) durante 23 horas. Una vez terminada la hidrólisis, sacar el frasco de la estufa, abrir cuidadosamente el tapón del frasco y colocar éste en un baño de hielo y agua. Dejar enfriar.

En función del método de ajuste del pH (5.3.3), pasar cuantitativamente el contenido del frasco a un vaso de 250 ml o a un matraz redondo de 250 ml, utilizando solución tampón de citrato (3.24).

Pasar a 5.3.3.

5.3.3. Ajuste del pH

En función de la tolerancia al sodio del analizador de aminoácidos (4.9) pasar a 5.3.3.1 o a 5.3.3.2 para ajustar el pH.

5.3.3.1. En caso de sistemas cromatográficos (4.9) que requieran una baja concentración de sodio:

Es recomendable utilizar una solución madre del patrón interno (3.27.3) si se utilizan analizadores de aminoácidos que requieran una baja concentración de sodio (cuando haya que reducir el volumen de ácido).

En este caso, añadir 2,00 ml de la solución madre de patrón interno (3.27.3) al hidrolizado antes o después de la evaporación.

Añadir 2 gotas de 1-octanol (3.15) al hidrolizado obtenido según 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

Mediante un evaporador rotatorio (4.7) reducir el volumen a 5-10 ml en vacío a 40 °C. Si el volumen se reduce accidentalmente a menos de 5 ml, debe desecharse el hidrolizado y volver a empezar el análisis.

Ajustar el pH a 2,20 con solución de hidróxido sódico (3.18) y pasar a 5.3.4.

5.3.3.2. En caso de cualquier otro analizador de aminoácidos (4.9)

Tomar los hidrolizados obtenidos de acuerdo con 5.3.2.3 o 5.3.2.4 y neutralizarlos parcialmente mediante la adición cuidadosa y con agitación de 17 ml de solución de hidróxido sódico (3.17), asegurándose de que la temperatura se mantiene por debajo de 40 °C.

Ajustar el pH a 2,20 a temperatura ambiente con solución de hidróxido sódico (3.17) y solución de hidróxido sódico (3.18). Pasar a 5.3.4.

5.3.4. Solución de muestra para cromatografía

Pasar cuantitativamente el hidrolizado con el pH ajustado (5.3.3.1 o 5.3.3.2) con solución tampón de citrato (3.24) a un matraz aforado de 200 ml y enrasar con solución tampón (3.24).

Si aún no se ha utilizado un patrón interno, añadir 2,00 ml de patrón interno (3.27.3) y enrasar con solución tampón de citrato (3.4). Homogeneizar perfectamente.

Pasar a la fase de cromatografía (5.4).

Si las soluciones de muestra no se van a cromatografiar el mismo día, deben conservarse a menos de 5 °C.

5.4. Cromatografía

Antes de realizar la cromatografía, llevar el extracto (5.2) o el hidrolizado (5.3.4) a temperatura ambiente. Agitar la mezcla y filtrar una cantidad adecuada a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (4.5). La solución clara obtenida se somete a cromatografía de intercambio iónico, utilizando un analizador de aminoácidos (4.9).

La inyección puede realizarse de forma manual o automática. Es importante que siempre se añada a la columna la misma cantidad de solución ± 0,5 % para el análisis de patrones y muestras, excepto cuando se utilice un patrón interno, y que la relación entre sodio y aminoácidos en las soluciones patrón y de muestra sea lo más similar posible.

La frecuencia de las calibraciones depende de la estabilidad del reactivo de ninhidrina y del sistema analítico en general. El patrón o la muestra se diluyen con solución tampón de citrato (3.24) para conseguir un área bajo el pico del patrón de 30-200 % del área bajo el pico del aminoácido correspondiente de la muestra.

La cromatografía de aminoácidos puede variar ligeramente según el tipo de analizador empleado y la resina utilizada. El sistema elegido debe ser capaz de separar los aminoácidos entre sí y de otros materiales que reaccionan con la ninhidrina. En el intervalo de funcionamiento, el sistema cromatográfico debe proporcionar una respuesta lineal a los cambios en las cantidades de aminoácidos que se añadan a la columna.

Durante la fase de cromatografía, se aplicarán las relaciones altura del valle/altura del pico que se mencionan más abajo, cuando se analice una solución equimolar (de los aminoácidos determinados). Esta solución equimolar debe contener al menos el 30 % de la carga máxima de cada aminoácido que puede medirse con precisión mediante el sistema de análisis de aminoácidos (4.9).

