



2024/771

15.3.2024

**REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2024/771 DE LA COMISIÓN**

**de 29 de febrero de 2024**

**que modifica el Reglamento (CE) n.º 152/2009 de la Comisión, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos**

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 1/2005 y (CE) n.º 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.º 854/2004 y (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales) <sup>(1)</sup>, y en particular su artículo 34, apartado 6,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) n.º 152/2009 de la Comisión <sup>(2)</sup> establece los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos.
- (2) Los métodos de muestreo y análisis establecidos por el Reglamento (CE) n.º 152/2009 deben adaptarse a la luz de la evolución de los conocimientos científicos y tecnológicos. El presente Reglamento debe introducir varios cambios menores teniendo en cuenta la experiencia adquirida mediante la aplicación del método de análisis o para aclarar determinadas disposiciones.
- (3) El método de muestreo descrito en el Reglamento (CE) n.º 152/2009 no es adecuado para el muestreo destinado al control de la contaminación microbiológica y, por tanto, está excluido del ámbito de aplicación. Sin embargo, al haber dejado de estar explícitamente excluido del ámbito de aplicación tras la modificación introducida por el Reglamento (UE) n.º 691/2013 de la Comisión <sup>(3)</sup>, esto ha dado lugar a cierta confusión, por lo que procede excluirlo de nuevo explícitamente.
- (4) Conviene introducir disposiciones específicas para el muestreo de piensos ofrecidos a la venta por los explotadores de empresas de piensos mediante comunicación a distancia, dado que la venta de piensos mediante comunicación a distancia está aumentando. Además de las disposiciones sobre incertidumbre de la medida analítica y recuperación en caso de análisis de sustancias indeseables, también deben introducirse dichas disposiciones para el análisis del contenido de aditivos para piensos, dado que también son pertinentes en ese caso. A la vista de las pruebas que muestran que la aplicación del método de análisis para determinar la urea fuera del ámbito de aplicación de la autorización de la urea como aditivo para piensos genera resultados analíticos incorrectos, debe especificarse el ámbito de aplicación de dicho método y debe añadirse información sobre la evaluación del método y los resultados de un estudio colaborativo.
- (5) Deben suprimirse varios métodos de análisis establecidos por el Reglamento (CE) n.º 152/2009, pues ya no son válidos para la finalidad prevista. El método de análisis para la determinación de las bases nitrogenadas volátiles y el método de determinación de los carbonatos deben suprimirse, pues ya no existe ningún requisito legal para su control en la legislación de la Unión en materia de piensos. El método de análisis existente para la determinación del diclazurilo contiene errores de redacción y, por consiguiente, no proporciona resultados analíticos fiables. Por lo tanto, debe sustituirse por un método ajustado que haya demostrado ofrecer resultados fiables. Los nuevos métodos

<sup>(1)</sup> DO L 95 de 7.4.2017, p. 1.

<sup>(2)</sup> Reglamento (CE) n.º 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos (DO L 54 de 26.2.2009, p. 1).

<sup>(3)</sup> Reglamento (UE) n.º 691/2013 de la Comisión, de 19 de julio de 2013, que modifica el Reglamento (CE) n.º 152/2009 en cuanto a los métodos de muestreo y análisis (DO L 197 de 20.7.2013, p. 1).

para el análisis del gosispol libre y total han demostrado que el método de análisis para la determinación del gosispol libre y total establecido por el Reglamento (CE) n.º 152/2009 no proporciona resultados fiables y, por tanto, debe suprimirse y sustituirse por una referencia a las normas europeas (normas EN). Deben suprimirse los métodos de análisis para controlar la presencia ilegal de aditivos que ya no están autorizados en los piensos, ya que se han desarrollado procedimientos de cribado y métodos de análisis más sensibles.

- (6) Además de los métodos de análisis descritos en los anexos del presente Reglamento, debe hacerse una referencia a las normas EN para su uso en el control oficial.
- (7) Dado que el Reglamento de Ejecución (UE) 2021/2047 de la Comisión (\*) autorizó el nuevo aditivo para piensos amprolio, debe añadirse un método de análisis para la determinación del amprolio en el anexo IV del Reglamento (CE) n.º 152/2009.
- (8) Dado que las modificaciones del Reglamento (CE) n.º 152/2009 son sustanciales y se refieren a múltiples disposiciones de sus anexos, conviene, en aras de la claridad, sustituir dichos anexos en su totalidad.
- (9) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de Vegetales, Animales, Alimentos y Piensos.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

#### Artículo 1

### Modificaciones del Reglamento (CE) n.º 152/2009

El Reglamento (CE) n.º 152/2009 se modifica como sigue:

- 1) En el artículo 1, el párrafo primero se sustituye por el texto siguiente:

«El muestreo para el control oficial de los piensos, en particular en lo que se refiere a la determinación de los componentes, incluido el material que esté compuesto por organismos modificados genéticamente (OMG), los contenga o haya sido producido a partir de ellos, los aditivos tal como se definen en el Reglamento (CE) n.º 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo (\*), y las sustancias indeseables tal como se definen en la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (\*\*), se llevará a cabo de acuerdo con los métodos expuestos en el anexo I, a excepción del muestreo para el control de la contaminación microbiológica.»

(\*) Reglamento (CE) n.º 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal (DO L 268 de 18.10.2003, p. 29).

(\*\*) Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal (DO L 140 de 30.5.2002, p. 10).».

- 2) El anexo I se sustituye por el texto que figura en el anexo I del presente Reglamento.
- 3) El anexo II se sustituye por el texto que figura en el anexo II del presente Reglamento.
- 4) El anexo III se sustituye por el texto que figura en el anexo III del presente Reglamento.
- 5) El anexo IV se sustituye por el texto que figura en el anexo IV del presente Reglamento.
- 6) El anexo V se sustituye por el texto que figura en el anexo V del presente Reglamento.
- 7) El anexo VII se sustituye por el texto que figura en el anexo VI del presente Reglamento.
- 8) Se suprime el anexo VIII.

(\*) Reglamento de Ejecución (UE) 2021/2047 de la Comisión, de 23 de noviembre de 2021, relativo a la autorización del clorhidrato de amprolio (COXAM) como aditivo en piensos para pollos de engorde y pollitas criadas para puesta (titular de la autorización: Huvepharma NV) (DO L 418 de 24.11.2021, p. 13).

*Artículo 2*

**Entrada en vigor**

El presente Reglamento entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 29 de febrero de 2024.

*Por la Comisión*  
*La Presidenta*  
Ursula VON DER LEYEN

## ANEXO I

## «ANEXO I

**MÉTODOS DE MUESTREO**

## 1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Las muestras destinadas al control oficial de los piensos se tomarán siguiendo los métodos que se describen a continuación. Las muestras así obtenidas se considerarán representativas de las porciones de muestreo.

El objetivo de un muestreo representativo es obtener una pequeña fracción de un lote de forma que la determinación de una característica concreta de dicha fracción represente el valor medio de la característica en el lote. El muestreo del lote consistirá en tomar varias muestras elementales en distintos lugares del lote. Estas muestras elementales se mezclarán hasta constituir una muestra global, de la cual se extraerán muestras finales representativas mediante división representativa.

Si a la inspección ocular, o a partir de otra información pertinente, hay partes del pienso por muestrear que presentan una diferencia de calidad con respecto al resto del pienso del mismo lote, estas partes se separarán del resto y se tratarán como un sublote aparte. Si no es posible dividir el pienso en sublotes, se muestreará como un lote. En tales casos, esto se mencionará en el acta de muestreo.

Cuando un pienso muestreado con arreglo al presente Reglamento no satisfaga los requisitos de la UE, y forme parte de un lote de piensos de la misma clase o descripción, se considerarán afectados todos los piensos de dicho lote, salvo que una evaluación detallada ponga de manifiesto que no está demostrado que el resto del lote no satisfaga tales requisitos.

El muestreo puede incluir también el pienso ofrecido a la venta por explotadores de empresas de piensos mediante comunicación a distancia, de conformidad con el artículo 11, apartado 3, del Reglamento (CE) n.º 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo <sup>(1)</sup>. El muestreo de los piensos ofrecidos a la venta mediante comunicación a distancia estará sujeto, en principio, a los puntos establecidos en el presente anexo. En el punto 11 se describen aspectos específicos del muestreo de piensos de venta a distancia.

## 2. DEFINICIONES

- Lote: la cantidad identificable de pienso respecto de la cual se hayan determinado unas características comunes tales como el origen, la variedad, el tipo de envase, el envasador, el expedidor o el etiquetado y, en el caso de un proceso de producción, la unidad de producción de una única planta que utilice parámetros uniformes de producción o una serie de esas unidades cuando se produzcan en orden continuo y se almacenen juntas.
- Porción de muestreo: un lote o una parte identificada del lote o sublote que va a ser objeto de muestreo.
- Muestra precintada: aquella a la que no se puede acceder sin romper o retirar el precinto.
- Muestra elemental: cantidad tomada en un punto de la porción de muestreo.
- Muestra global: suma de las muestras elementales tomadas de la misma porción de muestreo.
- Muestra reducida: parte representativa de la muestra global, obtenida por reducción de esta.
- Muestra final: una parte de la muestra global (mezclada), de la muestra reducida o de la mezcla global homogeneizada, según el tipo de control (véase el punto 9.4).
- Muestra de laboratorio: la destinada al laboratorio (tal como este la recibe), que puede ser final, reducida o global.
- Muestra de venta a distancia: muestra de un lote de piensos puestos a la venta mediante comunicación a distancia.

<sup>(1)</sup> Reglamento (CE) n.º 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de julio de 2009, sobre la comercialización y la utilización de los piensos, por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 1831/2003 y se derogan las Directivas 79/373/CEE del Consejo, 80/511/CEE de la Comisión, 82/471/CEE del Consejo, 83/228/CEE del Consejo, 93/74/CEE del Consejo, 93/113/CEE del Consejo y 96/25/CE del Consejo y la Decisión 2004/217/CE de la Comisión (DO L 229 de 1.9.2009, p. 1).

### 3. DISPOSICIONES GENERALES

- La toma de muestras correrá a cargo de personas autorizadas al efecto por la autoridad competente.
- Para las muestras de venta a distancia, la autoridad competente solicitará al explotador de la empresa de piensos una cantidad de piensos mediante comunicación a distancia.
- La muestra irá precintada de tal manera que no se pueda acceder a ella sin romper o retirar el precinto.  
La marca del precinto debe ser claramente identificable y claramente visible.
- Identificación de la muestra: la muestra llevará una marca indeleble y su identificación establecerá sin ambigüedad su vínculo con el acta de muestreo.
- De cada muestra global o muestra reducida se toman las siguientes muestras finales: una como control (cumplimiento) y una para el explotador de la empresa de piensos (muestra de defensa). Más adelante puede tomarse una muestra final de referencia. Si se homogeneiza la totalidad de la muestra global, las muestras finales se toman de la muestra global homogeneizada, a menos que este procedimiento contravenga la normativa de los Estados miembros sobre los derechos del explotador de la empresa de piensos.
- De conformidad con el artículo 15, apartados 1 y 2, del Reglamento (UE) 2017/625, cuando sea necesario para la realización de muestreos oficiales, los explotadores de empresas de piensos, si así lo exigen las autoridades competentes:
  - darán acceso al personal de las autoridades competentes a los equipos que estén bajo su control, incluida, cuando sea necesario, la puesta a disposición de los equipos de muestreo y de protección individual adecuados;
  - prestarán asistencia al personal de las autoridades competentes y cooperarán con él para permitir el muestreo, incluida la puesta de los piensos a disposición del personal de las autoridades competentes.

### 4. INSTRUMENTAL

4.1. El instrumental de muestreo debe estar hecho de materiales que no puedan contaminar los productos de los que se hayan de tomar muestras. El instrumental destinado a múltiples utilizaciones será fácil de limpiar, para evitar la contaminación cruzada.

#### 4.2. Instrumental recomendado para el muestreo de piensos sólidos

##### 4.2.1. Muestreo manual

4.2.1.1. Pala de muestreo de fondo plano y bordes verticales.

4.2.1.2. Sonda de muestreo con hendidura larga o compartimentos. Las dimensiones de la sonda deben ajustarse a las características de la porción de muestreo (profundidad del recipiente, dimensiones del saco, etc.) y al tamaño de las partículas del pienso.

Si la sonda de muestreo tiene varias aberturas, para garantizar que la muestra se toma en diversos puntos a lo largo de la misma, se separan las aberturas mediante compartimentos o se escalonan secuencialmente.

##### 4.2.2. Muestreo mecánico

Podrán utilizarse aparatos mecánicos apropiados para el muestreo de piensos en movimiento. El aparato mecánico se considerará apropiado cuando se muestree como mínimo toda la sección del flujo.

El muestreo de piensos en movimiento (en grandes caudales) puede hacerse con muestreadores automáticos.

##### 4.2.3. Divisor

Cuando sea posible y pertinente, para preparar muestras reducidas representativas se utilizarán aparatos diseñados para dividir la muestra en partes aproximadamente iguales.

5. REQUISITOS CUANTITATIVOS EN CUANTO AL NÚMERO DE MUESTRAS ELEMENTALES

- Los requisitos cuantitativos de los puntos 5.1 y 5.2 en cuanto al número de muestras elementales son aplicables a tamaños de porciones de muestreo de hasta 500 toneladas y que pueden muestrearse de modo representativo. El procedimiento de muestreo descrito es igualmente válido para cantidades superiores al máximo prescrito si no se tiene en cuenta el número máximo de muestras elementales indicado en los cuadros de los puntos 5.1.1, 5.1.3 y 5.1.5, y si se incrementa proporcionalmente el número de muestras elementales determinado por la fórmula de la raíz cuadrada que figura en la parte correspondiente del procedimiento (véase el punto 5.3) y el tamaño mínimo de la muestra global. Ello no impide subdividir un lote grande en sublotes más pequeños y muestrear cada uno de estos según el procedimiento descrito en los puntos 5.1 y 5.2.
- La porción de muestreo debe tener un tamaño que permita tomar muestras de todas las partes que la compongan.
- A los lotes o sublotes muy grandes (> 500 toneladas) y a los transportados o almacenados de tal modo que no puedan muestrearse según el procedimiento descrito en los puntos 5.1 y 5.2, se aplicará el procedimiento de muestreo dispuesto en el punto 5.3.
- En el caso de las muestras de venta a distancia, la autoridad competente no suele conocer el tamaño del lote del que se solicita la cantidad; por lo tanto, no puede utilizarse el procedimiento a que se refieren los puntos 5.1 y 5.2. En ese caso, se seguirá el procedimiento descrito en el punto 11.
- Si la legislación, en el marco de un sistema obligatorio de seguimiento, obliga a cumplir el presente Reglamento al explotador de la empresa de piensos, este podrá, en función de sus características operativas, apartarse de los requisitos cuantitativos establecidos en este punto si demuestra que su procedimiento de muestreo es equivalente en cuanto a la representatividad y recibe la autorización previa de la autoridad competente.
- En casos excepcionales, si no es posible aplicar los criterios cuantitativos del método de muestreo establecido por el daño comercial inaceptable que se ocasionaría al lote (por el tipo de envase, los medios de transporte o almacenamiento, etc.), podrá aplicarse otro método de muestreo que sea lo más representativo posible y esté plenamente descrito y documentado.

5.1. **Requisitos cuantitativos de las muestras elementales para el control de sustancias o productos repartidos de manera uniforme en los piensos**

5.1.1. *Piensos sólidos a granel*

Tamaño de la porción de muestreo	Número mínimo de muestras elementales
≤ 2,5 toneladas	7
> 2,5 toneladas	$\sqrt{20 \times n.º}$ de toneladas que constituyen la porción de muestreo) (*), hasta un máximo de 40 muestras elementales

(\*) Cuando la cifra obtenida sea decimal, deberá redondearse al siguiente número entero.

5.1.2. *Piensos líquidos a granel*

Tamaño de la porción de muestreo	Número mínimo de muestras elementales
≤ 2,5 toneladas o ≤ 2 500 litros	4 (*)
> 2,5 toneladas o > 2 500 litros	7 (*)

(\*) Si no es posible homogeneizar el líquido, se aumentará el número de muestras elementales.

5.1.3. *Piensos envasados*

Los piensos (sólidos y líquidos) pueden envasarse en bolsas, sacos, latas, barricas, etc., denominados “unidades” en el cuadro siguiente. Las unidades grandes ( $\geq 500$  kg o litros) se muestrearán según lo previsto para los piensos a granel (véanse los puntos 5.1.1 y 5.1.2).

Tamaño de la porción de muestreo	Número mínimo de unidades de las que hay que tomar (al menos) una muestra elemental (*)
1 a 20 unidades	1 unidad (**)
21 a 150 unidades	3 unidades (**)
151 a 400 unidades	5 unidades (**)
> 400 unidades	$\frac{1}{4}$ de $\sqrt{(\text{n.º de unidades que componen la porción de muestreo})}$ (***) , hasta 40 unidades

(\*) Si la apertura de una unidad puede afectar al análisis (por ejemplo, piensos húmedos perecederos), constituirá una muestra elemental la unidad cerrada.

(\*\*) Cuando el contenido de una unidad no exceda de 1 kg o 1 l, constituirá una muestra elemental el contenido de una unidad original.

(\*\*\*) Cuando la cifra obtenida sea decimal, deberá redondearse al siguiente número entero.

5.1.4. *Piensos en bloques y piedras para lamer*

Se muestreará al menos 1 bloque o una piedra para lamer por porción de muestreo de 25 unidades, hasta un máximo de 4 bloques o piedras para lamer.

Cuando cada bloque o piedra para lamer no supere un peso de 1 kg, constituirá una muestra elemental el contenido de un bloque o una piedra para lamer.

5.1.5. *Forrajes y forrajes groseros*

Tamaño de la porción de muestreo	Número mínimo de muestras elementales (*)
$\leq 5$ toneladas	5
> 5 toneladas	$\sqrt{5 \times \text{n.º de toneladas que constituyen la porción de muestreo}}$ (**), hasta un máximo de 40 muestras elementales

(\*) Se reconoce que en determinadas situaciones (por ejemplo, ensilado) no es posible tomar las muestras elementales previstas sin causar un daño inaceptable en el lote. En estas situaciones podrá aplicarse un método alternativo, y se han elaborado orientaciones sobre el muestreo de tales lotes que se pueden consultar en [https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance\\_documents\\_691\\_2013\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf).

(\*\*) Cuando la cifra obtenida sea decimal, deberá redondearse al siguiente número entero.

5.2. **Requisitos cuantitativos de las muestras elementales para el control de componentes o sustancias que pueden estar repartidos de manera no uniforme en los piensos**

Estos requisitos cuantitativos de las muestras elementales se utilizarán en las siguientes situaciones:

- control de las aflatoxinas, del cornezuelo del centeno, de otras micotoxinas y de impurezas botánicas perjudiciales en las materias primas para piensos;
- control de la contaminación cruzada por un componente, incluido material modificado genéticamente, o una sustancia que no suelen estar repartidos de modo uniforme en los piensos.

Si la autoridad de control tiene la fuerte sospecha de que tal reparto no uniforme se da también en caso de contaminación cruzada por un componente o una sustancia de un pienso compuesto, pueden aplicarse los requisitos cuantitativos del cuadro siguiente.

Tamaño de la porción de muestreo	Número mínimo de muestras elementales
< 80 toneladas	Véanse los requisitos cuantitativos del punto 5.1; el número de muestras elementales que deben tomarse ha de multiplicarse por 2,5.
≥ 80 toneladas	100

### 5.3. Requisitos cuantitativos de muestras elementales de lotes muy grandes

Cuando las porciones de muestreo son grandes (> 500 toneladas) se tomarán 40 muestras elementales +  $\sqrt{n}$  (n.º de toneladas para el control de sustancias o productos repartidos de manera uniforme en los piensos), o 100 muestras elementales +  $\sqrt{n}$  (n.º de toneladas para el control de componentes o sustancias que pueden estar repartidos de manera no uniforme en los piensos).

### 6. REQUISITOS CUANTITATIVOS EN CUANTO A LA MUESTRA GLOBAL

Se requiere una sola muestra global por cada porción de muestreo.

	Tipo de pienso	Tamaño mínimo de la muestra global (*) (**)
6.1.	Piensos a granel	4 kg
6.2.	Piensos envasados	4 kg (***)
6.3.	Piensos líquidos o semilíquidos	4 litros
6.4.	Piensos en bloques o piedras para lamer	
6.4.1.	De un peso superior a 1 kg cada uno	4 kg
6.4.2.	De un peso no superior a 1 kg cada uno	El peso de cuatro bloques o piedras para lamer
6.5.	Forrajes y forrajes groseros	4 kg (****)

(\*) Si el pienso muestreado es de gran valor, puede tomarse una muestra global menor, siempre que esto se describa y documente en el acta de muestreo.

(\*\*) De conformidad con las disposiciones del Reglamento (UE) n.º 619/2011 de la Comisión, de 24 de junio de 2011, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos y de la presencia en ellos de material modificado genéticamente cuyo procedimiento de autorización esté pendiente o cuya autorización haya caducado (DO L 166 de 25.6.2011, p. 9), el tamaño de las muestras globales para el control de la presencia de material modificado genéticamente no será inferior al peso correspondiente a 35 000 granos o semillas. Esto significa que el tamaño de una muestra global de maíz será, como mínimo, de 10,5 kg y el de una muestra global de soja, de 7 kg. Una muestra global de 4 kg de otros granos y semillas como cebada, mijo, avena, arroz, centeno, trigo y colza corresponde a más de 35 000 semillas.

(\*\*\*) En el caso de piensos envasados, también puede ser que no se alcance un tamaño de muestra global de 4 kg, según sea el tamaño de cada unidad.

(\*\*\*\*) Si se trata de forrajes y forrajes groseros de baja densidad específica, como el heno o la paja, la muestra global debe tener un tamaño mínimo de 1 kg.

### 7. REQUISITOS CUANTITATIVOS EN CUANTO A LAS MUESTRAS FINALES

#### Muestras finales

Se requiere el análisis de, por lo menos, una muestra final. La cantidad de muestra final destinada al análisis no será inferior a lo que se indica a continuación:



Piensos sólidos	500 g (*) (**) (***) (****)
Piensos líquidos o semilíquidos	500 ml (*)

(\*) De conformidad con las disposiciones del Reglamento (UE) n.º 619/2011, el tamaño de la muestra final para el control de la presencia de material modificado genéticamente no será inferior al peso correspondiente a 10 000 granos o semillas. Esto significa que el tamaño de la muestra final de maíz será, como mínimo, de 3 000 g y el de la muestra final de soja, de 2 000 g. Una muestra final de 500 g de otros granos y semillas como cebada, mijo, avena, arroz, centeno, trigo y colza corresponde a más de 10 000 semillas.

(\*\*) Si el tamaño de la muestra global es significativamente inferior a 4 kg o 4 l (véanse las notas a pie de página del punto 6), puede asimismo tomarse una muestra final menor, siempre que esto se describa y documente en el acta de muestreo.

(\*\*\*) Si se muestrean legumbres, granos de cereales y frutos de cáscara para determinar residuos de plaguicidas, el tamaño mínimo de la muestra final será de 1 kg, de conformidad con las disposiciones de la Directiva 2002/63/CE de la Comisión, de 11 de julio de 2002, por la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal y se deroga la Directiva 79/700/CEE (DO L 187 de 16.7.2002, p. 30).

(\*\*\*\*) En caso de inspección visual o con microscopio, el tamaño de la muestra final para inspección será de 1 kg.

## 8. MÉTODO DE MUESTREO DE LOTES MUY GRANDES, O TRANSPORTADOS O ALMACENADOS DE TAL MODO QUE NO PUEDAN MUESTREARSE EN SU TOTALIDAD

### 8.1. Principios generales

Cuando el medio de transporte o almacenamiento de un lote no permita tomar muestras elementales de su totalidad, el muestreo del mismo se realizará de preferencia con el lote en movimiento.

Hay que animar a los explotadores de almacenes de piensos de grandes dimensiones a que instalen equipos que hagan posible el muestreo (automático) del conjunto del lote almacenado.

Si se aplican los procedimientos de muestreo previstos en el presente punto, se informa del procedimiento de muestreo al explotador de la empresa de piensos o a su representante. Si el explotador de la empresa de piensos o su representante cuestionan dicho procedimiento de muestreo, deberán permitir que la autoridad competente proceda al muestreo de la totalidad del lote, y correrán con los costes.

### 8.2. Lotes grandes transportados en buque

#### 8.2.1. Muestreo dinámico de lotes grandes transportados en buque

El muestreo de lotes grandes transportados en buque se realiza de preferencia con el producto en movimiento (muestreo dinámico).

El muestreo se realiza por bodega (espacio separable físicamente), pero las bodegas se vacían parcialmente una tras otra, con lo cual la separación inicial ya no existe una vez transferido el contenido al almacén. Por ello, el muestreo puede hacerse según la separación inicial o según la separación después de transferido el contenido al almacén.

La descarga de un buque puede durar varios días. Normalmente, el muestreo se realiza a intervalos regulares durante toda la duración de la descarga. Sin embargo, no es siempre factible o adecuado que un inspector oficial esté presente para hacer el muestreo durante toda la operación de descarga. Por eso se permite el muestreo de una parte (porción de muestreo) del total. El número de muestras elementales se determina en función del tamaño de la porción de muestreo.

Si se muestrea una parte de un lote de piensos de la misma clase o descripción y se determina que dicha parte no satisface los requisitos de la UE, se considerarán afectados todos los piensos de dicho lote, salvo que una evaluación detallada ponga de manifiesto que no está demostrado que el resto del lote no satisfaga los requisitos de la UE.

Aunque el muestreo oficial sea automático, tiene que estar presente un inspector. No obstante, si el muestreo automático se realiza con parámetros predeterminados que no pueden modificarse durante el mismo y las muestras elementales se recogen en un recipiente precintado, lo que impide todo posible fraude, el inspector solo tiene que estar presente al comienzo del muestreo, cada vez que se cambia el recipiente y al final del muestreo.

#### 8.2.2. *Muestreo estático de lotes transportados en buque*

El muestreo estático seguirá el mismo procedimiento establecido para los almacenes (silos) de carga superior (véase el punto 8.4.1).

El muestreo se realizará en la parte accesible (superior) del lote o la bodega. El número de muestras elementales se determina en función del tamaño de la porción de muestreo. Si se muestrea una parte de un lote de piensos de la misma clase o descripción y se determina que dicha parte no satisface los requisitos de la UE, se considerarán afectados todos los piensos de dicho lote, salvo que una evaluación detallada ponga de manifiesto que no está demostrado que el resto del lote no satisfaga los requisitos de la UE.

#### 8.3. **Muestreo de lotes grandes almacenados en depósitos**

El muestreo se realizará en la parte accesible del lote. El número de muestras elementales se determina en función del tamaño de la porción de muestreo. Si se muestrea una parte de un lote de piensos de la misma clase o descripción y se determina que dicha parte no satisface los requisitos de la UE, se considerarán afectados todos los piensos de dicho lote, salvo que una evaluación detallada ponga de manifiesto que no está demostrado que el resto del lote no satisfaga los requisitos de la UE.

#### 8.4. **Muestreo en almacenes (silos)**

##### 8.4.1. *Muestreo de silos (fácilmente) accesibles por su parte superior*

El muestreo se realizará en la parte accesible del lote. El número de muestras elementales se determina en función del tamaño de la porción de muestreo. Si se muestrea una parte de un lote de piensos de la misma clase o descripción y se determina que dicha parte no satisface los requisitos de la UE, se considerarán afectados todos los piensos de dicho lote, salvo que una evaluación detallada ponga de manifiesto que no está demostrado que el resto del lote no satisfaga los requisitos de la UE.

##### 8.4.2. *Muestreo de silos no accesibles por su parte superior (silos cerrados)*

###### 8.4.2.1. Silos no accesibles por su parte superior (silos cerrados) > 100 toneladas

Los piensos almacenados en este tipo de silos no pueden someterse a un muestreo estático. Por lo tanto, si hay que muestrear el pienso de este silo y no es posible desplazarlo, hay que llegar a un acuerdo con el explotador para que comunique al inspector cuándo se descargará el silo, de modo que se proceda entonces a un muestreo dinámico de los piensos.

###### 8.4.2.2. Silos no accesibles por su parte superior (silos cerrados) < 100 toneladas

El procedimiento de muestreo conlleva sacar a un recipiente una cantidad de entre 50 kg y 100 kg, de la cual se toma la muestra. El tamaño de la muestra global corresponde a la totalidad del lote y el número de muestras elementales guarda relación con la cantidad que se ha sacado del silo al recipiente para el muestreo. Si se muestrea una parte de un lote de piensos de la misma clase o descripción y se determina que dicha parte no satisface los requisitos de la UE, se considerarán afectados todos los piensos de dicho lote, salvo que una evaluación detallada ponga de manifiesto que no está demostrado que el resto del lote no satisfaga los requisitos de la UE.

#### 8.5. **Muestreo de piensos a granel en grandes contenedores cerrados**

Por lo general estos lotes solo pueden muestrearse cuando se descargan. En algunos casos no es posible descargar en el punto de importación o control, por lo que hay que proceder al muestreo al descargar los contenedores.

#### 9. INSTRUCCIONES PARA LA TOMA, LA PREPARACIÓN Y EL ENVASADO DE LAS MUESTRAS

##### 9.1. **Generalidades**

Hay que tomar y preparar las muestras lo más rápidamente posible teniendo en cuenta las precauciones necesarias para evitar que el producto se altere o contamine. Los instrumentos, así como las superficies y los recipientes destinados a recibir las muestras, deben estar limpios y secos.

## 9.2. Muestras elementales

Las muestras elementales deben tomarse distribuidas de forma aleatoria y uniforme en toda la porción de muestreo y tener aproximadamente el mismo tamaño.

El tamaño de la muestra elemental será de al menos 100 g, o 25 g en caso de forraje basto o forraje de baja densidad específica.

Si, de conformidad con las normas de muestreo establecidas en el punto 8, deben tomarse menos de 40 muestras elementales, su tamaño se determinará en función del tamaño de la muestra global que deba alcanzarse (véase el punto 6).

Si se muestrean lotes pequeños de piensos envasados cuando según los requisitos cuantitativos debe tomarse un número limitado de muestras elementales, constituirá una muestra elemental el contenido de una unidad original que no exceda de 1 kg o 1 l.

Al muestrear piensos envasados en unidades pequeñas (por ejemplo < 250 g), el tamaño de la muestra elemental dependerá del tamaño de la unidad.

En el caso de las muestras de venta a distancia, el tamaño de la muestra elemental dependerá del tamaño de la unidad y podrá contener menos de 100 g o 100 ml en casos concretos.

### 9.2.1. Piensos a granel

En su caso, el muestreo puede realizarse mientras la porción de muestreo está en movimiento (carga o descarga).

### 9.2.2. Piensos envasados

Una vez seleccionado el número requerido de unidades para muestreo según se indica en el punto 5, se tomará una parte del contenido de cada unidad con una sonda o una pala. Si es necesario, las muestras se tomarán después de haber vaciado por separado las unidades.

### 9.2.3. Piensos líquidos o semilíquidos homogéneos u homogeneizables

Una vez seleccionado el número requerido de unidades para muestreo según se indica en el punto 5, se homogeneizará el contenido, si es necesario, y se tomará una cantidad determinada de cada unidad.

Las muestras elementales pueden tomarse mientras se vacía el contenido.

### 9.2.4. Piensos líquidos o semilíquidos no homogeneizables

Una vez seleccionado el número requerido de unidades para muestreo según se indica en el punto 5, se tomarán muestras en diferentes niveles.

También pueden tomarse muestras mientras se vacía el contenido, pero, en ese caso, deberán desecharse las primeras fracciones.

En cualquier caso, el volumen total recogido no será inferior a 10 l.

### 9.2.5. Piensos en bloques y piedras para lamer

Una vez seleccionado el número requerido de bloques o piedras para muestreo según se indica en el punto 5, se tomará una parte de cada bloque o piedra para lamer. Si se sospecha que no son homogéneos, puede tomarse como muestra todo el bloque o la piedra.

Cuando cada bloque o piedra para lamer no supere un peso de 1 kg, constituirá una muestra elemental el contenido de un bloque o una piedra para lamer.

## 9.3. Preparación de muestras globales

Las muestras elementales se mezclarán para formar una sola muestra global.

## 9.4. Preparación de muestras finales

Se mezclará cuidadosamente el material de cada muestra global (?).

---

(?) Los grumos deberán deshacerse (si es necesario apartándolos y reintegrándolos luego a la muestra).

Cada muestra se introducirá en un recipiente apropiado. Deberán tomarse todas las precauciones necesarias para evitar cualquier alteración en la composición de la muestra o cualquier contaminación o adulteración que pudiera sobrevenir durante el transporte o el almacenamiento.

#### 9.4.1. *Sustancias repartidas de manera uniforme*

Al controlar componentes o sustancias repartidos de manera uniforme por el pienso, la muestra global puede reducirse representativamente al menos a 2,0 kg o 2,0 l (muestra reducida) <sup>(3)</sup>, de preferencia con un separador mecánico o automático. Si se muestrean legumbres, granos de cereales y frutos de cáscara para determinar residuos de plaguicidas, el tamaño mínimo de la muestra reducida será de 3 kg. Si el tipo de pienso no permite utilizar un separador, o si no se dispone de uno, puede reducirse la muestra por el método de cuarteo.

A partir de la muestra global o de las muestras reducidas se prepararán entonces las muestras finales (para control, defensa y posible referencia), con aproximadamente la misma cantidad y respetando los requisitos cuantitativos del punto 7.

#### 9.4.2. *Sustancias repartidas de manera no uniforme*

Al controlar componentes, incluido material modificado genéticamente, o sustancias que puedan estar repartidos de manera no uniforme en los materiales para piensos, la muestra global deberá:

- i) homogeneizarse completamente; después, a partir de la muestra global homogeneizada se prepararán entonces las muestras finales (para control, defensa y posible referencia), con aproximadamente la misma cantidad y respetando los requisitos cuantitativos del punto 7, o bien
- ii) reducirse al menos a 2 kg o 2 l <sup>(4)</sup> con un separador mecánico o automático; solo si el tipo de pienso no permite utilizar un separador puede reducirse la muestra, en caso necesario, por el método de cuarteo; para controlar la presencia de material modificado genéticamente en el marco del Reglamento (UE) n.º 619/2011, la muestra reducida no será inferior al peso correspondiente a 35 000 granos o semillas, para que salgan de ella las muestras finales de control, defensa y posible referencia, cuyo tamaño no será inferior al peso correspondiente a 10 000 granos o semillas [véanse las notas a pie de página <sup>(\*\*)</sup> del punto 6 y <sup>(\*)</sup> del punto 7].

A partir de las muestras reducidas se tomarán entonces las muestras finales, con aproximadamente la misma cantidad y respetando los requisitos cuantitativos del punto 7.

#### 9.5. **Envasado de las muestras**

Los recipientes o envases irán precintados y etiquetados de tal manera que no se puedan abrir sin romper el precinto. La etiqueta debe estar totalmente incorporada en el precinto. Como alternativa, la muestra puede colocarse en un recipiente que pueda cerrarse de manera que no pueda abrirse sin quedar irreversiblemente dañado y que imposibilite su reutilización.

#### 9.6. **Envío de muestras al laboratorio**

La muestra se enviará sin demora innecesaria al laboratorio de análisis designado, junto con la información necesaria para el analista.

#### 10. ACTA DE MUESTREO

De cada muestreo deberá levantarse un acta que permita identificar sin ambigüedad la porción de muestreo y su tamaño.

En tal acta se mencionará toda desviación del procedimiento de muestreo dispuesto en el presente Reglamento.

El acta estará a disposición del laboratorio de control oficial, del explotador de la empresa de piensos y del laboratorio que este designe.

<sup>(3)</sup> Salvo en el caso del forraje o forraje basto de baja densidad específica.

<sup>(4)</sup> Salvo en el caso del forraje o forraje basto de baja densidad específica.

## 11. MUESTREO DE VENTA A DISTANCIA

- Para el muestreo de venta a distancia, la autoridad competente solicitará el pienso al explotador de la empresa de piensos mediante técnicas de comunicación a distancia. En este caso, al solicitar el pienso, la autoridad competente no tendrá que identificarse con una identidad oficial al explotador de la empresa de piensos y podrá utilizar una identidad encubierta.
- Las personas autorizadas a tal efecto deberán tomar la muestra global y las muestras finales de la muestra de venta a distancia inmediatamente después de la recepción del envío. Para generar la muestra global, deberá tomarse un número adecuado de muestras elementales, distribuidas de forma aleatoria y uniforme a partir de la cantidad total obtenida y mezclarlas/homogeneizarlas cuidadosamente de acuerdo, en la medida de lo posible, con los principios establecidos en los puntos 5, 9.2 y 9.3. Si el pienso está envasado en unidades individuales, deben obtenerse al menos cuatro unidades de las que deberá tomarse, al menos, una muestra elemental. Si se demuestra caso por caso que las unidades obtenidas proceden de lotes diferentes, el número de unidades a muestrear deberá reducirse y limitarse a las unidades procedentes del mismo lote. En caso de analizar la muestra de venta a distancia para el control de componentes o sustancias que no están repartidos de manera uniforme en el pienso, el número de muestras elementales debe ser al menos 2,5 veces superior al de las muestras analizadas para controlar sustancias repartidas de manera uniforme en el pienso.

A partir de la muestra global, se toman las muestras finales correspondientes (para control, defensa y posible referencia) de acuerdo, en la medida de lo posible, con los principios establecidos en el punto 9.4, y en el acta de muestreo se indica que la muestra es una muestra a distancia. A continuación, la autoridad competente informa inmediatamente del muestreo al explotador de la empresa de piensos. También se notifica al explotador de la empresa de piensos que la autoridad competente mantiene una muestra a su disposición (para defensa) en un lugar determinado, con fines de defensa, o que se le ha enviado a él o al laboratorio designado por él de conformidad con las normas nacionales vigentes.

Si la muestra se envía directamente al laboratorio oficial, la muestra final deberá ser preparada y sellada en el laboratorio por personas autorizadas a tal efecto o en presencia de personas autorizadas a tal efecto. El registro de muestreo de la muestra de venta a distancia debe enviarse inmediatamente a la autoridad competente después de que se hayan formado las muestras finales, y la autoridad competente a su vez informará del muestreo al explotador de la empresa de piensos.

Se considera que la cantidad suministrada por el explotador de la empresa de piensos a la autoridad competente representa una parte de un lote de pienso de la misma clase o descripción. De conformidad con el artículo 15 del Reglamento (CE) n.º 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo <sup>(5)</sup>, si se determina que esa parte del lote no satisface los requisitos de la UE se considerarán afectados todos los piensos de dicho lote, también en el caso de muestras de venta a distancia, salvo que una evaluación detallada (en su caso, en una inspección *in situ*) ponga de manifiesto que no está demostrado que el resto del lote no satisfaga los requisitos de la UE.».

---

<sup>(5)</sup> Reglamento (CE) n.º 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (DO L 31 de 1.2.2002, p. 1).

## ANEXO II

## «ANEXO II

**DISPOSICIONES GENERALES SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA PIENSOS**

## A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

**1. Objeto**

Los procedimientos descritos en este anexo se refieren a la preparación para el análisis de muestras enviadas a los laboratorios de control tras ser tomadas conforme a lo dispuesto en el anexo I.

Estas muestras para el laboratorio deben prepararse de manera que las cantidades pesadas según disponen los métodos de análisis sean homogéneas y representativas de las muestras finales.

Además de los procedimientos descritos en el presente anexo, se seguirán las directrices para la preparación de muestras establecidas en la norma EN ISO 6498.

**2. Precauciones que deben tomarse**

El procedimiento que debe seguirse para preparar las muestras depende de los métodos de análisis que vayan a emplearse y de los componentes o sustancias que vayan a controlarse. Por tanto, es muy importante que dicho procedimiento se adecúe al método de análisis que vaya a emplearse y a los componentes o sustancias que vayan a controlarse.

Todas las operaciones necesarias deben realizarse de modo que se eviten en lo posible la contaminación de la muestra y los cambios en su composición.

La molienda, la mezcla y el tamizado deberán efectuarse lo más rápidamente posible, a fin de minimizar la exposición de la muestra al aire y a la luz. No se emplearán molinos ni molidoras que puedan calentar perceptiblemente la muestra.

Para los piensos especialmente sensibles al calor se recomienda la molienda manual. Deberá cuidarse también de que el propio instrumental no sea fuente de contaminación.

Se ha demostrado que la homogeneización de la muestra mediante un mezclador de alto cizallamiento con agua para preparar una suspensión proporciona en algunos casos submuestras más homogéneas que la homogeneización/molienda en seco, en particular en el caso de sustancias químicas repartidas de manera heterogénea. No obstante, la homogeneización mediante una molienda suficiente en seco también podría proporcionar submuestras homogéneas.

En algunos casos, como la determinación del cornezuelo del centeno, las impurezas botánicas nocivas, etc., la homogeneización de la muestra no puede hacerse moliendo, sino mezclando suficientemente la muestra.

Si la muestra no puede prepararse sin que su contenido de humedad sufra cambios significativos, debe determinarse dicho contenido antes y después de prepararla, de acuerdo con el método establecido en la parte A del anexo III.

**3. Procedimiento****3.1. Procedimiento general**

La alícuota de ensayo se toma de la muestra final homogeneizada. No se recomienda la técnica de conos y cuarteo, pues las alícuotas resultantes pueden presentar un elevado error de división.

**3.1.1. Piensos que pueden molerse tal como se presentan**

— Mezclar la muestra final y recogerla en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Volver a mezclar para asegurar la completa homogeneización, inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis (alícuota de ensayo).

**3.1.2. Piensos que pueden molerse tras secarse**

— Salvo que se especifique lo contrario en los métodos de análisis, secar la muestra final hasta que su contenido de humedad disminuya a un nivel de entre el 8 % y el 12 %, de acuerdo con el procedimiento preliminar de secado descrito en el punto 4.3 del método de determinación de la humedad mencionado en la parte A del anexo III. Proceder a continuación como se indica en el punto 3.1.1.

### 3.1.3. Piensos líquidos o semilíquidos

- Colocar la muestra final en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Mezclar enérgicamente para asegurar la completa homogeneización, inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis (alícuota de ensayo).

### 3.1.4. Otros piensos

- Las muestras finales que no puedan prepararse conforme a uno de los procedimientos anteriores deberán someterse a cualquier otro procedimiento que garantice que las cantidades pesadas para el análisis (alícuotas de ensayo) son homogéneas y representativas de las muestras finales.

## 3.2. *Procedimiento específico en caso de examen por inspección visual, por microscopía o cuando se homogeneiza toda la muestra global*

- En caso de inspección visual (sin microscopio), se examina toda la muestra global o toda la muestra final.
- En caso de examen microscópico, el laboratorio puede reducir la muestra global, o volver a reducir la muestra reducida. Las muestras finales para defensa y posible referencia se toman según un procedimiento equivalente al seguido para la muestra final de control.
- Cuando se homogeneiza toda la muestra global, las muestras finales se toman de la muestra global homogeneizada.
- Para determinar el cornezuelo del centeno y las impurezas botánicas nocivas, la muestra final debe dividirse en dos submuestras de igual peso, de aproximadamente 500 gramos. Se examina una de las dos submuestras. Si el resultado de la submuestra es igual o inferior al 50 % (umbral analítico) del contenido máximo, se considerará que la muestra se ajusta al contenido máximo. Si el resultado es superior al 50 % del contenido máximo, deberá examinarse la otra submuestra y se utilizará la media del resultado de las dos submuestras para comprobar el cumplimiento del contenido máximo.

## 4. **Almacenamiento de las muestras**

Las muestras deben almacenarse a una temperatura que no altere su composición. Las destinadas al análisis de vitaminas o sustancias especialmente fotosensibles se guardarán de manera que no les afecte la luz.

### B. DISPOSICIONES RELATIVAS A LOS REACTIVOS Y EL INSTRUMENTAL EMPLEADOS EN LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

1. Salvo que se especifique lo contrario en el método de análisis, todos los reactivos deben ser analíticamente puros (a.p.). Si se analizan oligoelementos, debe comprobarse la pureza de los reactivos por medio de un ensayo en blanco. Dependiendo de los resultados que se obtengan, quizá sea necesaria una mayor purificación de los reactivos.
2. Siempre que en los métodos de análisis se mencionen operaciones que impliquen preparación de soluciones, dilución, enjuague o lavado sin indicar la naturaleza del disolvente o el diluyente, debe utilizarse agua. Por regla general, el agua deberá ser desmineralizada o destilada. En casos particulares, indicados en los métodos de análisis, debe someterse a procedimientos especiales de purificación.
3. Habida cuenta del equipamiento que se encuentra normalmente en los laboratorios de control, en los métodos de análisis solo se hace referencia a los instrumentos y aparatos especiales o que requieren un uso específico. Deben estar limpios, sobre todo cuando hayan de determinarse cantidades muy pequeñas de sustancias.

### C. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 1. **Procedimiento de extracción**

Varios métodos establecen un procedimiento de extracción específico. Como regla general, puede aplicarse un procedimiento de extracción distinto al mencionado en el método si se ha demostrado que su eficacia de extracción es equivalente para la matriz analizada.

## 2. Procedimiento de limpieza

Varios métodos establecen un procedimiento de limpieza específico. Como regla general, puede aplicarse un procedimiento de limpieza distinto al mencionado en el método si se ha demostrado que sus resultados analíticos son equivalentes para la matriz analizada.

## 3. Número de determinaciones

Al analizar sustancias indeseables, si el resultado de la primera determinación es significativamente inferior (> 50 %) a la especificación que ha de controlarse, no serán necesarias más determinaciones, a condición de que se apliquen los procedimientos de calidad adecuados. En otros casos, es necesario otro análisis (segunda determinación) para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. La media de las dos determinaciones se usa para una evaluación posterior.

Si se controlan los contenidos mínimos o máximos de aditivos para piensos y los resultados de la primera determinación están por encima del nivel mínimo o por debajo del contenido máximo, no son necesarias determinaciones adicionales, a condición de que se apliquen los procedimientos de calidad adecuados. En otros casos, es necesario otro análisis (segunda determinación) para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. La media de las dos determinaciones se usa para una evaluación posterior.

Si se controla el contenido declarado de una sustancia o un ingrediente y el resultado de la primera determinación confirma dicho contenido, es decir, que el resultado analítico entra en el intervalo de variación aceptable del contenido declarado, no será necesaria una segunda determinación, siempre que se apliquen los procedimientos de calidad apropiados. En otros casos, es necesario otro análisis (segunda determinación) para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. La media de las dos determinaciones se usa para una evaluación posterior (el resultado analítico medio se sitúa o no dentro del intervalo aceptable de variación del contenido declarado).

En algunos casos, este intervalo de variación aceptable está definido en la legislación, por ejemplo, en el Reglamento (CE) n.º 767/2009 y en el Reglamento (UE) 2019/4 del Parlamento Europeo y del Consejo <sup>(1)</sup>.

## 4. Comunicación del método de análisis empleado

En el informe de análisis se indicará el método de análisis utilizado.

## 5. Comunicación de los resultados analíticos

El resultado analítico se expresará según establezca el método de análisis, con el número adecuado de cifras significativas, y se corregirá, si es necesario, con respecto al contenido de humedad de la muestra final antes de la preparación.

La mayoría de los niveles reglamentarios (por ejemplo, el contenido máximo y el contenido mínimo) en la legislación de la UE sobre piensos se establecen en relación con un pienso con un contenido de humedad del 12 %. Por lo tanto, en estos casos, para evaluar el resultado analítico medido en la muestra con respecto al contenido reglamentario, el resultado analítico debe primero multiplicarse por 88 y dividirse por el contenido de materia seca de la muestra (en porcentaje), tal como se indica en la siguiente fórmula:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

donde:

$Mc$ : contenido de humedad de la muestra (en porcentaje); Por tanto,  $100 - Mc$  representa el contenido de materia seca de la muestra (en porcentaje)

$R_{ana}$ : resultado analítico de la medición de la muestra

$R_{12\%}$ : resultado para un pienso con un contenido de humedad del 12 %; debe evaluarse con respecto al contenido reglamentario.

<sup>(1)</sup> Reglamento (UE) 2019/4 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicamentosos, por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y se deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo (DO L 4 de 7.1.2019, p. 1).



Además, si se cumplen las condiciones siguientes:

- el resultado del análisis es significativamente ( $> 50\%$ ) inferior o superior a la información o especificación de la etiqueta que debe controlarse (dependiendo de si la información o especificación de la etiqueta es un contenido máximo o mínimo);
- se conoce el contenido de humedad del pienso y se puede determinar que la corrección del contenido de humedad no modificará la evaluación;

en ese caso, a condición de que se apliquen los procedimientos de calidad adecuados y el análisis sirva únicamente para comprobar el cumplimiento de las disposiciones legales, podrá omitirse la corrección del contenido de humedad (por ejemplo, en casos en que no exista especificación o contenido reglamentario), a menos que sea necesaria para su interpretación.

Si el resultado analítico se corrige en función del contenido de humedad, la incertidumbre de la medida correspondiente también debe corregirse en el mismo procedimiento.

En caso de análisis en busca de cornezuelo del centeno o de impurezas botánicas nocivas mediante un examen visual o al microscopio, no será necesario corregir el contenido de humedad.

#### 6. Incertidumbre de la medida analítica y tasa de recuperación en caso de análisis de sustancias indeseables

Por lo que se refiere a las sustancias indeseables según se definen en la Directiva 2002/32/CE, se considerará que un producto destinado a la alimentación animal no cumple los requisitos de contenido máximo si se estima que el resultado analítico, entendido como la media de dos determinaciones independientes, de un pienso con un contenido de humedad del 12 % excede de dicho contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida usando un factor de cobertura de 2, que proporciona un nivel de confianza de aproximadamente el 95 %, y la corrección en función de la recuperación. Esto significa que, para evaluar el cumplimiento, se emplea la concentración analizada una vez corregida en función de la recuperación y tras deducirse la incertidumbre de medida expandida. Este procedimiento solo es aplicable en los casos en que el método de análisis permite estimar la incertidumbre de medida expandida y la corrección en función de la recuperación (es decir, que no es necesario si el examen es visual o al microscopio).

Si el resultado analítico de la muestra tomada para defensa supera el contenido máximo (sin tener en cuenta la incertidumbre de medida expandida), esto confirma el incumplimiento establecido con la muestra de control, en ausencia de normas nacionales al respecto.

El resultado analítico se comunicará como sigue (en la medida en que el método de análisis utilizado permita estimar la incertidumbre de medida expandida):

- a) corregido en función de la recuperación, cuando proceda y sea pertinente; en caso de que esté corregido, deberá indicarse. La tasa de recuperación debe citarse a menos que la corrección intrínseca del sesgo forme parte del procedimiento, donde el sesgo es la diferencia entre el valor medido y la concentración de referencia. Dicha corrección no será necesaria si la tasa de recuperación se sitúa entre el 90 % y el 110 %;
- b) como " $x \pm U$ ", donde  $x$  es el resultado analítico y  $U$  la incertidumbre de medida expandida, utilizando un factor de cobertura de 2 <sup>(2)</sup>, que da un nivel de confianza del 95 % aproximadamente.

Sin embargo, si el resultado del análisis fuera notablemente inferior ( $> 50\%$ ) a la especificación que ha de controlarse, podrían omitirse la tasa de recuperación y la incertidumbre de medida expandida (por ejemplo, en los casos en los que no exista especificación o nivel reglamentario), a menos que la incertidumbre de medida sea necesaria para la interpretación.

#### 7. Incertidumbre de la medida analítica y tasa de recuperación en caso de análisis del contenido de aditivos en los piensos

A fin de comprobar el cumplimiento del contenido mínimo y máximo autorizado de aditivos para piensos, la presencia de un aditivo para piensos se considerará no conforme con el contenido mínimo y máximo establecido si se considera que el resultado analítico, como media de dos determinaciones independientes, en relación con un pienso con un contenido de humedad del 12 %:

<sup>(2)</sup> El intervalo de confianza del 95 % puede alcanzarse utilizando otro factor, como el factor  $t$ .

- supera el contenido máximo teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida y la corrección en función de la recuperación. Esto significa que, para evaluar el cumplimiento, se emplea la concentración analizada (como media de dos determinaciones) una vez corregida en función de la recuperación y tras deducirse la incertidumbre de medida expandida;
- es inferior al contenido mínimo teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida y la corrección en función de la recuperación. Esto significa que, para evaluar el cumplimiento, se emplea la concentración analizada (como media de dos determinaciones) una vez corregida en función de la recuperación y tras sumarse la incertidumbre de medida expandida.

Si el resultado analítico de la muestra tomada para defensa supera el contenido máximo (sin tener en cuenta la incertidumbre de medida expandida), esto confirma el incumplimiento establecido con la muestra de control, en ausencia de normas nacionales al respecto.

El resultado analítico se comunicará como sigue (en la medida en que el método de análisis utilizado permita estimar la incertidumbre de medida expandida):

- a) corregido en función de la recuperación, cuando proceda y sea pertinente; en caso de que esté corregido, deberá indicarse. La tasa de recuperación debe citarse a menos que la corrección intrínseca del sesgo forme parte del procedimiento, donde el sesgo es la diferencia entre el valor medido y la concentración de referencia. Dicha corrección no será necesaria si la tasa de recuperación se sitúa entre el 90 % y el 110 %;
- b) como " $x \pm U$ ", donde  $x$  es el resultado analítico (como media de dos determinaciones) y  $U$  la incertidumbre de medida expandida, utilizando un factor de cobertura de 2 <sup>(3)</sup>, que da un nivel de confianza del 95 % aproximadamente.».

—

---

<sup>(3)</sup> El intervalo de confianza del 95 % puede alcanzarse utilizando otro factor, como el factor  $t$ .

## ANEXO III

## «ANEXO III

**MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES PARA PIENSOS Y LOS PIENSOS COMPUESTOS**

## A. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

**1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el contenido de humedad de los piensos. Si el pienso contiene sustancias volátiles, como ácidos orgánicos, debe tenerse presente que, junto con el contenido de humedad, también se determina un número significativo de esas sustancias.

No incluye el análisis de productos lácteos como materiales para piensos y piensos compuestos formados predominantemente por productos lácteos, el análisis de grasas y aceites animales y vegetales, ni el análisis de semillas y frutos oleaginosos.

La determinación del contenido de humedad de las semillas oleaginosas debe determinarse mediante el método previsto en la norma EN ISO 665: Determinación del contenido de humedad y de materias volátiles, entendiéndose que la soja debe molerse antes de determinar el contenido de humedad.

**2. Principio**

La muestra se deseca en las condiciones especificadas, que varían en función de la naturaleza del pienso. La pérdida de peso se determina mediante pesada. Cuando se trata de piensos sólidos con un elevado contenido de humedad, es necesario efectuar un secado preliminar.

**3. Instrumental**

- 3.1. Trituradora de material que no absorba la humedad, fácil de limpiar, que permita un triturado rápido y uniforme sin provocar un calentamiento sensible, evite al máximo el contacto con el aire exterior y cumpla los requisitos indicados en los puntos 4.1.1 y 4.1.2 (por ejemplo, microtrituradoras de martillos o de enfriamiento por agua, molinos de conos plegables, trituradoras de movimiento lento o de discos dentados).
- 3.2. Balanza analítica, con una exactitud de 1 mg.
- 3.3. Recipientes secos de metal no corrosible o de vidrio, con tapas que garanticen un cierre hermético; la superficie de trabajo debe permitir que la muestra de ensayo se esparza a razón de 0,3 g/cm<sup>2</sup> aproximadamente.
- 3.4. Estufa isotérmica de calentamiento eléctrico ( $\pm 2$  °C), adecuadamente ventilada, que permita una rápida regulación de la temperatura <sup>(1)</sup>.
- 3.5. Estufa de vacío regulable de calentamiento eléctrico, provista de una bomba de aceite y un mecanismo para introducir o bien aire desecado caliente, o bien un agente desecante (por ejemplo, óxido de calcio).
- 3.6. Desecador con una placa gruesa perforada de metal o porcelana, que contenga un agente desecante eficaz.

**4. Procedimiento**

*Nota:* Las operaciones que se describen en esta sección deben realizarse inmediatamente después de abrir los paquetes de muestras. Los análisis deben efectuarse, como mínimo, por duplicado.

<sup>(1)</sup> Para el secado de cereales, harina, grañones y sémola, la estufa debe tener una capacidad térmica tal que, precalentada a 131 °C, recupere esa temperatura en menos de 45 minutos una vez puestas a desecar simultáneamente en su interior el máximo número de muestras de ensayo. La ventilación debe ser tal que, tras dos horas secando el máximo número de muestras de trigo candeal que pueda contener, los resultados difieran en menos de un 0,15 % de los obtenidos tras cuatro horas de secado.

#### 4.1. Preparación

##### 4.1.1. Piensos distintos de los contemplados en los puntos 4.1.2 y 4.1.3.

Tomar, como mínimo, 50 g de la muestra. Si es necesario, triturar o dividir de manera que no se produzca variación alguna en el contenido de humedad (véase el punto 6).

##### 4.1.2. Cereales y grañones.

Tomar, como mínimo, 50 g de la muestra. Moler en partículas de las que al menos el 50 % pasen por un tamiz con una luz de malla de 0,5 mm y no dejen más de un 10 % de residuo en un tamiz con una luz de malla redonda de 1 mm.

##### 4.1.3. Piensos líquidos o en forma de pasta, piensos compuestos predominantemente de aceites y grasas.

Tomar unos 25 g de la muestra, pesar con una precisión de 10 mg, añadir una cantidad apropiada de arena anhidra pesada con una precisión de 10 mg y mezclar hasta obtener un producto homogéneo.

#### 4.2. Desecación

Secar un recipiente (punto 3.3) con su tapa en la estufa ajustada a 103 °C durante 30 min ± 1 min. Sacar y dejar enfriar a temperatura ambiente en el desecador (punto 3.6).

##### 4.2.1. Piensos distintos de los contemplados en los puntos 4.2.2 y 4.2.3.

Tarar un recipiente con su tapa, con una precisión de 1 mg. En el recipiente tarado, pesar, con una precisión de 1 mg, unos 5 g de la muestra y esparcirla uniformemente. Colocar el recipiente, sin su tapa, en la estufa precalentada a 103 °C. Para impedir que la estufa se enfríe en exceso, introducir el recipiente lo más rápidamente posible. Dejar secar durante cuatro horas, contadas a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo una temperatura de 103 °C. Abrirla, tapar inmediatamente el recipiente, retirarlo de la estufa, dejarlo enfriar de 30 minutos a 45 minutos en el desecador (punto 3.6) y pesar con una precisión de 1 mg.

En el caso de piensos compuestos predominantemente (> 50 %) de aceites y grasas, tanto animales como vegetales, secar en la estufa durante otros 30 minutos a 103 °C. La diferencia entre las dos pesadas no debe superar el 0,1 % de humedad.

##### 4.2.2. Cereales, harina, grañones y sémola.

Tarar un recipiente con su tapa, con una precisión de 0,5 mg. En el recipiente tarado, pesar, con una precisión de 1 mg, unos 5 g de la muestra triturada y esparcirla uniformemente. Colocar el recipiente, sin su tapa, en la estufa precalentada a 130 °C. Para impedir que la estufa se enfríe en exceso, introducir el recipiente lo más rápidamente posible. Dejar secar durante 2 horas, contadas a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo una temperatura de 130 °C. Abrirla, tapar inmediatamente el recipiente, retirarlo de la estufa, dejarlo enfriar de 30 minutos a 45 minutos en el desecador (punto 3.6) y pesar con una precisión de 1 mg.

##### 4.2.3. Piensos compuestos con más de un 4 % de sacarosa o lactosa: materiales para piensos como algarrobas, productos cerealísticos hidrolizados, semillas de malta, lonchas de remolacha desecadas, pescado y azúcares solubles.

Tarar un recipiente con su tapa, con una precisión de 0,5 mg. En el recipiente tarado, pesar, con una precisión de 1 mg, unos 5 g de la muestra y esparcirla uniformemente. Colocar el recipiente, sin su tapa, en la estufa de vacío (punto 3.5) precalentada a una temperatura comprendida entre 80 °C y 85 °C. Para impedir que la estufa se enfríe en exceso, introducir el recipiente lo más rápidamente posible.

Elevar la presión a 100 Torr y dejar secar durante 4 horas a esa presión, bien en una corriente de aire seco caliente, bien mediante un agente desecante (unos 300 g para 20 muestras). En este último caso, desconectar la bomba de vacío cuando se haya alcanzado la presión prescrita. Calcular el tiempo de secado a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo una temperatura de 80 °C a 85 °C. A continuación, restablecer con precaución la presión atmosférica en la estufa. Abrirla, tapar inmediatamente el recipiente, retirarlo de la estufa, dejarlo enfriar de 30 minutos a 45 minutos en el desecador (punto 3.6) y pesar con una precisión de 1 mg. Proceder a una desecación complementaria de 30 minutos en la estufa de vacío a una temperatura de 80 °C a 85 °C y volver a pesar. La diferencia entre las dos pesadas no debe superar el 0,1 % de humedad.

#### 4.3. *Predesecación (parcial)*

Es necesario desecar parcialmente los piensos “húmedos” con una fracción másica de menos del 85 % de materia seca [como forrajes, raciones totales mezcladas, alimentos (no) líquidos] antes de la molienda fina con el fin de analizar sus sustancias estables; las sustancias inestables no se pueden desecar parcialmente.

La desecación parcial se puede llevar a cabo en una estufa de convección forzada, en un horno microondas o en un liofilizador. Excepto en el caso de la desecación parcial por liofilización, el objetivo es secar el pienso manteniendo la temperatura de la muestra por debajo de 60 °C, de modo que la composición química se vea afectada lo menos posible. La desecación a temperaturas por encima de los 60 °C provoca cambios químicos en los piensos (por ejemplo, la degradación de las proteínas). El pienso desecado deberá equilibrarse a temperatura ambiente durante unos quince minutos antes de medir la materia seca parcial, a fin de reducir al mínimo el cambio de humedad que se puede producir durante la molienda y el almacenamiento. La desecación a temperaturas por debajo de los 60 °C no elimina completamente el agua del pienso: por consiguiente, la desecación parcial (inicial) no representa la materia seca total del pienso. Tras la desecación, la submuestra se muele y se analiza para calcular la materia seca (final) de la muestra parcialmente seca (la humedad restante es del 3 % al 15 %) cuando se determinan otros componentes químicos.

Por lo tanto, se recomienda un procedimiento en dos fases para determinar la materia seca. En primer lugar, determinar el contenido de materia seca (si es menos del 85 % de materia seca); a continuación, determinar el contenido de materia seca restante en una muestra de ensayo molida y multiplicar la materia seca parcial por la materia seca restante para determinar el contenido de materia seca total.

### 5. **Cálculo de los resultados**

El contenido de humedad (X), en porcentaje de la muestra, se calcula con las fórmulas siguientes:

#### 5.1. *Desecación sin predesecación*

$$X = \left( \frac{m - m_0}{m} \right) \times 100$$

donde:

m: = peso inicial, en gramos, de la muestra de ensayo

m<sub>0</sub>: = peso, en gramos, de la muestra de ensayo seca

#### 5.2. *Desecación con predesecación <sup>(2)</sup>*

$$X_p = \left[ \frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left( 1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

donde:

m: = peso inicial, en gramos, de la muestra de ensayo

m<sub>1</sub>: = peso, en gramos, de la muestra de ensayo tras la predesecación

m<sub>2</sub>: = peso, en gramos, de la muestra de ensayo una vez triturada o molida

m<sub>0</sub>: = peso, en gramos, de la muestra de ensayo seca

<sup>(2)</sup> Para más detalles sobre el cálculo, véase la norma EN ISO 6498: Alimentos para animales. Directrices para la preparación de muestras.

### 5.3. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no excederá del 0,2 % del valor absoluto de humedad, excepto en el caso de los alimentos húmedos para animales de compañía y los accesorios masticables para perros, en cuyo caso la diferencia no excederá del 0,5 % del valor absoluto de humedad.

## 6. Observación

Cuando resulte necesario efectuar una trituración y se considere que esta modifica el contenido de humedad del producto, los resultados del análisis de los componentes del pienso deben corregirse atendiendo al contenido de humedad de la muestra en su estado inicial.

### B. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES

## 1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de agua y sustancias volátiles de las grasas y los aceites animales y vegetales.

## 2. Principio

Se deseca la muestra a 103 °C con un peso constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 1 mg). La pérdida de peso se determina mediante pesada.

## 3. Instrumental

- 3.1. Plato de fondo plano de material resistente a la corrosión, de 8 cm a 9 cm de diámetro y de aproximadamente 3 cm de alto.
- 3.2. Termómetro de bulbo reforzado con tubo capilar en el extremo superior, graduado entre aproximadamente 80 °C y, como mínimo, 110 °C, de unos 10 cm de longitud.
- 3.3. Baño de arena o placa calefactora eléctrica.
- 3.4. Desecador con un agente desecante eficaz.
- 3.5. Balanza analítica.

## 4. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, unos 20 g de la muestra homogeneizada en el plato tarado seco (punto 3.1) que contiene el termómetro (punto 3.2). Calentar sobre el baño de arena o la placa calefactora (punto 3.3), removiendo constantemente con el termómetro, de manera que la temperatura alcance 90 °C en unos siete minutos.

Reducir el calor, observando con qué frecuencia salen burbujas del fondo del plato. La temperatura no debe sobrepasar los 105 °C. Seguir removiendo, raspando el fondo del plato, hasta que dejen de formarse burbujas.

Para eliminar completamente la humedad, calentar varias veces a  $(103 \pm 2)$  °C, enfriando a 93 °C entre los sucesivos calentamientos. A continuación, dejar enfriar a temperatura ambiente en el desecador (punto 3.4) y pesar. Repetir esta operación hasta que la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas deje de sobrepasar los 2 mg.

*Nota:* El incremento del peso de la muestra tras varios calentamientos es indicio de una oxidación de la grasa, en cuyo caso debe calcularse el resultado a partir de la pesada efectuada inmediatamente antes de que empezara a producirse ese incremento.

## 5. Cálculo de los resultados

El contenido de humedad ( $X$ ), como porcentaje de la muestra, viene dado por la fórmula siguiente:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

donde:

$m$ : = peso, en gramos, de la muestra de ensayo

$m_1$ : = peso, en gramos, del plato con su contenido, antes del calentamiento

$m_2$ : = peso, en gramos, del plato con su contenido, tras el calentamiento

Los resultados inferiores al 0,05 % deben registrarse como "inferior al 0,05 %".

#### *Repetibilidad*

La diferencia de humedad entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder del 0,1 %, en valor absoluto.

### C. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO Y CÁLCULO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA BRUTA

#### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de proteína bruta del pienso sobre la base del contenido de nitrógeno, determinado por el método Kjeldahl (<sup>3</sup>).

#### 2. Principio

La muestra se digiere con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. La solución ácida se alcaliniza con una solución de hidróxido de sodio. El amoníaco se destila y se recoge en una cantidad medida de ácido sulfúrico, cuyo exceso se valora con una solución patrón de hidróxido de sodio.

Alternativamente, el amoníaco desprendido se destila en una solución de ácido bórico en exceso, tras lo cual se efectúa la valoración con una solución de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

#### 3. Reactivos

- 3.1. Sulfato de potasio.
- 3.2. Catalizador: óxido de cobre [II], CuO, o sulfato de cobre [II] pentahidratado, CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O.
- 3.3. Zinc granulado.
- 3.4. Ácido sulfúrico,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.
- 3.5. Ácido sulfúrico, solución volumétrica patrón,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$  mol/l.
- 3.6. Ácido sulfúrico, solución volumétrica patrón,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$  mol/l.
- 3.7. Ácido sulfúrico, solución volumétrica patrón,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$  mol/l.
- 3.8. Indicador rojo de metilo: disolver 300 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol,  $\sigma = 95\% - 96\%$  (v/v).
- 3.9. Solución de hidróxido de sodio (puede utilizarse el de grado técnico),  $\beta = 40$  g/100 ml (m/v: 40 %).
- 3.10. Hidróxido de sodio, solución volumétrica patrón,  $c(\text{NaOH}) = 0,25$  mol/l.
- 3.11. Hidróxido de sodio, solución volumétrica patrón,  $c(\text{NaOH}) = 0,10$  mol/l.
- 3.12. Piedra pómez granulada, lavada en ácido clorhídrico y calcinada.
- 3.13. Acetanilida (punto de fusión = 114 °C, contenido de N = 10,36 %).
- 3.14. Sacarosa (exenta de nitrógeno).
- 3.15. Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

(<sup>3</sup>) El contenido de nitrógeno se puede determinar en todos los piensos, pero el factor de conversión de 6,25 para el cálculo de proteína bruta puede no ser aplicable a materias primas para piensos procedentes de insectos (factor de conversión más bajo) y a determinados alimentos para animales de compañía y proteínas del plasma sanguíneo (factor de conversión más alto).

- 3.16. Solución de indicador rojo de metilo: disolver 100 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol o metanol.
- 3.17. Solución de verde de bromocresol: disolver 100 mg de verde de bromocresol en 100 ml de etanol o metanol.
- 3.18. Solución de ácido bórico (10 g/l a 40 g/l, en función del instrumental empleado).

Si se aplica la detección colorimétrica del punto final, debe añadirse rojo de metilo y verde de bromocresol a las soluciones de ácido bórico. Si se prepara 1 l de solución de ácido bórico, antes de ajustar el volumen deberán añadirse 7 ml de solución de indicador rojo de metilo (punto 3.16) y 10 ml de solución de verde de bromocresol (punto 3.17).

Dependiendo del agua utilizada, el pH de la solución de ácido bórico podría variar de un lote a otro. El pH de la solución de ácido bórico tiene que estar entre 4,3 y 4,7. A menudo es necesario un ajuste con un pequeño volumen de álcali para obtener un blanco positivo.

*Nota:* Añadiendo de 3 ml a 4 ml aproximadamente de NaOH (punto 3.11) a 1 l de solución de ácido bórico de 10 g/l se suelen conseguir buenos ajustes. Guardar la solución a temperatura ambiente, al abrigo de la luz y de fuentes de vapores amoniacales.

- 3.19. Ácido clorhídrico, solución volumétrica patrón,  $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$ .

*Nota:* Pueden emplearse otras concentraciones de soluciones volumétricas (puntos 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 y 3.19), si en los cálculos se hacen las correcciones correspondientes. Las concentraciones deberán expresarse siempre con cuatro decimales.

#### 4. Instrumental

El adecuado para efectuar la digestión, la destilación y la valoración conforme al procedimiento Kjeldahl.

#### 5. Procedimiento

##### 5.1. Digestión

Pesar, con una precisión de 0,001 g, 1 g de la muestra, y pasar esta al matraz del aparato de digestión. Añadir 15 g de sulfato de potasio (punto 3.1), una cantidad apropiada de catalizador (punto 3.2) (de 0,3 g a 0,4 g de óxido de cobre [III] o de 0,9 g a 1,2 g de sulfato de cobre [II] pentahidratado), 25 ml de ácido sulfúrico (punto 3.4) y, si es necesario, unos pocos gránulos de piedra pómez (punto 3.12), y mezclar.

Calentar el matraz, moderadamente al principio, agitándolo en círculos de vez en cuando, si es necesario, hasta que la masa se haya carbonizado y la espuma haya desaparecido; a continuación, calentar más intensamente hasta que el líquido hierva de manera constante. El calentamiento es el adecuado si el ácido en ebullición se condensa en la pared del matraz. Evitar que los lados se sobrecalienten y que se adhieran a ellos partículas orgánicas.

Cuando la solución se aclare y adopte un color verde claro, seguir hirviendo durante otras dos horas, y dejar enfriar a continuación.

##### 5.2. Destilación

Añadir con cuidado suficiente agua para que los sulfatos se disuelvan por completo. Dejar enfriar y, a continuación, si es necesario, añadir unos pocos gránulos de zinc (punto 3.3). Proceder conforme al punto 5.2.1 o 5.2.2.

##### 5.2.1. Destilación en ácido sulfúrico

Verter en el matraz receptor del aparato de destilación exactamente 25 ml de ácido sulfúrico (punto 3.5) o (punto 3.7), en función del supuesto contenido de nitrógeno. Añadir unas pocas gotas del indicador rojo de metilo (punto 3.8).

Conectar el matraz de digestión al condensador del aparato de destilación y sumergir el extremo del condensador, como mínimo, 1 cm en el líquido contenido en el matraz receptor (véase la observación del punto 8.3). Verter lentamente 100 ml de solución de hidróxido de sodio (punto 3.9) en el matraz de digestión sin pérdida de amoníaco (véase la observación del punto 8.1). Calentar el matraz hasta que el amoníaco se haya destilado.



### 5.2.2. Destilación en ácido bórico

Si la valoración del contenido de amoniaco del destilado se efectúa manualmente, se aplica el procedimiento mencionado a continuación. Si la unidad de destilación está completamente automatizada e incluye la valoración del contenido de amoniaco del destilado, seguir las instrucciones de empleo del fabricante.

Colocar un matraz receptor que contenga de 25 ml a 30 ml de la solución de ácido bórico (punto 3.18) bajo la salida del condensador, de manera que el tubo de descarga quede bajo la superficie del exceso de solución de ácido bórico. Ajustar la unidad de destilación para que dispense 50 ml de solución de hidróxido de sodio (punto 3.9). Poner en funcionamiento la unidad de destilación siguiendo las instrucciones del fabricante y destilar el amoniaco desprendido por la adición de la solución de hidróxido de sodio. Recoger el destilado en la solución receptora de ácido bórico. La cantidad de destilado (tiempo de destilación de vapor) depende de la cantidad de nitrógeno que contiene la muestra. Seguir las instrucciones del fabricante.

*Nota:* En una unidad de destilación semiautomática, la adición de exceso de hidróxido de sodio y la destilación de vapor se realizan de forma automática.

### 5.3. Valoración

Proceder conforme al punto 5.3.1 o 5.3.2.

#### 5.3.1. Ácido sulfúrico

Valorar el exceso de ácido sulfúrico en el matraz receptor con solución de hidróxido de sodio (punto 3.10 o 3.11), dependiendo de la concentración del ácido sulfúrico empleado, hasta alcanzar el punto final.

#### 5.3.2. Ácido bórico

Valorar, empleando una bureta, el contenido del matraz receptor con la solución volumétrica patrón de ácido clorhídrico (punto 3.19) o con la solución volumétrica patrón de ácido sulfúrico (punto 3.6), y leer la cantidad de valorante utilizado.

Si se aplica la detección colorimétrica del punto final, este se alcanza cuando aparece el primer rastro de coloración rosa en el contenido. Leer la bureta con una precisión de 0,05 ml. Una placa agitadora magnética iluminada o un detector fotométrico pueden ayudar a visualizar el punto final.

También puede hacerse automáticamente utilizando un destilador de vapor con valoración automática.

Utilizar el destilador o el destilador/valorador siguiendo las correspondientes instrucciones del fabricante.

*Nota:* Si se utiliza un sistema de valoración automática, la valoración empieza inmediatamente después de que comience la destilación, y se emplea la solución de ácido bórico al 1 % (punto 3.18).

Si se utiliza una unidad de destilación completamente automática, la valoración automática del amoniaco puede también llevarse a cabo con detección del punto final mediante un sistema de pH potenciométrico.

En este caso se emplea un valorador automático con pH-metro. El medidor de pH deberá calibrarse adecuadamente en el intervalo de pH 4 a pH 7, siguiendo los procedimientos normales de laboratorio para la calibración del pH.

El punto final del pH de la valoración se alcanza con un pH 4,6, que es el punto álgido de la curva de valoración (punto de inflexión).

### 5.4. Ensayo en blanco

Para confirmar que los reactivos no tienen nitrógeno, efectuar un ensayo en blanco (digestión, destilación y valoración) con un 1 g de sacarosa (punto 3.14) en lugar de la muestra.

## 6. Cálculo de los resultados

Los cálculos se realizan conforme al punto 6.1 o 6.2.

### 6.1. Cálculo para la valoración según el punto 5.3.1

El contenido de proteína bruta, expresado en porcentaje en peso, se calcula según la fórmula siguiente:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

donde:

- $V_0$ : = volumen (ml) de NaOH (punto 3.10 o 3.11) empleado en el ensayo en blanco  
 $V_1$ : = volumen (ml) de NaOH (punto 3.10 o 3.11) empleado en la valoración de la muestra  
 $c$ : = concentración (mol/l) de hidróxido de sodio (punto 3.10 o 3.11)  
 $m$ : = peso (g) de la muestra

## 6.2. Cálculo para la valoración según el punto 5.3.2

### 6.2.1. Valoración con ácido clorhídrico

El contenido de proteína bruta, expresado en porcentaje en peso, se calcula según la fórmula siguiente:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

donde:

- $m$ : = peso (g) de la porción de ensayo  
 $c$ : = concentración (mol/l) de la solución volumétrica patrón de ácido clorhídrico (punto 3.19)  
 $V_0$ : = volumen (ml) de ácido clorhídrico empleado en el ensayo en blanco  
 $V_1$ : = volumen (ml) de ácido clorhídrico empleado para la porción de ensayo

### 6.2.2. Valoración con ácido sulfúrico

El contenido de proteína bruta, expresado en porcentaje en peso, se calcula según la fórmula siguiente:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

donde:

- $m$ : = peso (g) de la porción de ensayo  
 $c$ : = concentración (mol/l) de solución volumétrica patrón de ácido sulfúrico (punto 3.6)  
 $V_0$ : = volumen (ml) de ácido sulfúrico (punto 3.6) empleado para el ensayo en blanco  
 $V_1$ : = volumen (ml) de ácido sulfúrico (punto 3.6) empleado para la porción de ensayo

## 7. Verificación del método

### 7.1. Repetibilidad

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

- el 0,4 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de proteína bruta inferiores al 20 %;
- el 2,0 % del valor superior, en el caso de contenidos de proteína bruta del 20 % al 40 %;
- el 0,8 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de proteína bruta superiores al 40 %.

### 7.2. Reproducibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas con la misma muestra en laboratorios diferentes no debe superar:

- el 1,8 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de proteína bruta inferiores al 20 %;
- el 9,0 % del valor superior, en el caso de contenidos de proteína bruta del 20 % al 40 %;
- el 3,6 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de proteína bruta superiores al 40 %.

### 7.3. *Exactitud*

Efectuar el análisis (digestión, destilación y valoración) con una cantidad adecuada de acetanilida (punto 3.13) (entre 0,2 g y 0,3 g) en presencia de 1 g de sacarosa (punto 3.14); 1 g de acetanilida consume 14,80 ml de ácido sulfúrico (punto 3.5). La recuperación debe ser de al menos el 99 %.

## 8. **Observaciones**

- 8.1. El instrumental puede ser de tipo manual, semiautomático o automático. Si requiere un transvase entre la digestión y la destilación, este debe tener lugar sin pérdidas. Si el matraz del aparato de destilación no va provisto de un embudo de decantación, añadir el hidróxido de sodio inmediatamente antes de conectarlo al condensador, vertiendo el líquido de forma que caiga lentamente por la pared del matraz.
- 8.2. Si el producto de la digestión se solidifica, recomenzar la determinación con una cantidad de ácido sulfúrico (punto 3.4) mayor que la especificada en el punto 5.1.
- 8.3. En el caso de productos con un bajo contenido de nitrógeno, el volumen de ácido sulfúrico (punto 3.7) que se pone en el matraz receptor puede reducirse, si es necesario, a 10 ml o 15 ml, enrasando a continuación con agua hasta los 25 ml.
- 8.4. Aunque para los análisis ordinarios pueden emplearse métodos de determinación de la proteína bruta alternativos, el método Kjeldahl descrito en esta parte C es el método de referencia. La equivalencia de los resultados obtenidos con el método alternativo (por ejemplo, DUMAS) respecto de los obtenidos con el método de referencia debe demostrarse para cada una de las matrices. Puesto que los resultados obtenidos con un método alternativo, aun habiéndose verificado la equivalencia, pueden desviarse ligeramente de los obtenidos con el método de referencia, es necesario mencionar en el informe analítico el método de análisis empleado para la determinación de la proteína bruta.

## D. DETERMINACIÓN DE LA UREA

### 1. **Finalidad y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar la cantidad de urea utilizada como aditivo en los piensos para rumiantes.

### 2. **Principio**

La muestra se suspende en agua con un agente clarificante. A continuación se filtra la suspensión. El contenido de urea del filtrado se determina tras añadir 4-dimetilaminobenzaldehído (4-DMAB) midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 420 nm.

### 3. **Reactivos**

- 3.1. Solución de 4-dimetilaminobenzaldehído: disolver 1,6 g de 4-DMAB en 100 ml de etanol al 96 % y añadir 10 ml de ácido clorhídrico ( $\rho_{20} = 1,19$  g/ml). Este reactivo se conserva como máximo dos semanas.
- 3.2. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de zinc,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  y 3 g de ácido acético glacial; enrasar con agua a 100 ml.
- 3.3. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ; enrasar con agua a 100 ml.
- 3.4. Carbón activo que no absorba urea (debe comprobarse).
- 3.5. Solución de urea al 0,1 % (p/v).

### 4. **Instrumental**

- 4.1. Mezclador (tambor): de aproximadamente 35 a 40 revoluciones por minuto.
- 4.2. Tubos de ensayo: (160 × 16) mm con tapones esmerilados.
- 4.3. Espectrofotómetro.

## 5. Procedimiento

### 5.1. Análisis de la muestra

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2 g de la muestra e introducirlos con 1 g de carbón activo (punto 3.4) en un matraz aforado de 500 ml. Añadir 400 ml de agua y 5 ml de solución de Carrez I (punto 3.2), mezclar durante aproximadamente 30 segundos y añadir 5 ml de solución de Carrez II (punto 3.3). Mezclar durante 30 minutos en el tambor. Enrasar con agua, agitar y filtrar.

Retirar 5 ml de los filtrados incoloros transparentes, colocarlos en tubos de ensayo con tapones esmerilados, añadir 5 ml de solución de 4-DMAB (punto 3.1) y mezclar. Colocar los tubos en un baño maría a 20 °C (+/- 4 °C). Transcurridos 15 minutos, medir la densidad óptica de la solución de muestra con el espectrofotómetro a 420 nm. Comparar con la solución de ensayo en blanco de los reactivos.

### 5.2. Curva de calibración

Retirar de la solución de urea (punto 3.5) unos volúmenes de 1, 2, 4, 5 y 10 ml, verterlos en matraces aforados de 100 ml y enrasar con agua. Retirar 5 ml de cada solución, añadir a cada una de ellas 5 ml de solución de 4-DMAB (punto 3.1), homogeneizar y medir la densidad óptica, como se ha mostrado anteriormente, comparándola con una solución de control que contenga 5 ml de 4-DMAB y 5 ml de agua sin urea. Trazar la curva de calibración.

## 6. Cálculo de los resultados

Determinar la cantidad de urea de la muestra empleando la curva de calibración.

Expresar los resultados en miligramos de urea por kilogramo de muestra.

## 7. Evaluación del método

### 7.1. Repetibilidad

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

- A 420 nm
  - el 50 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 3 000 mg/kg a menos de 5 000 mg/kg;
  - el 25 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 5 000 mg/kg a menos de 7 000 mg/kg;
  - el 20 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 7 000 mg/kg o más.
- A 435 nm
  - el 40 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 3 000 mg/kg a menos de 5 000 mg/kg;
  - el 25 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 5 000 mg/kg a menos de 9 000 mg/kg;
  - el 5 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 9 000 mg/kg o más.

### 7.2. Reproducibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra en laboratorios diferentes y/o por analistas diferentes no debe superar:

- A 420 nm
  - los 3 000 mg/kg en valor absoluto, en el caso de contenidos de urea de 3 000 mg/kg a menos de 12 000 mg/kg;
  - los 4 500 mg/kg en valor absoluto, en el caso de contenidos de urea de 12 000 mg/kg o más.
- A 435 nm
  - el 50 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 3 000 mg/kg a menos de 8 000 mg/kg;
  - el 25 % del valor superior, en el caso de contenidos de urea de 8 000 mg/kg o más.

## 8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un ejercicio de comparación entre laboratorios de la UE en el que participaron dieciocho laboratorios. Se analizaron cinco muestras positivas de piensos compuestos para rumiantes (llamados MAT en los cuadros 1 y 2) (un análisis) en duplicados enmascarados, mientras que se hizo un análisis en blanco de un pienso compuesto para rumiantes.