Para separar la treonina de la serina, la relación altura del valle/altura del pico del más bajo de los dos aminoácidos que se solapan en el cromatograma no debe pasar de 2/10 (si sólo se determinan cistina, cisteína, metionina, treonina y lisina, la insuficiente separación entre picos consecutivos afectará negativamente el resultado de la determinación). Respecto a los demás aminoácidos, la separación debe ser mejor que 1/10.

El sistema debe garantizar que la lisina se separa de los «artefactos de lisina» y de la ornitina.

6. Cálculo de los resultados

Las áreas de los picos correspondientes a la muestra y al patrón se miden para cada aminoácido y se calcula la cantidad correspondiente en g de aminoácidos por kg de muestra.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1000} = \text{g de aminoácido por kg de muestra}$$

Si se utiliza un patrón interno, debe multiplicarse por $\frac{D}{C}$

- A = área del pico, hidrolizado o extracto
 B = área del pico, solución patrón de calibración
 C = área del pico, patrón interno en el hidrolizado o extracto
 D = área del pico, patrón interno, solución patrón de calibración
 MW = peso molecular
 E = concentración del patrón en $\mu\text{mol/ml}$
 W = peso de la muestra (g) (corregido para obtener el peso original si se ha realizado algún proceso de desecado o desengrasado)
 F = ml de hidrolizado total (5.3.4) o ml de volumen calculado de dilución total del extracto (6.1).

La cistina y la cisteína se determinan ambas como ácido cisteico en hidrolizados de la muestra oxidada, pero se calculan en cistina ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, MW 240,30) utilizando MW 120,15 (= $0,5 \times 240,30$).

La metionina se determina como metionina sulfona en hidrolizados de muestra oxidada, pero se calcula en metionina utilizando el MW de la metionina: 149,21.

La metionina libre añadida se determina previa extracción como metionina, utilizando para el cálculo el mismo MW.

- 6.1. El volumen total de dilución de los extractos (F) para la determinación de los aminoácidos libres (5.2) se calcula de la forma siguiente:

$$F = 100 \text{ ml} \times \frac{(10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V_{\text{ml}}}{10 \text{ ml}}$$

V = volumen de extracto final

7. Evaluación del método

El método se ha comprobado en un estudio intercomparativo realizado internacionalmente en 1990 con diferentes piensos (pienso mezclado para cerdos, pienso compuesto para pollos, concentrado de proteínas, premezcla). Los resultados, tras descartar los datos aberrantes, de la media y de la desviación típica se indican en el cuadro siguiente:

Medias en g/kg

Material de referencia	Aminoácidos			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Compuesto para pollos	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentrado de proteínas	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premezcla	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = número de laboratorios participantes.

7.1. Repetibilidad

Se indican las cifras de la repetibilidad correspondientes a los aminoácidos estudiados. La repetibilidad, expresada como «desviación típica dentro del laboratorio», del citado estudio intercomparativo se indica en los cuadros siguientes:

Desviación típica dentro del laboratorio (S_p) en g/kg

Material de referencia	Aminoácidos			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Compuesto para pollos	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Concentrado de proteínas	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premezcla	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = número de laboratorios participantes

Coefficiente de variación (%) de la desviación típica dentro del laboratorio (S_p)

Material de referencia	Aminoácidos			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Compuesto para pollos	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentrado de proteínas	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premezcla	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = número de laboratorios participantes

7.2. Reproducibilidad

En el cuadro siguiente se indican los resultados de la desviación típica entre laboratorios obtenida en el citado estudio intercomparativo:

Desviación típica entre laboratorios (S_p) en g/kg

Material de referencia	Aminoácidos			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Compuesto para pollos	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Concentrado de proteínas	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premezcla	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = número de laboratorios participantes

Coefficiente de variación (%) de la desviación típica entre laboratorios (S_j)

Material de referencia	Aminoácidos			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Compuesto para pollos	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentrado de proteínas	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premezcla	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = número de laboratorios participantes

8. Uso de materiales de referencia

La correcta aplicación del método se verificará haciendo mediciones duplicadas de materiales certificados de referencia, cuando se disponga de éstos. Se recomienda la calibración con soluciones certificadas de calibración de aminoácidos.