Los cálculos de los límites de repetibilidad ( $r$ ) y reproducibilidad ( $R$ ) definidos en las directrices internacionales se llevaron a cabo tras la eliminación de los valores atípicos utilizando el análisis de varianza de los valores válidos.

Las cifras calculadas de rendimiento del método (repetibilidad, reproducibilidad) se presentan en los cuadros siguientes. En ninguna de las muestras analizadas, incluido el material en blanco, se encontraron falsos positivos ni falsos negativos.

Cuadro 1

### Características de rendimiento del método para la urea calculada a $\lambda = 420$ nm en todos los materiales

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovinos	Bovinos	Ovinos	Ovinos	Bovinos
Fracción másica objetivo ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Fracción másica media ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	1 141	1 303	985	994	1 711
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	723	601	549	712	737
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ (%)	27	19	13	10	14
Desviación estándar relativa de repetibilidad $RSD_r$ (%)	17	9	7	7	6
Límite de reproducibilidad, $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Límite de repetibilidad, $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Cuadro 2

### Características de rendimiento del método para la urea calculada a $\lambda = 435$ nm en todos los materiales

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovinos	Bovinos	Ovinos	Ovinos	Bovinos
Fracción másica objetivo ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Fracción másica media ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	706	1 194	675	745	1 378
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	570	628	613	196	167

Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ (%)	17	18	9	7	12
Desviación estándar relativa de repetibilidad $RSD_r$ (%)	14	10	8	2	1
Límite de reproducibilidad, $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Límite de repetibilidad, $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ]	1 596	1 759	1 715	549	467

## 9. Observaciones

- 9.1. Si el contenido de urea excede del 3 %, reducir la muestra a 1 g o diluir la solución inicial de manera que en 500 ml no haya más de 50 mg de urea.
- 9.2. Si los contenidos de urea son bajos, incrementar la muestra, siempre que el filtrado siga siendo transparente e incoloro.
- 9.3. Los resultados anteriores de ensayos colaborativos no indican una diferencia significativa de precisión entre la urea medida a 420 nm y la medida a 435 nm.

### E. DETERMINACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS (EXCEPTO EL TRIPTÓFANO)

Los métodos de análisis que deben utilizarse para la determinación de los aminoácidos (excepto el triptófano) son:

- EN ISO 13903: Productos para alimentación animal. Determinación del contenido de aminoácidos.
- EN ISO 17180: Alimentos para animales. Determinación de lisina, metionina y treonina en productos comerciales de aminoácidos y en premezclas (\*).
- El método de análisis según se describe en los apartados 1 a 10.

## 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la presencia en los piensos de aminoácidos libres (sintéticos y naturales) y totales (unidos en péptidos y libres) en piensos, piensos compuestos y premezclas que contengan menos del 10 % (\*) de cada aminoácido, 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 diversas sales de los aminoácidos y tampoco puede diferenciar 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 por filtración. El pH de la solución filtrada se ajusta a 2,20. Los aminoácidos se separan por cromatografía de intercambio iónico y se determinan por reacción con ninhidrina mediante detección fotométrica a 570 nm.

(\*) El método de análisis previsto en la norma EN 17180 se refiere a un método alternativo que debe utilizarse a efectos de control oficial para la determinación de aminoácidos en piensos que contengan más de un 10 % de aminoácidos.

(\*) Este método no se ha validado mediante un ensayo colaborativo para premezclas que contienen más de un 10 % y aditivos para piensos. No obstante, también es aplicable a estas matrices con las leves modificaciones necesarias, siempre que a continuación el método se valide internamente. Si desea información adicional, consulte [https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation\\_en?prefLang=es](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=es)

## 2.2. *Aminoácidos totales*

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

La oxidación se realiza a 0 °C con una mezcla de ácido per fórmico y fenol. El exceso de reactivo oxidante se descompone con disulfito de sodio. La muestra oxidada o no oxidada se hidroliza con ácido clorhídrico (punto 3.20) durante 23 horas. El pH del hidrolizado se ajusta a 2,20. Los aminoácidos se separan por cromatografía de intercambio iónico y se determinan por reacción con ninhidrina mediante detección fotométrica a 570 nm (440 nm en el caso de la prolina).

## 3. **Reactivos**

Agua bidestilada o de calidad equivalente (conductividad < 10 µS).

- 3.1. Peróxido de hidrógeno, p (p/p) = 30 %.
- 3.2. Ácido fórmico, p (p/p) = 98 %-100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Disulfito de sodio.
- 3.5. Hidróxido de sodio.
- 3.6. Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado.
- 3.7. Ácido clorhídrico, con una densidad aproximada de 1,18 g/ml.
- 3.8. Citrato trisódico dihidratado.
- 3.9. 2,2'-Tiodietanol (tiodiglicol).
- 3.10. Cloruro de sodio.
- 3.11. Ninhidrina.
- 3.12. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40 °C – 60 °C.
- 3.13. Norleucina, u otro compuesto adecuado para ser utilizado como patrón interno.
- 3.14. Gas nitrógeno (< 10 ppm de oxígeno).
- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Aminoácidos.
  - 3.16.1. Sustancias patrón de los aminoácidos citados en el punto 1 (Finalidad y ámbito de aplicación). Compuestos puros sin agua de cristalización. Desecar en vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante una semana antes de su utilización.
  - 3.16.2. Ácido cisteico.
  - 3.16.3. Metionina sulfona.
- 3.17. Solución de hidróxido de sodio, c = 7,5 mol/l:  
disolver 300 g de NaOH (punto 3.5) en agua y enrasar a 1 l.
- 3.18. Solución de hidróxido de sodio, c = 1 mol/l:  
disolver 40 g de NaOH (punto 3.5) en agua y enrasar a 1 l.
- 3.19. Solución de ácido fórmico y fenol:  
mezclar 889 g de ácido fórmico (punto 3.2) con 111 g de agua y añadir 4,73 g de fenol (punto 3.3).

- 3.20. Mezcla de hidrólisis,  $c = 6$  mol de HCl/l, con 1 g de fenol/l:  
añadir 1 g de fenol (punto 3.3) a 492 ml de HCl (punto 3.7) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.21. Mezcla de extracción,  $c = 0,1$  mol de HCl/l, con un 2 % de tiodiglicol: diluir 8,2 ml de HCl (punto 3.7), en unos 900 ml de agua, añadir 20 ml de tiodiglicol (punto 3.9) y enrasar a 1 l con agua (no mezclar puntos 3.7 y 3.9 directamente).
- 3.22. Ácido 5-sulfosalicílico,  $\beta = 6$  %:  
disolver 60 g de ácido 5-sulfosalicílico (punto 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 (punto 3.1) con 4,5 ml de solución de ácido fórmico y fenol (punto 3.19) en un pequeño vaso de precipitado; 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: evitar el contacto con la piel y llevar ropa de protección.
- 3.24. Solución reguladora de citrato,  $c = 0,2$  mol de Na<sup>+</sup>/l, pH = 2,20:  
disolver 19,61 g de citrato de sodio (punto 3.8), 5 ml de tiodiglicol (punto 3.9), 1 g de fenol (punto 3.3) y 16,50 ml de HCl (punto 3.7) en unos 800 ml de agua; ajustar el pH a 2,20; enrasar a 1 l con agua.
- 3.25. Tampones de elución, preparados según las condiciones del analizador utilizado (punto 4.9).
- 3.26. Reactivo de ninhidrina, preparado según las condiciones del analizador utilizado (punto 4.9).
- 3.27. Soluciones patrón de aminoácidos. Estas soluciones deberán conservarse a una temperatura inferior a 5 °C.
- 3.27.1. Solución patrón madre de aminoácidos (punto 3.16.1):  
 $c = 2,5$  µmol/ml de cada uno en ácido clorhídrico.  
Disponibles en los comercios.
- 3.27.2. Solución patrón madre de ácido cisteico y metionina sulfona,  $c = 1,25$  µmol/ml:  
disolver 0,2115 g de ácido cisteico (punto 3.16.2) y 0,2265 g de metionina sulfona (punto 3.16.3) en tampón citrato (punto 3.24) en un matraz aforado de 1 l y enrasar con tampón citrato; conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 12 meses; esta solución no se utiliza si la solución patrón madre (punto 3.27.1) contiene ácido cisteico y metionina sulfona.
- 3.27.3. Solución madre del patrón interno, por ejemplo, norleucina,  $c = 20$  µmol/ml:  
disolver 0,6560 g de norleucina (punto 3.13) en tampón citrato (punto 3.24) en un matraz aforado y enrasar a 250 ml con tampón citrato; conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 6 meses.
- 3.27.4. Solución de calibración de los aminoácidos patrón para utilizar con los hidrolizados,  $c = 5$  nmol/50 µl de ácido cisteico y metionina sulfona y  $c = 10$  nmol/50 µl de los demás aminoácidos: disolver 2,2 g de cloruro de sodio (punto 3.10) en un vaso de precipitado de 100 ml con 30 ml de solución tampón citrato (punto 3.24); añadir 4,00 ml de solución madre de aminoácidos (punto 3.27.1), 4,00 ml de solución patrón madre de ácido cisteico y metionina sulfona (punto 3.27.2) y 0,50 ml de solución patrón madre de patrón interno (punto 3.27.3), si se utiliza; ajustar el pH a 2,20 con hidróxido de sodio (punto 3.18);  
transvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con tampón citrato (punto 3.24) y mezclar;  
conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 3 meses.  
Véanse también las observaciones del punto 9.1.
- 3.27.5. Solución de calibración de los aminoácidos patrón para utilizar con los hidrolizados preparados según el punto 5.3.3.1 y con los extractos (punto 5.2). La solución de calibración se prepara con arreglo al punto 3.27.4, pero sin cloruro de sodio.  
Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 3 meses.



#### 4. Instrumental

- 4.1. Matraz redondo de 100 o 250 ml con condensador de reflujo.
- 4.2. Frasco de vidrio borosilicato de 100 ml con tapón de rosca provisto de junta de goma/teflón (por ejemplo, Duran, Schott), para uso en estufa.
- 4.3. Estufa con ventilación forzada y con un regulador de la temperatura de exactitud superior a  $\pm 2$  °C.
- 4.4. pH-metro (lectura con tres decimales).
- 4.5. Filtro de membrana (0,22  $\mu\text{m}$ ).
- 4.6. Centrífuga.
- 4.7. Rotavapor.
- 4.8. Agitador mecánico o magnético.
- 4.9. Analizador de aminoácidos o equipo de cromatografía líquida de alta resolución con columna de intercambio iónico, dispositivo para ninhidrina, derivatización postcolumna y detector fotométrico.

La columna se llena con resinas de poliestireno sulfonadas capaces de separar unos aminoácidos de otros y de otros materiales que reaccionan con la ninhidrina. El flujo en las conducciones de tampón y de ninhidrina se regula mediante bombas con una estabilidad de flujo de  $\pm 0,5$  % en el período que abarca tanto la fase de calibración con el patrón como el análisis de la muestra.

Con algunos analizadores de aminoácidos pueden utilizarse procedimientos de hidrólisis en los 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 ion sodio. En este caso, el volumen de ácido se reduce por evaporación hasta aproximadamente 5 ml después de la hidrólisis y antes de ajustar el pH. La evaporación deberá realizarse en vacío a 40 °C como máximo.

#### 5. Procedimiento

##### 5.1. Preparación de la muestra

La muestra se muele hasta que pase 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 molienda. Las muestras con un elevado contenido de grasa deberán someterse a extracción con éter de petróleo (punto 3.12) antes de la molienda.

##### 5.2. Determinación de los aminoácidos libres

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

Añadir removiendo 5,0 ml de solución de ácido sulfosalicílico (punto 3.22) y seguir removiendo con ayuda de un agitador magnético durante cinco minutos. Filtrar o centrifugar el sobrenadante para eliminar el posible precipitado. Verter 10,0 ml de la solución resultante en un vaso de precipitado de 100 ml y ajustar el pH a 2,20 con solución de hidróxido de sodio (punto 3.18), transvasar a un matraz aforado de volumen adecuado con tampón citrato (punto 3.24) y enrasar con este mismo tampón.

Si se utiliza un patrón interno, añadir 1,00 ml de patrón interno (punto 3.27.3) por cada 100 ml de solución final y enrasar con el tampón (punto 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 g y 1 g de la muestra preparada (punto 5.1) en:

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

La porción de muestra pesada debe tener un contenido de nitrógeno de unos 10 mg y un contenido de humedad 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 (punto 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. Transcurridas esas 16 horas, sacar del frigorífico y descomponer el exceso de reactivo de oxidación añadiendo 0,84 g de disulfito de sodio (punto 3.4).

Pasar al punto 5.3.2.1.

#### 5.3.2. Hidrólisis

##### 5.3.2.1. Hidrólisis de muestras oxidadas

Añadir 25 ml de mezcla de hidrólisis (punto 3.20) a la muestra oxidada preparada según el punto 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, proceder según el punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

##### 5.3.2.2. Hidrólisis de muestras no oxidadas

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

##### 5.3.2.3. Hidrólisis abierta

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

Proceder según el punto 5.3.3.

##### 5.3.2.4. Hidrólisis cerrada

Colocar el frasco con la mezcla preparada según el punto 5.3.2.1 o 5.3.2.2 en una estufa (punto 4.3) a 110 °C. Durante la primera hora, para prevenir la formación de presión (debido a la producción de sustancias gaseosas) y evitar el peligro de explosión, poner el tapón de rosca encima del frasco, pero sin cerrarlo. No cerrar el frasco con el tapón. Al cabo de una hora, cerrar el frasco con el tapón y dejarlo en la estufa (punto 4.3) durante 23 horas. Una vez terminada la hidrólisis, sacar el frasco de la estufa, desenroscar cuidadosamente el tapón y colocar el frasco en un baño de hielo y agua. Dejar enfriar.

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

Proceder según el punto 5.3.3.

### 5.3.3. Ajuste del pH

En función de la tolerancia al sodio del analizador de aminoácidos (punto 4.9), proceder según el punto 5.3.3.1 o 5.3.3.2 para ajustar el pH.

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

Es recomendable utilizar una solución madre del patrón interno (punto 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 al hidrolizado 2,00 ml de la solución madre del patrón interno (punto 3.27.3) antes de la evaporación.

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

Mediante un rotavapor (punto 4.7) reducir el volumen a 5 ml – 10 ml en vacío a 40 °C. Si el volumen se reduce accidentalmente a menos de 5 ml, debe desecharse el hidrolizado y recomenzarse el análisis.

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

#### 5.3.3.2. Para los demás analizadores de aminoácidos (punto 4.9)

Tomar los hidrolizados obtenidos de acuerdo con los puntos 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 de sodio (punto 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 de sodio (punto 3.17) y, finalmente, con solución de hidróxido de sodio (punto 3.18). Pasar al punto 5.3.4.

### 5.3.4. Solución de muestra para cromatografía

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

Si aún no se ha utilizado un patrón interno, añadir 2,00 ml de patrón interno (punto 3.27.3) y enrasar con tampón citrato (punto 3.24). Mezclar perfectamente.

Pasar a la fase de cromatografía (punto 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 (punto 5.2) o el hidrolizado (punto 5.3.4) a temperatura ambiente. Agitar la mezcla y filtrar una cantidad adecuada a través de un filtro de membrana de 0,22 µm (punto 4.5). Se obtiene una solución clara que se somete a cromatografía de intercambio iónico, utilizando un analizador de aminoácidos (punto 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  $\pm 0,5 \%$  para el análisis de patrones y muestras, excepto cuando se utilice un patrón interno, y que las relaciones sodio/aminoácidos de las soluciones patrón y de muestra sean lo más parecidas posible.

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

La cromatografía de aminoácidos variará ligeramente según el tipo de analizador empleado y la resina utilizada. El sistema elegido debe ser capaz de separar unos aminoácidos de otros 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, cuando se analice una solución equimolar (de los aminoácidos analizados), se aplicarán las relaciones altura de valle/altura de pico que se mencionan más adelante. Esta solución equimolar debe contener al menos el 30 % de la carga máxima de cada aminoácido que puede medirse con exactitud con el sistema de análisis de aminoácidos (punto 4.9).

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

El sistema debe garantizar que la lisina se separe 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 (X) en gramos de aminoácido por kilogramo de muestra.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000}$$

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

M: = masa molecular del aminoácido que se está determinando

c: = concentración del patrón (µmol/ml)

m: = peso de la muestra (g) (corregido para obtener el peso original si se ha realizado algún proceso de desecado o desengrasado)

V: = ml de hidrolizado total (punto 5.3.4) o ml de volumen calculado de dilución total del extracto (punto 6.1).

Tanto la cistina como la cisteína se determinan como ácido cisteico en hidrolizados de la muestra oxidada, pero se calculan como cistina ( $C_6H_{12}N_2O_4S_2$ , M = 240,30 g/mol) utilizando una M de 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol).

La metionina se determina como metionina sulfona en hidrolizados de muestra oxidada, pero se calcula como metionina utilizando la M de la metionina: 149,21 g/mol.

La metionina libre añadida se determina tras extracción como metionina, utilizando para el cálculo la misma M.

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

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

V = volumen del extracto final

## 7. Evaluación del método

El método se puso a prueba en un estudio intercomparativo realizado a nivel internacional en 1990 con cuatro piensos diferentes (pienso mezclado para cerdos, pienso compuesto para pollos de engorde, concentrado de proteínas y premezcla).

*Nota:* El método se puso a prueba durante un segundo estudio intercomparativo internacional realizado en 2003 mediante doble enmascaramiento utilizando pares de muestras de pienso de acabado de pollos de engorde, pienso de iniciación de pollos de engorde, maíz, harina de pescado y harina de aves de corral. Para más detalles, véase la norma EN ISO 13903.

Los resultados del estudio intercomparativo de 1990, tras descartar los valores atípicos, de la media y de la desviación típica se indican en los cuadros que figuran en el presente punto:

#### Medias en gramos por kilogramo

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Piensos compuestos para pollos de engorde	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

La repetibilidad del citado estudio intercomparativo de la tabla anterior, expresada como “desviación típica intralaboratorio”, se indica en los cuadros siguientes:

#### Coefficiente de variación (%) de repetibilidad (CV<sub>r</sub>)

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Pienso compuesto para pollos de engorde	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:

#### Coefficiente de variación (%) de reproducibilidad (CV<sub>R</sub>)

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Pienso compuesto para pollos de engorde	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 reiteradas de materiales de referencia certificados, cuando estén disponibles. Se recomienda la calibración con solución de calibración de aminoácidos certificada.

## 9. **Observaciones**

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

El intervalo de respuesta lineal del aparato debe comprobarse con todos los aminoácidos.

La solución patrón se diluye con tampón citrato para obtener áreas de pico en el centro del intervalo.

- 9.2. Si se usa un equipo de cromatografía líquida de alta resolución para analizar los hidrolizados, deben optimizarse las condiciones experimentales siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- 9.3. Si se aplica este método a piensos compuestos o premezclas que contengan más de un 1 % de cloruro (concentrados, piensos minerales, piensos complementarios), es posible que se subestimen los valores de metionina, por lo que debe aplicarse un tratamiento especial.

## 10. **Criterios de rendimiento**

La compilación de los resultados (excepto los de la tirosina) procedentes de los dos estudios colaborativos (el de 1990 mencionado en el punto 7 y el de 2005 en EN/ISO 13903) ofrece los siguientes criterios de repetibilidad y reproducibilidad. Los valores derivados de estas dos pruebas interlaboratorios pueden no ser aplicables a matrices y rangos de concentración distintos de los indicados aquí.

### 10.1. *Repetibilidad*

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

- el 6 % del valor superior, en el caso de los aminoácidos totales de glicina, alanina, lisina, prolina, ácido glutámico, isoleucina e histidina;
- el 8 % del valor superior en el caso de los aminoácidos totales de treonina, fenilalanina, metionina, ácido aspártico y leucina;
- el 10 % del valor superior en el caso de los aminoácidos totales de arginina y valina;
- el 12 % del valor superior en el caso de los aminoácidos totales de serina;
- el 15 % del valor superior en el caso de los aminoácidos totales de cistina y cisteína.

### 10.2. *Reproducibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra en laboratorios diferentes y/o por analistas diferentes no debe superar:

- el 15 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de glicina, alanina y treonina;
- el 20 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de lisina, prolina, fenilalanina, metionina y ácido aspártico;
- el 22 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de ácido glutámico y leucina;
- el 27 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de arginina;
- el 32 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de isoleucina;

- el 35 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de valina y serina;
- el 40 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de histidina;
- el 50 % del valor superior, para los aminoácidos totales en el caso de cistina y cisteína.

#### F. DETERMINACIÓN DEL TRIPTÓFANO

Los métodos de análisis que deben utilizarse para la determinación del triptófano son:

- EN ISO 13904: Alimentos para animales. Determinación del contenido de triptófano;
- el método de análisis según se describe en los apartados 1 a 9.

##### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el triptófano total y libre en los piensos. No distingue entre formas L y D.

##### 2. Principio

Para la determinación del triptófano total, la muestra se hidroliza en condiciones alcalinas con solución saturada de hidróxido de bario y calentando a 110 °C durante veinte horas. Tras la hidrólisis se añade patrón interno.

Para la determinación del triptófano libre, la muestra se somete a extracción en condiciones de acidez suave en presencia de patrón interno.

El triptófano y el patrón interno presentes en el hidrolizado o en el extracto se analizan mediante HPLC con detección por fluorescencia.

##### 3. Reactivos

- 3.1. Debe utilizarse agua bidestilada o agua de calidad equivalente (conductividad < 10 µS/cm).
- 3.2. Sustancia patrón: triptófano (pureza/contenido ≥ 99 %), desecado al vacío sobre pentaóxido de fósforo.
- 3.3. Patrón interno: α-metiltriptófano (pureza/contenido ≥ 99 %), desecado al vacío sobre pentaóxido de fósforo.
- 3.4. Hidróxido de bario octahidratado (deberá procurarse no exponer excesivamente el Ba(OH)<sub>2</sub> × 8 H<sub>2</sub>O al aire a fin de evitar la formación de BaCO<sub>3</sub>, que podría interferir en la determinación) (véase la observación del punto 9.3).
- 3.5. Hidróxido de sodio.
- 3.6. Ácido ortofosfórico, p (p/p) = 85 %.
- 3.7. Ácido clorhídrico, ρ<sub>20</sub> = 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, equivalente al de grado HPLC.
- 3.9. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40 °C – 60 °C.
- 3.10. Solución de hidróxido de sodio, c = 1 mol/l:  
disolver 40,0 g de NaOH (punto 3.5) en agua y enrasar a 1 l con agua (punto 3.1).
- 3.11. Ácido clorhídrico, c = 6 mol/l:  
tomar 492 ml de HCl (punto 3.7) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.12. Ácido clorhídrico, c = 1 mol/l:  
tomar 82 ml de HCl (punto 3.7) y enrasar a 1 l con agua.

- 3.13. Ácido clorhídrico,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ :  
tomar 8,2 ml de HCl (punto 3.7) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.14. Ácido ortofosfórico,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ :  
tomar 34 ml de ácido ortofosfórico (punto 3.6) y enrasar a 1 l con agua (punto 3.1).
- 3.15. Solución concentrada de triptófano (punto 3.2),  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
en un matraz aforado de 500 ml, disolver 0,2553 g de triptófano (punto 3.2) en ácido clorhídrico (punto 3.13) y enrasar con ácido clorhídrico (punto 3.13); conservar a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  durante cuatro semanas como máximo.
- 3.16. Solución concentrada de patrón interno,  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
en un matraz aforado de 500 ml, disolver 0,2728 g de  $\alpha$ -metiltryptófano (punto 3.3) en ácido clorhídrico (punto 3.13) y enrasar con ácido clorhídrico (punto 3.13); conservar a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  durante cuatro semanas como máximo.
- 3.17. Solución patrón de calibración de triptófano y patrón interno:  
tomar 2,00 ml de solución concentrada de triptófano (punto 3.15) y 2,00 ml de solución concentrada de patrón interno ( $\alpha$ -metiltryptófano) (punto 3.16); diluir con agua (punto 3.1) y metanol (punto 3.8) hasta conseguir aproximadamente el mismo volumen y la misma concentración de metanol (10 % – 30 %) que en el hidrolizado final.  
Esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.  
Proteger de la luz solar directa mientras se prepara.
- 3.18. Ácido acético.
- 3.19. 1,1,1-Tricloro-2-metil-2-propanol.
- 3.20. Etanolamina p (p/p) > 98 %.
- 3.21. Solución de 1 g de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (punto 3.19) en 100 ml de metanol (punto 3.8).
- 3.22. Fase móvil para HPLC: 3,00 g de ácido acético (punto 3.18) + 900 ml de agua (punto 3.1) + 50,0 ml de solución (punto 3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (punto 3.19) en metanol (punto 3.8) (1 g/100 ml); ajustar el pH a 5,00 con etanolamina (punto 3.20); enrasar a 1 000 ml con agua (punto 3.1).

#### 4. Instrumental

- 4.1. Equipo de HPLC con espectrofluorímetro.
- 4.2. Columna de cromatografía líquida, de 125 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$  de fase reversa, relleno de 3  $\mu\text{m}$ , o equivalente.
- 4.3. pH-metro.
- 4.4. Matraz de polipropileno, de 125 ml de capacidad, cuello ancho y tapón de rosca.
- 4.5. Filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 4.6. Autoclave, ( $110 \pm 2$ )  $^\circ\text{C}$ , ( $1,4 \pm 0,1$ ) bar.
- 4.7. Agitador mecánico o magnético.
- 4.8. Agitador vortex.



## 5. Procedimiento

### 5.1. Preparación de las muestras

La muestra se muele hasta que pase 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 molienda. Las muestras con un elevado contenido de grasa deberán someterse a extracción con éter de petróleo (punto 3.9) antes de la molienda.

### 5.2. Determinación del triptófano libre (extracto)

Pesar en un erlenmeyer, con una precisión de 1 mg, una cantidad adecuada (de 1 g a 5 g) de la muestra preparada (punto 5.1). Añadir 100,0 ml de ácido clorhídrico (punto 3.13) y 5,00 ml de solución concentrada de patrón interno (punto 3.16). Agitar o mezclar durante 60 minutos utilizando un agitador mecánico o magnético (punto 4.7). Dejar sedimentar y pipetear 10,0 ml de la solución sobrenadante a un vaso de precipitado. Añadir 5 ml de ácido ortofosfórico (punto 3.14). Ajustar el pH a 3 utilizando hidróxido de sodio (punto 3.10). Añadir suficiente metanol (punto 3.8) para obtener una concentración de metanol de entre el 10 % y el 30 % en el volumen final. Transvasar a un matraz aforado de capacidad adecuada y diluir con agua hasta conseguir el volumen necesario para la cromatografía [aproximadamente el mismo volumen que la solución patrón de calibración (punto 3.17)].

Filtrar unos pocos mililitros de la solución con un filtro de membrana de 0,45 µm (punto 4.5) antes de inyectarla en la columna de HPLC. Pasar a la fase de cromatografía según el punto 5.4.

Proteger la solución patrón y los extractos de la luz solar directa. Si no es posible analizar los extractos el mismo día, pueden conservarse a 5 °C durante tres días como máximo.

### 5.3. Determinación del triptófano total (hidrolizado)

Pesar en el matraz de polipropileno (punto 4.4), con una precisión de 0,2 mg, entre 0,1 g y 1 g de la muestra preparada (punto 5.1). La porción de la muestra pesada deberá tener un contenido de nitrógeno de unos 10 mg. Añadir 8,4 g de hidróxido de bario octahidratado (punto 3.4) y 10 ml de agua. Homogeneizar con un agitador vórtex (punto 4.8) o un agitador magnético (punto 4.7). Dejar dentro de la mezcla el imán recubierto de teflón. Lavar las paredes del recipiente con 4 ml de agua. Poner el tapón de rosca y cerrar el matraz sin apretar. Pasar al autoclave (punto 4.6) con agua hirviendo y dejar hervir entre 30 minutos y 60 minutos. Cerrar el autoclave y dejar a  $(110 \pm 2)$  °C durante 20 horas.

Antes de abrir el autoclave reducir la temperatura hasta justo por debajo de 100 °C. Para evitar la cristalización del  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$ , añadir a la mezcla caliente 30 ml de agua que esté a temperatura ambiente. Agitar o remover suavemente. Añadir 2,00 ml de solución concentrada de patrón interno ( $\alpha$ -metiltriptófano) (punto 3.16). Enfriar el recipiente en baño de agua y hielo durante 15 minutos.

A continuación, añadir 5 ml de ácido ortofosfórico (punto 3.14). Mantener el recipiente en el baño frío y neutralizar con HCl (punto 3.11), al tiempo que se remueve; ajustar el pH a 3,0 con HCl (punto 3.12). Añadir suficiente metanol para obtener una concentración de metanol entre el 10 y el 30 % en el volumen final. Pasar a un matraz aforado de capacidad adecuada y diluir con agua hasta conseguir el volumen definido necesario para la cromatografía (por ejemplo, 100 ml). La adición de metanol no deberá producir precipitación.

Filtrar unos pocos mililitros de la solución con un filtro de membrana de 0,45 µm (punto 4.5) antes de inyectarla en la columna de HPLC. Pasar a la fase de cromatografía según el punto 5.4.

Proteger la solución patrón y los hidrolizados de la luz solar directa. Si no es posible analizar los hidrolizados el mismo día, pueden conservarse a 5 °C durante tres días, como máximo.

### 5.4. Determinación mediante HPLC

Las siguientes condiciones de elución isocrática tienen carácter orientativo; pueden aplicarse otras, siempre que ofrezcan resultados equivalentes (véanse también las observaciones de los puntos 9.1 y 9.2).

Columna de cromatografía líquida (punto 4.2):	125 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , relleno de 3 μm, o equivalente
Temperatura de la columna:	Temperatura ambiente
Fase móvil (punto 3.22):	3,00 g de ácido acético (punto 3.18) + 900 ml de agua (punto 3.1) + 50,0 ml de solución (punto 3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (punto 3.19) en metanol (punto 3.8) (1 g/100 ml). Ajustar el pH a 5,00 con etanolamina (punto 3.20). Enrasar a 1 000 ml con agua (punto 3.1)
Caudal:	1 ml/min
Tiempo total de elución:	aproximadamente 34 minutos
Longitud de onda de detección:	excitación: 280 nm, emisión: 356 nm
Volumen de inyección:	20 μl

## 6. Cálculo de los resultados

Se calcula la cantidad de triptófano (X) en gramos por cada 100 g de muestra.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

- A: = área de pico del patrón interno, solución patrón de calibración (punto 3.17)
- B: = área de pico del triptófano, extracto (punto 5.2) o hidrolizado (punto 5.3)
- V<sub>1</sub>: = volumen en mililitros (2 ml) de la solución concentrada de triptófano (punto 3.15) añadida a la solución de calibración (punto 3.17)
- c: = concentración en μmol/ml (= 2,50) de la solución concentrada de triptófano (punto 3.15) añadida a la solución de calibración (punto 3.17)
- V<sub>2</sub>: = volumen en mililitros de la solución concentrada de patrón interno (punto 3.16) añadida al extracto (punto 5.2) (= 5,00 ml) o al hidrolizado (punto 5.3) (= 2,00 ml)
- C: = área de pico del patrón interno, extracto (punto 5.2) o hidrolizado (punto 5.3)
- D: = área de pico del triptófano, solución patrón de calibración (punto 3.17)
- V<sub>3</sub>: = volumen en mililitros (= 2,00 ml) de la solución concentrada de patrón interno (punto 3.16) añadida a la solución patrón de calibración (punto 3.17)
- m: = peso de la muestra en gramos (corregido al peso original si se ha desecado o desengrasado)
- M: = masa molecular del triptófano (= 204,23 g/mol)

## 7. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe superar el 10 % del resultado más elevado.

## 8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo de la Comunidad Europea (cuarta comparación interlaboratorios), en el cual hasta doce laboratorios analizaron tres muestras para certificar el método de hidrólisis. Con cada muestra se repitieron varios análisis (5). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 1 Pienso para cerdos	Muestra 2 Pienso para cerdos con complemento de L-triptófano	Muestra 3 Pienso concentrado para cerdos
L	12	12	12
n	50	55	50
Media [g/kg]	2,42	3,40	4,22
$s_r$ [g/kg]	0,05	0,05	0,08
$r$ [g/kg]	0,14	0,14	0,22
$CV_r$ [%]	1,9	1,6	1,9
$S_R$ [g/kg]	0,15	0,20	0,09
$R$ [g/kg]	0,42	0,56	0,25
$CV_R$ [%]	6,3	6,0	2,2

L: número de laboratorios que presentaron resultados

n: número de resultados individuales aceptados tras eliminar los valores atípicos (identificados mediante las pruebas de Cochran y Dixon)

$s_r$ : desviación típica de la repetibilidad

$S_R$ : desviación típica de la reproducibilidad

$r$ : repetibilidad

$R$ : reproducibilidad

$CV_r$ : coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

$CV_R$ : coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

En otro estudio colaborativo de la Unión Europea (tercera comparación interlaboratorios), hasta trece laboratorios analizaron dos muestras para certificar el método de extracción del triptófano libre. Con cada muestra se repitieron varios análisis (5). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 4 Mezcla de trigo y soja	Muestra 5 Mezcla de trigo y soja (= muestra 4) con triptófano añadido (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Media [g/kg]	0,391	0,931
$s_r$ [g/kg]	0,005	0,012
$r$ [g/kg]	0,014	0,034
$CV_r$ [%]	1,34	1,34
$S_R$ [g/kg]	0,018	0,048
$R$ [g/kg]	0,050	0,134
$CV_R$ [%]	4,71	5,11

---

L:	número de laboratorios que presentaron resultados
n:	número de resultados individuales aceptados tras eliminar los valores atípicos (identificados mediante las pruebas de Cochran y Dixon)
s <sub>r</sub> :	desviación típica de la repetibilidad
S <sub>R</sub> :	desviación típica de la reproducibilidad
r:	repetibilidad
R:	reproducibilidad
CV <sub>r</sub> :	coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento
CV <sub>R</sub> :	coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

---

En otro estudio intercomparativo de la Unión Europea, hasta siete laboratorios analizaron cuatro muestras para certificar el método de hidrólisis del triptófano. Con cada muestra se repitieron varios análisis (5). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 1 Pienso mixto para cerdos (CRM 117)	Muestra 2 Harina de pescado con poca grasa (CRM 118)	Muestra 3 Sémola de soja (CRM 119)	Muestra 4 Leche desnatada en polvo (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Media [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s <sub>r</sub> [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV <sub>r</sub> [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S <sub>R</sub> [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV <sub>R</sub> [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L:	número de laboratorios que presentaron resultados
n:	número de resultados individuales aceptados tras eliminar los valores atípicos (identificados mediante las pruebas de Cochran y Dixon)
s <sub>r</sub> :	desviación típica de la repetibilidad
S <sub>R</sub> :	desviación típica de la reproducibilidad
r:	repetibilidad
R:	reproducibilidad
CV <sub>r</sub> :	coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento
CV <sub>R</sub> :	coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

---

## 9. Observaciones

- 9.1. Las siguientes condiciones cromatográficas pueden ofrecer una mejor separación entre el triptófano y el α-metiltriptófano.

Elución isocrática, seguida de lavado de la columna en gradiente:

Columna de cromatografía líquida:	125 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , relleno de 5 µm, o equivalente	
Temperatura de la columna:	32 °C	
Fase móvil:	A: 0,01 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /metanol, 95 + 5 (V + V)	
	B: metanol	
Programa de gradientes:	0 min 100 % A	0 % B
	15 min 100 % A	0 % B
	17 min 60 % A	40 % B
	19 min 60 % A	40 % B
	21 min 100 % A	0 % B
	33 min 100 % A	0 % B
Caudal:	1,2 ml/min	
Tiempo total de elución:	aproximadamente 33 minutos	

- 9.2. La cromatografía variará en función del tipo de HPLC y del material de relleno de la columna. El sistema elegido debe proporcionar una separación en la línea base entre el triptófano y el patrón interno. Asimismo, es importante que los productos de degradación se separen bien del triptófano y del patrón interno. Deberán pasarse hidrolizados sin patrón interno para comprobar las impurezas de la línea base bajo el patrón interno. También es importante que el tiempo de elución sea suficientemente largo para que se eluyan todos los productos de degradación, pues, de lo contrario, los picos de elución tardía pueden interferir en los ciclos cromatográficos posteriores.

En el intervalo de funcionamiento, el sistema cromatográfico deberá dar una respuesta lineal. Esta deberá medirse con una concentración constante (la normal) del patrón interno y con concentraciones variables de triptófano. Es importante que el tamaño de los picos tanto del triptófano como del patrón interno estén dentro del intervalo lineal del sistema de HPLC/fluorescencia. Si los picos del triptófano o del patrón interno son demasiado pequeños o demasiado grandes, deberá repetirse el análisis con otro tamaño de muestra o con un volumen final distinto.

### 9.3. *Hidróxido de bario*

Con el tiempo, el hidróxido de bario es más difícil de disolver. Esto hace que la solución para la determinación mediante HPLC esté turbia, lo que puede dar unos resultados bajos de triptófano.

## G. DETERMINACIÓN DE LAS MATERIAS GRASAS BRUTAS

### 1. **Finalidad y ámbito de aplicación**

Este método sirve para determinar el contenido de materia grasa bruta de los piensos.

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

Para la determinación de materias grasas brutas en semillas oleaginosas y frutos oleaginosos, así como en piensos en los que el contenido de aceite/grasa bruto sea superior al 15 %, la extracción debe realizarse mediante el procedimiento A y la nueva extracción según el procedimiento B (punto 5.3).

#### 1.1. Procedimiento A. Materias grasas brutas directamente extraíbles

Este método es aplicable a los materiales para piensos de origen vegetal, excepto los incluidos en el ámbito de aplicación del procedimiento B.

## 1.2. Procedimiento B. Materias grasas brutas totales

Este método es aplicable a los materiales para piensos de origen animal y a todos los piensos compuestos. Se ha de utilizar con todos los materiales de los que los aceites y las grasas no puedan extraerse completamente sin hidrólisis previa (por ejemplo, los glútenes, las levaduras, las proteínas de patata y los productos sujetos a procesos como la extrusión, la floculación y el calentamiento).

## 1.3. Interpretación de los resultados

En todos los casos en que el resultado obtenido con el procedimiento B sea mayor que el obtenido con el procedimiento A, el resultado obtenido con el procedimiento B se aceptará como el valor real.

## 2. Principio

### 2.1. Procedimiento A

La muestra se somete a extracción con éter de petróleo. El disolvente se extrae por destilación y el residuo se seca y se pesa.

### 2.2. Procedimiento B

La muestra se trata en caliente con ácido clorhídrico. La mezcla se enfría y se filtra. Una vez lavado y secado, el residuo se somete a la determinación según el procedimiento A.

## 3. Reactivos

3.1. Éter de petróleo, intervalo de ebullición: 40 °C 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,  $c = 3 \text{ mol/l}$ .

3.4. Coadyuvante de filtración, como, por ejemplo, Kieselgur o Hyflo Supercel.

## 4. Instrumental

4.1. Aparato de extracción. Si el aparato está provisto de un sifón (aparato Soxhlet), el caudal de reflujo deberá regularse de forma que se obtengan como mínimo diez ciclos por hora; si se trata de un aparato sin sifón, el caudal de reflujo deberá ser de alrededor de 10 ml/min.

4.2. Cartuchos de extracción, exentos de sustancias solubles en el éter de petróleo y de porosidad compatible con las exigencias del punto 4.1.

4.3. Estufa de secado, bien por vacío a  $(75 \pm 3) \text{ °C}$ , bien a presión atmosférica a  $(100 \pm 3) \text{ °C}$ .

## 5. Procedimiento

### 5.1. Procedimiento A (véase el punto 8.1)

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g de la muestra, pasarlos a un cartucho de extracción (punto 4.2) y cubrirlos con un poco de algodón hidrófilo exento de grasa.

Colocar el cartucho en un extractor (punto 4.1) y extraer durante seis horas con éter de petróleo (punto 3.1). Recoger el extracto de éter de petróleo en un matraz seco tarado que contenga fragmentos de piedra pómez <sup>(6)</sup>.

Extraer el disolvente por destilación. Secar el residuo dejando el matraz hora y media en la estufa de secado (punto 4.3). Dejar enfriar en un desecador y pesar. Volver a secar durante 30 minutos para que el peso de la materia grasa se mantenga constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 1 mg).

<sup>(6)</sup> Sustituir los fragmentos de piedra pómez por perlas de vidrio cuando el aceite o la grasa deban someterse a exámenes cualitativos ulteriores.

## 5.2. Procedimiento B

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra (véase el punto 8.2), introducirlos en un vaso de precipitado de 400 ml o en un erlenmeyer de 300 ml y añadir 100 ml de ácido clorhídrico (punto 3.3), junto con algunos fragmentos de piedra pómez. Cubrir el vaso de precipitado con un vidrio de reloj o dotar al erlenmeyer de un condensador de reflujo. Llevar la mezcla a ebullición suave sobre una llama pequeña o una placa calefactora eléctrica y mantenerla así durante una hora. No dejar que el producto se adhiera a las paredes del recipiente.

Enfriar y añadir una cantidad de coadyuvante de filtración (punto 3.4) suficiente para evitar que se pierda aceite o grasa durante la filtración. Filtrar a través de un papel de filtro doble humedecido exento de grasa. Lavar el residuo con agua fría hasta obtener un filtrado neutro. Comprobar que el filtrado no contiene aceites ni grasas. Si los contiene, la muestra debe someterse a extracción con éter de petróleo, según el procedimiento A, antes de la hidrólisis.

Colocar el papel de filtro doble que contiene el residuo sobre un vidrio de reloj y secar durante hora y media en la estufa de aire (punto 4.3) a  $(100 \pm 3) ^\circ\text{C}$ .

Introducir el papel de filtro doble que contiene el residuo seco en un cartucho de extracción (punto 4.2) y cubrirlo con un poco de algodón hidrófilo exento de grasa. Colocar el cartucho en un extractor (punto 4.1) y proceder según se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

## 5.3. Procedimiento A y nueva extracción por el procedimiento B

Para la determinación de materias grasas brutas en semillas oleaginosas y frutos oleaginosos, así como en piensos en los que el contenido de aceite/grasa bruto sea superior al 15 %, la extracción debe realizarse mediante el procedimiento A y la nueva extracción según el procedimiento B.