9. Observaciones

- 9.1. Debido a las diferencias entre los analizadores de aminoácidos, las concentraciones finales de las soluciones de calibración de aminoácidos patrón (véanse 3.27.4 y 3.27.5) y del hidrolizado (véase 5.3.4) deben tomarse como orientativas.

La gama de respuesta lineal del aparato deberá comprobarse para todos los aminoácidos.

La solución patrón se diluirá con un amortiguador de citrato para detectar las áreas bajo el pico en el centro de la gama.

- 9.2. Cuando se use un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución para analizar los hidrolizados, deben optimizarse las condiciones experimentales de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 9.3. Si se aplica este método a alimentos que contengan más de un 1 % de cloruro (concentrados, alimentos minerales, complementos), es posible que los valores correspondientes a la metionina queden indicados por debajo del nivel real, por lo que es necesario utilizar un tratamiento especial.

PARTE B

4. DETERMINACIÓN DE LAS MATERIAS GRASAS BRUTAS

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método sirve para determinar el contenido de materias grasas brutas de los piensos. No es válido para el análisis de las semillas y frutos oleaginosos definidos en el Reglamento n° 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1996.

La aplicación de uno u otro de los dos procedimientos que se describen a continuación dependerá de la naturaleza y composición del pienso y de la razón por la que se lleva a cabo el análisis.

1.1. Procedimiento A. Materias grasas directamente extraíbles

El procedimiento es aplicable a las materias simples de origen vegetal, excepto las incluidas en el ámbito de aplicación del procedimiento B.

1.2. Procedimiento B. Materias grasas brutas totales

El procedimiento es aplicable a los piensos simples de origen animal, así como a los piensos compuestos. Se ha de utilizar para todos los materiales cuyas materias grasas no puedan extraerse completamente sin hidrólisis previa, por ejemplo, los glútenes, las levaduras, las proteínas de patatas y los productos sujetos a procesos como la extrusión, floculación y calentamiento.

1.3. Interpretación de los resultados

Aquellos casos en los que el resultado obtenido con el procedimiento B sea mejor que el obtenido con el procedimiento A se aceptarán como el valor real.

2. Principio

2.1. Procedimiento A

Se extrae la muestra por medio de éter de petróleo. Se destila el disolvente y se seca y pesa el residuo.

2.2. Procedimiento B

Se trata la muestra en caliente mediante ácido clorhídrico. Se enfría y filtra la mezcla. Después de lavarlo y secarlo, el residuo se somete al análisis según el procedimiento A.

3. Reactivos

- 3.1. Éter de petróleo, intervalo de ebullición: 40 a 60 °C. El índice de bromo debe ser inferior a 1 y el residuo en evaporación inferior a 2 mg/100 ml.
- 3.2. Sulfato de sodio, anhidro.
- 3.3. Ácido clorhídrico 3 M.
- 3.4. Coadyudante de filtración, como, por ejemplo, tierra de diatomeas, Hiflo-supercel.

4. Aparatos

- 4.1. Extractor. Si el aparato está provisto de un sifón (aparato Soxhlet), el caudal de reflujo debe regularse de forma que se obtengan por lo menos 10 ciclos por hora. Si se trata de un aparato sin sifón, el caudal líquido refluído debe ser de alrededor de 10 ml por minuto.
- 4.2. Cartuchos de extracción, exentos de sustancias solubles en el éter de petróleo, cuya porosidad sea compatible con las exigencias del punto 4.1.
- 4.3. Estufa de secado, bien por vacío a 75 °C ± 3 °C, bien a presión atmosférica a 100 °C ± 3 °C.

5. Modo de operación

5.1. Procedimiento A (véase la observación 8.1)

Pesar, con error no superior a 1 mg, 5 g de muestra, introducirlos en un cartucho de extracción (4.2) y cubrirlos con una torunda de algodón desgrasado.

Colocar el cartucho en un extractor (4.1) y extraer durante seis horas por medio de éter de petróleo (3.1). Recoger el extracto de éter de petróleo en un matraz seco provisto de piedra pómez⁽¹⁾ y tarado.

Eliminar el disolvente por destilación. Secar el residuo mediante colocación del matraz durante una hora y media en una estufa de secado (4.3). Dejar enfriar en un secador y pesar. Secar de nuevo durante treinta minutos para asegurarse de que el peso de la materia grasa se mantiene constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior a 1 mg).