Esto significa que, tras la extracción con éter de petróleo (procedimiento A), el residuo o una parte del residuo se extrae de nuevo con ácido clorhídrico (procedimiento B). El contenido de materia grasa bruta es la suma de los procedimientos A y B.

## 6. Expresión del resultado

Expresar el peso del residuo como porcentaje de la muestra.

## 7. Repetibilidad

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

- el 0,2 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de materia grasa bruta inferiores al 5 %;
- el 4,0 % del resultado más elevado para contenidos del 5 al 10 %;
- el 0,4 % en valor absoluto, para contenidos superiores al 10 %.

## 8. Observaciones

### 8.1. Con los productos que tienen un alto contenido de materia grasa y son difíciles de triturar o inapropiados para obtener una muestra de ensayo reducida homogénea, proceder del modo siguiente:

Pesar, con una precisión de 1 mg, 20 g de la muestra y mezclarlos con 10 g o más de sulfato de sodio anhidro (punto 3.2). Extraer con éter de petróleo (punto 3.1) según se indica en el punto 5.1. Enrasar el extracto obtenido a 500 ml con éter de petróleo (punto 3.1) y mezclar. Tomar 50 ml de la solución y ponerlos en un matraz pequeño, seco y tarado con fragmentos de piedra pómez. Extraer el disolvente por destilación, secar y proceder según se indica en el último párrafo del punto 5.1.

Eliminar el disolvente del residuo de extracción que haya quedado en el cartucho, triturar el residuo a una finura de 1 mm, colocarlo de nuevo en el cartucho de extracción (no añadir sulfato de sodio) y proceder según se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

Calcular el contenido de materia grasa en porcentaje de la muestra aplicando la siguiente fórmula:

$$(10 m_1 + m_2) \times 5$$

donde:

$m_1$ : = peso en gramos del residuo tras la primera extracción (alícuota del extracto)

$m_2$ : = peso en gramos del residuo tras la segunda extracción

- 8.2. Para algunos productos (como los productos pobres en materia grasa) la muestra de ensayo puede aumentarse.
- 8.3. Es posible que los piensos para animales de compañía con un alto contenido de agua deban mezclarse con sulfato de sodio anhidro antes de la hidrólisis y la extracción conforme al procedimiento B.
- 8.4. En el punto 5.2 puede resultar más eficaz utilizar agua caliente en lugar de agua fría para lavar el residuo tras la filtración.
- 8.5. Con algunos piensos quizá sea necesario aumentar el tiempo de secado de hora y media. Se evitará un secado excesivo, ya que puede producir resultados bajos. También puede utilizarse un horno microondas.

#### H. DETERMINACIÓN DE LA FIBRA BRUTA

##### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar las sustancias orgánicas de los piensos exentas de grasa que son insolubles en medios ácidos y alcalinos y se designan convencionalmente como fibra bruta.

El método no es aplicable en el caso de la lignocelulosa y el carbono vegetal (partículas demasiado finas).

##### 2. Principio

La muestra, si es necesario desengrasada, se trata sucesivamente con soluciones en ebullición de ácido sulfúrico e hidróxido de potasio de concentraciones determinadas. El residuo se separa por filtración en un filtro de vidrio sinterizado, se lava, se deseca, se pesa y se calcina en un intervalo de 475 °C a 500 °C. La pérdida de peso resultante de la calcinación corresponde a la fibra bruta presente en la muestra de ensayo.

##### 3. Reactivos

- 3.1. Ácido sulfúrico,  $c = 0,13 \text{ mol/l}$ .
- 3.2. Agente antiespumante (por ejemplo, n-octanol).
- 3.3. Coadyuvante de filtración (Celite 545 o equivalente), calentado a 500 °C durante cuatro horas (punto 8.6).
- 3.4. Acetona.
- 3.5. Éter de petróleo, con un intervalo de ebullición de 40 a 60 °C.
- 3.6. Ácido clorhídrico,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ .
- 3.7. Solución de hidróxido de potasio,  $c = 0,23 \text{ mol/l}$ .

##### 4. Instrumental

- 4.1. Unidad de calentamiento para digestión con ácido sulfúrico y solución de hidróxido de potasio, provista de un soporte para el crisol de filtración (punto 4.2) y de un tubo de salida con una llave conectada a la salida de líquidos y al vacío, posiblemente con aire comprimido. Antes de usarla, precalentar la unidad todos los días con agua hirviendo durante cinco minutos.
- 4.2. Crisol de filtración de vidrio, con placa filtrante de vidrio sinterizado fundido de porosidad comprendida entre 40  $\mu\text{m}$  y 90  $\mu\text{m}$ . Antes de utilizarlo por primera vez, calentarlo a 500 °C durante unos minutos y enfriarlo (punto 8.6).



- 4.3. Probeta apta para ebullición, de 270 ml como mínimo, con condensador de reflujo.
- 4.4. Estufa de secado con termostato.
- 4.5. Horno de mufla con termostato.
- 4.6. Unidad de extracción consistente en una placa soporte para el crisol de filtración (punto 4.2), con un tubo de descarga provisto de llave conectada al vacío y a la salida de líquidos.
- 4.7. Anillos de conexión para unir la unidad de calentamiento (punto 4.1), el crisol (punto 4.2) y la probeta (punto 4.3) y conectar la unidad de extracción en frío (punto 4.6) y el crisol.

## 5. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, 1 g de la muestra, ponerlo en el crisol (punto 4.2) (véanse las observaciones 9.1, 9.2 y 9.3) y añadir 1 g de coadyuvante de filtración (punto 3.3).

Tras ensamblar la unidad de calentamiento (punto 4.1) y el crisol de filtración (punto 4.2), unir a este último la probeta (punto 4.3). Verter 150 ml de ácido sulfúrico (punto 3.1) en ebullición en la probeta y el crisol ensamblados y, si es necesario, añadir unas pocas gotas de agente antiespumante (punto 3.2).

Llevar el líquido a ebullición en  $(5 \pm 2)$  minutos y dejar hervir con fuerza durante 30 minutos exactos.

Abrir la llave del tubo de descarga (punto 4.1), filtrar al vacío el ácido sulfúrico a través del crisol de filtración y lavar el residuo tres veces consecutivas con 30 ml de agua hirviendo cada vez, cuidando de que el residuo se filtre a sequedad después de cada lavado.

Cerrar la llave de salida y verter 150 ml de solución de hidróxido de potasio (punto 3.7) hirviendo en la probeta y el crisol ensamblados, añadiendo después unas pocas gotas de agente antiespumante (punto 3.2). Llevar el líquido al punto de ebullición en  $(5 \pm 2)$  minutos y dejar hervir con fuerza durante 30 minutos exactos. Filtrar y repetir el proceso de lavado empleado en la fase de ácido sulfúrico.

Después del lavado y secado finales, desconectar el crisol con su contenido y volverlo a conectar a la unidad de extracción en frío (punto 4.6). Aplicar el vacío y lavar el residuo en el crisol tres veces consecutivas con 25 ml de acetona (punto 3.4) cada vez, cuidando de que el residuo se filtre a sequedad después de cada lavado.

Secar el crisol en la estufa a 130 °C hasta alcanzar un peso constante. Después de cada secado, enfriar en el desecador y pesar rápidamente. Colocar el crisol en un horno de mufla y calcinar, hasta alcanzar un peso constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 2 mg), a una temperatura de entre 475 °C y 500 °C durante 30 minutos como mínimo.

Después de cada calentamiento, enfriar, primero en el horno y después en el desecador, antes de pesar.

Realizar una prueba en blanco sin la muestra. La pérdida de peso debida a la calcinación no debe superar los 4 mg.

## 6. Cálculo de los resultados

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

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

donde:

m: = peso de la muestra, en g

$m_0$ : = pérdida de peso tras la calcinación durante la determinación, en gramos

$m_1$ : = pérdida de peso tras la calcinación durante el ensayo en blanco, en gramos

## 7. Repetibilidad

La diferencia entre dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe superar:

- el 0,6 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de fibra bruta inferiores al 10 %;
- el 6 % del resultado superior, en el caso de contenidos de fibra bruta iguales o superiores al 10 %.

## 8. **Reproducibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas con la misma muestra en laboratorios diferentes no debe superar:

- el 1,0 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de fibra bruta inferiores al 10 %;
- el 10 % del resultado superior, en el caso de contenidos de fibra bruta iguales o superiores al 10 %.

## 9. **Observaciones**

- 9.1. Los piensos con más de un 10 % de grasa bruta deben desengrasarse antes de efectuar el análisis con éter de petróleo (punto 3.5). Conectar el crisol de filtración (punto 4.2), con su contenido, a la unidad de extracción en frío (punto 4.6), aplicar vacío y lavar el residuo tres veces consecutivas con 30 ml de éter de petróleo cada vez, cuidando de que el residuo esté seco. Conectar el crisol, con su contenido, a la unidad de calentamiento (punto 4.1) y continuar según se describe en el punto 5.
- 9.2. Los piensos que contengan grasas que no puedan extraerse directamente con éter de petróleo (punto 3.5) deben desengrasarse con arreglo al punto 8.1 y someterse a un nuevo desengrasado después de haber sido hervidos con ácido. Tras el hervor con ácido y el subsiguiente lavado, unir el crisol, con su contenido, a la unidad de extracción en frío (punto 4.6) y lavar tres veces con 30 ml de acetona y otras tres veces con 30 ml de éter de petróleo cada vez. Filtrar en vacío hasta sequedad y continuar el análisis como se describe en el punto 5, comenzando por el tratamiento con hidróxido de potasio.
- 9.3. Si los piensos contienen más de un 5 % de carbonatos, expresados en carbonato de calcio, conectar el crisol (punto 4.2), con la muestra pesada, a la unidad de calentamiento (punto 4.1). Lavar la muestra tres veces con 30 ml de ácido clorhídrico (punto 3.6). Después de cada adición, dejar reposar la muestra durante un minuto aproximadamente antes de filtrar. Lavar una vez con 30 ml de agua y proseguir como se describe en el punto 5.
- 9.4. Si se utiliza una batería de aparatos (varios crisoles unidos a la misma unidad de calentamiento), no pueden realizarse dos determinaciones distintas de la misma muestra en la misma serie.
- 9.5. Si, tras el hervor, resulta difícil filtrar las soluciones ácidas y alcalinas, introducir aire comprimido por el tubo de descarga de la unidad de calentamiento y seguir filtrando a continuación.
- 9.6. Con objeto de alargar la vida útil de los crisoles de filtración de vidrio, la temperatura de calcinación no superará los 500 °C. Asimismo, deben evitarse los cambios bruscos de temperatura en los ciclos de calentamiento y enfriamiento.

## I. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

### 1. **Finalidad y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar la cantidad de azúcares reductores y azúcares totales tras su inversión, expresados en glucosa o, si procede, en sacarosa, por conversión mediante un factor de 0,95. Es aplicable a los piensos compuestos. Para otros piensos se establecen métodos especiales. Si es necesario, la lactosa deberá medirse por separado y tenerse en cuenta al calcular los resultados.

Este método debe utilizarse para determinar el contenido de azúcares para el cálculo del valor energético del pienso.

En caso de que el contenido de azúcares deba determinarse para otros fines, podrán utilizarse otros métodos de análisis.

### 2. **Principio**

Los azúcares se extraen en etanol diluido; la solución se clarifica con las soluciones de Carrez I y II. Tras eliminar el etanol se determinan las cantidades antes y después de la inversión, siguiendo el método de Luff-Schoorl.

### 3. **Reactivos**

- 3.1. Solución de etanol al 40 % (v/v), con una densidad de 0,948 g/ml a 20 °C, neutralizada frente a fenolftaleína.

- 3.2. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de zinc,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  y 3 g de ácido acético glacial; enrasar con agua a 100 ml.
- 3.3. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ; enrasar con agua a 100 ml.
- 3.4. Naranja de metilo, solución al 0,1 % (p/v).
- 3.5. Ácido clorhídrico de 4 mol/l.
- 3.6. Ácido clorhídrico de 0,1 mol/l.
- 3.7. Solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/l.
- 3.8. Reactivo de Luff-Schoorl:  
Verter la solución de ácido cítrico (punto 3.8.2) en la solución de carbonato de sodio (punto 3.8.3) removiendo con cuidado; añadir la solución de sulfato de cobre (punto 3.8.1) y enrasar a 1 l con agua; dejar reposar una noche y filtrar.  
Comprobar la concentración del reactivo así obtenido (0,05 mol/l de Cu; 1 mol/l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), véase el punto 5.4, último párrafo. El pH de la solución deberá ser de 9,4 aproximadamente.
- 3.8.1. Solución de sulfato de cobre: disolver 25 g de sulfato de cobre,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , exento de hierro, en 100 ml de agua.
- 3.8.2. Solución de ácido cítrico: disolver 50 g de ácido cítrico  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$  en 50 ml de agua.
- 3.8.3. Solución de carbonato de sodio: disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro en 300 ml aproximadamente de agua caliente; dejar enfriar.
- 3.9. Solución de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l.
- 3.10. Solución de almidón: añadir una mezcla de 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua a 1 l de agua hirviendo; hervir durante tres minutos, dejar enfriar y, si es necesario, añadir 10 mg de yoduro de mercurio como conservante.
- 3.11. Ácido sulfúrico de 3 mol/l.
- 3.12. Yoduro de potasio, solución al 30 % (p/v).
- 3.13. Piedra pómez granulada, hervida en ácido clorhídrico, lavada en agua y desecada.
- 3.14. 3-Metilbutan-1-ol.

#### 4. Instrumental

Mezclador (tambor): de aproximadamente 35 a 40 revoluciones por minuto.

#### 5. Procedimiento

##### 5.1. Extracción de la muestra

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra e introducirlos en un matraz aforado de 250 ml. Añadir 200 ml de etanol (punto 3.1) y mezclar en el tambor durante una hora. Añadir 5 ml de solución de Carrez I (punto 3.2) y remover durante 30 segundos aproximadamente. Añadir 5 ml de solución de Carrez II (punto 3.3) y volver a remover durante un minuto. Enrasar con etanol (punto 3.1), homogeneizar y filtrar. Tomar 200 ml del filtrado y evaporar alrededor de la mitad de su volumen, con el fin de eliminar la mayor parte del etanol. Transvasar cuantitativamente el residuo de evaporación, por medio de agua caliente, a un matraz aforado de 200 ml, enfriar, enrasar con agua, homogeneizar y filtrar, si es necesario. Esta solución se empleará para determinar la cantidad de azúcares reductores y, tras inversión, la cantidad de azúcares totales.

##### 5.2. Determinación de los azúcares reductores

Pipetear no más de 25 ml de la solución que contenga menos de 60 mg de azúcares reductores, expresados en glucosa. Si es necesario, enrasar a 25 ml con agua destilada y determinar el contenido de azúcares reductores siguiendo el método de Luff-Schoorl. El resultado se expresará en porcentaje de glucosa de la muestra.

### 5.3. *Determinación de los azúcares totales tras inversión*

Pipetear 50 ml de solución y transvasarlos a un matraz aforado de 100 ml. Añadir a continuación unas gotas de solución de naranja de metilo (punto 3.4), con cuidado y sin parar de remover, y añadir ácido clorhídrico (punto 3.5) hasta que el líquido se vuelva definitivamente rojo. Añadir 15 ml de ácido clorhídrico (punto 3.6), sumergir el matraz en un baño maría en fuerte ebullición y mantenerlo allí durante 30 minutos. Enfriar rápidamente a unos 20 °C y añadir 15 ml de solución de hidróxido de sodio (punto 3.7). Enrasar a 100 ml con agua y homogeneizar. Retirar no más de 25 ml con un contenido de azúcares reductores inferior a 60 mg, expresados en glucosa. Si es necesario, enrasar a 25 ml con agua destilada y determinar el contenido de azúcares reductores siguiendo el método de Luff-Schoorl. El resultado se expresa en porcentaje de glucosa o, si procede, de sacarosa, multiplicando por un factor de 0,95.

### 5.4. *Valoración por el método de Luff-Schoorl*

Pipetear 25 ml del reactivo de Luff-Schoorl (punto 3.8) y transvasarlos a un erlenmeyer de 300 ml; añadir exactamente 25 ml de la solución de azúcares clarificada. Añadir dos gránulos de piedra pómez (punto 3.13), calentar, removiendo manualmente, sobre una llama desnuda de altura media y llevar el líquido a ebullición en dos minutos aproximadamente. Colocar inmediatamente el erlenmeyer sobre una tela metálica provista de una pantalla de amianto con un orificio de 6 cm de diámetro aproximadamente, bajo la que se ha encendido previamente una llama. Esta se regula de forma que solo se caliente el fondo del erlenmeyer. Ajustar a este último un condensador de reflujo. Hervir durante diez minutos exactos. Enfriar inmediatamente en agua fría y, transcurridos unos cinco minutos, valorar como se indica a continuación:

Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (punto 3.12), e inmediatamente después (con cuidado, ya que puede formarse mucha espuma) 25 ml de ácido sulfúrico (punto 3.11). Valorar con solución de tiosulfato de sodio (punto 3.9) hasta que aparezca una coloración amarilla mate, añadir el indicador de almidón (punto 3.10) y completar la valoración.

Efectuar la misma valoración en una mezcla exactamente medida de 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl (punto 3.8) y 25 ml de agua, después de añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (punto 3.12) y 25 ml de ácido sulfúrico (punto 3.11) sin hervir.

## 6. **Cálculo de los resultados**

Establecer, con ayuda de la tabla, la cantidad de glucosa en miligramos que corresponde a la diferencia entre los valores de las dos valoraciones, expresados en miligramos de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

## 7. **Procedimientos especiales**

- 7.1. Para los piensos ricos en melaza y otros alimentos poco homogéneos, pesar 20 g e introducirlos en un matraz aforado de 1 l con 500 ml de agua. Mezclar durante una hora en el tambor. Clarificar con los reactivos de Carrez I (punto 3.2) y II (punto 3.3) según se describe en el punto 5.1, empleando esta vez una cantidad cuatro veces superior de cada reactivo. Enrasar con etanol al 80 % (v/v).

Homogeneizar y filtrar. Eliminar el etanol como se describe en el punto 5.1. En ausencia de almidón dextrinado, enrasar con agua destilada.

- 7.2. En el caso de melazas y materiales para piensos que sean ricos en azúcares y no tengan prácticamente almidón (algarrobas, peladuras desecadas de remolachas, etc.), pesar 5 g e introducirlos en un matraz aforado de 250 ml, añadir 200 ml de agua destilada y mezclar en el tambor durante una hora o más, si es necesario. Clarificar con los reactivos de Carrez I (punto 3.2) y II (punto 3.3) según se describe en el punto 5.1. Enrasar con agua fría, homogeneizar y filtrar. Para determinar la cantidad de azúcares totales, proseguir como se describe en el punto 5.3.

## 8. **Observaciones**

- 8.1. Es recomendable añadir (sea cual sea el volumen) aproximadamente 1 ml de 3-metilbutan-1-ol (punto 3.14) antes de hervir con el reactivo de Luff-Schoorl, a fin de evitar la formación de espuma.
- 8.2. La diferencia entre el contenido de azúcares totales después de inversión, expresados en glucosa, y el contenido de azúcares reductores, expresados en glucosa, multiplicada por 0,95, da el porcentaje de sacarosa.
- 8.3. Para determinar el contenido de azúcares reductores, excluida la lactosa, pueden adoptarse dos métodos:

- 8.3.1. Para un cálculo aproximado, multiplicar por 0,675 el contenido de lactosa establecido mediante un método de análisis diferente y restar el resultado obtenido al contenido de azúcares reductores.
- 8.3.2. Para un cálculo exacto de los azúcares reductores, excluida la lactosa, debe emplearse la misma muestra en las dos determinaciones finales. Uno de los análisis se efectúa con una parte de la solución obtenida según el punto 5.1, y el otro con una parte de la solución obtenida al determinar la lactosa conforme al método establecido al efecto (previa fermentación de los otros tipos de azúcares y clarificación).

En ambos casos, la cantidad de azúcar presente se determina según el método de Luff-Schoorl y se calcula en miligramos de glucosa. Los dos valores se restan y la diferencia se expresa en porcentaje de la muestra.

#### Ejemplo

Los dos volúmenes tomados corresponden, para cada determinación, a una muestra de 250 mg.

En el primer caso se consumen 17 ml de solución de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l, lo que corresponde a 44,2 mg de glucosa; en el segundo, 11 ml, que corresponden a 27,6 mg de glucosa.

La diferencia es de 16,6 mg de glucosa.

El contenido de azúcares reductores (excluida la lactosa), calculado en glucosa, es pues de:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

Tabla de valores correspondientes a 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl

#### militros de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 0,1 mol/l, calentamiento de dos minutos, hervor de diez minutos

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l	Glucosa, fructosa, azúcares invertidos C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lactosa C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l
ml	mg	diferencia	mg	diferencia	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

#### J. DETERMINACIÓN DE LA LACTOSA

##### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de lactosa de los piensos que contienen más de un 0,5 % de este azúcar.

## 2. Principio

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

## 3. Reactivos

3.1. Suspensión de *Saccharomyces cerevisiae*: suspender 25 g de levadura fresca en 100 ml de agua. En el frigorífico, el período máximo de conservación de la suspensión es de una semana.

3.2. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de zinc,  $Zn(CH_3COO)_2 \times 2 H_2O$  y 3 g de ácido acético glacial; enrasar con agua a 100 ml.

3.3. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio,  $K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$ ; enrasar con agua a 100 ml.

3.4. Reactivo de Luff-Schoorl:

verter la solución de ácido cítrico (punto 3.4.2) en la solución de carbonato de sodio (punto 3.4.3) removiendo con cuidado; añadir la solución de sulfato de cobre (punto 3.4.1) y enrasar a 1 l con agua; dejar reposar una noche y filtrar; comprobar la concentración del reactivo así obtenido (Cu 0,05 mol/l;  $Na_2CO_3$  1 mol/l); el pH de la solución deberá ser de 9,4 aproximadamente.

3.4.1. Solución de sulfato de cobre: disolver 25 g de sulfato de cobre,  $CuSO_4 \times 5H_2O$ , exento de hierro, en 100 ml de agua.

3.4.2. Solución de ácido cítrico: disolver 50 g de ácido cítrico  $C_6H_8O_7 \times H_2O$  en 50 ml de agua.

3.4.3. Solución de carbonato de sodio: disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro en 300 ml aproximadamente de agua caliente. Dejar enfriar.

3.5. Piedra pómez granulada, hervida en ácido clorhídrico, lavada en agua y desecada.

3.6. Yoduro de potasio, solución al 30 % (p/v).

3.7. Ácido sulfúrico de 3 mol/l.

3.8. Solución de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l.

3.9. Solución de almidón: añadir una mezcla de 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua a 1 l de agua hirviendo; hervir durante tres minutos, dejar enfriar y, si es necesario, añadir 10 mg de yoduro de mercurio como conservante.

## 4. Instrumental

Baño maría con termostato, regulado a (38-40) °C.

## 5. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, 1 g de la muestra e introducirlo en un matraz aforado de 100 ml. Añadir de 25 ml a 30 ml de agua. Colocar el matraz durante treinta minutos en un baño de agua hirviendo y refrigerar a continuación a 35 °C aproximadamente. Añadir 5 ml de suspensión de levadura (punto 3.1) y homogeneizar. Dejar reposar el matraz durante dos horas en un baño maría, a una temperatura de 38-40 °C. Enfriar a 20 °C aproximadamente.

Añadir 2,5 ml de solución de Carrez I (punto 3.2) y agitar durante treinta segundos; añadir a continuación 2,5 ml de solución de Carrez II (punto 3.3) y agitar de nuevo durante treinta segundos. Enrasar a 100 ml con agua, mezclar y filtrar. Pipetear no más de 25 ml de filtrado que contenga preferiblemente de 40 mg a 80 mg de lactosa y transvasarlos a un erlenmeyer de 300 ml. Si es necesario, enrasar a 25 ml con agua.

Efectuar de la misma manera un ensayo en blanco con 5 ml de suspensión de levadura (punto 3.1). Determinar, como se indica a continuación, el contenido de lactosa siguiendo el método de Luff-Schoorl: añadir exactamente 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl (punto 3.4) y dos gránulos de piedra pómez (punto 3.5). Remover manualmente sobre una llama desnuda de media altura y llevar el líquido a ebullición en dos minutos aproximadamente. Colocar inmediatamente el erlenmeyer sobre una tela metálica provista de una pantalla de

amianto con un orificio de 6 cm de diámetro aproximadamente, bajo la que se ha encendido previamente una llama. Esta se regula de forma que solo se caliente el fondo del erlenmeyer. Ajustar a este último un condensador de reflujo. Hervir durante diez minutos exactos. Enfriar inmediatamente en agua fría y, transcurridos unos cinco minutos, valorar como se indica a continuación:

Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (punto 3.6), e inmediatamente después (con cuidado, ya que puede formarse mucha espuma), 25 ml de ácido sulfúrico (punto 3.7). Valorar con solución de tiosulfato de sodio (punto 3.8) hasta que aparezca una coloración amarilla mate, añadir el indicador de almidón (punto 3.9) y completar la valoración.

Efectuar la misma valoración en una mezcla exactamente medida de 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl (punto 3.4) y 25 ml de agua, después de añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (punto 3.6) y 25 ml de ácido sulfúrico (punto 3.7) sin hervir.

## 6. Cálculo de los resultados

Establecer, con ayuda del cuadro adjunto, la cantidad de lactosa en miligramos que corresponde a la diferencia entre los resultados de las dos valoraciones, expresados en mililitros de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l.

Expresar el resultado de lactosa anhidra como porcentaje de la muestra.

## 7. Observaciones

1. Para productos que contengan más de un 40 % de azúcares fermentables, emplear más de 5 ml de suspensión de levadura (punto 3.1).
2. En los piensos "con cantidades reducidas de lactosa" (por ejemplo, leche de gato), la lactosa se convierte en fructosa, que no se fermenta completamente en un plazo de dos horas, lo que da lugar a resultados positivos superiores o falsos (debidos a la presencia de residuos de fructosa en el extracto).

Tabla de valores correspondientes a 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl

### mililitros de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 0,1 mol/l, calentamiento de dos minutos, hervor de diez minutos

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l	Glucosa, fructosa, azúcares invertidos C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lactosa C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l
ml	mg	diferencia	mg	diferencia	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

## K. DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN

## MÉTODO POLARIMÉTRICO

**1. Finalidad y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar los niveles de almidón y de productos de la degradación del almidón de elevada masa molecular presentes en los piensos, a fin de comprobar que se cumple el valor energético declarado (disposiciones del anexo VII) y lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo.

Este método debe utilizarse para determinar el contenido de almidón para el cálculo del valor energético del pienso.

En caso de que el contenido de almidón deba determinarse para otros fines, podrán utilizarse otros métodos de análisis.

**2. Principio**

El método comprende dos determinaciones. En la primera, la muestra se trata con ácido clorhídrico diluido. Tras clarificación y filtración, se mide la rotación óptica de la solución por polarimetría.

En la segunda, la muestra se extrae con etanol al 40 %. Tras acidificación del filtrado con ácido clorhídrico, clarificación y filtración, se mide la rotación óptica como en la primera determinación.

La diferencia entre las dos mediciones, multiplicada por un factor conocido, da el contenido de almidón de la muestra.

**3. Reactivos**

3.1. Ácido clorhídrico, solución al 25 % (p/p), con una densidad de 1,126 g/ml.

3.2. Ácido clorhídrico, solución al 1,13 % (p/v).

La concentración debe comprobarse por valoración con una solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/l en presencia de rojo de metilo al 0,1 % (p/v) en etanol al 94 % (v/v). Para la neutralización de 10 ml se necesitan 30,94 ml de NaOH de 0,1 ml/l.

3.3. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de zinc,  $Zn(CH_3COO)_2 \times 2 H_2O$  y 3 g de ácido acético glacial; enrasar con agua a 100 ml.

3.4. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio,  $K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$ ; enrasar con agua a 100 ml.

3.5. Etanol, solución al 40 % (v/v), con una densidad de 0,948 g/ml a 20 °C.

**4. Instrumental**

4.1. Erlenmeyer de 250 ml con junta esmerilada estándar y condensador de reflujo.

4.2. Polarímetro o sacarímetro.

**5. Procedimiento****5.1. Preparación de la muestra**

Triturar la muestra hasta que sea lo suficientemente fina para pasar en su totalidad por un tamiz con una luz de malla redonda de 0,5 mm.



5.2. Determinación de la rotación óptica total (P o S) (véase la observación del punto 7.1)

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra triturada e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 25 ml de ácido clorhídrico (punto 3.2), agitar para obtener una distribución uniforme de la muestra de ensayo y añadir otros 25 ml de ácido clorhídrico (punto 3.2). Sumergir el matraz en un baño maría hirviendo y, durante los tres primeros minutos, agitar enérgica y constantemente para evitar la formación de aglomerados. La cantidad de agua del baño maría debe ser suficiente para que pueda mantenerse en ebullición cuando se introduzca en él el matraz. Este no debe retirarse del baño mientras se agita. Transcurridos exactamente 15 minutos, sacarlo del baño, añadir 30 ml de agua fría y enfriar inmediatamente a 20 °C.

Añadir 5 ml de solución de Carrez I (punto 3.3) y agitar durante 30 segundos aproximadamente. Añadir 5 ml de solución de Carrez II (punto 3.4) y agitar durante 30 segundos aproximadamente. Enrasar con agua, mezclar y filtrar. Si el filtrado no está perfectamente claro (lo cual es raro), repetir la determinación con una cantidad mayor de soluciones de Carrez I y II, por ejemplo 10 ml.

Medir la rotación óptica de la solución en un tubo de 200 mm con el polarímetro o el sacarímetro.

5.3. *Determinación de la rotación óptica (P' o S') de sustancias solubles en etanol al 40 %*

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g de la muestra, introducirlos en un matraz aforado de 100 ml y añadir unos 80 ml de etanol (punto 3.5) (véase la observación 7.2). Dejar reposar el matraz durante una hora a temperatura ambiente; durante este tiempo, agitar enérgicamente seis veces de manera que la muestra se mezcle completamente con el etanol. Enrasar con etanol (punto 3.5), mezclar y filtrar.

Pipetear 50 ml del filtrado (correspondientes a 2,5 g de la muestra) y transvasarlos a un erlenmeyer de 250 ml; añadir a continuación 2,1 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1) y agitar enérgicamente. Ajustar un condensador de reflujo al erlenmeyer y sumergir este último en un baño maría hirviendo. Transcurridos exactamente 15 minutos, retirar el erlenmeyer del baño, transvasar su contenido a un matraz aforado de 100 ml, enjuagando con un poco de agua fría, y enfriar a 20 °C.

Clarificar con soluciones de Carrez I (punto 3.3) y II (punto 3.4), enrasar con agua, mezclar, filtrar y medir la rotación óptica como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.2.

6. **Cálculo de los resultados**

El contenido de almidón (%) se calcula como sigue:

6.1. *Medición con polarímetro*

$$\text{Porcentaje de almidón} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P: = rotación óptica total en grados de ángulo

P': = rotación óptica en grados de ángulo de las sustancias solubles en etanol al 40 % (v/v)

$[\alpha]_D^{20}$  = rotación óptica específica del almidón puro. Los valores numéricos aceptados convencionalmente para este factor son los siguientes:

+ 185,9°: almidón de arroz

+ 185,7°: fécula 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 y mezclas de almidón en piensos compuestos

6.2. *Medición con sacarímetro*

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

S: = rotación óptica total, en grados de sacarímetro

S': = rotación óptica, en grados de sacarímetro, de las sustancias solubles en etanol al 40 % (v/v)

N: = peso (g) de la sacarosa en 100 ml de agua que da una rotación óptica de 100 grados de sacarímetro cuando se mide con un tubo de 200 mm

16,29 g para sacarímetros franceses

26,00 g para sacarímetros alemanes

20,00 g para sacarímetros mixtos

$[\alpha]_D^{20}$  = rotación óptica específica del almidón puro (véase el punto 6.1)

6.3. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder de 0,4 en valor absoluto, en el caso de un contenido de almidón inferior al 40 %, ni del 1 % en el caso de contenidos de almidón iguales o superiores al 40 %.

7. **Observaciones**

7.1. Si la muestra contiene más de un 6 % de carbonatos, calculados en carbonato de calcio, deben destruirse mediante un tratamiento con la cantidad exacta apropiada de ácido sulfúrico diluido antes de proceder a la determinación de la rotación óptica total.

7.2. En el caso de productos con un elevado contenido de lactosa, como el suero de leche en polvo o la leche desnatada en polvo, proceder como sigue tras añadir 80 ml de etanol (punto 3.5). Ajustar un condensador de reflujo al erlenmeyer y sumergir este último en un baño maría a 50 °C durante 30 minutos. Dejar enfriar y seguir con el análisis como se indica en el punto 5.3.

7.3. Cuando están presentes en cantidades importantes en los piensos, los siguientes materiales producen interferencias en la determinación del contenido de almidón por el método polarimétrico, lo que podría dar lugar a resultados incorrectos:

- productos de la remolacha (azucarera), como la pulpa de remolacha (azucarera), las melazas de remolacha (azucarera), la pulpa de remolacha (azucarera) melazada, la vinaza de remolacha (azucarera) o el azúcar (de remolacha),
- pulpa de cítricos,
- linaza, torta de presión de linaza, extracto de linaza,
- semillas de colza, torta de presión de semillas de colza, extracto de semillas de colza, cáscaras de semillas de colza,
- semillas de girasol, extracto de semillas de girasol, extracto de semillas de girasol parcialmente peladas,
- torta de presión de copra, extracto de copra,
- pulpa de patata,
- levadura deshidratada,
- productos ricos en inulina (por ejemplo, rodajas y sémola de patacas),
- chicharrones,
- productos a base de soja.

En estos casos puede aplicarse el método de análisis previsto en el Reglamento (CE) n.º 121/2008 de la Comisión <sup>(7)</sup>. Este método también puede utilizarse para piensos que contengan menos de un 1 % de almidón.

<sup>(7)</sup> Reglamento (CE) n.º 121/2008 de la Comisión, de 11 de febrero de 2008, por el que se establece el método de análisis para la determinación del contenido de almidón en las preparaciones del tipo de las utilizadas para la alimentación de los animales (código NC 2309) (DO L 37 de 12.2.2008, p. 3).

## L. DETERMINACIÓN DE LA CENIZA BRUTA

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el contenido de ceniza bruta de los piensos.

2. **Principio**

La muestra se incinera a 550 °C; el residuo se pesa.

3. **Reactivos**

Nitrato de amonio, solución al 20 % (p/v).

4. **Instrumental**

4.1. Placa calefactora.

4.2. Horno eléctrico de mufla con termostato.

4.3. Crisoles de incineración de sílice, porcelana o platino, bien rectangulares (60 × 40 × 25 mm, aproximadamente), bien redondos (60 mm a 75 mm de diámetro y 20 mm a 40 mm de altura).

5. **Procedimiento**

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g aproximadamente de la muestra (2,5 g en el caso de productos con tendencia a hincharse) e introducirlos en un crisol de incineración previamente calentado a 550 °C, enfriado y tarado. Colocar el crisol sobre la placa calefactora y calentar gradualmente hasta que se carbonice la sustancia. Incinerar conforme al punto 5.1 o 5.2.

5.1. Introducir el crisol en el horno de mufla calibrado, regulado a 550 °C. Mantener a esta temperatura hasta obtener una ceniza blanca, gris claro o rojiza aparentemente exenta de partículas carbonosas. Colocar el crisol en un desecador, dejar enfriar y pesar inmediatamente.

5.2. Introducir el crisol en el horno de mufla calibrado, regulado a 550 °C. Incinerar durante tres horas. Colocar el crisol en un desecador, dejar enfriar y pesar inmediatamente. Volver a incinerar durante 30 minutos para que el peso de la ceniza se mantenga constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 1 mg).

6. **Cálculo de los resultados**

Calcular el peso del residuo deduciendo la tara.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

7. **Observaciones**

7.1. La ceniza de *sustancias difíciles de incinerar* debe someterse a una primera incineración de, como mínimo, tres horas y después enfriarse, para a continuación añadirle unas pocas gotas de una solución de nitrato de amonio al 20 % o agua (con cuidado de que no se disperse la ceniza ni se formen grumos). Continuar la calcinación después de desecar en la estufa. Repetir la operación las veces necesarias hasta que la incineración sea completa.

7.2. En el caso de *sustancias resistentes al tratamiento* descrito en el punto 7.1, proceder como sigue: tras incinerar durante tres horas, poner la ceniza en agua caliente y filtrar por un filtro pequeño sin cenizas. Incinerar el filtro y su contenido en el crisol inicial. Colocar el filtrado en el crisol enfriado, evaporar hasta que esté seco, incinerar y pesar.

7.3. En el caso de *materia grasa*, pesar con exactitud una muestra de 25 g en un crisol de tamaño adecuado. Carbonizar inflamando la sustancia con una tira de papel de filtro sin cenizas. Tras la combustión, humedecer con el mínimo estrictamente necesario de agua. Secar e incinerar como se describe en el punto 5.

## M. DETERMINACIÓN DE CENIZA INSOLUBLE EN ÁCIDO CLORHÍDRICO

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar la cantidad de sustancias minerales de los piensos que son insolubles en ácido clorhídrico. Pueden seguirse dos métodos, en función de la naturaleza de la muestra.

- 1.1. *Método A*: aplicable a las materias primas para piensos orgánicas y a la mayor parte de los piensos compuestos.
- 1.2. *Método B*: aplicable a los compuestos y mezclas minerales y a los piensos compuestos cuyo contenido de sustancias insolubles en ácido clorhídrico, determinado por el método A, sea superior al 1 %.

## 2. Principio

- 2.1. *Método A*: la muestra se incinera, la ceniza se hierve en ácido clorhídrico y el residuo insoluble se filtra y se pesa.
- 2.2. *Método B*: la mezcla se trata con ácido clorhídrico. La solución se filtra, el residuo se incinera y la ceniza así obtenida se trata conforme al método A.

## 3. Reactivos

- 3.1. Ácido clorhídrico de 3 mol/l.
- 3.2. Ácido tricloroacético, solución al 20 % (p/v).
- 3.3. Ácido tricloroacético, solución al 1 % (p/v).

## 4. Instrumental

- 4.1. Placa calefactora.
- 4.2. Horno eléctrico de mufla con termostato.
- 4.3. Crisoles de incineración de sílice, porcelana o platino, bien rectangulares (60 × 40 × 25 mm, aproximadamente), bien redondos (60 mm a 75 mm de diámetro y 20 mm a 40 mm de altura).
- 4.4. Filtros sin cenizas.

## 5. Procedimiento

### 5.1. *Método A*

Incinerar la muestra según el método descrito para la determinación de la ceniza bruta. También puede emplearse la ceniza obtenida en ese análisis.

Introducir la ceniza en un vaso de precipitado de 250 ml a 400 ml, empleando 75 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1). Llevar el líquido con prudencia a ebullición suave y mantener esta durante 15 minutos. Filtrar la solución caliente por un papel de filtro sin cenizas y lavar el residuo con agua caliente hasta que deje de ser visible la reacción ácida. Secar el filtro que contiene el residuo e incinerarlo en un crisol tarado a una temperatura no inferior a 550 °C ni superior a 700 °C. Enfriar en un desecador y pesar.

### 5.2. *Método B*

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g de la muestra e introducirlos en un vaso de precipitado de 250 ml a 400 ml. Añadir sucesivamente 25 ml de agua y 25 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1), mezclar y esperar a que cese la efervescencia. Añadir otros 50 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1). Esperar al final de un posible desprendimiento de gases, 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 por un filtro sin cenizas y lavar el filtro en 50 ml de agua caliente (véase la observación del punto 7). Colocar el filtro que contiene el residuo en un crisol de incineración, secar e incinerar a una temperatura no inferior a 550 °C ni superior a 700 °C. Introducir la ceniza en un vaso de precipitado de 250 ml a 400 ml, empleando 75 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1); continuar como se describe en el punto 5.1, párrafo segundo.

## 6. Cálculo de los resultados

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

## 7. Observación

Si la filtración resultara difícil, recomenzar el análisis sustituyendo los 50 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1) por 50 ml de ácido tricloracético al 20 % (p/v) (punto 3.2) y lavando el filtro en una solución caliente de ácido tricloracético al 1 % (punto 3.3).

## N. DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO TOTAL

El fósforo total se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 15510: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del contenido de calcio, sodio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc, cobre, manganeso, cobalto, molibdeno y plomo por ICP-AES, o
- el método de análisis detallado en EN 15621: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del calcio, sodio, fósforo, magnesio, potasio, azufre, hierro, zinc, cobre, manganeso y cobalto tras digestión bajo presión mediante ICP-AES, o
- el método fotométrico, tal como se describe a continuación.

## MÉTODO FOTOMÉTRICO

### 1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de fósforo total en los piensos. Está indicado, en particular, para el análisis de los productos pobres en fósforo. En determinados casos (productos ricos en fósforo), puede aplicarse un método gravimétrico.

### 2. Principio

La muestra se mineraliza, bien por combustión seca (en el caso de piensos orgánicos), bien por digestión ácida (en el caso de compuestos minerales y piensos líquidos), y se introduce en una solución ácida. La solución se trata con el reactivo de molibdovanadato. La densidad óptica de la solución amarilla así formada se mide en el espectrofotómetro a 430 nm.

### 3. Reactivos

- 3.1. Carbonato de calcio.
- 3.2. Ácido clorhídrico,  $\rho_{20} = 1,10$  g/ml (aproximadamente 6 mol/l).
- 3.3. Ácido nítrico,  $\rho_{20} = 1,045$  g/ml.
- 3.4. Ácido nítrico,  $\rho_{20} = 1,38$  g/ml a 1,42 g/ml.
- 3.5. Ácido sulfúrico,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.
- 3.6. Reactivo de molibdovanadato: mezclar 200 ml de solución de heptamolibdato de amonio (punto 3.6.1), 200 ml de solución de monovanadato de amonio (punto 3.6.2) y 134 ml de ácido nítrico (punto 3.4) en un matraz aforado de 1 l; enrasar con agua y mezclar.
  - 3.6.1. Solución de heptamolibdato de amonio: disolver en agua caliente 100 g de heptamolibdato de amonio,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ; añadir 10 ml de amoniaco (densidad 0,91 g/ml) y enrasar a 1 l con agua.
  - 3.6.2. Solución de monovanadato de amonio: disolver 2,35 g de monovanadato de amonio,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , en 400 ml de agua caliente; añadir lentamente y sin parar de remover 20 ml de ácido nítrico diluido [7 ml de  $\text{HNO}_3$  (punto 3.4) + 13 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ] y enrasar a 1 l con agua.
- 3.7. Solución patrón de 1 mg de fósforo por mililitro: disolver en agua 4,387 g de dihidrogenofosfato de potasio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; enrasar a 1 l con agua.

#### 4. Instrumental

- 4.1. Crisoles de incineración de sílice, porcelana o platino.
- 4.2. Horno eléctrico de mufla con termostato, regulado a 550 °C.
- 4.3. Matraz Kjeldahl de 250 ml.
- 4.4. Matraces aforados y pipetas de precisión.
- 4.5. Espectrofotómetro.
- 4.6. Tubos de ensayo de aproximadamente 16 mm de diámetro, con tapones rebajados a un diámetro de 14,5 mm; capacidad de 25 ml a 30 ml.

#### 5. Procedimiento

##### 5.1. Preparación de la solución

Según la naturaleza de la muestra, preparar una solución como se indica en el punto 5.1.1 o 5.1.2.

##### 5.1.1. Procedimiento habitual

Pesar, con una precisión de 1 mg, 1 g o más de la muestra. Introducirla en un matraz Kjeldahl, añadir 20 ml de ácido sulfúrico (punto 3.5), agitar para impregnar completamente la sustancia de ácido y evitar que se adhiera a las paredes del matraz, calentar y mantener durante diez minutos en el punto de ebullición. Dejar enfriar ligeramente, añadir 2 ml de ácido nítrico (punto 3.4), calentar suavemente, dejar enfriar ligeramente, añadir un poco más de ácido nítrico (punto 3.4) y llevar de nuevo al punto de ebullición. Repetir este procedimiento hasta obtener una solución incolora. Enfriar, añadir un poco de agua y decantar el líquido en un matraz aforado de 500 ml, enjuagando el matraz Kjeldahl con agua caliente. Dejar enfriar, enrasar con agua, homogeneizar y filtrar.

##### 5.1.2. Muestras que contengan sustancias orgánicas y estén exentas de dihidrogenofosfatos de calcio y de magnesio

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g aproximadamente de la muestra en un crisol de incineración. Mezclar la muestra de ensayo completamente con 1 g de carbonato de calcio (punto 3.1). Incinerar en la estufa a 550 °C hasta obtener una ceniza blanca o gris (no importa que quede algo de carbón). Transferir la ceniza a un vaso de precipitado de 250 ml. Añadir 20 ml de agua y de ácido clorhídrico (punto 3.2) hasta que cese la efervescencia. Añadir otros 10 ml de ácido clorhídrico (punto 3.2). Poner el vaso de precipitado sobre un baño de arena y evaporar hasta sequedad para insolubilizar la sílice. Volver a disolver el residuo en 10 ml de ácido nítrico (punto 3.3) y hervir durante cinco minutos sobre el baño de arena o la placa calefactora, sin evaporación, hasta sequedad. Decantar el líquido en un matraz aforado de 500 ml, enjuagando el vaso de precipitado varias veces con agua caliente. Dejar enfriar, enrasar con agua, homogeneizar y filtrar.

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

Diluir una alícuota del filtrado obtenido con el procedimiento del punto 5.1.1 o 5.1.2 para obtener una concentración de fósforo no superior a 40 µg/ml. Introducir 10 ml de esta solución en un tubo de ensayo (punto 4.6) y añadir 10 ml del reactivo de molibdovanadato (punto 3.6). Homogeneizar y dejar reposar un mínimo de diez minutos a 20 °C. Medir la densidad óptica en un espectrofotómetro a 430 nm por comparación con una solución obtenida añadiendo 10 ml del reactivo de molibdovanadato (punto 3.6) a 10 ml de agua.

##### 5.3. Curva de calibración

A partir de la solución patrón (punto 3.7), preparar soluciones que contengan, respectivamente, 5, 10, 20, 30 y 40 µg de fósforo por mililitro. Tomar 10 ml de cada una de estas soluciones y añadirles 10 ml del reactivo de molibdovanadato (punto 3.6). Homogeneizar y dejar reposar un mínimo de diez minutos a 20 °C. Medir la densidad óptica como se indica en el punto 5.2. Trazar la curva de calibración relacionando las densidades ópticas con las correspondientes cantidades de fósforo. La curva será lineal para concentraciones comprendidas entre 0 µg/ml y 40 µg/ml.

#### 6. Cálculo de los resultados

Determinar la cantidad de fósforo de la muestra por medio de la curva de calibración.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

#### Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no excederá de:

- el 3 % del resultado superior, en el caso de contenidos de fósforo inferiores al 5 %;
- el 0,15 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de fósforo iguales o superiores al 5 %.

### O. DETERMINACIÓN DEL CLORO EN FORMA DE CLORUROS

#### 1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de cloro de los cloruros solubles en agua, expresada convencionalmente en cloruro de sodio. Es aplicable a todos los piensos.

#### 2. Principio

Los cloruros se disuelven en agua. Si el producto contiene materia orgánica, se procede a una clarificación. La solución se acidifica ligeramente con ácido nítrico y los cloruros se precipitan en forma de cloruro de plata por medio de una solución de nitrato de plata. El exceso de nitrato de plata se valora con una solución de tiocianato de amonio por el método de Volhard.

#### 3. Reactivos

- 3.1. Solución de tiocianato de amonio de 0,1 mol/l.
- 3.2. Solución de nitrato de plata de 0,1 mol/l.
- 3.3. Solución saturada de sulfato férrico amónico  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ .
- 3.4. Ácido nítrico de 1,38 g/ml de densidad.
- 3.5. Éter dietílico.
- 3.6. Acetona.
- 3.7. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de zinc,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  y 3 g de ácido acético glacial; enrasar con agua a 100 ml.
- 3.8. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ; enrasar con agua a 100 ml.
- 3.9. Carbón activo, exento de cloruros y que no los absorba.

#### 4. Instrumental

Mezclador (tambor): de aproximadamente 35 a 40 revoluciones por minuto.

#### 5. Procedimiento

##### 5.1. Preparación de la solución

Según la naturaleza de la muestra, preparar una solución como se indica en el punto 5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3.

Al mismo tiempo, efectuar un *ensayo en blanco* sin la muestra que debe analizarse.

##### 5.1.1. Muestras exentas de materia orgánica

Pesar, con una precisión de 1 mg, una muestra de no más de 10 g que no contenga más de 3 g de cloro en forma de cloruros. Introducir la con 400 ml de agua en un matraz aforado de 500 ml a unos 20 °C. Mezclar durante treinta minutos en el tambor, enrasar al volumen, homogeneizar y filtrar.

- 5.1.2. Muestras que contienen materia orgánica, excepto los productos mencionados en el punto 5.1.3

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g aproximadamente de la muestra e introducirlos con 1 g de carbón activo en un matraz aforado de 500 ml. Añadir 400 ml de agua a unos 20 °C y 5 ml de solución de Carrez I (punto 3.7), remover durante 30 segundos y, a continuación, añadir 5 ml de solución de Carrez II (punto 3.8). Mezclar durante treinta minutos en el tambor, enrasar al volumen, homogeneizar y filtrar.

- 5.1.3. Piensos cocidos, tortas y harina de lino, productos ricos en harina de lino y otros productos ricos en mucílago o en sustancias coloidales (por ejemplo, almidón dextrinado)

Preparar la solución como se describe en el punto 5.1.2, pero no filtrar. Decantar (si fuera necesario, centrifugar), retirar 100 ml del líquido sobrenadante y transvasar a un matraz aforado de 200 ml. Mezclar con acetona (punto 3.6) y enrasar con este disolvente, homogeneizar y filtrar.

- 5.2. *Valoración*

Transvasar con una pipeta al erlenmeyer entre 25 ml y 100 ml del filtrado (según el contenido supuesto de cloro) obtenido según se describe en el punto 5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3. La alícuota no debe contener más de 150 mg de cloro (Cl). Diluir, si fuera necesario, a 50 ml como mínimo con agua, añadir 5 ml de ácido nítrico (punto 3.4), 2 ml de solución saturada de sulfato férrico amónico (punto 3.3) y dos gotas de solución de tiocianato de amonio (punto 3.1) suministradas mediante una bureta llena hasta la marca de aforo cero. Transvasar con una bureta la solución de nitrato de plata (punto 3.2) de forma que se obtenga un exceso de 5 ml. Añadir 5 ml de éter dietílico (punto 3.5) y agitar fuertemente para coagular el precipitado. Valorar el exceso de nitrato de plata con la solución de tiocianato de amonio (punto 3.1) hasta que la tinción marrón rojiza haya persistido un minuto.

## 6. **Cálculo de los resultados**

El contenido de cloro (X), expresado en porcentaje de cloruro de sodio, se calcula con la fórmula siguiente:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

donde:

V<sub>1</sub>: =      mililitros añadidos de solución de nitrato de plata de 0,1 mol/l

V<sub>2</sub>: =      mililitros de solución de tiocianato de amonio de 0,1 mol/l empleados para la valoración

m =      peso en gramos de la muestra en la alícuota

Si el ensayo en blanco indica un consumo de solución de nitrato de plata de 0,1 mol/l, deducir este valor del volumen (V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>).

## 7. **Observaciones**

- 7.1. La valoración también puede hacerse por potenciometría o amperometría.

- 7.2. Para los productos muy ricos en materias grasas, proceder a un desengrasado previo mediante el éter dietílico o el éter de petróleo.

- 7.3. En el caso de las harinas de pescado, la valoración puede efectuarse por el método de Mohr.»



## ANEXO IV

## «ANEXO IV

## MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DEL NIVEL DE ADITIVOS AUTORIZADOS EN LOS PIENSOS

## A. DETERMINACIÓN DE LA VITAMINA A

La vitamina A se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17547: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del contenido en vitamina A, E y D <sup>(1)</sup>. Método basado en la purificación por extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o
- mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un detector de UV o fluorescencia, tal como se describe en los puntos 1 a 9 siguientes.

**1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar la cantidad de vitamina A (retinol) en piensos. La vitamina A incluye el todo-*trans*-retinol y sus isómeros *cis*, que se determinan con este método. El contenido de vitamina A se expresa en unidades internacionales (UI) por kilogramo. Una UI corresponde a la actividad de 0,300 µg de todo-*trans*-retinol, 0,344 µg de acetato de todo-*trans*-vitamina A o 0,550 µg de palmitato de todo-*trans*-vitamina A.

El límite de cuantificación es de 2 000 UI de vitamina A por kilogramo.

**2. Principio**

La muestra se hidroliza con solución etanólica de hidróxido de potasio y la vitamina A se extrae en éter de petróleo. El disolvente se elimina por evaporación y el residuo se disuelve en metanol y, en caso necesario, se diluye hasta conseguir la concentración necesaria. El contenido de vitamina A se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) con detector de UV o de fluorescencia. Los parámetros cromatográficos se seleccionan de forma que no haya separación entre el todo-*trans*-retinol y sus isómeros *cis*.

**3. Reactivos**

- 3.1. Etanol,  $\sigma = 96 \%$ .
- 3.2. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40 °C-60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Solución de hidróxido de potasio,  $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$ .
- 3.5. Solución de ascorbato de sodio,  $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$  (véanse las observaciones del punto 7.7).
- 3.6. Sulfuro de sodio,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$  ( $x = 7 - 9$ ).
- 3.6.1. Solución de sulfuro de sodio,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  en glicerol,  $\beta = 120 \text{ g/l}$  (para  $x = 9$ ) (véanse las observaciones del punto 7.8).
- 3.7. Solución de fenoltaleína,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  en etanol (punto 3.1).
- 3.8. 2-Propanol.
- 3.9. Fase móvil para HPLC: mezcla de metanol (punto 3.3) y agua, por ejemplo 980 + 20 (v + v). La proporción exacta estará en función de las características de la columna empleada.
- 3.10. Nitrógeno, exento de oxígeno.

<sup>(1)</sup> El método de análisis previsto en la norma EN 17547 es un método alternativo que debe utilizarse a efectos de control oficial para la determinación de las vitaminas A y E en lugar del método descrito para la determinación de la vitamina A en la parte A del presente anexo y para la vitamina E en la parte B del presente anexo.

- 3.11. Acetato de todo-*trans*-vitamina A, extrapuro, de actividad certificada, por ejemplo  $2,80 \times 10^6$  UI/g.
  - 3.11.1. Solución madre de acetato de todo-*trans*-vitamina A: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de acetato de vitamina A (punto 3.11) en un matraz aforado de 100 ml; disolver en 2-propanol (punto 3.8) y enrasar con el mismo disolvente; la concentración nominal de esta solución es de 1 400 UI de vitamina A por mililitro; el contenido exacto ha de determinarse según el punto 5.6.3.1.
- 3.12. Palmitato de todo-*trans*-vitamina A, extrapuro, de actividad certificada, por ejemplo  $1,80 \times 10^6$  UI/g.
  - 3.12.1. Solución madre de palmitato de todo-*trans*-vitamina A: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 80 mg de palmitato de vitamina A (punto 3.12) en un matraz aforado de 100 ml; disolver en 2-propanol (punto 3.8) y enrasar con el mismo disolvente; la concentración nominal de esta solución es de 1 400 UI de vitamina A por mililitro; el contenido exacto ha de determinarse según el punto 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (véanse las observaciones del punto 7.5).

#### 4. Instrumental

- 4.1. Rotavapor.
- 4.2. Material de vidrio ámbar.
  - 4.2.1. Matraces Erlenmeyer o de fondo plano, de 500 ml, con boca esmerilada.
  - 4.2.2. Matraces aforados con tapón esmerilado, de cuello estrecho, de 10, 25, 100 y 500 ml.
  - 4.2.3. Embudos cónicos de decantación, de 1 000 ml, con tapón esmerilado.
  - 4.2.4. Matraces piriformes, de 250 ml, con boca esmerilada.
- 4.3. Condensador de Allihn, con camisa de 300 mm de longitud, junta esmerilada y adaptador para tubo de alimentación de gas.
- 4.4. Papel de filtro de pliegues para separación de fases, de 185 mm de diámetro (por ejemplo, Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. Equipo de HPLC con sistema de inyección.
  - 4.5.1. Columna cromatográfica de líquidos, de 250 mm  $\times$  4 mm, C<sub>18</sub>, relleno de 5  $\mu$ m o 10  $\mu$ m, o equivalente (criterio de funcionamiento: un único pico para todos los isómeros de retinol en las condiciones de HPLC).
  - 4.5.2. Detector de UV o de fluorescencia, con ajuste de longitud de onda variable.
- 4.6. Espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm.
- 4.7. Baño maría con agitador magnético.
- 4.8. Aparato de extracción (véase la figura 1) con los siguientes elementos:
  - 4.8.1. Probeta de vidrio de 1 l de capacidad provista de cuello y tapón esmerilados.
  - 4.8.2. Pieza esmerilada provista de una oliva lateral y de un tubo ajustable que la atraviesa por el centro. El extremo inferior del tubo ajustable deberá tener forma de U, mientras que el superior debe ser una tobera, de forma que pueda pasarse la fase superior de líquido de la probeta a un embudo de decantación.

## 5. Procedimiento

*Nota:* La vitamina A es sensible a la luz (UV) y a la oxidación. Todas las operaciones deberán realizarse en ausencia de luz (utilizando material de vidrio ámbar o protegido con papel de aluminio) y de oxígeno (chorro de nitrógeno). Durante la extracción, el aire que se encuentre por encima del líquido deberá sustituirse por nitrógeno (evitar un exceso de presión aflojando el tapón de vez en cuando).

### 5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra de modo que pase por un tamiz con una luz de malla de 1 mm, cuidando de que no se produzca calor. La trituración debe realizarse inmediatamente antes del pesaje y la saponificación, de lo contrario puede haber pérdidas de vitamina A. No moler las muestras si la granulometría es adecuada (por ejemplo, premezclas y aditivos para piensos).

### 5.2. Saponificación

En función del contenido de vitamina A, pesar, con una precisión de 1 mg, entre 2 g y 25 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (punto 4.2.1). En caso de concentraciones bajas, puede aumentarse el peso de la muestra para tener suficientes partículas en la porción de ensayo. Añadir sucesivamente, agitando en círculos, 130 ml de etanol (punto 3.1), unos 100 mg de BHT (punto 3.13), 2 ml de solución de ascorbato de sodio (punto 3.5) y 2 ml de solución de sulfuro de sodio (punto 3.6). Ajustar un condensador (punto 4.3) al matraz y sumergir este en un baño maría con agitador magnético (punto 4.7). Calentar hasta ebullición y dejar refluir durante cinco minutos. Añadir entonces 25 ml de solución de hidróxido de potasio (punto 3.4) a través del condensador (punto 4.3) y dejar hervir a reflujo durante 25 minutos más, agitando circularmente bajo una corriente lenta de nitrógeno. Enjuagar después el condensador con unos 20 ml de agua y enfriar el contenido del matraz hasta la temperatura ambiente.

### 5.3. Extracción

Pasar cuantitativamente por decantación la solución de saponificación, enjuagando con un volumen total de 250 ml de agua, a un embudo de decantación de 1 000 ml (punto 4.2.3) o al aparato de extracción (punto 4.8). Enjuagar el matraz de saponificación sucesivamente con 25 ml de etanol (punto 3.1) y 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) y transvasar los líquidos de enjuague al embudo de decantación o al aparato de extracción. La proporción de agua y etanol en las soluciones combinadas debe ser aproximadamente de 2:1. Agitar energicamente durante dos minutos y dejar reposar durante otros dos minutos.

#### 5.3.1. Extracción con embudo de decantación (punto 4.2.3)

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), transvasar la fase de éter de petróleo a otro embudo de decantación (punto 4.2.3). Repetir esta extracción dos veces con 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) y dos veces con 50 ml de éter de petróleo (punto 3.2).

Lavar dos veces los extractos combinados en el embudo de decantación, agitando en círculos suavemente (para evitar la formación de emulsiones), con sendas porciones de 100 ml de agua y después, agitando repetidas veces, con más porciones de 100 ml de agua hasta que el agua no se colorea al añadir solución de fenoltaleína (punto 3.7) (normalmente es suficiente con lavar cuatro veces). Pasar el extracto lavado a un matraz aforado de 500 ml (punto 4.2.2) a través de un filtro de pliegues seco para separación de fases (punto 4.4), a fin de eliminar el agua que pudiera quedar en suspensión. Enjuagar el embudo de decantación y el filtro con 50 ml de éter de petróleo (punto 3.2), enrasar con éter de petróleo (punto 3.2) y mezclar bien.

#### 5.3.2. Extracción con aparato de extracción (punto 4.8)

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), sustituir el tapón de la probeta (punto 4.8.1) por la pieza esmerilada (punto 4.8.2) y colocar el extremo inferior con forma de U del tubo ajustable de manera que quede justo por encima del nivel de la interfase. Aplicando a la oliva la presión de un conducto de nitrógeno, transvasar la fase superior de éter de petróleo a un embudo de decantación de 1 000 ml (punto 4.2.3). Añadir 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) a la probeta, tapar y agitar bien. Dejar que se separen las fases y transvasar la fase superior al embudo de decantación, como antes. Repetir el procedimiento de extracción con otros 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) y otras dos veces con sendas porciones de 50 ml de éter de petróleo (punto 3.2), añadiendo a continuación las fases de éter de petróleo al embudo de decantación.

Lavar los extractos combinados de éter de petróleo como se describe en el punto 5.3.1 y seguir el procedimiento allí descrito.

#### 5.4. Preparación de la solución de muestra para HPLC

Pipetear una alícuota de la solución de éter de petróleo (del punto 5.3.1 o 5.3.2) a un matraz piriforme de 250 ml (punto 4.2.4). Evaporar el disolvente casi por completo en el rotavapor (punto 4.1) a presión reducida y a una temperatura del baño no superior a 40 °C. Restaurar la presión atmosférica introduciendo nitrógeno (punto 3.10) y sacar el matraz del rotavapor. Eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (punto 3.10) y disolver inmediatamente el residuo en un volumen conocido (de 10 ml a 100 ml) de metanol (punto 3.3) (la concentración de vitamina A debe quedar en un intervalo de 5 UI/ml a 30 UI/ml).

#### 5.5. Determinación mediante HPLC

La vitamina A se separa en una columna de fase reversa C<sub>18</sub> (punto 4.5.1) y su concentración se mide mediante un detector de UV (325 nm) o un detector de fluorescencia (excitación: 325 nm, emisión: 475 nm) (punto 4.5.2).

Inyectar una alícuota (por ejemplo, 20 µl) de la solución metanólica obtenida según el punto 5.4 y eluir con la fase móvil (punto 3.9). Calcular la altura (área) media de pico de varias inyecciones de la misma solución de muestra, así como la altura (área) media de pico de varias inyecciones de las soluciones de calibración (punto 5.6.2).

##### Condiciones de la HPLC

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna de cromatografía líquida (punto 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente
Fase móvil (punto 3.9):	mezcla de metanol (punto 3.3) y agua, por ejemplo, 980 + 20 (v + v)
Caudal:	1 ml/min – 2 ml/min
Detector (punto 4.5.2):	Detector de UV (325 nm) o detector de fluorescencia (excitación: 325 nm; emisión: 475 nm)

#### 5.6. Calibración

##### 5.6.1. Preparación de las soluciones patrón de trabajo

Pipetear a un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (punto 4.2.1) 20 ml de la solución madre de acetato de vitamina A (punto 3.11.1) o 20 ml de la solución madre de palmitato de vitamina A (punto 3.12.1), e hidrolizar según se describe en el punto 5.2, pero sin añadir BHT. Extraer después con éter de petróleo (punto 3.2) según el punto 5.3 y enrasar a 500 ml con éter de petróleo (punto 3.2). Evaporar 100 ml de este extracto casi hasta sequedad en el rotavapor (véase el punto 5.4), eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (punto 3.10) y volver a disolver el residuo en 10,0 ml de metanol (punto 3.3). La concentración nominal de esta solución es de 560 UI de vitamina A por mililitro. El contenido exacto debe determinarse según el punto 5.6.3.3. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

Pipetear 2,0 ml de esta solución patrón de trabajo a un matraz aforado de 20 ml, enrasar con metanol (punto 3.3) y mezclar. La concentración nominal de esta solución patrón de trabajo diluida es de 56 UI de vitamina A por mililitro.

##### 5.6.2. Preparación de las soluciones de calibración y de la curva de calibración

Transvasar 1,0, 2,0, 5,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo diluida a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (punto 3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,8, 5,6, 14,0 y 28,0 UI de vitamina A por mililitro.

Inyectar varias veces 20 µl de cada solución de calibración y determinar las alturas (áreas) medias de pico. Utilizar estas últimas para trazar la curva de calibración teniendo en cuenta los resultados del control de UV (punto 5.6.3.3).

## 5.6.3. Normalización UV de las soluciones patrón.

## 5.6.3.1. Solución madre de acetato de vitamina A.

Pipetear 2,0 ml de la solución madre de acetato de vitamina A (punto 3.11.1) a un matraz aforado de 50 ml (punto 4.2.2) y enrasar con 2-propanol (punto 3.8). La concentración nominal de esta solución es de 56 UI de vitamina A por mililitro. Pipetear 3,0 ml de esta solución diluida de acetato de vitamina A a un matraz aforado de 25 ml y enrasar con 2-propanol (punto 3.8). La concentración nominal de esta solución es de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Medir en el espectrofotómetro (punto 4.6) entre 300 nm y 400 nm el espectro de UV de esta solución frente al 2-propanol (punto 3.8). El coeficiente máximo de extinción debe estar entre 325 nm y 327 nm.

Cálculo del contenido de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ para el acetato de vitamina A} = 1\,530 \text{ a } 326 \text{ nm en 2-Propanol})$$

## 5.6.3.2. Solución madre de palmitato de vitamina A

Pipetear 2,0 ml de la solución madre de palmitato de vitamina A (punto 3.12.1) a un matraz aforado de 50 ml (punto 4.2.2) y enrasar con 2-propanol (punto 3.8). La concentración nominal de esta solución es de 56 UI de vitamina A por mililitro. Pipetear 3,0 ml de esta solución diluida de palmitato de vitamina A a un matraz aforado de 25 ml y enrasar con 2-propanol (punto 3.8). La concentración nominal de esta solución es de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Medir en el espectrofotómetro (punto 4.6) entre 300 nm y 400 nm el espectro de UV de esta solución frente al 2-propanol (punto 3.8). El coeficiente máximo de extinción debe estar entre 325 nm y 327 nm.

Cálculo del contenido de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ para el palmitato de vitamina A} = 957 \text{ a } 326 \text{ nm en 2-Propanol})$$

## 5.6.3.3. Solución patrón de trabajo de vitamina A

Pipetear a un matraz aforado de 50 ml (punto 4.2.2) 3,0 ml de la solución patrón de trabajo de vitamina A sin diluir, preparada de acuerdo con el punto 5.6.1, y enrasar con 2-propanol (punto 3.8). Pipetear 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml y enrasar con 2-propanol (punto 3.8). La concentración nominal de esta solución es de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Medir en el espectrofotómetro (punto 4.6) entre 300 nm y 400 nm el espectro de UV de esta solución frente al 2-propanol (punto 3.8). El coeficiente máximo de extinción debe estar entre 325 nm y 327 nm.

Cálculo del contenido de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ para el retinol} = 1\,821 \text{ a } 325 \text{ nm en 2-Propanol})$$

## 6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de vitamina A de la solución de muestra, determinar la concentración de esta última en UI/ml tomando como referencia la curva de calibración (punto 5.6.2).

El contenido w de vitamina A de la muestra en UI/kg viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} [\text{UI/kg}]$$

donde:

c: = concentración de vitamina A de la solución de muestra (punto 5.4), en UI/ml

V<sub>1</sub>: = volumen de la solución de muestra (punto 5.4), en mililitros

$V_2$ : = volumen de la alícuota tomada en el punto 5.4, en mililitros

$m$ : = peso de la porción de ensayo, en gramos

## 7. Observaciones

- 7.1. En caso de muestras con baja concentración de vitamina A puede ser útil combinar los extractos de éter de petróleo de dos cargas de saponificación (cantidad pesada: 25 g) en una única solución de muestra para la determinación por HPLC.
- 7.2. La muestra tomada para el análisis no contendrá en peso más de 2 g de grasa.
- 7.3. Si no se produce la separación de las fases, añadir unos 10 ml de etanol (punto 3.1) para romper la emulsión.
- 7.4. Con aceite de hígado de bacalao y otras grasas puras, el tiempo de saponificación deberá prolongarse hasta durar de 45 a 60 minutos.
- 7.5. Puede utilizarse hidroquinona en lugar de BHT.
- 7.6. Con una columna de fase normal se pueden separar los isómeros del retinol. Pero, en ese caso, para hacer los cálculos deben sumarse las alturas (áreas) de todos los picos de los isómeros *cis* y *trans*.
- 7.7. En lugar de la solución de ascorbato de sodio pueden utilizarse unos 150 mg de ácido ascórbico.
- 7.8. En lugar de la solución de sulfuro de sodio pueden utilizarse unos 50 mg de EDTA.
- 7.9. Cuando se analice la vitamina A de sustitutivos de la leche, debe prestarse una atención especial a:
- la saponificación (punto 5.2): debido a la cantidad de grasa presente en la muestra, quizá sea necesario incrementar la cantidad de solución de hidróxido de potasio (punto 3.4);
  - la extracción (punto 5.3): debido a la presencia de emulsiones, puede ser necesario adaptar la relación 2:1 de agua/etanol.

Para comprobar si el método de análisis aplicado arroja resultados fiables para esta matriz concreta (sustitutivo de la leche), deberá efectuarse un ensayo de recuperación con una porción de ensayo adicional. Si la tasa de recuperación es inferior al 80 %, el resultado analítico debe corregirse para tener en cuenta la recuperación.

## 8. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe rebasar el 15 % del resultado más elevado.

## 9. Resultados de un estudio colaborativo <sup>(?)</sup>

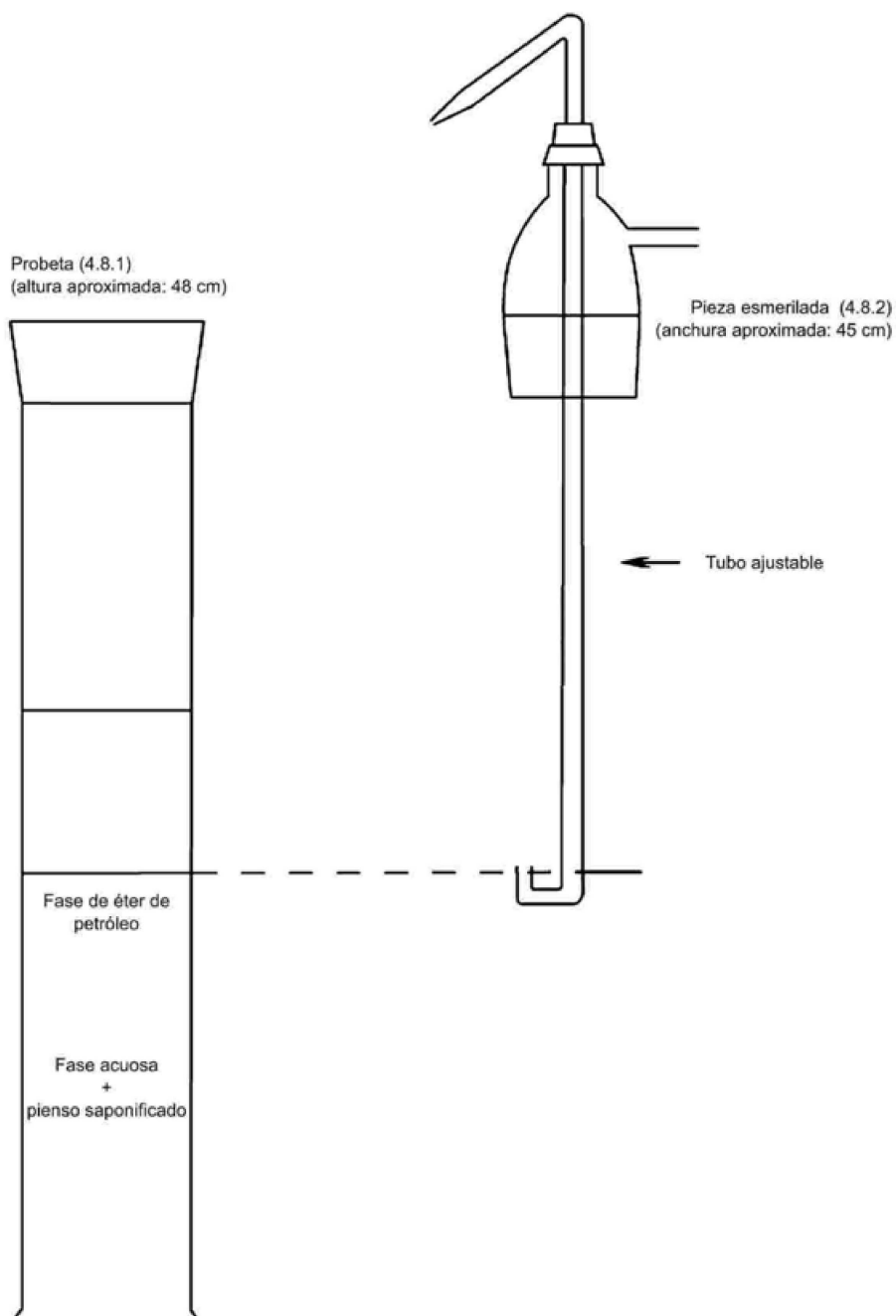
	Premezcla	Pienso de premezcla	Concentrado de minerales	Pienso proteínico	Alimento para lechones
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
media [UI/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
sr [UI/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [UI/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [UI/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [UI/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119

(?) Realizado por el Grupo de Trabajo sobre Piensos de la Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
L:	número de laboratorios				
n:	número de valores individuales				
sr:	desviación típica de la repetibilidad				
sR:	desviación típica de la reproducibilidad				
r:	repetibilidad				
R:	reproducibilidad				
CVr:	coeficiente de variación de la repetibilidad				
CVR:	coeficiente de variación de la reproducibilidad				

Figura 1

## Aparato de extracción (punto 4.8)



## B. DETERMINACIÓN DE LA VITAMINA E

La vitamina E se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17547: Alimentos para animales: Métodos de muestreo y análisis. Determinación del contenido en vitamina A, E y D <sup>(3)</sup>. Método basado en la purificación por extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o
- mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un detector de UV o fluorescencia, tal como se describe en los puntos 1 a 9 siguientes.

**1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar la cantidad de vitamina E en piensos. El contenido de vitamina E se expresa en miligramos de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por kilogramo. Un miligramo de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol corresponde a 0,91 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).

El límite de cuantificación es de 2 mg de vitamina E por kilogramo. Este límite de cuantificación solo puede alcanzarse con un detector de fluorescencia. Con un detector de UV, el límite de cuantificación es de 10 mg/kg.

**2. Principio**

La muestra se hidroliza con solución etanólica de hidróxido de potasio y la vitamina E se extrae en éter de petróleo. El disolvente se elimina por evaporación y el residuo se disuelve en metanol y, en caso necesario, se diluye hasta conseguir la concentración necesaria. El contenido de vitamina E se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa con detector de fluorescencia o de UV.

**3. Reactivos**

- 3.1. Etanol,  $\sigma = 96 \%$ .
- 3.2. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40 °C – 60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Solución de hidróxido de potasio,  $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$ .
- 3.5. Solución de ascorbato de sodio,  $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$  (véanse las observaciones del punto 7.7).
- 3.6. Sulfuro de sodio,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$  ( $x = 7 - 9$ ).
- 3.6.1. Solución de sulfuro de sodio,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  en glicerol,  $\beta = 120 \text{ g/l}$  (para  $x = 9$ ) (véanse las observaciones del punto 7.8).
- 3.7. Solución de fenolftaleína,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  en etanol (punto 3.1).
- 3.8. Fase móvil para HPLC: mezcla de metanol (punto 3.3) y agua, por ejemplo 980 + 20 (v + v). La proporción exacta estará en función de las características de la columna empleada.
- 3.9. Nitrógeno, exento de oxígeno.
- 3.10. Acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol, extra puro, de actividad certificada.
- 3.10.1. Solución madre de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 100 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol (punto 3.10) en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en etanol (punto 3.1) y enrasar con el mismo disolvente. Un mililitro de esta solución contiene 1 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol. (Con respecto al control de UV, véase el punto 5.6.1.3; con respecto a la estabilización, véanse las observaciones del punto 7.4).

<sup>(3)</sup> El método de análisis previsto en la norma EN 17547 es un método alternativo que debe utilizarse a efectos de control oficial para la determinación de las vitaminas A y E en lugar del método descrito para la determinación de la vitamina A en la parte A del presente anexo y para la vitamina E en la parte B del presente anexo.



- 3.11. DL- $\alpha$ -tocoferol, extra puro, de actividad certificada.
  - 3.11.1. Solución madre de DL- $\alpha$ -tocoferol: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 100 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol (punto 3.11) en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en etanol (punto 3.1) y enrasar con el mismo disolvente. Un mililitro de esta solución contiene 1 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol. (Con respecto al control de UV, véase el punto 5.6.2.3; con respecto a la estabilización, véanse las observaciones del punto 7.4).
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (véanse las observaciones del punto 7.5).

#### 4. Instrumental

- 4.1. Rotavapor de película.
- 4.2. Material de vidrio ámbar.
  - 4.2.1. Matraces Erlenmeyer o de fondo plano, de 500 ml, con boca esmerilada.
  - 4.2.2. Matraces aforados con tapón esmerilado, de cuello estrecho, de 10, 25, 100 y 500 ml.
  - 4.2.3. Embudos cónicos de decantación, de 1 000 ml, con tapón esmerilado.
  - 4.2.4. Matraces piriformes, de 250 ml, con boca esmerilada.
- 4.3. Condensador de Allihn, con camisa de 300 mm de longitud, junta esmerilada y adaptador para tubo de alimentación de gas.
- 4.4. Papel de filtro de pliegues para separación de fases, de 185 mm de diámetro (por ejemplo, Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. Equipo de HPLC con sistema de inyección.
  - 4.5.1. Columna de cromatografía líquida, de 250 mm x 4 mm, C<sub>18</sub>, relleno de 5  $\mu$ m o 10  $\mu$ m, o equivalente.
  - 4.5.2. Detector de UV o de fluorescencia, con ajuste de longitud de onda variable.
- 4.6. Espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm.
- 4.7. Baño maría con agitador magnético.
- 4.8. Aparato de extracción (véase la figura 2) con los siguientes elementos:
  - 4.8.1. Probeta de vidrio de 1 l de capacidad provista de cuello y tapón esmerilados.
  - 4.8.2. Pieza esmerilada provista de una oliva lateral y de un tubo ajustable que la atraviesa por el centro. El extremo inferior del tubo ajustable deberá tener forma de U, mientras que el superior debe ser una tobera, de forma que pueda pasarse la fase superior de líquido de la probeta a un embudo de decantación.

#### 5. Procedimiento

*Nota:* La vitamina E es sensible a la luz (UV) y a la oxidación. Todas las operaciones deberán realizarse en ausencia de luz (utilizando material de vidrio ámbar o protegido con papel de aluminio) y de oxígeno (chorro de nitrógeno). Durante la extracción, el aire que se encuentre por encima del líquido deberá sustituirse por nitrógeno (evitar un exceso de presión aflojando el tapón de vez en cuando).

##### 5.1. Preparación de la muestra

Moler la muestra de modo que pase por un tamiz con una luz de malla de 1 mm, cuidando de que no se produzca calor. La molienda debe hacerse inmediatamente antes de la pesada y la saponificación, pues, de lo contrario, puede haber pérdidas de vitamina E.

## 5.2. *Saponificación*

En función del contenido de vitamina E, pesar, con una precisión de 0,01 g, entre 2 g y 25 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (punto 4.2.1). Añadir sucesivamente, agitando en círculos, 130 ml de etanol (punto 3.1), unos 100 mg de BHT (punto 3.12), 2 ml de solución de ascorbato de sodio (punto 3.5) y 2 ml de solución de sulfuro de sodio (punto 3.6). Ajustar el condensador (punto 4.3) al matraz y sumergir este en un baño maría con agitador magnético (punto 4.7). Calentar hasta ebullición y dejar refluir durante cinco minutos. Añadir entonces 25 ml de solución de hidróxido potásico (punto 3.4) a través del condensador (punto 4.3) y dejar hervir a reflujo durante 25 minutos más, agitando circularmente bajo una corriente lenta de nitrógeno. Enjuagar después el condensador con unos 20 ml de agua y enfriar el contenido del matraz hasta la temperatura ambiente.

## 5.3. *Extracción*

Pasar cuantitativamente por decantación la solución de saponificación, enjuagando con un volumen total de 250 ml de agua, a un embudo de decantación de 1 000 ml (punto 4.2.3) o al aparato de extracción (punto 4.8). Enjuagar el matraz de saponificación sucesivamente con 25 ml de etanol (punto 3.1) y 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) y transvasar los líquidos de enjuague al embudo de decantación o al aparato de extracción. La proporción de agua y etanol en las soluciones combinadas debe ser aproximadamente de 2:1. Agitar energicamente durante dos minutos y dejar reposar durante otros dos minutos.

### 5.3.1. *Extracción con embudo de decantación (punto 4.2.3)*

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), transvasar la fase de éter de petróleo a otro embudo de decantación (punto 4.2.3). Repetir esta extracción dos veces con 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) y dos veces con 50 ml de éter de petróleo (punto 3.2).

Lavar dos veces los extractos combinados en el embudo de decantación, agitando en círculos suavemente (para evitar la formación de emulsiones), con sendas porciones de 100 ml de agua y después, agitando repetidas veces, con más porciones de 100 ml de agua hasta que el agua no se colorea al añadir solución de fenoltaleína (punto 3.7) (normalmente es suficiente con lavar cuatro veces). Pasar el extracto lavado a un matraz aforado de 500 ml (punto 4.2.2) a través de un filtro de pliegues seco para separación de fases (punto 4.4), a fin de eliminar el agua que pudiera quedar en suspensión. Enjuagar el embudo de decantación y el filtro con 50 ml de éter de petróleo (punto 3.2), enrasar con éter de petróleo (punto 3.2) y mezclar bien.

### 5.3.2. *Extracción con aparato de extracción (punto 4.8)*

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), sustituir el tapón de la probeta (punto 4.8.1) por la pieza esmerilada (punto 4.8.2) y colocar el extremo inferior con forma de U del tubo ajustable de manera que quede justo por encima del nivel de la interfase. Aplicando a la oliva la presión de un conducto de nitrógeno, transvasar la fase superior de éter de petróleo a un embudo de decantación de 1 000 ml (punto 4.2.3). Añadir 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) a la probeta, tapar y agitar bien. Dejar que se separen las fases y transvasar la fase superior al embudo de decantación, como antes. Repetir el procedimiento de extracción con otros 100 ml de éter de petróleo (punto 3.2) y otras dos veces con sendas porciones de 50 ml de éter de petróleo (punto 3.2), añadiendo a continuación las fases de éter de petróleo al embudo de decantación.

Lavar los extractos combinados de éter de petróleo como se describe en el punto 5.3.1 y seguir el procedimiento allí descrito.

## 5.4. *Preparación de la solución de muestra para HPLC*

Pipetear una alícuota de la solución de éter de petróleo (del punto 5.3.1 o 5.3.2) a un matraz piriforme de 250 ml (punto 4.2.4). Evaporar el disolvente casi por completo en el rotavapor (punto 4.1) a presión reducida y a una temperatura del baño no superior a 40 °C. Restaurar la presión atmosférica introduciendo nitrógeno (punto 3.9) y sacar el matraz del rotavapor. Eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (punto 3.9) y disolver inmediatamente el residuo en un volumen conocido (entre 10 ml y 100 ml) de metanol (punto 3.3) (la concentración de DL- $\alpha$ -tocoferol debe quedar en un intervalo de 5  $\mu$ g/ml a 30  $\mu$ g/ml).