5.2. Procedimiento B

Pesar, con error inferior a 1 mg, 2,5 g de la muestra (véase la observación 8.2), introducirlos en un cilindro de 400 ml o en un matraz cónico de 300 ml y añadir 100 ml de ácido clorhídrico 3 M (3.3) y algunos fragmentos de piedra pómez. Cubrir el cilindro con un vidrio de reloj o dotar al matraz cónico de un refrigerador de reflujo. Llevar la mezcla a ebullición suave con ayuda de una llama pequeña o de una placa eléctrica, y mantenerla así durante una hora. Evitar que el producto se pegue a las paredes del recipiente.

Enfriar y añadir una cantidad de coadyudante de filtración (3.4) suficiente para evitar cualquier pérdida de materia grasa en el momento de la filtración. Filtrar en un papel filtro doble humedecido, exento de materias grasas. Lavar el residuo con agua fría hasta la neutralidad del filtrado. Comprobar que el filtrado no contiene materias grasas. La presencia de éstas indica que debe efectuarse una extracción, de la muestra mediante éter de petróleo, según el procedimiento A, antes de la hidrólisis.

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

Introducir el papel filtro doble que contiene el residuo seco en un cartucho de extracción (4.2) y cubrirlo con una torunda de algodón desgrasado. Colocar el cartucho en un extractor (4.1) y continuar la operación tal como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

⁽¹⁾ Sustitúyanse los fragmentos de piedra pómez por perlas de vidrio cuando la materia grasa deba someterse a exámenes cualitativos ulteriores.

6. Cálculo de los resultados

Expresar el resultado de la pesada en partes por ciento de muestra.

7. Repetibilidad

La diferencia entre dos determinaciones paralelas efectuadas en una misma muestra mediante el mismo análisis no debe superar:

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

8. Observaciones

8.1. Para los productos con alto contenido de materias grasas, difíciles de desleír o no apropiados para la obtención de una muestra de ensayo reducida homogénea, ha de procederse del modo siguiente:

Pesar, con un error inferior a 1 mg, 20 g de la muestra y mezclarlos con 10 g o más de sulfato de sodio anhidro (3.2). Extraer mediante éter de petróleo (3.1) tal como se indica en el punto 5.1. Completar el extracto obtenido hasta 500 ml con éter de petróleo (3.1) y mezclarlo. Introducir 50 ml de la solución en un matraz pequeño seco, provisto de algunos fragmentos de piedra pómez⁽¹⁾ y tarado. Eliminar el disolvente por destilación, secar y continuar la operación tal como se indica en el último párrafo del punto 5.1.

Eliminar el disolvente del residuo de extracción presente en el cartucho, reducir el residuo a una finura de 1 mm, colocarlo de nuevo en el cartucho (no añadir suflato de sodio) y continuar la operación tal como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

El contenido de materias grasas brutas en partes por ciento de muestras se determina mediante la fórmula:

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

en la que:

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

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

- 8.2. La cantidad para ensayo de los productos pobres en materias grasas puede aumentarse a 5 g.
- 8.3. Es posible que los piensos para animales de compañía con un alto contenido en agua deban ser mezclados con sulfato de sodio anhidro antes de la hidrólisis y extracción realizada según el procedimiento B.
- 8.4. En el punto 5.2, el uso de agua caliente en vez de agua fría para lavar los residuos tras la filtración puede resultar más efectivo.
- 8.5. Puede que se necesite ampliar el tiempo de secado una hora y media para algunos piensos. Se debe evitar el secado en exceso ya que puede producir bajos resultados. También se puede utilizar un horno microondas.
- 8.6. Se recomienda utilizar la pre-extracción por medio del procedimiento A antes de la hidrólisis y la re-extracción por medio del procedimiento B, si el contenido en materias grasas brutas es superior al 15 %. Hasta cierto punto, esto depende de la naturaleza de los piensos y de la naturaleza de las materias grasas de éstos.

Parte C**DETERMINACIÓN DE OLAQUINDOX**

(N¹,N⁴-(dióxido de 2-[N-2'-(hidroxietil(carbamoil))-3-metilquinoxalina-)

1. Finalidad y campo de aplicación

El presente método permite determinar el olaquindox en los piensos. El límite de determinación es de 5 mg/kg.

2. Principio

La muestra se extrae mediante una mezcla de agua y metanol. El contenido de olaquindox se determina por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase inversa con detección UV.