## 5.5. *Determinación mediante HPLC*

La vitamina E se separa en una columna de fase reversa C<sub>18</sub> (punto 4.5.1) y su concentración se mide mediante un detector de fluorescencia (excitación: 295 nm, emisión: 330 nm) o un detector de UV (292 nm) (punto 4.5.2).

Inyectar una alícuota (por ejemplo, 20 µl) de la solución metanólica obtenida según el punto 5.4 y eluir con la fase móvil (punto 3.8). Calcular las alturas (áreas) medias de pico de varias inyecciones de la misma solución de muestra, así como las alturas (áreas) medias de pico de varias inyecciones de las soluciones de calibración (punto 5.6.2).

#### Condiciones de la HPLC

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna de cromatografía líquida (punto 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente
Fase móvil (punto 3.8):	mezcla de metanol (punto 3.3) y agua, por ejemplo, 980 + 20 (v + v)
Caudal:	(1-2) ml/min
Detector (punto 4.5.2):	Detector de fluorescencia (excitación: 295 nm/emisión: 330 nm) o detector de UV (292 nm)

### 5.6. Calibración (acetato de DL-α-tocoferol o DL-α-tocoferol)

#### 5.6.1. Patrón de acetato de DL-α-tocoferol

##### 5.6.1.1. Preparación de la solución patrón de trabajo

Pipetear en un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (punto 4.2.1) 25 ml de la solución madre de acetato de DL-α-tocoferol (punto 3.10.1) e hidrolizar como se describe en el punto 5.2. Extraer después con éter de petróleo (punto 3.2) según el punto 5.3 y enrasar a 500 ml con éter de petróleo. Evaporar 25 ml de este extracto casi hasta sequedad en el rotavapor (véase el punto 5.4), eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (punto 3.9) y volver a disolver el residuo en 25,0 ml de metanol (punto 3.3). La concentración nominal de esta solución es de 45,5 µg de DL-α-tocoferol por mililitro, equivalente a 50 µg de acetato de DL-α-tocoferol por mililitro. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

##### 5.6.1.2. Preparación de las soluciones de calibración y de la curva de calibración

Transvasar 1,0, 2,0, 4,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (punto 3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,5, 5,0, 10,0 y 25,0 µg/ml de acetato de DL-α-tocoferol, es decir, 2,28, 4,55, 9,10 y 22,8 µg/ml de DL-α-tocoferol.

Inyectar varias veces 20 µl de cada solución de calibración y determinar las alturas (áreas) medias de pico. Utilizar las alturas (áreas) medias de pico para trazar una curva de calibración.

##### 5.6.1.3. Normalización UV de la solución madre de acetato de DL-α-tocoferol (punto 3.10.1)

Diluir 5,0 ml de solución madre de acetato de DL-α-tocoferol (punto 3.10.1) con etanol hasta un volumen de 25,0 ml y medir en el espectrofotómetro (punto 4.6) entre 250 nm y 320 nm el espectro de UV de esta solución frente al etanol (punto 3.1).

El máximo de absorción será a 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ a } 284 \text{ nm en etanol}$$

Con esta dilución debe obtenerse un valor de extinción de 0,84 a 0,88.

#### 5.6.2. Patrón de DL-α-tocoferol

##### 5.6.2.1. Preparación de la solución patrón de trabajo

Pipetear 2 ml de la solución madre de DL-α-tocoferol (punto 3.11.1) a un matraz aforado de 50 ml, disolver en metanol (punto 3.3) y enrasar con metanol. La concentración nominal de esta solución es de 40 µg de DL-α-tocoferol por mililitro, equivalente a 44,0 µg de acetato de DL-α-tocoferol por mililitro. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

#### 5.6.2.2. Preparación de las soluciones de calibración y de la curva de calibración

Transvasar 1,0, 2,0, 4,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (punto 3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,0, 4,0, 8,0 y 20,0 µg/ml de DL-α-tocoferol, es decir, 2,20, 4,40, 8,79 y 22,0 µg/ml de acetato de DL-α-tocoferol.

Inyectar varias veces 20 µl de cada solución de calibración y determinar las alturas (áreas) medias de pico. Utilizar las alturas (áreas) medias de pico para trazar una curva de calibración.

#### 5.6.2.3. Normalización UV de la solución madre de DL-α-tocoferol (punto 3.11.1)

Diluir 2,0 ml de solución madre de DL-α-tocoferol (punto 3.11.1) con etanol hasta un volumen de 25,0 ml y medir en el espectrofotómetro (punto 4.6) entre 250 nm y 320 nm el espectro de UV de esta solución frente al etanol (punto 3.1). El máximo de absorción será a 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ a } 292 \text{ nm en etanol}$$

Con esta dilución debe obtenerse un valor de extinción de 0,6.

### 6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de vitamina E de la solución de muestra, determinar la concentración de esta última en µg/ml (calculada en acetato de DL/α-tocoferol) tomando como referencia la curva de calibración (punto 5.6.1.2 o 5.6.2.2).

El contenido w de vitamina E de la muestra, en mg/kg, viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

- c: = concentración de vitamina E (en acetato de DL-α-tocoferol) de la solución de muestra (punto 5.4), (µg/ml)
- V<sub>1</sub>: = volumen de la solución de muestra (punto 5.4), (ml)
- V<sub>2</sub>: = volumen de la alícuota tomada en el punto 5.4, (ml)
- m = peso de la porción de ensayo, (g)

### 7. Observaciones

- 7.1. En caso de muestras con baja concentración de vitamina E puede ser útil combinar los extractos de éter de petróleo de dos cargas de saponificación (cantidad pesada: 25 g) en una única solución de muestra para la determinación por HPLC.
- 7.2. La muestra tomada para el análisis no contendrá en peso más de 2 g de grasa.
- 7.3. Si no se produce la separación de las fases, añadir unos 10 ml de etanol (punto 3.1) para romper la emulsión.
- 7.4. Tras la medición espectrofotométrica de la solución de acetato de DL-α-tocoferol o de la solución de DL-α-tocoferol conforme al punto 5.6.1.3 o 5.6.2.3, respectivamente, añadir unos 10 mg de BHT (punto 3.12) a la solución (punto 3.10.1 o 3.10.2) y guardarla en el frigorífico (período máximo de conservación: cuatro semanas).
- 7.5. Puede utilizarse hidroquinona en lugar de BHT.
- 7.6. Con una columna de fase normal se pueden separar el α-tocoferol, el β-tocoferol, el γ-tocoferol y el δ-tocoferol.

- 7.7. En lugar de la solución de ascorbato de sodio pueden utilizarse unos 150 mg de ácido ascórbico.
- 7.8. En lugar de la solución de sulfuro de sodio pueden utilizarse unos 50 mg de EDTA.
- 7.9. El acetato de vitamina E se hidroliza muy deprisa en condiciones alcalinas y, por tanto, es muy sensible a la oxidación, especialmente en presencia de oligoelementos como el hierro o el cobre. La vitamina E puede degradarse si se determina en premezclas a niveles superiores a 5 000 mg/kg. Por consiguiente, se recomienda confirmar los resultados mediante una HPLC que incluya la digestión enzimática de la formulación de vitamina E, sin la fase de saponificación alcalina.
8. Repetibilidad  
La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe superar el 15 % del resultado más elevado.
9. **Resultados de un estudio colaborativo** <sup>(4)</sup>

	Premezcla	Pienso de premezcla	Concentrado de minerales	Pienso proteínico	Alimento para lechones
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
media [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: número de laboratorios

n: número de valores individuales

s<sub>r</sub>: desviación típica de la repetibilidad

S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad

r: repetibilidad

R: reproducibilidad

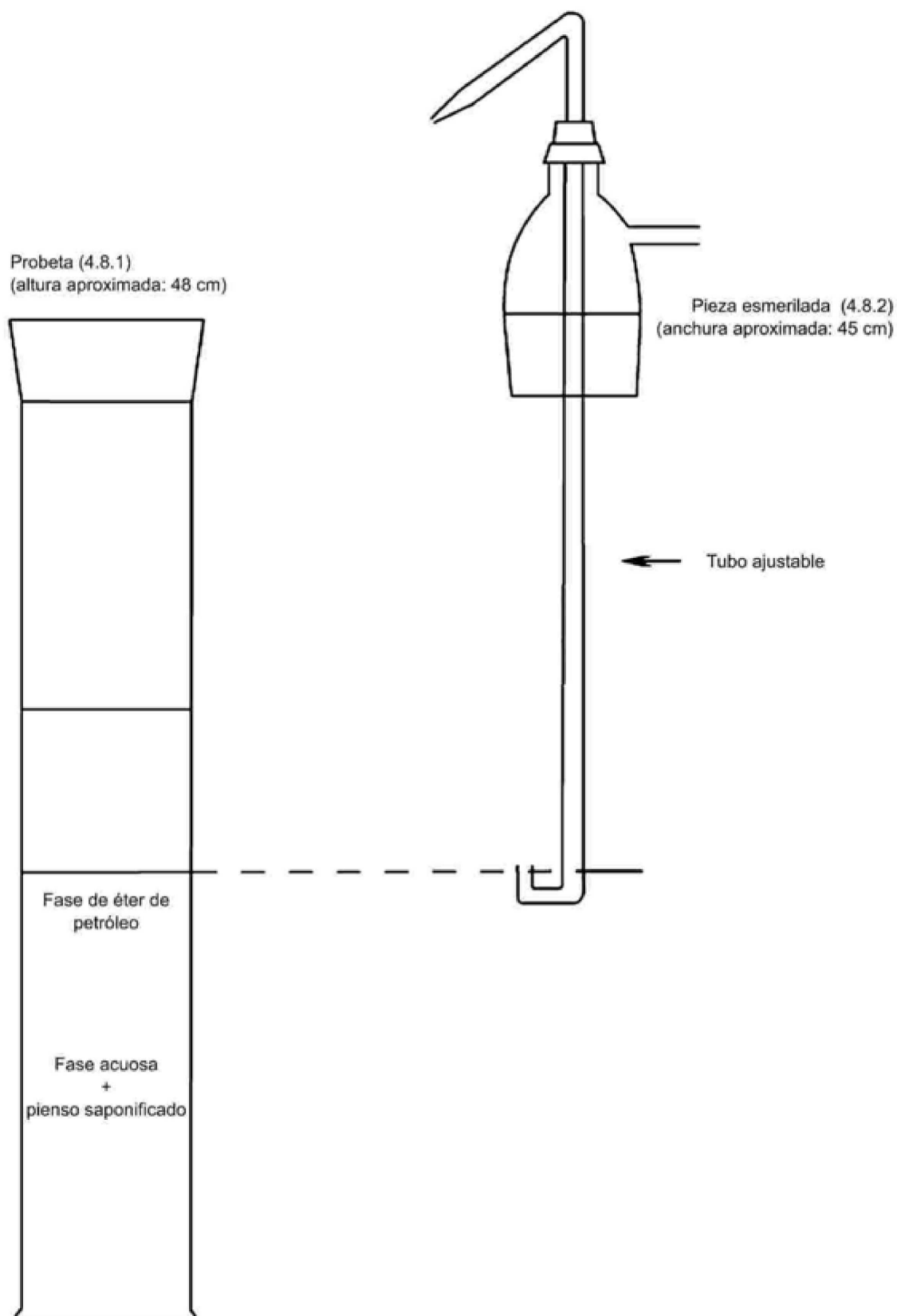
CV<sub>r</sub>: coeficiente de variación de la repetibilidad

CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad

<sup>(4)</sup> Realizado por el Grupo de Trabajo sobre Piensos de la Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figura 2

## Aparato de extracción (punto 4.8)



## C. DETERMINACIÓN DE LOS OLIGOELEMENTOS HIERRO, COBRE, MANGANESO Y ZINC

El contenido de hierro, cobre, manganeso y zinc se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 15510: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del contenido de calcio, sodio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc, cobre, manganeso, cobalto, molibdeno y plomo por ICP-AES, o
- el método de análisis detallado en EN 15621: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del calcio, sodio, fósforo, magnesio, potasio, azufre, hierro, zinc, cobre, manganeso y cobalto tras digestión bajo presión mediante ICP-AES, o
- el método de análisis detallado en EN 17053: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de elementos traza, metales pesados y otros elementos en los alimentos para animales por ICP-MS (multimétodo), o
- el método de análisis detallado en EN ISO 6869: Alimentos para animales. Determinación del contenido de calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc. Método por espectrometría de absorción atómica, o
- el método de espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), tal como se describe en los puntos 1 a 8 siguientes.

### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar los oligoelementos hierro, cobre, manganeso y zinc en los piensos <sup>(5)</sup>. Los límites de cuantificación son:

- hierro (Fe): 20 mg/kg,
- cobre (Cu): 10 mg/kg,
- manganeso (Mn): 20 mg/kg,
- zinc (Zn): 20 mg/kg.

### 2. Principio

Tras destruir la posible materia orgánica, la muestra se disuelve en ácido clorhídrico. Los oligoelementos hierro, cobre, manganeso y zinc se determinan, tras la dilución apropiada, por espectrometría de absorción atómica.

### 3. Reactivos

#### *Observaciones preliminares*

Para preparar los reactivos y las soluciones analíticas, utilizar agua exenta de los cationes por determinar, obtenida bien por doble destilación en un frasco de vidrio borosilicato o un alambique de cuarzo, bien por tratamiento doble en resina de intercambio iónico.

Los reactivos deben ser al menos de calidad analítica. La ausencia del elemento por determinar debe comprobarse en un ensayo en blanco. Si es necesario, los reactivos deben someterse a una purificación más profunda.

Las soluciones patrón descritas a continuación pueden sustituirse por soluciones patrón comerciales, siempre que estén garantizadas y se hayan comprobado antes de ser utilizadas.

- 3.1. Ácido clorhídrico (d: 1,19 g/ml).
- 3.2. Ácido clorhídrico (6 mol/l).
- 3.3. Ácido clorhídrico (0,5 mol/l).
- 3.4. Ácido fluorhídrico del 38 % al 40 % (v/v), con un contenido de hierro inferior a 1 mg/l y cuyo residuo de evaporación sea inferior a 10 mg (expresado en sulfatos)/l.

<sup>(5)</sup> Este método ha sido validado mediante un ensayo colaborativo para diversas matrices de piensos. Si desea información adicional, consulte [https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation\\_en?prefLang=es](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=es).

- 3.5. Ácido sulfúrico (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Peróxido de hidrógeno, a 100 vol. aproximadamente de oxígeno (30 % en peso).
- 3.7. Solución patrón de hierro (1 000 µg Fe/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente: disolver 1 g de alambre de hierro en 200 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2), añadir 16 ml de peróxido de hidrógeno (punto 3.6) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.7.1. Solución patrón de hierro de trabajo (100 µg Fe/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (punto 3.7) con nueve partes de agua.
- 3.8. Solución patrón de cobre (1 000 µg Cu/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente:
- disolver 1 g de cobre en polvo en 25 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2), añadir 5 ml de peróxido de hidrógeno (punto 3.6) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.8.1. Solución patrón de cobre de trabajo (10 µg Cu/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (punto 3.8) con nueve partes de agua, y diluyendo a continuación una parte de la solución resultante con nueve partes de agua.
- 3.9. Solución patrón de manganeso (1 000 µg Mn/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente:
- disolver 1 g de manganeso en polvo en 25 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.9.1. Solución patrón de manganeso de trabajo (10 µg Mn/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (punto 3.9) con nueve partes de agua, y diluyendo a continuación una parte de la solución resultante con nueve partes de agua.
- 3.10. Solución patrón de zinc (1 000 µg Zn/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente:
- disolver 1 g de zinc en tira o en hoja en 25 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.10.1. Solución patrón de zinc de trabajo (10 µg Zn/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (punto 3.10) con nueve partes de agua, y diluyendo a continuación una parte de la solución resultante con nueve partes de agua.
- 3.11. Solución de cloruro de lantano: disolver 12 g de óxido de lantano en 150 ml de agua, añadir 100 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2) y enrasar a 1 l con agua.

#### 4. Instrumental

- 4.1. Horno de mufla de temperatura regulable y, preferiblemente, con registrador.
- 4.2. El material de vidrio debe ser de borosilicato resistente, y se recomienda utilizar un instrumental que esté reservado exclusivamente a la determinación de oligoelementos.
- 4.3. Espectrofotómetro de absorción atómica que responda a las exigencias del método en cuanto a sensibilidad y precisión en el intervalo requerido.



## 5. Procedimiento <sup>(6)</sup>

### 5.1. Muestras que contienen materia orgánica

#### 5.1.1. Incineración y preparación de la solución para análisis <sup>(7)</sup>

- 5.1.1.1. Colocar de 5 g a 10 g de la muestra, pesados con una precisión de 0,2 mg, en un crisol de cuarzo o de platino [véase la nota b)], secar en una estufa a 105 °C e introducir el crisol en el horno de mufla (punto 4.1) frío. Cerrar el horno [véase la nota c)] y elevar progresivamente su temperatura para alcanzar de 450 °C a 475 °C en 90 minutos aproximadamente. Mantener dicha temperatura entre 4 horas y 16 horas (por ejemplo, durante la noche) para eliminar el material carbonoso, abrir a continuación el horno y dejar enfriar [véase la nota d)].

Humedecer las cenizas con agua e introducir las en un vaso de precipitado de 250 ml. Lavar el crisol con no más de 5 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1) y añadir este último lentamente y con precaución al vaso de precipitado (puede producirse una fuerte reacción debido a la formación de CO<sub>2</sub>). Añadir gota a gota, agitando, ácido clorhídrico (punto 3.1) hasta que cese la efervescencia. Evaporar hasta sequedad, removiendo de vez en cuando con una varilla de vidrio.

A continuación, añadir al residuo 15 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2), y luego unos 120 ml de agua. Remover con la varilla de vidrio, que deberá dejarse en el vaso de precipitado, y cubrir este con un vidrio de reloj. Llevar suavemente a ebullición y mantener en el punto de ebullición hasta que aparentemente ya no se disuelvan las cenizas. Filtrar en un papel de filtro exento de 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 de 6 mol/l (punto 3.2) caliente y dos veces con agua hirviendo. Enrasar el matraz aforado con agua (concentración de HCl: 0,5 mol/l aproximadamente).

- 5.1.1.2. Si el residuo que queda en el filtro es negro (carbón), volver a introducirlo en el horno y a incinerarlo a una temperatura de 450 °C a 475 °C. Esta incineración, que solo requiere unas horas (de tres a cinco horas, aproximadamente), se termina cuando la ceniza tiene un aspecto blanco o casi blanco. Disolver el residuo con unos 2 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1), evaporar hasta sequedad y añadir 5 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2). Calentar, filtrar la solución en el matraz aforado y enrasar con agua (concentración de HCl: 0,5 mol/l, aproximadamente).

#### Notas:

- a) Al determinar los oligoelementos, es importante estar alerta ante los riesgos de contaminación, en particular por el zinc, el cobre y el hierro. Por consiguiente, el equipo utilizado para preparar las muestras no debe contener estos metales.

Para reducir el riesgo general de contaminación, trabajar en atmósfera sin polvo con un equipo escrupulosamente limpio y material de vidrio cuidadosamente lavado. La determinación del zinc es especialmente sensible a muchos tipos de contaminación, por ejemplo, la producida por el material de vidrio, los reactivos, el polvo, etc.

- b) El peso de la muestra que va a incinerarse se calcula partiendo del contenido aproximado de oligoelementos del pienso en relación con la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. Para determinados piensos pobres en oligoelementos, quizá sea necesario comenzar con una muestra de 10 g a 20 g y enrasar la solución final tan solo a 100 ml.
- c) La incineración debe efectuarse en un horno cerrado sin inyección de aire ni de oxígeno.
- d) La temperatura indicada por el pirómetro no debe superar los 475 °C.

<sup>(6)</sup> Pueden emplearse otros métodos de digestión, siempre que se haya demostrado que ofrecen resultados similares (por ejemplo, digestión a presión por microondas).

<sup>(7)</sup> El forraje verde (fresco o desecado) puede contener grandes cantidades de sílice vegetal, que puede retener oligoelementos y debe eliminarse. Por tanto, con las muestras de estos piensos debe aplicarse el procedimiento modificado que sigue. Efectuar la operación del punto 5.1.1.1, hasta la filtración. Lavar el papel de filtro que contiene el residuo insoluble dos veces con agua hirviendo e introducirlo en un crisol de cuarzo o platino.

Calcinar en el horno de mufla (punto 4.1) a una temperatura por debajo de 550 °C hasta que haya desaparecido por completo todo el material carbonoso. Dejar enfriar, añadir unas pocas gotas de agua y, a continuación, de 10 ml a 15 ml de ácido fluorhídrico (punto 3.4), evaporando después hasta sequedad a unos 150 °C. Si el residuo sigue conteniendo sílice, volver a disolverlo en unos pocos mililitros de ácido fluorhídrico (punto 3.4) y evaporar hasta sequedad. Añadir cinco gotas de ácido sulfúrico (punto 3.5) y calentar hasta que dejen de desprenderse vapores. Tras añadir 5 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (punto 3.2) y unos 30 ml de agua, calentar, filtrar la solución en el matraz aforado de 250 ml y enrasar con agua (concentración de HCl: 0,5 mol/l aproximadamente). Proseguir entonces con la determinación a partir del punto 5.1.2.

## 5.1.2. Determinación espectrofotométrica

## 5.1.2.1. Preparación de las soluciones de calibración

Preparar, para cada elemento por determinar, una gama de soluciones de calibración a partir de las soluciones patrón de trabajo de los puntos 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 y 3.10.1, de forma que cada solución de calibración tenga una concentración de HCl de 0,5 mol/l aproximadamente y (en el caso del hierro, del manganeso y del zinc) una concentración de cloruro de lantano equivalente a 0,1 % La (p/v).

Las concentraciones escogidas de oligoelementos deben encontrarse en el intervalo de sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. Los cuadros siguientes muestran, a título de ejemplo, las composiciones de intervalos típicos de soluciones de calibración; sin embargo, en función del tipo y la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado, puede ser necesario escoger otras concentraciones.

**Hierro**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de solución patrón de trabajo (punto 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de HCl (punto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (punto 3.11) y enrasar a 100 ml con agua

**Cobre**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solución patrón de trabajo (punto 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml de HCl (punto 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

**Manganeso**

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solución patrón de trabajo (punto 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml de HCl (punto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (punto 3.11) y enrasar a 100 ml con agua

**Zinc**

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

añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (punto 3.11) y enrasar a 100 ml con agua

## 5.1.2.2. Preparación de la solución para el análisis

Para la determinación del cobre, la solución preparada según el punto 5.1.1 puede, en general, utilizarse directamente. Si es necesario ajustar su concentración al intervalo de las soluciones de calibración, puede pipetarse una alícuota a un matraz aforado de 100 ml, enrasando a continuación con ácido clorhídrico de 0,5 mol/l (punto 3.3).

Para la determinación del hierro, el manganeso y el zinc, pipetear una alícuota de la solución preparada según el punto 5.1.1 a un matraz aforado de 100 ml, añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (punto 3.11) y enrasar con ácido clorhídrico de 0,5 mol/l (punto 3.3) (véase también la observación del punto 8).

#### 5.1.2.3. Experimento en blanco

El experimento en blanco debe incluir todas las etapas prescritas del procedimiento, pero omitiendo el material de muestra. La solución de calibración "0" no debe utilizarse como blanco.

#### 5.1.2.4. Medición de la absorción atómica

Medir la absorción atómica de las soluciones de calibración y de la solución objeto de análisis utilizando una llama oxidante aire-acetileno con las siguientes longitudes de onda:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Realizar cuatro veces cada medición.

#### 5.2. Piensos minerales

Si la muestra no contiene materia orgánica, no es necesaria la incineración previa. Proceder como se describe en el punto 5.1.1.1, comenzando a partir del párrafo segundo. Puede omitirse la evaporación con ácido fluorhídrico.

### 6. Cálculo de los resultados

Mediante una curva de calibración, calcular la concentración de oligoelementos de la solución objeto de análisis y expresar el resultado en miligramos de oligoelemento por kilogramo de muestra (ppm).

### 7. Repetibilidad

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

- los 5 mg/kg en valor absoluto, para los contenidos respectivos en oligoelementos hasta 50 mg/kg;
- el 10 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 50 mg/kg y hasta 100 mg/kg;
- los 10 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos superiores a 100 mg/kg y hasta 200 mg/kg;
- el 5 % del resultado superior, en el caso de que el contenido del oligoelemento en cuestión supere los 200 mg/kg.

### 8. Observación

La presencia de grandes cantidades de fosfatos puede interferir en la determinación del hierro, el manganeso y el zinc. Tal interferencia debe corregirse añadiendo solución de cloruro de lantano (punto 3.11). Si, de todas formas, la relación de peso Ca + Mg/P de la muestra es  $> 2$ , no es necesario añadir solución de cloruro de lantano (punto 3.11) a la solución objeto de análisis ni a las soluciones de calibración.

## D. DETERMINACIÓN DE LA HALOFUGINONA

*Bromhidrato de DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]quinazolin-4-(3H)-ona*

El contenido de halofuginona se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un detector de UV, tal como se describe en los puntos 1 a 8 siguientes.

### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de halofuginona en los piensos. El límite de cuantificación es de 1 mg/kg.

### 2. Principio

Tras tratamiento con agua caliente, la halofuginona se extrae como base libre en acetato de etilo y posteriormente se somete a separación como clorhidrato en una solución ácida acuosa. El extracto se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico. El contenido de halofuginona se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa, empleando un detector de UV.

### 3. Reactivos

- 3.1. Acetonitrilo, equivalente al de grado HPLC.
- 3.2. Resina Amberlite XAD-2.
- 3.3. Acetato de amonio.
- 3.4. Acetato de etilo.
- 3.5. Ácido acético glacial.
- 3.6. Halofuginona patrón (bromhidrato de DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]-quinazolin-4-(3H)-ona, E 764).
  - 3.6.1. Solución patrón madre de halofuginona (100 mg/ml)

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de halofuginona (punto 3.6) en un matraz aforado de 500 ml, disolver en solución tampón de acetato de amonio (punto 3.18), enrasar con la solución tampón y mezclar. Esta solución, almacenada en la oscuridad y a 5 °C, se mantiene estable durante tres semanas.
  - 3.6.2. Soluciones de calibración

Transvasar 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 6,0 ml de la solución patrón madre (punto 3.6.1) a una serie de matraces aforados de 100 ml. Enrasar con fase móvil (punto 3.21) y mezclar. Estas soluciones tienen concentraciones de halofuginona de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 6,0 µg/ml respectivamente. Deben prepararse poco antes de utilizarse.
- 3.7. Ácido clorhídrico ( $\rho_{20} = 1,16$  g/ml aproximadamente).
- 3.8. Metanol.
- 3.9. Nitrato de plata.
- 3.10. Ascorbato de sodio.
- 3.11. Carbonato de sodio.
- 3.12. Cloruro de sodio.

- 3.13. EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica).
- 3.14. Agua, equivalente a la de grado HPLC.
- 3.15. Solución de carbonato de sodio,  $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ .
- 3.16. Solución de carbonato de sodio saturada de cloruro de sodio,  $c = 5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ :  
disolver 50 g de carbonato de sodio (punto 3.11) en agua, diluir hasta 1 l y añadir cloruro de sodio (punto 3.12) hasta que la solución esté saturada.
- 3.17. Ácido clorhídrico, 0,1 mol/l aproximadamente:  
diluir 10 ml de HCl (punto 3.7) con agua, hasta 1 l.
- 3.18. Solución tampón de acetato de amonio de aproximadamente 0,25 mol/l:  
disolver 19,3 g de acetato de amonio (punto 3.3) y 30 ml de ácido acético (punto 3.5) en agua (punto 3.14) y diluir hasta 1 l.
- 3.19. Preparación de resina Amberlite XAD-2.  
Lavar una cantidad adecuada de resina Amberlite (punto 3.2) con agua hasta que se hayan eliminado todos los iones cloruro, lo cual se comprobará mediante una prueba con nitrato de plata (punto 3.20) en la fase acuosa desechada. A continuación, lavar la resina con 50 ml de metanol (punto 3.8), desechar el metanol y guardar la resina bajo metanol nuevo.
- 3.20. Solución de nitrato de plata, 0,1 mol/l aproximadamente:  
disolver 0,17 g de nitrato de plata (punto 3.9) en 10 ml de agua.
- 3.21. Fase móvil HPLC:  
mezclar 500 ml de acetonitrilo (punto 3.1) con 300 ml de solución tampón de acetato de amonio (punto 3.18) y 1 200 ml de agua (punto 3.14); ajustar el pH a 4,3 con ácido acético (punto 3.5); filtrar con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (punto 4.8) y degasificar la solución (por ejemplo, aplicando ultrasonidos durante diez minutos); esta solución, almacenada en la oscuridad y en un recipiente cerrado, es estable durante un mes.

#### 4. Instrumental

- 4.1. Baño ultrasónico.
- 4.2. Rotavapor de película.
- 4.3. Centrífuga.
- 4.4. Equipo de HPLC con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos.
- 4.4.1. Columna de cromatografía líquida, de 300 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$ , relleno de 10  $\mu\text{m}$ , o equivalente.
- 4.5. Columna de vidrio (300 mm  $\times$  10 mm) provista de filtro de vidrio sinterizado y llave de cierre.
- 4.6. Filtros de fibra de vidrio de 150 mm de diámetro.
- 4.7. Filtros de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 4.8. Filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 5. Procedimiento

*Nota:* La halofuginona como base libre es inestable en soluciones alcalinas y de acetato de etilo. No deberá permanecer en acetato de etilo durante más de 30 minutos.

##### 5.1. Generalidades

- 5.1.1. Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de halofuginona y de sustancias interferentes.

- 5.1.2. Asimismo, deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de halofuginona similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 3 mg/kg, añadir 300 µl de la solución patrón madre (punto 3.6.1) a 10 g del pienso en blanco, mezclar y esperar diez minutos antes de proceder a la extracción (punto 5.2).

*Nota:* A los efectos de este método, el pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse halofuginona.

## 5.2. Extracción

Pesar, con una precisión de 0,1 g, 10 g de la muestra preparada en un tubo de centrifuga de 200 ml, añadir 0,5 g de ascorbato de sodio (punto 3.10), 0,5 g de EDTA (punto 3.13) y 20 ml de agua, y mezclar. Colocar el tubo en un baño de agua a 80 °C durante 5 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, añadir 20 ml de solución de carbonato de sodio (punto 3.15) y mezclar. Añadir inmediatamente 100 ml de acetato de etilo (punto 3.4) y agitar enérgicamente a mano durante 15 segundos. Colocar después el tubo en el baño ultrasónico (punto 4.1) durante 3 minutos y aflojar el tapón. Centrifugar durante 2 minutos y decantar la fase de acetato de etilo en un embudo de decantación de 500 ml a través de un filtro de fibra de vidrio (punto 4.6). Repetir la extracción de la muestra con una segunda porción de 100 ml de acetato de etilo. Lavar los extractos combinados durante 1 minuto con 50 ml de solución de carbonato de sodio saturada de cloruro de sodio (punto 3.16) y desechar la fase acuosa.

Extraer la fase orgánica durante 1 minuto con 50 ml de ácido clorhídrico (punto 3.17). Separar la fase ácida inferior mediante un embudo de decantación de 250 ml. Extraer de nuevo la fase orgánica durante 1,5 minutos con otros 50 ml de ácido clorhídrico y combinar con el primer extracto. Lavar los extractos ácidos combinados agitando en círculos durante aproximadamente 10 segundos con 10 ml de acetato de etilo (punto 3.4).

Transvasar cuantitativamente la fase acuosa a un matraz de fondo redondo de 250 ml y desechar la fase orgánica. Evaporar todo el acetato de etilo que quede en la solución ácida empleando un rotavapor de película (punto 4.2). La temperatura del baño de agua no deberá superar los 40 °C. A una presión de vacío de unos 25 mbar se elimina todo el acetato de etilo residual en 5 minutos a 38 °C.

## 5.3. Limpieza

### 5.3.1. Preparación de la columna de Amberlite

Preparar una columna de XAD-2 para cada extracto de muestra. Pasar 10 g de resina Amberlite preparada (punto 3.19) a una columna de vidrio (punto 4.5) con metanol (punto 3.8). Poner un trozo pequeño de lana de vidrio encima del lecho de resina. Dejar salir el metanol de la columna y lavar la resina con 100 ml de agua, cortando el flujo cuando el líquido alcance la parte superior del lecho de resina. Antes de utilizarla, dejar que la columna se equilibre durante 10 minutos. No dejar nunca que se seque.

### 5.3.2. Limpieza de la muestra

Transferir el extracto (punto 5.2) cuantitativamente a la parte superior de la columna de resina Amberlite preparada (punto 5.3.1) y eluir, desechando el eluido. La velocidad de elución no debe exceder de 20 ml/min. Enjuagar el matraz de fondo redondo con 20 ml de ácido clorhídrico (punto 3.17) y emplear este líquido para lavar la columna de resina. Eliminar todo resto de solución ácida con un chorro de aire. Desechar los líquidos de lavado. Añadir 100 ml de metanol (punto 3.8) a la columna y dejar eluir de 5 a 10 ml; recoger el eluido en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Dejar que el metanol restante se equilibre durante 10 minutos con la resina y continuar con la elución a una velocidad que no supere los 20 ml/min; recoger el eluido en el mismo matraz de fondo redondo. Evaporar el metanol en el rotavapor de película (punto 4.2) sin que la temperatura del baño maría sobrepase los 40 °C. Transferir cuantitativamente el residuo a un matraz aforado de 10 ml empleando la fase móvil (punto 3.21). Enrasar con fase móvil y mezclar. Filtrar una alícuota a través de un filtro de membrana (punto 4.7). Reservar esta solución para la determinación por HPLC (punto 5.4).

## 5.4. Determinación mediante HPLC

### 5.4.1. Parámetros

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna de cromatografía líquida (punto 4.4.1)

Fase móvil para la HPLC (punto 3.21)

Caudal: 1,5 ml/min – 2 ml/min

Longitud de onda de detección: 243 nm

Volumen de inyección: 40 µl – 100 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (punto 3.6.2) con 3,0 µg/ml, hasta obtener alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

#### 5.4.2. Curva de calibración

Inyectar varias veces cada solución de calibración (punto 3.6.2) y medir las alturas (áreas) de pico para cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas o áreas de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

#### 5.4.3. Solución de muestra

Inyectar varias veces el extracto de muestra (punto 5.3.2) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de halofuginona.

### 6. Cálculo de los resultados

Determinar la concentración de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de sus picos de halofuginona, tomando como referencia la curva de calibración (punto 5.4.2).

El contenido de halofuginona  $w$  (mg/kg) de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

donde:

$c$ : concentración de halofuginona de la solución de muestra, en microgramos por mililitro

$m$ : peso de la porción de ensayo, en gramos

### 7. Validación de los resultados

#### 7.1. Identidad

La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía o mediante un detector de red de diodos que permita comparar los espectros del extracto de la muestra y de la solución de calibración (punto 3.6.2) con 6,0 µg/ml.

##### 7.1.1. Cocromatografía

Enriquecer un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (punto 3.6.2). La cantidad de halofuginona añadida debe ser similar a la cantidad estimada de halofuginona hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de halofuginona deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, debe ser igual  $\pm 10\%$  a la anchura original.

##### 7.1.2. Detección por red de diodos

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en  $\pm 2$  nm;

- b) entre 225 nm y 300 nm, los espectros de la muestra y del 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; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- c) entre 225 nm y 300 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de la muestra no deben ser diferentes entre sí en las partes del espectro situadas entre el 10 % y el 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice;

si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

### 7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas llevadas a cabo con la misma muestra no debe superar los 0,5 mg/kg para contenidos de halofuginona de hasta 3 mg/kg.

### 7.3. Recuperación

La recuperación de la muestra en blanco enriquecida deberá ser al menos del 80 %.

## 8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo (\*) en el que ocho laboratorios analizaron tres muestras.

### Resultados

	Muestra A (blanco) A la recepción	Muestra B (sémola)		Muestra C (gránulos)	
		A la recepción	Tras dos meses	A la recepción	Tras dos meses
Media [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S <sub>R</sub> [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV <sub>R</sub> [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ND: no detectado

S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad

CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad (%)

Rec.: recuperación (%)

## E. DETERMINACIÓN DE LA ROBENIDINA

### Clorhidrato de 1,3-bis[(4-clorobenciliden)amino]guanidina

El contenido de robenidina se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 % al 3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un detector de UV, tal como se describe en los puntos 1 a 8 siguientes.

(\*) *The Analyst* 108, 1983, pp. 1252-1256.



## 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de robenidina en los piensos. El límite de cuantificación es de 5 mg/kg.

## 2. Principio

La muestra se extrae con metanol acidificado. El extracto se deseca y una alícuota se limpia en una columna de óxido de aluminio. La robenidina se eluye de la columna con metanol, se concentra y se enrasa a un volumen adecuado con fase móvil. El contenido de robenidina se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa, empleando un detector de UV.

## 3. Reactivos

### 3.1. Metanol.

### 3.2. Metanol acidificado:

transvasar 4,0 ml de ácido clorhídrico ( $\rho_{20} = 1,18$  g/ml) a un matraz aforado de 500 ml, enrasar con metanol (punto 3.1) y mezclar; esta solución deberá prepararse poco antes de utilizarse.

### 3.3. Acetonitrilo, equivalente al de grado HPLC.

### 3.4. Tamiz molecular:

tipo 3A, perlas de malla de 8 a 12 (perlas de entre 1,6 mm y 2,5 mm, aluminosilicato cristalino, poros de 0,3 mm de diámetro).

### 3.5. Óxido de aluminio de actividad ácida de grado I para cromatografía en columna:

transferir 100 g de óxido de aluminio a un recipiente apropiado y añadir 2,0 ml de agua; tapar y agitar durante 20 minutos aproximadamente; almacenar en un recipiente bien cerrado.

### 3.6. Solución de dihidrógenofosfato de potasio, $c = 0,025$ mol/l:

disolver 3,40 g de dihidrogenofosfato de potasio en agua (de grado HPLC) en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar y mezclar.

### 3.7. Solución de hidrógenofosfato de disodio, $c = 0,025$ mol/l:

disolver 3,55 g de hidrogenofosfato de disodio anhidro (o 4,45 g de dihidrato u 8,95 g de dodecahidrato) en agua (equivalente a la de grado HPLC) en un matraz aforado de 1 l, enrasar y mezclar.

### 3.8. Fase móvil HPLC.

Mezclar los reactivos siguientes:

650 ml de acetonitrilo (punto 3.3),

250 ml de agua (equivalente a la de grado HPLC),

50 ml de solución de dihidrogenofosfato de potasio (punto 3.6),

50 ml de solución de hidrogenofosfato de disodio (punto 3.7).

Filtrar por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (punto 4.6) y desgasificar la solución (por ejemplo, aplicando ultrasonidos durante 10 minutos).

### 3.9. Sustancia patrón.

Robenidina pura: clorhidrato de 1,3-bis[(4-clorobenciliden)amino]guanidina.

#### 3.9.1. Solución patrón madre de robenidina: 300 $\mu\text{g/ml}$ :

pesar, con una precisión de 0,1 mg, 30 mg de sustancia patrón de robenidina (punto 3.9); disolver en metanol acidificado (punto 3.2) en un matraz aforado de 100 ml, enrasar con el mismo disolvente y mezclar; envolver el matraz con papel de aluminio y guardar al abrigo de la luz.

- 3.9.2. Solución patrón intermedia de robenidina: 12 µg/ml:  
transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (punto 3.9.1) a un matraz aforado de 250 ml, enrasar con la fase móvil (punto 3.8) y mezclar; envolver el matraz con papel de aluminio y guardar al abrigo de la luz.
- 3.9.3. Soluciones de calibración:  
transvasar 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 y 25,0 ml de la solución patrón intermedia (punto 3.9.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml; enrasar con fase móvil (punto 3.8) y mezclar; estas soluciones corresponden, respectivamente, a 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 y 6,0 mg/ml de robenidina; deben prepararse poco antes de utilizarse.
- 3.10. Agua, equivalente a la de grado HPLC.

#### 4. Instrumental

- 4.1. Columna de vidrio.  
Columna de vidrio ámbar provista de llave de cierre y de un depósito de aproximadamente 150 ml de capacidad, con un diámetro interior de 10 mm a 15 mm y una longitud de 250 mm.
- 4.2. Agitador mecánico o magnético.
- 4.3. Rotavapor de película.
- 4.4. Equipo de HPLC con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos que funcione en el intervalo de 250 nm a 400 nm.
- 4.4.1. Columna de cromatografía líquida: 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, relleno de 10 µm, o equivalente.
- 4.5. Papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A o equivalente).
- 4.6. Filtros de membrana de 0,22 µm.
- 4.7. Filtros de membrana de 0,45 µm.

#### 5. Procedimiento

*Nota:* La robenidina es sensible a la luz. Deberá utilizarse material de vidrio ámbar en todas las operaciones.

##### 5.1. Generalidades

- 5.1.1. Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de robenidina y de sustancias interferentes.
- 5.1.2. Asimismo, deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco (punto 5.1.1), que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de robenidina similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 60 mg/kg, transvasar 3,0 ml de la solución patrón madre (punto 3.9.1) a un erlenmeyer de 250 ml. Evaporar la solución en una corriente de nitrógeno hasta que queden 0,5 ml, aproximadamente. Añadir 15 g del pienso en blanco, mezclar y esperar 10 minutos antes de proceder a la extracción (punto 5.2).

*Nota:* A los efectos de este método, el pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse robenidina.

##### 5.2. Extracción

Pesar, con una precisión de 0,01 g, 15 g aproximadamente de la muestra preparada. Transferirlos a un erlenmeyer de 250 ml y añadir 100,0 ml de metanol acidificado (punto 3.2), tapar y agitar durante una hora en el agitador (punto 4.2). Filtrar la solución por un papel de filtro de fibra de vidrio (punto 4.5) y recoger todo el filtrado en un erlenmeyer de 150 ml. Añadir 7,5 g de tamiz molecular (punto 3.4), tapar y agitar durante cinco minutos. Filtrar inmediatamente por un papel de filtro de fibra de vidrio. Conservar esta solución para la fase de purificación (punto 5.3).

### 5.3. Purificación

#### 5.3.1. Preparación de la columna de óxido de aluminio

Introducir un pequeño tapón de lana de vidrio en el extremo inferior de la columna de vidrio (punto 4.1) y apretarlo con una varilla de vidrio. Pesar 11,0 g del óxido de aluminio preparado (punto 3.5) y transferirlos a la columna. Durante esta fase deberá procurarse minimizar la exposición a la atmósfera. Golpear suavemente el extremo inferior de la columna cargada a fin de que se sedimente el óxido de aluminio.

#### 5.3.2. Purificación de la muestra

Pipetear a la columna 5,0 ml del extracto de muestra preparado según el punto 5.2, colocando la punta de la pipeta cerca de la pared de la columna y dejando que la solución se absorba en el óxido de aluminio. Eluir la robenidina de la columna con 100 ml de metanol (punto 3.1), manteniendo un caudal de 2 ml/min a 3 ml/min, y recoger el eluido en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Evaporar hasta sequedad la solución de metanol a presión reducida y a una temperatura de 40 °C, utilizando un rotavapor de película (punto 4.3). Disolver nuevamente el residuo en 3 ml o 4 ml de fase móvil (punto 3.8) y transvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml. Enjuagar el matraz con varias porciones de 1 ml a 2 ml de fase móvil y transvasar estos líquidos de enjuague al matraz aforado. Enrasar con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar una alícuota a través de un filtro de membrana de 0,45 µm (punto 4.7). Reservar esta solución para la determinación por HPLC (punto 5.4).

### 5.4. Determinación mediante HPLC

#### 5.4.1. Parámetros

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

columna de cromatografía líquida (punto 4.4.1),

fase móvil para la HPLC (punto 3.8),

caudal: 1,5 ml/min – 2 ml/min,

longitud de onda del detector: 317 nm,

volumen de inyección: 20 µl a 50 µl.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (punto 3.9.3) con un contenido de 3,6 µg/ml, hasta que se hayan alcanzado alturas o áreas de pico y tiempos de retención constantes.

#### 5.4.2. Curva de calibración

Inyectar varias veces cada solución de calibración (punto 3.9.3) y medir las alturas (áreas) de pico para cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas o áreas de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

#### 5.4.3. Solución de muestra

Inyectar varias veces el extracto de muestra (punto 5.3.2) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de robenidina.

## 6. Cálculo de los resultados

Determinar la concentración de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de los picos de robenidina, tomando como referencia la curva de calibración (punto 5.4.2).

El contenido de robenidina  $w$  (mg/kg) de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

donde:

c: = concentración de robenidina de la solución de muestra, en microgramos por mililitro

m: = peso de la porción de ensayo, en gramos

## 7. Validación de los resultados

### 7.1. Identidad

La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía o mediante un detector de red de diodos que permita comparar los espectros del extracto de la muestra y de la solución de calibración (punto 3.9.3) con 6 µg/ml.

#### 7.1.1. Cocromatografía

Enriquecer un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (punto 3.9.3). La cantidad de robenidina añadida debe ser similar a la cantidad estimada de robenidina hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de robenidina deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, debe ser aproximadamente el 10 % de la anchura original.

#### 7.1.2. Detección por red de diodos

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en aproximadamente 2 nm;
- entre 250 nm y 400 nm, los espectros de la muestra y del 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; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- entre 250 nm y 400 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de la muestra no deben ser diferentes entre sí en las partes del espectro situadas entre el 10 % y el 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice;

si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

### 7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas llevadas a cabo con la misma muestra no debe superar el 10 % del resultado superior en el caso de contenidos de robenidina mayores de 15 mg/kg.

### 7.3. Recuperación

La recuperación de la muestra en blanco enriquecida deberá ser al menos del 85 %.

## 8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo de la Comunidad Europea en el que doce laboratorios analizaron cuatro muestras de piensos para aves de corral y conejos, en forma de sémola o de gránulos. De cada muestra se hicieron análisis por duplicado. Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Aves de corral		Conejos	
	Sémola	Gránulos	Sémola	Gránulos
Media [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s <sub>r</sub> [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66

CV <sub>r</sub> [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S <sub>R</sub> [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV <sub>R</sub> [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Recuperación [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s<sub>r</sub>: desviación típica de la repetibilidad

CV<sub>r</sub>: coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad

CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

## F. DETERMINACIÓN DEL DICLAZURILO

(+)-4-clorofenil[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetonitrilo

El contenido de diclazurilo se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299 – Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 % al 3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un detector de UV, tal como se describe en los puntos 1 a 9 siguientes.

### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de diclazurilo en piensos compuestos y premezclas<sup>(\*)</sup>. El límite de detección es de 0,1 mg/kg; el de cuantificación, de 0,5 mg/kg. Se pueden alcanzar límites de cuantificación más bajos, pero el usuario debe validarlos.

### 2. Principio

Tras añadir un patrón interno, la muestra se extrae con metanol acidificado. En el caso de los piensos, se purifica una alícuota del extracto en un cartucho de extracción en fase sólida C<sub>18</sub>. El diclazurilo se eluye del cartucho con una mezcla de metanol acidificado y agua. Previa evaporación, el residuo se disuelve en DMF/agua. En el caso de las premezclas, el extracto se evapora y el residuo se disuelve en DMF/agua. El contenido de diclazurilo se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa y gradiente ternario, empleando un detector de UV.

### 3. Reactivos

- 3.1. Agua, equivalente a la de grado HPLC.
- 3.2. Acetato de amonio.
- 3.3. Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (TBHS).
- 3.4. Acetonitrilo, equivalente al de grado HPLC.
- 3.5. Metanol, equivalente al de grado HPLC.
- 3.6. N,N-dimetilformamida (DMF).
- 3.7. Ácido clorhídrico, ρ<sub>20</sub> = 1,19 g/ml.
- 3.8. Sustancia patrón: diclazurilo:  
(+)-4-clorofenil-[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetonitrilo de pureza garantizada.

<sup>(\*)</sup> El método también puede ser aplicable a la determinación del diclazurilo en las materias primas para piensos.

3.8.1. Solución patrón madre de diclazurilo de 500 µg/ml:

pesar, con una precisión de 0,1 mg, 25 mg de sustancia patrón de diclazurilo (punto 3.8) en un matraz aforado de 50 ml; disolver en DMF (punto 3.6), enrasar con DMF (punto 3.6) y mezclar; envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico; a una temperatura inferior o igual a 4 °C, la solución es estable durante un mes <sup>(10)</sup>.

3.8.2. Solución patrón de diclazurilo de 50 µg/ml:

transvasar 5,00 ml de la solución patrón madre (punto 3.8.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con DMF (punto 3.6) y mezclar; envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico; a una temperatura inferior o igual a 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.9. Patrón interno: 2,6-dicloro- $\alpha$ -(4-clorofenil)-4-(4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazina-2 (3H)-il)- $\alpha$ -metilbencenoacetónitrilo (metildiclazurilo).

3.9.1. Solución madre de patrón interno de 500 µg/ml:

pesar, con una precisión de 0,1 mg, 25 mg de patrón interno (punto 3.9) en un matraz aforado de 50 ml; disolver en DMF (punto 3.6), enrasar con DMF (punto 3.6) y mezclar; envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico; a una temperatura inferior o igual a 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.9.2. Solución de patrón interno de 50 µg/ml:

transvasar 5,00 ml de la solución madre del patrón interno (punto 3.9.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con DMF (punto 3.6) y mezclar; envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico; a una temperatura inferior o igual a 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.9.3. Solución de patrón interno para premezclas, p/1 000 mg/ml (p = contenido nominal de diclazurilo en la premezcla, expresado en miligramos por kilo);

pesar, con una precisión de 0,1 mg, p/10 mg de patrón interno en un matraz aforado de 100 ml, disolver en DMF (punto 3.6) en un baño ultrasónico (punto 4.7), enrasar con DMF y mezclar; envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico; a una temperatura inferior o igual a 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.10. Soluciones de calibración

3.10.1. Solución de calibración de 1 µg/ml (diclazurilo):

pipetear 1,00 ml de la solución patrón de diclazurilo (punto 3.8.2) y 2,00 ml de la solución de patrón interno (punto 3.9.2) a un matraz aforado de 50 ml; añadir 17 ml de DMF (punto 3.6), enrasar con agua (punto 3.1) y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.10.2. Solución de calibración de 2 µg/ml (diclazurilo):

pipetear 2,00 ml de la solución patrón de diclazurilo (punto 3.8.2) y 2,00 ml de la solución de patrón interno (punto 3.9.2) a un matraz aforado de 50 ml; añadir 16 ml de DMF (punto 3.6), enrasar con agua (punto 3.1) y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.10.3. Solución de calibración de 3 µg/ml (diclazurilo):

pipetear 3,00 ml de la solución patrón de diclazurilo (punto 3.8.2) y 2,00 ml de la solución de patrón interno (punto 3.9.2) a un matraz aforado de 50 ml; añadir 15 ml de DMF (punto 3.6), enrasar con agua (punto 3.1) y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

<sup>(10)</sup> Podría tener mayor estabilidad (hasta 1 año), pero el laboratorio debe confirmarlo.

3.10.4. Solución de calibración de 4 µg/ml (diclazurilo):

pipetear 4,00 ml de la solución patrón de diclazurilo (punto 3.8.2) y 2,00 ml de la solución de patrón interno (punto 3.9.2) a un matraz aforado de 50 ml; añadir 14 ml de DMF (punto 3.6), enrasar con agua (punto 3.1) y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.10.5. Solución de calibración de 5 µg/ml (diclazurilo):

pipetear 5,00 ml de la solución patrón de diclazurilo (punto 3.8.2) y 2,00 ml de la solución de patrón interno (punto 3.9.2) a un matraz aforado de 50 ml; añadir 13 ml de DMF (punto 3.6), enrasar con agua (punto 3.1) y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

*Nota:* Las soluciones de calibración (puntos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 y 3.10.5) cubren un intervalo de concentración de diclazurilo en los piensos que va de 0,5 mg/kg a 2,5 mg/kg cuando se utiliza el protocolo actual.

3.11. Cartucho de extracción en fase sólida C<sub>18</sub>, por ejemplo, Mega Bond Elut; tamaño: 20 ml, peso: 5 000 mg (preacondicionarlo siguiendo las directrices del fabricante).

3.12. Disolvente de extracción: metanol acidificado.

Pipetear 5,0 ml de ácido clorhídrico (punto 3.7) a 1 000 ml de metanol (punto 3.5) y mezclar.

3.13. Fase móvil para HPLC.

3.13.1. Eluyente A: solución de acetato de amonio e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio

Disolver 5 g de acetato de amonio (punto 3.2) y 3,4 g de TBHS (punto 3.3) en 1 000 ml de agua (punto 3.1) y mezclar.

3.13.2. Eluyente B: acetonitrilo (punto 3.4).

3.13.3. Eluyente C: metanol (punto 3.5).

#### 4. Instrumental

4.1. Agitador mecánico.

4.2. Equipo para HPLC de gradiente ternario.

4.2.1. Columna de cromatografía líquida, Hypersil ODS, relleno de 3 µm, de 100 mm × 4,6 mm, o equivalente.

4.2.2. Detector de UV de longitud de onda variable, o detector de red de diodos.

4.3. Rotavapor de película.

4.4. Filtro de membrana (por ejemplo, Nylon resistente químicamente), 0,45 µm.

4.5. Jeringa desechable, 5 ml.

4.6. Colector de vacío.

4.7. Baño ultrasónico.

#### 5. Procedimiento

5.1. Generalidades

5.1.1. Pienso en blanco

Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de diclazurilo y de sustancias interferentes. El pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse diclazurilo ni sustancias interferentes.

### 5.1.2. Ensayo de recuperación

Deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de diclazurilo similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 1 mg/kg, añadir 0,1 ml de la solución patrón madre (punto 3.8.1) a 50 g del pienso en blanco, mezclar completamente y esperar 10 minutos, volviendo a mezclar varias veces antes de proceder a la extracción (punto 5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), también puede realizarse un ensayo de recuperación por el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de diclazurilo similar a la que ya esté presente en ella. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación puede calcularse por sustracción.

## 5.2. Extracción

### 5.2.1. Piensos compuestos

Pesar, con una precisión de 0,01 g, unos 50 g de la muestra. Pasarlos a un erlenmeyer de 500 ml, añadir 1,00 ml de solución de patrón interno (punto 3.9.2) y 200 ml de disolvente de extracción (punto 3.12) y tapar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (punto 4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante diez minutos. Transvasar una alícuota de 20 ml del sobrenadante a un recipiente de vidrio adecuado y diluir con 20 ml de agua (punto 3.1). Transvasar esta solución a un cartucho de extracción (punto 3.11) y pasarla a su través aplicando vacío (punto 4.6). Lavar el cartucho con 25 ml de una mezcla de disolvente de extracción (punto 3.12) y agua (punto 3.1), 65 + 35 (V + V). Desechar las fracciones recogidas y eluir los compuestos con 25 ml de una mezcla de disolvente de extracción (punto 3.12) y agua, 80 + 20 (V + V). Evaporar esta fracción hasta llegar justo a la sequedad mediante el rotavapor (punto 4.3) a 60 °C. Disolver el residuo en 1,0 ml de DMF (punto 3.6), añadir 1,5 ml de agua (punto 3.1) y mezclar. Filtrar a través de un filtro de membrana (punto 4.4) montado en una jeringa desechable (punto 4.5). Proceder a la determinación mediante HPLC (punto 5.3).

### 5.2.2. Premezclas

Pesar, con una precisión de 0,001 g, aproximadamente 1 g de la muestra. Pasarlo a un erlenmeyer de 500 ml, añadir 1,00 ml de solución de patrón interno (punto 3.9.3) y 200 ml de disolvente de extracción (punto 3.12) y tapar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (punto 4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante diez minutos. Pasar una alícuota de 10 000/p ml (p = contenido nominal de diclazurilo en la premezcla, en miligramos por kilogramo) del sobrenadante a un matraz de fondo redondo de tamaño adecuado. Evaporar justo hasta llegar a sequedad a presión reducida y a 60 °C, por medio del rotavapor (punto 4.3). Volver a disolver el residuo en 10,0 ml de DMF (punto 3.6), añadir 15,0 ml de agua (punto 3.1) y mezclar. Proceder a la determinación mediante HPLC (punto 5.3).

## 5.3. Determinación mediante HPLC

### 5.3.1. Parámetros

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes o mejores.

- Columna de cromatografía líquida (punto 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, relleno de 3 µm, o equivalente
- Fase móvil
  - Eluyente A (punto 3.13.1): solución acuosa de acetato de amonio e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio
  - Eluyente B (punto 3.13.2): acetonitrilo
  - Eluyente C (punto 3.13.3): metanol
- Modo de elución: gradiente lineal
  - Condiciones iniciales: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)
  - después de 10 minutos, gradiente de elución durante 30 minutos a: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)
  - a continuación, lavar con B durante 10 minutos
- Caudal: 1,5 ml/min-2 ml/min



- Volumen de inyección: 20 µl
- Longitud de onda del detector: 280 nm

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (punto 3.10.2), que contiene 2 µg/ml de diclazurilo y de patrón interno, hasta que se alcancen alturas de pico y tiempos de retención constantes.

### 5.3.2. Análisis cromatográfico de las soluciones de calibración

Inyectar 20 µl de las soluciones de calibración (punto 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 y 3.10.5) dos veces cada una, identificar e integrar los picos de diclazurilo y de patrón interno y trazar la curva de calibración sobre la base de la relación entre la altura o área media del pico de diclazurilo y la altura o área media del pico del patrón interno frente a la concentración de diclazurilo en las soluciones de calibración (µg/ml).

### 5.3.3. Análisis cromatográfico de las soluciones de muestra

Inyectar dos veces 20 µl de la solución de muestra (punto 5.2.1 o 5.2.2) y determinar la altura (área) media de los picos de diclazurilo y patrón interno.

## 6. Cálculo de los resultados

### 6.1. Piensos compuestos

El contenido  $w$  (mg/kg) de diclazurilo de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{\text{Altura}(d,s) - b}{\text{Altura}(i,s)} \times \frac{10V}{m} \text{ o } w = \frac{\text{Área}(d,s) - b}{\text{Área}(i,s)} \times \frac{10V}{m}$$

donde:

- Altura (d, s) es la altura del pico de diclazurilo en la solución de muestra (punto 5.2.1),
- Área (d, s) es el área del pico de diclazurilo en la solución de muestra (punto 5.2.1),
- Altura (i, s) es la altura del pico de patrón interno en la solución de muestra (punto 5.2.1),
- Área (i, s) es el área del pico de patrón interno en la solución de muestra (punto 5.2.1),
- $b$  es la intersección de la curva de calibración trazada a partir de las soluciones de calibración (puntos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 y 3.10.5) según el punto 5.3.2,
- $a$  es la pendiente de la curva de calibración trazada a partir de las soluciones de calibración (puntos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 y 3.10.5) según el punto 5.3.2,
- $m$  es la masa de la porción de ensayo en gramos,
- $V$  es el volumen final en mililitros del extracto de muestra después de volver a disolverlo según el punto 5.2.1 (es decir, 2,5 ml).

### 6.2. Premezclas

El contenido  $w$  (mg/kg) de diclazurilo de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{\text{Altura}(d,s) - b}{\text{Altura}(i,s)} \times \frac{0,02V}{m} \times p \text{ o bien } w = \frac{\text{Área}(d,s) - b}{\text{Área}(i,s)} \times \frac{0,02V}{m} \times p$$

donde:

- Altura (d, s) es la altura del pico de diclazurilo en la solución de muestra (punto 5.2.2),
- Área (d, s) es el área del pico de diclazurilo en la solución de muestra (punto 5.2.2),
- Altura (i, s) es la altura del pico de patrón interno en la solución de muestra (punto 5.2.2),
- Área (i, s) es el área del pico de patrón interno en la solución de muestra (punto 5.2.2),

- b es la intersección de la curva de calibración trazada a partir de las soluciones de calibración (puntos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 y 3.10.5) según el punto 5.3.2,
- a es la pendiente de la curva de calibración trazada a partir de las soluciones de calibración (puntos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 y 3.10.5) según el punto 5.3.2,
- m es la masa de la porción de ensayo en gramos,
- V es el volumen final en mililitros del extracto de muestra después de volver a disolverlo según el punto 5.2.2 (es decir, 25 ml),
- p es el contenido nominal de diclazurilo de la premezcla, en miligramos por kilogramo.

## 7. Validación de los resultados

### 7.1. Identidad

La identidad del analito puede confirmarse mediante cromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra (punto 5.2.1 o 5.2.2) y de la solución de calibración (punto 3.10.2).

#### 7.1.1. Cocromatografía

Enriquecer un extracto de muestra (punto 5.2.1 o 5.2.2) añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (punto 3.10.2). La cantidad de diclazurilo añadida debe ser similar a la hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de diclazurilo y del pico de patrón interno deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, debe ser igual  $\pm 10\%$  a la anchura original del pico de diclazurilo o del pico de patrón interno del extracto de muestra sin enriquecer.

#### 7.1.2. Detección por red de diodos

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- a) la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en  $\pm 2$  nm;
- b) entre 230 nm y 320 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- c) entre 230 nm y 320 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice del pico;

si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

### 7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos mediciones independientes efectuadas con dos submuestras no debe superar:

- el 30 % del valor superior, en el caso de contenidos de diclazurilo de 0,5 mg/kg a 2,5 mg/kg;
- los 0,75 mg/kg, en el caso de contenidos de diclazurilo de 2,5 mg/kg a 5 mg/kg;
- el 15 % del valor superior, en el caso de contenidos de diclazurilo superiores a 5 mg/kg.

### 7.3. Recuperación

La recuperación de la muestra (en blanco) enriquecida deberá ser al menos del 80 %.

## 8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizaron dos estudios colaborativos. En el primero, realizado por otro grupo de laboratorios en 1994, las muestras analizadas fueron dos premezclas (O 100, A 100) y tres muestras de piensos complementarios para aves de corral (L1, Z1, K1). Una de estas muestras se mezcló con una matriz orgánica (O 100) y otra con una matriz inorgánica (A 100). El contenido teórico de diclazurilo fue de 100 mg/kg. Se dijo a los laboratorios que analizaran cada muestra una vez o por duplicado. (Puede encontrarse información más detallada sobre este estudio colaborativo en *Journal of AOAC International*, volumen 77, n.º 6, 1994, pp. 1359-1361).

En el segundo estudio colaborativo, se analizaron tres piensos compuestos para aves de corral que contenían diclazurilo en concentraciones de 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) y piensos en blanco (MAT 3). Puede encontrarse información más detallada sobre este estudio colaborativo en el informe técnico del JRC (2016) y en el *Journal of AOAC International*, volumen 102, n.º 2, 2019, pp. 646-652. Los resultados de los dos estudios colaborativos figuran en el cuadro siguiente.

	Muestra 1A 100	Muestra 2O 100	Muestra 3 L1	Muestra 4 Z1	Muestra 5 K1	Muestra 6 MAT 1	Muestra 7 MAT 2	Muestra 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Media (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LDC
S <sub>t</sub> (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV <sub>t</sub> (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S <sub>R</sub> (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV <sub>R</sub> (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Contenido nominal (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Referencia (*)	Primer estudio de 1994	Primer estudio de 1994	Primer estudio de 1994	Primer estudio de 1994	Primer estudio de 1994	Segundo estudio de 2015	Segundo estudio de 2015	Segundo estudio de 2015

L: número de laboratorios

n: número de valores individuales

S<sub>t</sub>: desviación típica de la repetibilidad

CV<sub>t</sub>: coeficiente de variación de la repetibilidad

S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad

CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad

LDC: límite de cuantificación

(\*) Primer estudio de 1994: *Journal of AOAC International*, volumen 77, n.º 6, 1994, pp. 1359-1361. Segundo estudio de 2015: Informe técnico del JRC: *Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study* ["Revalidación de un método para la determinación del diclazurilo mediante un estudio colaborativo", documento en inglés], (2016).

## 9. Observaciones generales

Previamente debe haberse demostrado que la respuesta del diclazurilo es lineal en todo el intervalo de concentraciones sometidas a medición.

Al menos para el análisis del diclazurilo en piensos compuestos con un alto contenido de grasa (para este fin, superior al 12 % de grasa), el método analítico podrá sustituirse por otros métodos basados en la HPLC, por ejemplo, un método de cromatografía líquida de alta resolución combinada con espectrometría de masas (HPLC-MS), siempre que el método alternativo tenga características de rendimiento equivalentes (tasa de recuperación, precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad).

## G. DETERMINACIÓN DEL LASALOCID SÓDICO

Sal sódica de un poliéter de ácido monocarboxílico producido por *Streptomyces lasaliensis*

El contenido de lasalocid sódico se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un espectrofluorímetro (fluorescencia), tal como se describe en los puntos 1 a 8 siguientes.

### 1. Finalidad y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de lasalocid sódico en piensos y premezclas. El límite de detección es de 5 mg/kg; el de cuantificación, de 10 mg/kg.

### 2. Principio

El lasalocid sódico se extrae de la muestra en metanol acidificado y se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), empleando un espectrofluorímetro (fluorescencia).

### 3. Reactivos

3.1. Dihidrogenofosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

3.2. Ácido ortofosfórico, p (p/p) = 85 %.

3.3. Solución de ácido ortofosfórico, c = 20 %.

Diluir 23,5 ml de ácido ortofosfórico (punto 3.2) con agua hasta 100 ml.

3.4. 6-Metil-2-heptilamina (1,5-dimetilhexilamina), p (p/p) = 99 %.

3.5. Metanol, equivalente al de grado HPLC.

3.6. Ácido clorhídrico, de 1,19 g/ml de densidad.

3.7. Solución tampón fosfato, c = 0,01 mol/l.

Disolver 1,36 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (punto 3.1) en 500 ml de agua (punto 3.11), añadir 3,5 ml de ácido ortofosfórico (punto 3.2) y 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamina (punto 3.4). Ajustar el pH a 4,0 con solución de ácido ortofosfórico (punto 3.3) y diluir con agua (punto 3.11) hasta 1 000 ml.

3.8. Metanol acidificado:

transvasar 5,0 ml de ácido clorhídrico (punto 3.6) a un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con metanol (punto 3.5) y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.9. Fase móvil para HPLC: solución tampón fosfato + metanol, 5 + 95 (V + V):

mezclar 5 ml de solución tampón fosfato (punto 3.7) con 95 ml de metanol (punto 3.5).

3.10. Sustancia patrón: lasalocid sódico de pureza garantizada, C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>O<sub>8</sub>Na (sal sódica de un poliéter de ácido monocarboxílico producido por *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Solución patrón madre de lasalocid sódico, 500 µg/ml:

pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de lasalocid sódico (punto 3.10) en un matraz aforado de 100 ml, disolver con metanol acidificado (punto 3.8), enrasar con este mismo disolvente y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

### 3.10.2. Solución patrón intermedia de lasalocid sódico, 50 µg/ml:

pipetear 10,0 ml de solución patrón madre (punto 3.10.1) a un matraz aforado de 100 ml, enrasar con metanol acidificado (punto 3.8) y mezclar; esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

### 3.10.3. Soluciones de calibración:

transvasar 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 y 10,0 ml de la solución patrón intermedia (punto 3.10.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml; enrasar con metanol acidificado (punto 3.8) y mezclar; estas soluciones corresponden, respectivamente, a 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 y 10,0 µg de lasalocid sódico por mililitro; deben prepararse poco antes de utilizarse.

### 3.11. Agua, equivalente a la de grado HPLC.

## 4. Instrumental

4.1. Baño de ultrasonidos (o baño de agua con agitación), con control de temperatura.

4.2. Filtros de membrana de 0,45 µm.

4.3. Equipo de HPLC con un sistema de inyección que permita inyectar volúmenes de 20 µl.

4.3.1. Columna de cromatografía líquida, de 125 mm × 4 mm, C<sub>18</sub> de fase reversa, relleno de 5 µm, o equivalente.

4.3.2. Espectrofluorímetro con ajuste variable de las longitudes de onda de excitación y emisión.

## 5. Procedimiento

### 5.1. Generalidades

#### 5.1.1. Pienso en blanco

Para el ensayo de recuperación (punto 5.1.2) deberá analizarse un pienso en blanco, a fin de comprobar la ausencia de lasalocid sódico y de sustancias interferentes. El pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse lasalocid sódico ni sustancias interferentes.

#### 5.1.2. Ensayo de recuperación

Deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de lasalocid sódico similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 100 mg/kg, transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (punto 3.10.1) a un erlenmeyer de 250 ml y evaporar la solución a unos 0,5 ml. Añadir 50 g del pienso en blanco, mezclar completamente y esperar 10 minutos, mezclando varias veces más antes de proceder a la extracción (punto 5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), también puede realizarse un ensayo de recuperación por el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de lasalocid sódico similar a la que ya esté presente en ella. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer y la recuperación se calcula por sustracción.

### 5.2. Extracción

#### 5.2.1. Pienso

Pesar, con una precisión de 0,01 g, de 5 g a 10 g de la muestra en un erlenmeyer de 250 ml con tapón. Añadir con la pipeta 100,0 ml de metanol acidificado (punto 3.8). Tapar sin apretar y agitar en círculos para dispersar. Colocar el matraz en un baño ultrasónico (punto 4.1) a unos 40 °C durante 20 minutos, sacarlo a continuación y enfriar a temperatura ambiente. Dejar reposar durante aproximadamente una hora hasta que la materia en suspensión se haya sedimentado; a continuación, verter una alícuota en un recipiente adecuado filtrándola por un filtro de membrana de 0,45 µm (punto 4.2). Proceder a la determinación mediante HPLC (punto 5.3).

### 5.2.2. Premezclas

Pesar, con una precisión de 0,001 g, unos 2 g de premezcla sin moler en un matraz aforado de 250 ml. Añadir 100,0 ml de metanol acidificado (punto 3.8) y agitar en círculos para dispersar. Colocar el matraz con su contenido en un baño ultrasónico (punto 4.1) a unos 40 °C durante 20 minutos, sacarlo a continuación y enfriar a temperatura ambiente. Diluir hasta la marca con metanol acidificado (punto 3.8) y mezclar completamente. Dejar reposar durante una hora hasta que la materia en suspensión se haya sedimentado; a continuación, filtrar una alícuota por un filtro de membrana de 0,45 µm (punto 4.2). Diluir un volumen apropiado del filtrado limpio con metanol acidificado (punto 3.8) para producir una solución final de ensayo que contenga en torno a 4 µg/ml de lasalocid sódico. Proceder a la determinación mediante HPLC (punto 5.3).

### 5.3. Determinación mediante HPLC

#### 5.3.1. Parámetros

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna de cromatografía líquida (punto 4.3.1):	125 mm × 4 mm, fase inversa C <sub>18</sub> , relleno de 5 µm, o equivalente
Fase móvil (punto 3.9):	Mezcla de solución tampón fosfato (punto 3.7) y metanol (punto 3.5), 5 + 95 (V + V)
Caudal:	1,2 ml/min
Longitudes de onda de detección:	Excitación: 310 nm Emisión: 419 nm
Volumen de inyección:	20 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (punto 3.10.3) de 4,0 µg/ml, hasta que se alcancen alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

#### 5.3.2. Curva de calibración

Inyectar varias veces cada solución de calibración (punto 3.10.3) y determinar las alturas (áreas) de pico medias de cada concentración. Trazar una curva de calibración poniendo las alturas (áreas) medias de los picos en ordenadas y las concentraciones correspondientes en µgramos por mililitro en abscisas.

#### 5.3.3. Solución de muestra

Inyectar varias veces los extractos de muestra obtenidos en el punto 5.2.1 o 5.2.2 empleando el mismo volumen que para la solución de calibración, y determinar las alturas (áreas) medias de los picos de lasalocid sódico.

## 6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos obtenidos por inyección de la solución de la muestra (punto 5.3.3), determinar la concentración de lasalocid sódico en µgramos por mililitro mediante la curva de calibración.

### 6.1. Pienso

El contenido *w* (mg/kg) de lasalocid sódico de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

donde:

- c*: = concentración de lasalocid sódico de la solución de muestra (punto 5.2.1), en microgramos por mililitro  
*V*<sub>1</sub>: = volumen del extracto de muestra según el punto 5.2.1, en mililitros (es decir, 100)  
*m*: = peso de la porción de ensayo, en gramos

6.2. *Premezclas*

El contenido  $w$  (mg/kg) de lasalocid sódico de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

donde:

$c$ : = concentración de lasalocid sódico de la solución de muestra (punto 5.2.2), en  $\mu$ gramos por mililitro

$V_2$ : = volumen del extracto de muestra según el punto 5.2.2, en mililitros (es decir, 250)

$f$ : = factor de dilución según el punto 5.2.2

$m$ : = peso de la porción de ensayo, en gramos

7. **Validación de los resultados**7.1. *Identidad*

Los métodos basados en la espectrofluorometría están menos sujetos a interferencias que aquellos en los que se emplea la detección por UV. La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía.

7.1.1. *Cocromatografía*

Enriquecer un extracto de muestra (punto 5.2.1 o 5.2.2) añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (punto 3.10.3). La cantidad de lasalocid sódico añadida debe ser similar a la hallada en el extracto de muestra. Solo la altura del pico de lasalocid sódico deberá aumentar en función de la cantidad de lasalocid sódico añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, debe ser igual  $\pm 10\%$  a la anchura del pico original producida por el extracto de muestra sin enriquecer.

7.2. *Repetibilidad*

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

- el 15 % del resultado superior en caso de un contenido de lasalocid sódico entre 30 mg/kg y 100 mg/kg;
- los 15 mg/kg en caso de un contenido de lasalocid sódico entre 100 mg/kg y 200 mg/kg;
- el 7,5 % del valor superior, en el caso de un contenido de lasalocid sódico superior a 200 mg/kg.

7.3. *Recuperación*

La recuperación de la muestra (en blanco) de pienso enriquecida deberá ser al menos del 80 %. En el caso de las muestras de premezclas enriquecidas, la recuperación deberá ser al menos del 90 %.

8. **Resultados de un estudio colaborativo**

Se organizó un estudio colaborativo (\*) en el que doce laboratorios analizaron dos premezclas (muestras 1 y 2) y cinco piensos (muestras 3 a 7). De cada muestra se hicieron análisis por duplicado. Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 1 Premezcla para pollos	Muestra 2 Premezcla para pavos	Muestra 3 Gránulos para pavos	Muestra 4 Migajas para pollos	Muestra 5 Pienso para pavos	Muestra 6 Pienso A para pollos	Muestra 7 Pienso B para pollos
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Media [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6

$s_r$ [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
$CV_r$ [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
$S_R$ [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
$CV_R$ [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Contenido nominal [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (†)	35 (†)

L: número de laboratorios

n: número de resultados individuales

$s_r$ : desviación típica de la repetibilidad

$s_R$ : desviación típica de la reproducibilidad

$CV_r$ : coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

$CV_R$ : coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

(\*) *The Analyst*, 1995, 120, pp. 2175-2180

(\*\*) Contenido declarado por el fabricante

(†) Pienso preparado en el laboratorio

## H. DETERMINACIÓN DEL CLORHIDRATO DE AMPROLIO

*cloruro de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinio, monoclóhidrato*

### 1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de amprolio en los piensos. El límite de detección es de 1 mg/kg; el de cuantificación, de 5 mg/kg.

### 2. Principio

La muestra se extrae con una mezcla de agua y metanol. Tras dilución con la fase móvil y filtración por un filtro de membrana, el contenido de amprolio se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio catiónico, empleando un detector de UV.

### 3. Reactivos

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitrilo, equivalente al de grado HPLC.

3.3. Agua, equivalente a la de grado HPLC.

3.4. Solución de dihidrogenofosfato sódico,  $c = 0,1$  mol/l:

disolver 13,80 g de dihidrogenofosfato sódico monohidratado en agua (punto 3.3) en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con agua (punto 3.3) y mezclar.

3.5. Solución de perclorato sódico  $c = 1,6$  mol/l:

disolver 224,74 g de perclorato sódico monohidratado en agua (punto 3.3) en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con agua (punto 3.3) y mezclar.

3.6. Fase móvil para HPLC (véase la observación 9.1):

mezcla de acetonitrilo (punto 3.2), solución de dihidrogenofosfato sódico (punto 3.4) y solución de perclorato sódico (punto 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v); antes de utilizarla, filtrar la solución por un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (punto 4.3) y desgasificarla [por ejemplo, en el baño ultrasónico (punto 4.4) durante, como mínimo, 15 minutos].

3.7. Sustancia patrón: amprolio puro, cloruro de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinio, E 750 (véase el punto 9.2)



3.7.1. Solución patrón madre de amprolio, 500 µg/ml:

pesar, con precisión de 0,1 mg, 50 mg de amprolio (punto 3.7) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en 80 ml de metanol (punto 3.1) y colocar el matraz durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos (punto 4.4); después del tratamiento de ultrasonidos, llevar la solución a temperatura ambiente, enrasar con agua y mezclar; a una temperatura de  $\leq 4$  °C, la solución es estable durante un mes.

3.7.2. Solución patrón intermedia de amprolio, 50 µg/ml:

pipetear 5,0 ml de la solución patrón madre (punto 3.7.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con el disolvente de extracción (punto 3.8) y mezclar; a una temperatura de  $\leq 4$  °C, la solución es estable durante un mes.

3.7.3. Soluciones de calibración:

transvasar 0,5, 1,0 y 2,0 ml de la solución patrón intermedia (punto 3.7.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml; enrasar con la fase móvil (punto 3.6) y mezclar; estas soluciones corresponden, respectivamente, a 0,5, 1,0 y 2,0 µg/ml de amprolio; deben prepararse poco antes de utilizarse.

3.8. Disolvente de extracción:

mezcla de metanol (punto 3.1) y agua 2 + 1 (v + v).

#### 4. Instrumental

4.1. Equipo de HPLC con un sistema de inyección que permita inyectar volúmenes de 100 µl.

4.1.1. Columna de cromatografía líquida, de 125 mm× 4 mm, Nucleosil 10 SA, de intercambio catiónico, relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente.

4.1.2. Detector de UV de longitud de onda variable, o detector de red de diodos.

4.2. Filtro de membrana de politetrafluoretileno de 0,45 µm.

4.3. Filtro de membrana de 0,22 µm.

4.4. Baño ultrasónico.

4.5. Agitador mecánico o magnético.

#### 5. Procedimiento

5.1. Generalidades

5.1.1. Pienso en blanco

Para el ensayo de recuperación (punto 5.1.2) deberá analizarse un pienso en blanco, a fin de comprobar la ausencia de amprolio y de sustancias interferentes. El pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no debe detectarse amprolio ni sustancias interferentes.

5.1.2. Ensayo de recuperación

Deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de amprolio similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 100 mg/kg, transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (punto 3.7.1) a un erlenmeyer de 250 ml y evaporar la solución 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 (punto 5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), también puede realizarse un ensayo de recuperación por el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de amprolio similar a la que ya esté presente en ella. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación puede calcularse por sustracción.

## 5.2. Extracción

### 5.2.1. Premezclas (contenido de < 1 % de amprolio) y piensos

En función del contenido de amprolio, pesar, con una precisión de 0,01 g, entre 5 g y 40 g de la muestra en un erlenmeyer de 500 ml y añadir 200 ml de disolvente de extracción (punto 3.8). Poner el matraz en el baño ultrasónico (punto 4.4) y dejarlo 15 minutos. Retirar el matraz del baño ultrasónico, agitar durante una hora en el agitador o remover en el agitador magnético (punto 4.5). Diluir una alícuota del extracto con la fase móvil (punto 3.6) hasta obtener un contenido de amprolio de entre 0,5 µg/ml y 2 µg/ml y mezclar (véase la observación del punto 9.3). Filtrar de 5 ml a 10 ml de esta solución diluida por un filtro de membrana (punto 4.2). Proceder a la determinación mediante HPLC (punto 5.3).

### 5.2.2. Premezclas (contenido de ≥ 1 % de amprolio)

En función del contenido de amprolio, pesar, con una precisión de 0,001 g, entre 1 g y 4 g de la premezcla en un erlenmeyer de 500 ml y añadir 200 ml de disolvente de extracción (punto 3.8). Poner el matraz en el baño ultrasónico (punto 4.4) y dejarlo 15 minutos. Retirar el matraz del baño ultrasónico, agitar durante una hora en el agitador o remover en el agitador magnético (punto 4.5). Diluir una alícuota del extracto con la fase móvil (punto 3.6) hasta obtener un contenido de amprolio de entre 0,5 µg/ml y 2 µg/ml y mezclar. Filtrar de 5 ml a 10 ml de esta solución diluida por un filtro de membrana (punto 4.2). Proceder a la determinación mediante HPLC (punto 5.3).

## 5.3. Determinación mediante HPLC

### 5.3.1. Parámetros

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna de cromatografía líquida (punto 4.1.1):	125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA, de intercambio catiónico, relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente
Fase móvil (punto 3.6):	Mezcla de acetonitrilo (punto 3.2), solución de dihidrogenofosfato sódico (punto 3.4) y solución de perclorato sódico (punto 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Caudal:	0,7 ml/min-1 ml/min
Longitud de onda de detección:	264 nm
Volumen de inyección:	100 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (punto 3.7.3) de 1,0 µg/ml hasta obtener alturas de pico y tiempos de retención constantes.

### 5.3.2. Curva de calibración

Inyectar varias veces cada solución de calibración (punto 3.7.3) y determinar las alturas (áreas) de pico medias de cada concentración. Trazar una curva de calibración utilizando las alturas (áreas) medias de los picos de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes en microgramos por mililitro como abscisas.

### 5.3.3. Solución de muestra

Inyectar varias veces el extracto de muestra (punto 5.2) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de amprolio.

## 6. Cálculo de los resultados

Determinar la concentración de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de los picos de amprolio, tomando como referencia la curva de calibración (punto 5.3.2).

El contenido w de amprolio de la muestra, en miligramos por kilogramo, viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

donde:

- V: = volumen del disolvente de extracción (punto 3.8) según el punto 5.2, en mililitros (es decir, 200 ml)  
c: = concentración de amprolio del extracto de muestra (punto 5.2), en microgramos por mililitro  
f: = factor de dilución según el punto 5.2  
m: = peso de la porción de ensayo, en gramos

## 7. Validación de los resultados

### 7.1. Identidad

La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía o mediante un detector de red de diodos que permita comparar los espectros del extracto de la muestra (punto 5.2) y de la solución de calibración (punto 3.7.3) con 2,0 µg/ml.

#### 7.1.1. Cocromatografía

Enriquecer un extracto de muestra (punto 5.2) añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (punto 3.7.3). La cantidad de amprolio añadida debe ser similar a la hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de amprolio deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, debe ser igual  $\pm 10\%$  a la anchura original del pico de amprolio del extracto de muestra sin enriquecer.

#### 7.1.2. Detección por red de diodos

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma 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  $\pm 2$  nm;
- entre 210 nm y 320 nm, los espectros de la muestra y del 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; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- entre 210 nm y 320 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de la muestra no deben ser diferentes entre sí en las partes del espectro situadas entre el 10 % y el 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice del pico;

si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

### 7.2. Repetibilidad

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

- el 15 % del resultado superior en caso de contenidos de amprolio de 25 mg/kg a 500 mg/kg;
- los 75 mg/kg en caso de contenidos de amprolio de 500 mg/kg y 1 000 mg/kg;
- el 7,5 % del resultado superior en caso de contenidos de amprolio mayores de 1 000 mg/kg.

### 7.3. Recuperación

La recuperación de la muestra (en blanco) enriquecida deberá ser al menos del 90 %.