⁽¹⁾ Sustitúyanse los fragmentos de piedra pómez por perlas de vidrio cuando la materia grasa deba someterse a exámenes cualitativos ulteriores.

3. Reactivos

3.1. Metanol.

3.2. Metanol de calidad CLAR.

3.3. Agua de calidad CLAR.

3.4. Fase móvil para la CLAR.

Mezcla de agua (3.3)-metanol (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Sustancia patrón: olaquinox puro N¹,N⁴- dióxido de 2-[N-2'-(hidroxietil)carbamoil]-3-metilquinoxalina, E 851.

3.5.1. Solución patrón madre de olaquinox, 250 µg/ml

Pesar, con un margen de error de 0,1 mg, 50 mg de olaquinox (3.5) en un matraz graduado de 200 ml y añadir aproximadamente 190 ml de agua. Colocar el matraz durante 20 minutos en un baño ultrasónico (4.1). Después del tratamiento ultrasónico, llevar la solución a temperatura ambiente, añadir agua hasta enrasar y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el refrigerador. Prepararla cada mes.

3.5.2. Solución patrón intermedia de olaquinox, 25 µg/ml:

Transferir 10,0 ml de la solución patrón madre (3.5.1) a un matraz graduado de 100 ml, añadir la fase móvil (3.4) hasta enrasar y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el refrigerador. Prepararla cada día.

3.5.3. Soluciones patrón de trabajo:

En una serie de matraces graduados de 50 ml, transferir 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 y 20,0 ml de solución patrón intermedia (3.5.2). Añadir la fase móvil (3.4) hasta llegar a la señal y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio. Estas soluciones corresponden respectivamente a 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 y 10,0 µg de olaquinox por ml. Las soluciones deben ser preparadas cada día.

4. Material

4.1. Baño ultrasónico.

4.2. Agitador mecánico.

4.3. Equipo para CLAR con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos.

4.3.1. Columna de cromatografía de 250 mm × 4 mm, C18, tamaño de partícula 10 µm, o equivalente.

4.4. Filtros de membrana de 0,45 µm.

5. Procedimiento

Nota: El olaquinox es sensible a la luz. Todas las operaciones deben realizarse con luz tenue o utilizando vidrio ámbar.

5.1. *Consideraciones generales*

5.1.1. Prueba en blanco de un pienso de referencia para comprobar la ausencia de olaquinox o de sustancias interferentes.

5.1.2. Efectuar un test de recuperación analizando el pienso de referencia al que se habrá añadido una determinada cantidad de olaquinox, similar a la presente en la muestra. Para obtener una concentración de 50 mg/kg, transferir 10,0 ml de la solución patrón madre (3.5.1) a un matraz cónico de 250 ml y concentrar la solución por evaporación a unos 0,5 ml. Añadir 50 g del pienso de referencia, mezclar cuidadosamente y esperar 10 minutos, volviendo a mezclar varias veces antes de proceder a la extracción (5.2).

Nota: Para llevar a cabo el presente método, el pienso de referencia debe ser de características similares al de la muestra y no debe detectarse en él presencia de olaquinox.

5.2. *Extracción*

Pesar, con un margen de error de 0,01 g, aproximadamente 50 g de la muestra. Transferir a un matraz cónico de 1 000 ml, añadir 100 ml de metanol (3.1) y colocar el matraz durante 5 minutos en un baño ultrasónico (4.1). Añadir 410 ml de agua y dejarlo en el baño ultrasónico durante 15 minutos más. Retirar el matraz del baño ultrasónico, agitarlo durante 30 minutos en el agitador (4.2) y filtrarlo a través de un filtro de pliegues. Transferir 10,0 ml del líquido filtrado a un matraz graduado de 20 ml, añadir agua hasta llegar a la señal y mezclar. Una parte alícuota se filtra a través de un filtro de membrana (4.4) (véase la observación 9). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3. *Determinación mediante CLAR*

5.3.1. Parámetros

Las siguientes condiciones se proponen con carácter indicativo, por lo que podrán aplicarse otras si ofrecen resultados equivalentes.

Columna de análisis (4.3.1)

Fase móvil (3.4): mezcla de agua (3.3) — y de metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)

Flujo: 1,5-2 ml/minuto

Longitud de onda de 380 nm

detección:

Volumen de inyección: 20 µl-100 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución patrón de trabajo (3.5.3) de 2,5 µg/ml hasta obtener alturas de pico y tiempos de retención constantes.

5.3.2. Curva de calibrado

Inyectar cada solución patrón de trabajo (3.5.3) varias veces y determinar las alturas (áreas) medias de los picos para cada concentración. Trazar una curva de calibrado utilizando las alturas (áreas) medias de los picos de las soluciones patrón de trabajo como ordenadas y las concentraciones correspondientes en µg/ml como abscisas.

5.3.3. Solución de la muestra

Inyectar el extracto de la muestra (5.2) varias veces utilizando el mismo volumen que el empleado para las soluciones patrón de trabajo y determinar la altura (área) media de los picos del olaquinox.

6. **Expresión de los resultados**

A partir de la altura (área) media de los picos del olaquinox de la solución de la muestra, determinar la concentración de la solución de la muestra en µg/ml por referencia a la curva de calibrado (5.3.2).

El contenido *p* de olaquinox de la muestra, expresado en mg/kg, se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$p = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

en la cual:

c = concentración de olaquinox en el extracto de la muestra (5.2) en µg/ml

m = masa de la muestra en g.

7. **Validación de los resultados**

7.1. *Identidad*

La identidad del analito puede ser confirmada por cocromatografía o mediante un detector de red de diodos que permite comparar los espectros del extracto de la muestra (5.2) y de la solución patrón de trabajo (3.5.3) de 5,0 µg/ml.

7.1.1. Cocromatografía

Se enriquece con una cantidad adecuada de la solución patrón de trabajo (3.5.3) un extracto de la muestra (5.2). La cantidad de olaquinox añadida debe ser similar a la cantidad de olaquinox encontrada en el extracto de la muestra.

Solamente debe aumentar la altura del pico de olaquinox teniendo en cuenta la cantidad añadida y la dilución del extracto. La anchura del pico a la mitad de su altura debe situarse aproximadamente ± 10 % de la anchura inicial del pico de olaquinox del extracto de la muestra antes de ser enriquecido.

7.1.2. Detección por red de diodos

Los resultados deben evaluarse de acuerdo con los siguientes criterios:

- a) La longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y de la solución patrón, registrada en el vértice del pico en el cromatograma, debe establecerse dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección. Para la detección por red de diodos se sitúa generalmente en ± 2 nm.

- b) Entre 220 y 400 nm, los espectros de la muestra y de la solución patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, no deben ser diferentes en las partes del espectro situadas entre el 10 % y el 100 % de la absorbancia relativa. Esta condición se reúne cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto la desviación observada entre los espectros supera el 15 % de la absorbancia del analito patrón.
- c) Entre 220 y 400 nm, los espectros de la pendiente ascendente del ápice y de la pendiente descendente del pico producidos por el extracto de la muestra no deben ser diferentes en las partes del espectro situadas entre el 10 % y el 100 % de la absorbancia relativa. Esta condición se reúne cuando están presentes los mismos máximos y en todos los puntos observados la desviación entre los espectros no supera el 15 % de la absorbancia del espectro del vértice del pico.

Si no se reúne una de estas dos condiciones, no se ha podido confirmar la presencia del analito.

7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe rebasar en un 15 % el resultado superior para los contenidos de olaquinox entre 10 y 200 mg/kg.

7.3. Rendimiento

En el caso de una muestra enriquecida, el rendimiento debe ser como mínimo del 90 %.

8. Resultados de un estudio entre varios laboratorios

Se ha organizado un estudio entre varios laboratorios comunitarios durante el cual cuatro muestras de piensos para cochinitillos -incluido un pienso de referencia- han sido analizadas por trece laboratorios. A continuación figuran los resultados del estudio:

	Muestra nº 1	Muestra nº 2	Muestra nº 3	Muestra nº 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
media [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S_r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S_R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV_r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV_R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Contenido nominal [mg/kg]	—	15	50	100
Recuperación (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : número de laboratorios
n : número de valores individuales
 S_r : desviación típica de la repetibilidad
 S_R : desviación típica de la reproducibilidad
 CV_r : coeficiente de variación de la repetibilidad
 CV_R : coeficiente de variación de la reproducibilidad.

9. Observación

Aunque el método no ha sido validado para piensos con un contenido de olaquinox mayor de 100 mg/kg, sería posible obtener resultados satisfactorios tomando un peso menor de la muestra o diluyendo el extracto (5.2) para conseguir una concentración dentro del rango de las soluciones de calibrado (5.3.2).