## 8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo en el que se analizaron tres piensos para aves de corral (muestras 1 a 3), un pienso mineral (muestra 4) y una premezcla (muestra 5). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	muestra 1 (pienso en blanco)	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
media [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s <sub>t</sub> [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV <sub>r</sub> [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s <sub>R</sub> [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV <sub>R</sub> [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
contenido nominal [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: número de laboratorios

n: número de valores individuales

s<sub>t</sub>: desviación típica de la repetibilidad

CV<sub>r</sub>: coeficiente de variación de la repetibilidad

S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad

CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad

## 9. Observaciones

- 9.1. Si la muestra contiene tiamina, su pico aparece en el cromatograma poco antes que el del amprolio. Según este método, el amprolio y la tiamina deben separarse. Si la columna (punto 4.1.1) utilizada en este método no separa el amprolio de la tiamina, sustituir hasta el 50 % de la porción de acetonitrilo de la fase móvil (punto 3.6) por metanol.
- 9.2. De acuerdo con la British Pharmacopoeia, el espectro de una solución de amprolio (c = 0,02 mol/l) en ácido clorhídrico (c = 0,1 mol/l) presenta máximos a 246 nm y 262 nm. La absorbancia será de 0,84 a 246 nm y de 0,80 a 262 nm.
- 9.3. El extracto debe diluirse siempre con la fase móvil, ya que, de lo contrario, el tiempo de retención del pico de amprolio puede variar significativamente, debido a cambios en la fuerza iónica.

### I. DETERMINACIÓN DE LA NARASINA

El contenido de narasina se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- el método detallado en EN ISO 14183: Piensos para animales. Determinación de los contenidos de monensina, narasina y salinomina. Método por cromatografía líquida utilizando transformación química postcolumna.

### J. DETERMINACIÓN DE LA NICARBACINA

El contenido de nicarbacina se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o

- el método detallado en EN 15782: Piensos para animales. Determinación de nicarbazina. Método por cromatografía líquida de alta resolución.

#### K. DETERMINACIÓN DEL DECOQUINATO

El contenido de decoquinato se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- el método detallado en EN 16162: Piensos para animales. Determinación de decoquinato mediante HPLC con detección por fluorescencia.

#### L. DETERMINACIÓN DE LA MONENSINA

El contenido de monensina se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- el método detallado en EN ISO 14183: Piensos para animales. Determinación de los contenidos de monensina, narasina y salinomicina. Método por cromatografía líquida utilizando transformación química postcolumna.

#### M. DETERMINACIÓN DE LA SALINOMICINA

El contenido de salinomicina se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- el método detallado en EN ISO 14183: Piensos para animales. Determinación de los contenidos de monensina, narasina y salinomicina. Método por cromatografía líquida utilizando transformación química postcolumna.

#### N. DETERMINACIÓN DE LA SEMDURAMICINA

El contenido de semduramicina se determinará mediante:

- el método de análisis detallado en EN 17299: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y determinación de coccidiostáticos autorizados a nivel aditivo y del 1 %-3 % de contaminación cruzada, de coccidiostáticos no-registrados y de un antibiótico a niveles de sub-aditivo, en piensos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. Detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), o
- el método detallado en EN ISO 16158: Alimentos para animales. Determinación del contenido de semduramicina. Método por cromatografía líquida utilizando un enfoque analítico en árbol.

#### O. NORMAS EN

Para la aplicación del artículo 34, apartado 2, letra a), del Reglamento (UE) 2017/625 son pertinentes las siguientes normas EN:

EN ISO 30024: Alimentos para animales. Determinación de la actividad de la fitasa.

EN 17050: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del yodo en la alimentación animal mediante ICP-MS.

EN 17550: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de carotenoides en piensos compuestos y premezclas para animales mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a una detección por UV (HPLC-UV).

EN 15784: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y recuento de *Bacillus* spp. utilizados como aditivo para alimentación animal.

EN 15785: Alimentos para animales. Aislamiento y recuento de *Bifidobacterium* spp.

EN 15786: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y recuento de *Pediococcus* spp. utilizados como aditivo para alimentación animal.

EN 15787: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Aislamiento y recuento de *Lactobacillus* spp. utilizados como aditivo para alimentación animal.

EN 15788: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Detección y recuento de *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. utilizados como aditivo para alimentación animal.

EN 15789: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Aislamiento y recuento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizados como aditivo para alimentación animal.

EN 15510: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del contenido de calcio, sodio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc, cobre, manganeso, cobalto, molibdeno y plomo por ICP-AES (para el análisis del cobalto y el molibdeno como aditivos para piensos).

EN 15621: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación del calcio, sodio, fósforo, magnesio, potasio, azufre, hierro, zinc, cobre, manganeso y cobalto mediante ICP-AES (para el análisis del cobalto como aditivo para piensos).

EN 16159: Alimentos para animales. Determinación de selenio por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruro (HGAAS) tras digestión con microondas (extracción con ácido nítrico al 65 % y peróxido de hidrógeno al 30 %) (para el análisis del selenio como aditivo para piensos).

EN 17053: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de elementos traza, metales pesados y otros elementos en los alimentos para animales por ICP-MS (multimétodo) (para el análisis del cobalto, el molibdeno y el selenio como aditivos para piensos).».

—

## ANEXO V

## «ANEXO V

## MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE SUSTANCIAS INDESEABLES EN LOS PIENSOS

## A. DETERMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y PCB

## CAPÍTULO I

## MÉTODOS DE MUESTREO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

1. **Ámbito de aplicación y definiciones**

Las muestras destinadas al control oficial de los contenidos de policlorodibenzodioxinas (PCDD), de policlorodibenzofuranos (PCDF), de policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas <sup>(1)</sup> y de PCB no similares a las dioxinas en los piensos se tomarán conforme a las disposiciones del anexo I. Serán de aplicación los requisitos cuantitativos relacionados con el control de las sustancias o los productos distribuidos uniformemente por el pienso que se establecen en el punto 5.1 del anexo I. Las muestras globales así obtenidas se considerarán representativas de los lotes o sublotos de los que se obtengan. El respeto de los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE se determinará en función de los contenidos hallados en las muestras de laboratorio.

A efectos de la presente parte, se aplicarán las definiciones establecidas en el anexo I del Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión <sup>(2)</sup>.

Además de tales definiciones, a efectos de la presente parte se entenderá por:

- <sup>(1)</sup> Tabla de FET (factores de equivalencia tóxica) correspondientes a PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas: Los FET-OMS de evaluación del riesgo para la salud humana se basan en las conclusiones de la reunión de expertos del Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), celebrada en Ginebra en junio de 2005 [Martin van den Berg *et al.*: "The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds". *Toxicological Sciences* 93(2), pp. 223-241 (2006)].

Congénera	Valor de FET	Congénera	Valor de FET
Policlorodibenzodioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF)		PCB "similares a las dioxinas" PCB no-orto + PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB no-orto	
1,2, 3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abreviaturas utilizadas: "T" = tetra, "Pe" = penta, "Hx" = hexa, "Hp" = hepta, "O" = octa, "CDD" = clorodibenzodioxina, "CDF" = clorodibenzofurano, "CB" = clorobifenilo.

- <sup>(2)</sup> Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión, de 22 de marzo de 2021, relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE (DO L 180 de 21.5.2021, p. 84).

“Métodos de cribado”: los utilizados para seleccionar las muestras con contenidos de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas que superan los contenidos máximos o los umbrales de intervención. Deberán permitir procesar un elevado número de muestras en poco tiempo con una buena relación coste-eficacia, y aumentar así la oportunidad de descubrir nuevos incidentes con una alta exposición y riesgos para la salud de los consumidores. Los métodos de cribado serán bioanalíticos o por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados de las muestras que superen el valor de corte utilizado para comprobar el cumplimiento del contenido máximo serán verificados por un nuevo análisis completo de la muestra original utilizando un método de confirmación.

“Métodos de confirmación”: los que proporcionan una información completa o complementaria que permite la identificación y cuantificación inequívocas de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas al nivel del contenido máximo o, en caso de necesidad, del umbral de intervención. Estos métodos utilizan la cromatografía de gases/espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS) o la cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS).

## 2. Conformidad del lote o sublote con el contenido máximo

### 2.1. *Respecto de los PCB no similares a las dioxinas*

El lote o sublote es conforme al contenido máximo si el resultado del análisis de la suma de PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 y PCB 180 (en lo sucesivo, “PCB no similares a las dioxinas”) no supera el contenido máximo de PCB fijado en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida <sup>(3)</sup>. El lote o sublote no es conforme al contenido máximo fijado en la Directiva 2002/32/CE si la media de dos resultados analíticos del límite superior <sup>(4)</sup> obtenidos mediante un análisis por duplicado <sup>(5)</sup>, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida, supera el contenido máximo fuera de toda duda razonable, es decir, que la concentración analizada tras deducirse la incertidumbre de medida expandida se emplea para evaluar el cumplimiento.

La incertidumbre de medida expandida se calcula aplicando un factor de cobertura de 2 que da un nivel de confianza de aproximadamente un 95 %. Un lote o sublote no es conforme si la media de los valores medidos menos la incertidumbre expandida de la media está por encima del contenido máximo.

Las normas mencionadas en los precedentes apartados de este punto se aplicarán al resultado analítico obtenido con la muestra para control oficial. En caso de análisis con fines de segunda opinión experta o referencia serán de aplicación las normas nacionales.

### 2.2. *Respecto de las PCDD/PCDF y los PCB similares a las dioxinas*

El lote o sublote es conforme al contenido máximo si el resultado analítico de un análisis único:

- realizado por un método de cribado que arroje menos del 5 % de falsos negativos, indica que no se supera el contenido máximo respectivo de PCDD/PCDF ni la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas establecidos en la Directiva 2002/32/CE;
- realizado por un método de confirmación, indica que no se supera el contenido máximo respectivo de PCDD/PCDF ni la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas establecidos en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida.

<sup>(3)</sup> Deberán aplicarse, cuando proceda, los principios que se describen en el “Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” ([https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance\\_document\\_pcdd-f\\_pcb\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf)).

<sup>(4)</sup> El concepto de “límite superior” exige considerar el límite de cuantificación como contribución de cada congénere no cuantificado. El concepto de “límite inferior” exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado es igual a cero. El concepto de “límite intermedio” exige considerar la mitad del límite de cuantificación como contribución de cada congénere no cuantificado.

<sup>(5)</sup> Análisis por duplicado: un análisis por separado de los analitos considerados utilizando una segunda alícuota de la misma muestra homogeneizada. En general, son de aplicación los requisitos para el análisis por duplicado, con arreglo a lo previsto en el anexo II, capítulo C, punto 3. No obstante, en métodos que utilizan el patrón interno marcado con <sup>13</sup>C para los analitos considerados, el análisis por duplicado solo es necesario si el resultado de la primera determinación no es conforme. El análisis por duplicado es necesario para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. Si el análisis se realiza en el curso de un incidente de contaminación, la confirmación mediante análisis por duplicado puede omitirse si las muestras seleccionadas para el análisis se pueden relacionar, merced a la trazabilidad, con dicho incidente y si el contenido encontrado es significativamente superior al máximo.



Para los ensayos de cribado se establecerá un valor de corte para decidir si la muestra respeta los contenidos máximos respectivos que se hayan establecido para las PCDD/PCDF o para la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas.

El lote o sublote no es conforme al contenido máximo fijado en la Directiva 2002/32/CE si la media de dos resultados analíticos del límite superior <sup>(6)</sup> obtenidos a partir de un análisis por duplicado <sup>(7)</sup> mediante un método de confirmación, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida, supera el contenido máximo fuera de toda duda razonable, es decir, que la concentración analizada tras deducirse la incertidumbre de medida expandida se emplea para evaluar el cumplimiento.

La incertidumbre de medida expandida se calcula aplicando un factor de cobertura de 2 que da un nivel de confianza de aproximadamente un 95 %. Un lote o sublote no es conforme si la media de los valores medidos menos la incertidumbre expandida de la media está por encima del contenido máximo.

Para la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas se usará la suma de las incertidumbres expandidas calculadas, correspondiente a los resultados analíticos obtenidos por separado para PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas.

Las normas mencionadas en los precedentes apartados de este punto se aplicarán al resultado analítico obtenido con la muestra para control oficial. En caso de análisis con fines de defensa o referencia serán de aplicación las normas nacionales.

### 3. **Resultados que superan los umbrales de intervención establecidos en el anexo II de la Directiva 2002/32/CE**

Los umbrales de intervención sirven como instrumento para seleccionar las muestras en los casos en los que es necesario determinar la fuente de contaminación y tomar medidas para su reducción o eliminación. Los métodos de cribado deberán establecer los valores de corte adecuados para seleccionar dichas muestras. Cuando sean necesarios esfuerzos significativos para identificar la fuente y reducir o eliminar la contaminación, es apropiado confirmar que se han superado los umbrales de intervención mediante un análisis por duplicado, con un método de confirmación y teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida <sup>(8)</sup>.

## CAPÍTULO II

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y REQUISITOS APLICABLES A LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS EN EL CONTROL OFICIAL DE LOS CONTENIDOS DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y PCB SIMILARES A LAS DIOXINAS EN LOS PIENSOS

#### 1. **Ámbito de aplicación**

Los requisitos establecidos en el presente capítulo se aplicarán al análisis de piensos realizado para el control oficial de los contenidos de los PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y en lo que respecta a la preparación de las muestras y los requisitos analíticos con otros fines reglamentarios, incluidos los controles llevados a cabo por el explotador de la empresa de piensos para garantizar el cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo <sup>(9)</sup>.

El control de la presencia de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas en los piensos puede realizarse mediante dos tipos de métodos de análisis:

<sup>(6)</sup> El concepto de "límite superior" exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al equivalente tóxico (EQT) es igual al límite de cuantificación. El concepto de "límite inferior" exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT es igual a cero. El concepto de "límite intermedio" exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT es igual a la mitad del límite de cuantificación.

<sup>(7)</sup> En general, son de aplicación los requisitos para el análisis por duplicado, con arreglo a lo previsto en el anexo II, capítulo C, punto 3. No obstante, en métodos que utilizan el patrón interno marcado con <sup>13</sup>C para los analitos considerados, el análisis por duplicado solo es necesario si el resultado de la primera determinación no es conforme. El análisis por duplicado es necesario para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. Si el análisis se realiza en el curso de un incidente de contaminación, la confirmación mediante análisis por duplicado puede omitirse si las muestras seleccionadas para el análisis se pueden relacionar, merced a la trazabilidad, con dicho incidente y si el contenido encontrado es significativamente superior al máximo.

<sup>(8)</sup> La misma explicación e idénticos requisitos para el análisis por duplicado con fines de controlar los umbrales de intervención que en la nota a pie de página 5 para los contenidos máximos.

<sup>(9)</sup> Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de enero de 2005, por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos (DO L 35 de 8.2.2005, p. 1).

a) *Métodos de cribado*

El objetivo de los métodos de cribado es seleccionar las muestras con contenidos de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas que superan los contenidos máximos o los umbrales de intervención. Permitirán procesar un elevado número de muestras en poco tiempo con una buena relación coste-eficacia, y aumentar así la oportunidad de descubrir nuevos incidentes con una alta exposición y riesgos para la salud de los consumidores. Su aplicación tendrá como objetivo que no se produzcan falsos negativos. Los métodos de cribado podrán ser bioanalíticos o de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS).

Los métodos de cribado comparan el resultado analítico con un valor de corte, lo que permite establecer si se ha superado o no el contenido máximo o el umbral de intervención. La concentración de PCDD/PCDF y la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en las muestras que no cumplen el contenido máximo se determinará o confirmará mediante un método de confirmación.

Además, los métodos de cribado pueden dar una indicación de los niveles de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas presentes en la muestra. Si se aplican métodos bioanalíticos de cribado, el resultado se expresa en equivalentes bioanalíticos (EQB), mientras que, si se aplican métodos fisicoquímicos de CG/EM, se expresa en equivalentes tóxicos (EQT). Los resultados de los métodos de cribado indicados de forma numérica son adecuados para demostrar el cumplimiento o la sospecha de incumplimiento, o bien la superación de los umbrales de intervención, y ofrecen una indicación del rango de contenidos en caso de seguimiento mediante métodos de confirmación. No son adecuados para fines como la evaluación de los contenidos de fondo, la estimación de la dosis, el seguimiento de las tendencias temporales de los contenidos o la nueva evaluación de los umbrales de intervención y los contenidos máximos.

b) *Métodos de confirmación*

Los métodos de confirmación permiten la identificación y cuantificación inequívocas de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas presentes en una muestra y proporcionan información completa sobre la concentración de los congéneres individuales. Por lo tanto, esos métodos permiten el control de los contenidos máximos y los umbrales de intervención, incluida la confirmación de los resultados obtenidos por métodos de cribado. Además, los resultados pueden utilizarse para otros fines, como la determinación de contenidos de fondo bajos en el control de los piensos, el seguimiento de sus tendencias temporales, la evaluación de la exposición y la creación de una base de datos para poder evaluar de nuevo los umbrales de intervención y los contenidos máximos. Son importantes también para elaborar patrones de congéneres con objeto de identificar la fuente de una posible contaminación. Estos métodos utilizan la GC-HMRS. Para confirmar la conformidad con el contenido máximo, también puede recurrirse a la GC-MS/MS.

## 2. Antecedentes

Para calcular las concentraciones de EQT se multiplica la concentración de cada sustancia de una muestra dada por su respectivo factor de equivalencia tóxica (TEF) (véase la nota a pie de página 1 del capítulo I) y se suman luego los resultados para obtener la concentración total de compuestos similares a dioxinas expresados en EQT.

A efectos de la presente parte A, el límite de cuantificación específico aceptado de un congénere individual será el contenido más bajo de analito que puede medirse con una certeza estadística razonable y que cumple requisitos de identificación como los descritos en normas reconocidas internacionalmente, por ejemplo, en la norma EN 16215:2012 (Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB indicadores por GC/HRMS) o en los métodos EPA 1613 y 1668 modificados.

El límite de cuantificación de cada congénere puede identificarse como:

- a) la concentración de un analito en el extracto de una muestra que produce una respuesta instrumental a dos iones diferentes que debe controlarse con una relación señal/ruido (S/R) de 3/1 para la señal de datos brutos menos intensiva; o bien
- b) si, por razones técnicas, el cálculo de señal a ruido no ofrece resultados fiables, el punto de concentración más bajo en una curva de calibración que presenta una desviación aceptable ( $\leq 30\%$ ) y coherente (medida, al menos, al principio y al final de una serie analítica de muestras) con respecto al factor de respuesta relativo medio calculado para todos los puntos en la curva de calibración en cada serie de muestras; el límite de cuantificación se calcula a partir del punto de concentración más bajo teniendo en cuenta la recuperación de los patrones internos y la dosis de muestra.

Los métodos bioanalíticos de cribado no darán resultados a nivel de congénere, sino una simple indicación <sup>(10)</sup> de la cantidad de EQT, expresada en EQB, como signo de que no todos los compuestos presentes en un extracto de muestra que producen una respuesta en la prueba pueden cumplir o cumplen todos los requisitos del principio EQT.

Los métodos de cribado y los de confirmación solo pueden aplicarse para el control de una matriz determinada si son suficientemente sensibles para detectar de forma fiable los contenidos al nivel de umbral de intervención o de contenido máximo.

### 3. Requisitos de aseguramiento de la calidad

- 3.1. Deberán tomarse las medidas pertinentes para evitar la contaminación cruzada en cada fase del procedimiento de toma de muestras y de análisis.
- 3.2. Las muestras deberán almacenarse y transportarse en recipientes adecuados de vidrio, aluminio, polipropileno o polietileno, que no influyan en los contenidos de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas de las muestras. Deberán eliminarse los restos de polvo de papel del recipiente que contiene la muestra.
- 3.3. El almacenamiento y el transporte de las muestras de piensos deberán realizarse de modo que se preserve la integridad de las mismas.
- 3.4. En su caso, cada muestra de laboratorio deberá molerse finamente y mezclarse a conciencia mediante un procedimiento con el que esté demostrado que se obtiene una homogeneización completa (por ejemplo, moler hasta que pase por un tamiz de 1 mm). Las muestras deberán desecarse antes de molerse si su contenido de humedad es muy elevado.
- 3.5. Deberán controlarse los reactivos, los recipientes de vidrio y el resto del equipo para comprobar que no influyen en los resultados de EQT o EQB.
- 3.6. Deberá efectuarse un análisis en blanco realizando todo el procedimiento analítico, únicamente sin la muestra.
- 3.7. Para los métodos bioanalíticos, deberá comprobarse que todo el material de vidrio y los disolventes utilizados en el análisis están libres de compuestos que interfieran con la detección de los compuestos objeto de estudio en el intervalo de trabajo. El material de vidrio deberá enjuagarse con disolventes o calentarse a temperaturas adecuadas para eliminar de su superficie los restos de PCDD/PCDF, compuestos similares a dioxinas y demás compuestos que puedan interferir.
- 3.8. La cantidad de muestra utilizada para la extracción deberá ser suficiente para que se cumplan los requisitos relativos a un intervalo de trabajo lo suficientemente bajo, incluidas las concentraciones máximas o los umbrales de intervención.
- 3.9. Los procedimientos concretos de preparación de muestras que se empleen para los productos en cuestión deberán cumplir directrices aceptadas a nivel internacional, como la norma EN ISO 6498.

### 4. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

- 4.1. De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2017/625, los laboratorios deberán estar acreditados por un organismo reconocido que opere de conformidad con la Guía ISO/IEC 58, de modo que esté garantizado que aplican un aseguramiento de la calidad analítica. Dicha acreditación deberá efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025. Deberán aplicarse los principios que se describen en las orientaciones técnicas para la estimación de la incertidumbre de medida y los límites de cuantificación para el análisis de PCDD/PCDF y PCB <sup>(11)</sup>.
- 4.2. La aptitud del laboratorio se demostrará mediante su participación continua y exitosa en estudios interlaboratorios para la determinación de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas en las matrices de piensos y los intervalos de concentración pertinentes.

<sup>(10)</sup> Los métodos bioanalíticos no son específicos de los congéneres incluidos en el esquema de FET. En la muestra pueden existir otros compuestos de estructura similar que activan los ligandos de los receptores de hidrocarburos aromáticos y contribuyen a la respuesta global. Por lo tanto, los resultados bioanalíticos no pueden constituir una estimación, sino más bien una indicación de la cantidad de EQT de la muestra.

<sup>(11)</sup> *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* [[https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance\\_document\\_pcdd-f\\_pcb\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf)], *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* ([https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs\\_contaminants\\_sampling\\_analysis-report\\_2004\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf)).

- 4.3. Los laboratorios que apliquen métodos de cribado para los controles sistemáticos de muestras colaborarán estrechamente con los que aplican el método de confirmación, tanto para el control de calidad como para la confirmación del resultado analítico de muestras sospechosas.
5. **Requisitos básicos que deben cumplir los procedimientos analíticos aplicables a las dioxinas (PCDD/PCDF) y a los PCB similares a las dioxinas**
- 5.1. *Intervalo de trabajo y límites de cuantificación bajos*
- En el caso de las PCDD/PCDF, las cantidades detectables deberán encontrarse en el intervalo superior de los femtogramos ( $10^{-15}$  g), dada la extrema toxicidad de algunos de estos compuestos. Para la mayoría de los congéneres del grupo de los PCB, es suficiente un límite de cuantificación en el intervalo de nanogramos ( $10^{-9}$  g). Para medir los congéneres más tóxicos de los PCB similares a las dioxinas (en particular, los congéneres no *orto*-sustituídos), el extremo inferior del intervalo de trabajo deberá bajar hasta el nivel de picogramos ( $10^{-12}$  g). Para todos los demás congéneres de PCB, es suficiente una sensibilidad en el intervalo de los nanogramos ( $10^{-9}$  g).
- 5.2. *Selectividad elevada (especificidad)*
- 5.2.1. Es necesario establecer una distinción entre PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas y una multitud de otros compuestos extraídos simultáneamente de la muestra, capaces de interferir, y que están presentes en concentraciones de hasta varios órdenes de magnitud superiores a las de los analitos considerados. Por lo que respecta a los métodos de GC-MS, es necesario distinguir entre varios congéneres, en particular entre los tóxicos (por ejemplo, los diecisiete PCDD/PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y los doce PCB similares a las dioxinas) y los demás.
- 5.2.2. Los métodos bioanalíticos estarán en condiciones de detectar los compuestos objeto de estudio como la suma de PCDD/PCDF y/o PCB similares a las dioxinas. La limpieza de las muestras irá destinada a eliminar compuestos que provoquen falsos positivos o compuestos que puedan disminuir la respuesta, dando lugar a falsos negativos.
- 5.3. *Alto grado de exactitud (veracidad y precisión, recuperación aparente del bioensayo)*
- 5.3.1. Para los métodos de GC-MS, la determinación deberá proporcionar una estimación válida de la concentración real en una muestra. Es necesario alcanzar una exactitud elevada a fin de evitar que el resultado del análisis de una muestra sea rechazado debido a la escasa fiabilidad de la estimación de EQT. La exactitud se expresa como *veracidad* (diferencia entre el valor medio medido de un analito en un material certificado y su valor certificado, expresado como porcentaje de este valor) y *precisión* (desviación estándar relativa  $RSD_R$ , calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad).
- 5.3.2. Para los métodos bioanalíticos, deberá determinarse la recuperación aparente del bioensayo. La recuperación aparente del bioensayo es el valor EQB calculado a partir de la curva de calibración de la TCDD o del PCB 126 corregida en función del resultado de ensayo en blanco y dividida después por el valor EQT determinado por el método de confirmación. Con ello se pretende corregir factores como la pérdida de PCDD/PCDF y compuestos similares a las dioxinas durante la extracción y la limpieza, la coextracción de compuestos que aumentan o reducen la respuesta (efectos agonista y antagonista), la calidad del ajuste de la curva, o las diferencias entre los valores del FET y de la potencia relativa (REP). La recuperación aparente del bioensayo se calcula a partir de muestras de referencia adecuadas que tengan pautas de congéneres representativas en torno al nivel considerado.
- 5.4. *Validación en el intervalo del contenido máximo y medidas generales de control de calidad*
- 5.4.1. Los laboratorios deberán demostrar el funcionamiento de un método en el intervalo del contenido máximo, por ejemplo 0,5, 1 y 2 veces el contenido máximo, con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos durante el procedimiento de validación y durante análisis sistemáticos.
- 5.4.2. Como medidas internas de aseguramiento de la calidad, deberán realizarse regularmente controles en blanco y experimentos con muestras enriquecidas o análisis de muestras de control (de preferencia, si existe, material de referencia certificado). Estos controles en blanco y experimentos con muestras enriquecidas o análisis de muestras de control se registrarán en fichas de control y se comprobarán para verificar que el análisis cumple los requisitos de funcionamiento.

5.5. *Límite de cuantificación*

- 5.5.1. No es indispensable establecer un límite de cuantificación para los métodos bioanalíticos de cribado, pero deberá demostrarse que el método discrimina entre el blanco y el valor de corte. Cuando se ofrezca un nivel de EQB, se establecerá un nivel de referencia para tratar las muestras que presenten una respuesta por debajo de este nivel. Debe demostrarse que el nivel de notificación es diferente, al menos, por un factor de tres, de las muestras en blanco con una respuesta inferior al intervalo de trabajo. Por lo tanto, debe calcularse a partir de muestras que contengan los compuestos objeto de estudio en torno al contenido mínimo exigido, y no de una relación señal/ruido (S/R) ni de un ensayo en blanco.
- 5.5.2. En un método de confirmación, el límite de cuantificación debe ser aproximadamente un quinto del contenido máximo.

5.6. *Criterios de análisis*

Para obtener resultados fiables con los métodos de confirmación o de cribado, en el intervalo del contenido máximo deberán cumplirse los siguientes criterios para el valor EQT o EQB, respectivamente, ya se determinen como EQT total o EQB total (suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas) o por separado para PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas:

	Cribado por métodos bioanalíticos o fisicoquímicos	Métodos de confirmación
Porcentaje de falsos negativos (*)	< 5 %	
Veracidad		- 20 % a + 20 %
Repetibilidad (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Precisión intermedia (RSD)	< 25 %	< 15 %

(\*) Con respecto a los contenidos máximos.

5.7. *Requisitos específicos para métodos de cribado*

- 5.7.1. El cribado podrá realizarse tanto utilizando métodos de GC-MS como métodos bioanalíticos. En el caso de los métodos de GC-MS deben cumplirse los requisitos establecidos en el punto 6. Para los métodos bioanalíticos basados en células se establecen requisitos específicos en el punto 7.
- 5.7.2. Los laboratorios que aplican métodos de cribado para los controles sistemáticos de muestras cooperarán estrechamente con los que aplican el método de confirmación.
- 5.7.3. Durante los análisis sistemáticos es necesario verificar el rendimiento del método de cribado, mediante un control de la calidad analítica y la validación del método en curso. Existirá un programa continuo para controlar la conformidad de los resultados.
- 5.7.4. Comprobación de la posible supresión de la respuesta celular y la citotoxicidad

Un 20 % de los extractos de muestra se medirán a través de un cribado sistemático con y sin adición de TCDD sustituido en las posiciones 2, 3, 7 y 8, correspondientes al contenido máximo o al umbral de intervención, para comprobar si se ha podido suprimir la respuesta a causa de sustancias interfirientes presentes en el extracto de muestra. La concentración medida de la muestra enriquecida se compara con la suma de la concentración del extracto no enriquecido más la concentración de enriquecimiento. Si esta concentración medida es inferior en más de un 25 % a la concentración (sumatoria) calculada, constituye una indicación de posible supresión de la señal, y la muestra en cuestión ha de someterse a análisis de confirmación mediante GC-HRMS. Los resultados se controlarán por medio de gráficos de control de calidad.

5.7.5. *Control de calidad de las muestras conformes*

Aproximadamente entre un 2 % y un 10 % de las muestras conformes, en función de la matriz de la muestra y de la experiencia de laboratorio, deberán confirmarse por GC-HRMS.

5.7.6. Determinación de los porcentajes de falsos negativos a partir de los datos de control de calidad

Deberá determinarse el porcentaje de resultados falsos negativos en el cribado de muestras por debajo y por encima del contenido máximo o del umbral de intervención. Los porcentajes reales de falsos negativos deberán ser inferiores al 5 %. Cuando se disponga de un mínimo de veinte resultados confirmados por matriz o grupo de matrices a partir del control de calidad de las muestras conformes, de esta base de datos se extraerán conclusiones sobre el porcentaje de falsos negativos. Los resultados de las muestras analizadas en ensayos interlaboratorios o durante incidentes de contaminación, que cubran un intervalo de concentración de, por ejemplo, hasta el doble del contenido máximo, pueden también incluirse en el mínimo de veinte resultados para la evaluación del porcentaje de falsos negativos. Las muestras cubrirán los patrones de congéneres más frecuentes, que representen diversas fuentes.

Aunque el cribado se destina sobre todo a detectar muestras que superan el umbral de intervención, el criterio para determinar el porcentaje de falsos negativos es el contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida del método de confirmación.

5.7.7. Tras un cribado, las posibles muestras no conformes se verificarán siempre mediante un nuevo análisis completo de la muestra original por un método analítico de confirmación. Esas muestras se pueden usar asimismo para evaluar el porcentaje de falsos positivos. Para los métodos de cribado, el porcentaje de falsos positivos será la fracción de resultados confirmados conformes mediante análisis de confirmación, cuando en el cribado previo la muestra había sido declarada presuntamente no conforme. La evaluación de las ventajas del método de cribado se basará en la comparación de las muestras falsas positivas con el número total de muestras comprobadas. Ese índice deberá ser lo suficientemente bajo para que la herramienta de cribado resulte ventajosa.

5.7.8. En condiciones de validación, los métodos bioanalíticos deberán proporcionar una indicación válida del nivel de EQT, calculado y expresado como EQB.

También en el caso de métodos bioanalíticos empleados en condiciones repetidas, la  $RSD_r$  intralaboratorio suele ser menor que en condiciones de reproducibilidad ( $RSD_R$ ).

**6. Requisitos específicos que deben cumplir los métodos GC-MS utilizados con fines de cribado o de confirmación**

6.1. *Diferencias aceptables entre los resultados de límite superior y límite inferior de EQT-OMS*

La diferencia entre el límite superior y el límite inferior no superará el 20 % para la confirmación de la superación del contenido máximo o, en caso de necesidad, de los umbrales de intervención.

6.2. *Control de la recuperación*

6.2.1. A fin de validar el procedimiento analítico, será preciso añadir, desde el mismo comienzo del método analítico — por ejemplo, antes de la extracción—, patrones internos de PCDD/PCDF marcados con  $^{13}\text{C}$  clorosustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con  $^{13}\text{C}$ . Se añadirá al menos un congénere por cada grupo homólogo tetra- a octoclorado de PCDD/PCDF y al menos un congénere por cada grupo homólogo de PCB similares a las dioxinas (otra posibilidad es añadir al menos un congénere por cada función de registro de iones seleccionada por espectrometría de masas y utilizada para el control de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas). En los métodos de confirmación, se utilizarán los diecisiete patrones internos de PCDD/PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y marcados con  $^{13}\text{C}$ , así como los doce patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con  $^{13}\text{C}$ .

6.2.2. Habrán de determinarse asimismo los factores de respuesta relativos en el caso de los congéneres para los que no se añada ningún análogo marcado con  $^{13}\text{C}$ , por medio de soluciones de calibración apropiadas.

6.2.3. Para los piensos de origen vegetal y de origen animal con un contenido de grasa inferior al 10 %, será obligatorio añadir patrones internos antes de proceder a la extracción. En el caso de los piensos de origen animal con un contenido de grasa superior al 10 %, los patrones internos pueden añadirse antes o después de la extracción de grasas. Deberá validarse adecuadamente la eficacia de la extracción, en función de la fase en la que se introduzcan los patrones internos.

6.2.4. Con anterioridad al análisis mediante GC-MS, deberán añadirse uno o dos patrones de recuperación (sustitutos).

6.2.5. Es preciso realizar un control de la recuperación. Para los métodos de confirmación, los porcentajes de recuperación de cada patrón interno deberán situarse en un intervalo del 60 % al 120 %. En el caso de congéneres individuales, en particular en relación con algunas dibenzo-*p*-dioxinas y dibenzofuranos hepta- y octoclorados, podrán aceptarse porcentajes de recuperación inferiores o superiores, siempre y cuando su contribución al valor de EQT no supere el 10 % del valor total de EQT (suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas). Para los métodos de cribado por GC-MS, los porcentajes de recuperación deberán situarse en un intervalo del 30 % al 140 %.

### 6.3. *Eliminación de sustancias interfirientes*

- Los PCDD/PCDF se separarán de los compuestos clorados interfirientes, tales como los PCB no similares a las dioxinas y los éteres difenílicos clorados, mediante técnicas de cromatografía adecuadas (de preferencia con una columna de florisil, alúmina o carbono, o de varios de ellos).
- La separación de los isómeros por cromatografía de gases será < 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF y 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

### 6.4. *Calibración con curva patrón*

El intervalo de la curva de calibración cubrirá el intervalo pertinente del contenido máximo o de los umbrales de intervención.

### 6.5. *Requisitos específicos para métodos de confirmación*

- Para GC-HRMS:

En HRMS, la resolución será normalmente mayor o igual a 10 000 para todo el intervalo de masa a un valle del 10 %.

Cumplimiento de otros criterios de identificación y confirmación, tal como se describen en normas reconocidas internacionalmente, por ejemplo, en la norma EN 16215:2012 (Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de dioxinas, PCB similares a dioxinas y PCB indicadores por GC/HRMS) o en los métodos EPA 1613 y 1668 modificados.

- Para GC-MS/MS:

Control de al menos dos iones precursores específicos, cada uno con un ion producto de transición específico para cada uno de los analitos marcados y no marcados en el ámbito de aplicación de los análisis.

Tolerancia máxima permitida de las intensidades iónicas relativas de  $\pm 15$  % para iones producto de transición seleccionados en comparación con los valores calculados o medidos (media de los patrones de calibración), en condiciones idénticas de MS/MS, en particular, energía de colisión y presión del gas de colisión, para cada transición de un analito.

La resolución de cada cuadrupolo debe ser igual o superior a la resolución de masa unitaria (resolución de masa unitaria: resolución suficiente para separar dos picos de una unidad de masa) con el fin de minimizar las posibles interferencias con los analitos de interés.

Cumplimiento de los demás criterios de identificación y confirmación, tal como se describen en normas reconocidas internacionalmente, por ejemplo, en la norma EN 16215:2012 (Alimentos para animales. Determinación de dioxinas, de PCB como dioxinas y de PCB indicadores mediante GC/HRMS) o en los métodos EPA 1613 y 1668 modificados, excepto la obligación de utilizar GC-HRMS.

## 7. **Requisitos específicos para métodos bioanalíticos**

Los métodos bioanalíticos son métodos basados en el uso de principios biológicos como los ensayos celulares, los ensayos sobre el receptor o los inmunoensayos. El presente punto establece requisitos para los métodos bioanalíticos en general.

Un método de cribado en principio clasifica una muestra como conforme o presuntamente no conforme. Para ello, se compara el nivel de EQB calculado con el valor de corte (véase el punto 7.3). Las muestras por debajo del valor de corte se consideran conformes, y las muestras iguales o superiores al valor de corte, presuntamente no conformes, lo que exige un análisis mediante un método de confirmación. En la práctica, un EQB correspondiente a dos tercios del contenido máximo puede servir como valor de corte siempre que se garantice un porcentaje de falsos negativos inferior a 5 % y un porcentaje aceptable de falsos positivos. Con contenidos máximos separados de PCDD/PCDF y de la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas, comprobar la conformidad de las muestras sin fraccionamiento requiere unos valores de corte de bioensayo adecuados de PCDD/PCDF. Para el control de las muestras que superan los umbrales de intervención, podrá tomarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los mismos.

Si un valor indicativo se expresa en EQB, los resultados de las muestras estarán en el intervalo de trabajo y superarán el límite de notificación (véanse los puntos 7.1.1 y 7.1.6).

## 7.1. Evaluación de la respuesta al ensayo

### 7.1.1. Condiciones generales

- Cuando se calculan las concentraciones a partir de una curva de calibración de TCDD, los valores del límite superior de la curva presentarán una gran variación (elevado coeficiente de variación, CV). El intervalo de trabajo es el área en que dicho CV es inferior a 15 %. El extremo inferior del intervalo de trabajo (límite de notificación) deberá establecerse, como mínimo, en el triple del de los ensayos en blanco. El límite superior del intervalo de trabajo se suele representar por el valor EC<sub>70</sub> (70 % de concentración efectiva máxima), pero se sitúa en un nivel inferior si el CV es superior al 15 % en este intervalo. El intervalo de trabajo se establecerá durante el proceso de validación. Los valores de corte (véase el punto 7.3) estarán plenamente dentro del intervalo de trabajo.
- Las soluciones patrón y los extractos de muestras deberán someterse a ensayo por triplicado o, como mínimo, por duplicado. Cuando se usan duplicados, una solución patrón o un extracto control probado en de cuatro a seis pocillos repartidos por la placa producirán una respuesta o una concentración (solo posible en el intervalo de trabajo) basada en un CV < 15 %.

### 7.1.2. Calibración

#### 7.1.2.1. Calibración con curva patrón

- Los contenidos de las muestras se calcularán comparando la respuesta del ensayo con una curva de calibración de la TCDD (o PCB 126, o una mezcla patrón de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas) para calcular el EQB del extracto y, posteriormente, de la muestra.
- Las curvas de calibración contendrán de ocho a doce concentraciones (como mínimo por duplicado), con concentraciones suficientes en la parte inferior de la curva (intervalo de trabajo). Se prestará una atención especial a la calidad del ajuste de la curva en el intervalo de trabajo. Como tal, el valor R<sup>2</sup> tiene poco o ningún valor para estimar la adecuación del ajuste en regresión no lineal. Se logrará un mejor ajuste reduciendo la diferencia entre los contenidos calculados y los observados en el intervalo de trabajo de la curva, por ejemplo, minimizando la suma de los cuadrados de la variación.
- Después se corregirá el nivel calculado para el extracto de la muestra en función del EQB calculado para una muestra en blanco de matriz o disolvente (para tener en cuenta las impurezas procedentes de los disolventes y los productos químicos utilizados) y en función de la recuperación aparente (calculada a partir del EQB de las muestras de referencia pertinentes con pautas representativas de congéneres en torno al contenido máximo o al umbral de intervención). Para corregir la recuperación, la recuperación aparente habrá de encontrarse en el intervalo requerido (véase el punto 7.1.4). Las muestras de referencia utilizadas para la corrección de la recuperación deberán cumplir los requisitos establecidos en el punto 7.2.

#### 7.1.2.2. Calibración con muestras de referencia

Como alternativa podrá utilizarse una curva de calibración preparada, como mínimo, a partir de cuatro muestras de referencia (véase el punto 7.2.4): una matriz en blanco y tres muestras de referencia de 0,5, 1 y 2 veces el contenido máximo o el umbral de intervención, lo que evita tener que corregir en función del blanco y de la recuperación, si las propiedades de la matriz de las muestras de referencia se corresponden con las de las muestras desconocidas. En este caso, la respuesta correspondiente a dos tercios del contenido máximo (véase el punto 7.3) puede calcularse directamente de estas muestras y utilizarse como valor de corte. Para el control de las muestras que superan los umbrales de intervención, podrá tomarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los mismos.

### 7.1.3. Determinación por separado de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas

Los extractos pueden dividirse en fracciones que contengan PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas, de manera que se puede obtener una indicación separada de niveles de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas (en EQB). Se utilizará preferiblemente una curva de calibración patrón del PCB 126 para evaluar los resultados de la fracción que contenga PCB similares a las dioxinas.



#### 7.1.4. Recuperaciones aparentes de los bioensayos

La “recuperación aparente de los bioensayos” se calculará a partir de muestras de referencia adecuadas con patrones de congéneres representativos próximos al contenido máximo o al umbral de intervención y expresados en porcentaje del valor EQB en comparación con el nivel de EQT. Según el tipo de ensayo y el esquema de FET utilizados <sup>(13)</sup>, las diferencias entre el FET y la REP para los PCB similares a las dioxinas pueden producir una baja recuperación aparente de PCB similares a las dioxinas, en comparación con las PCDD/PCDF. Por tanto, si se determinan por separado las PCDD/PCDF y los PCB similares a las dioxinas, las recuperaciones aparentes de los bioensayos serán: para los PCB similares a las dioxinas, del 20 % al 60 %; para las PCDD/PCDF, del 50 % al 130 % (si se emplea la curva de calibración TCDD). La contribución de los PCB similares a las dioxinas a la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas puede variar entre diferentes matrices y muestras, por lo que las recuperaciones aparentes de los bioensayos para la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas reflejan estos intervalos y se situarán entre el 30 % y el 130 %. Cualquier modificación sustancial para la legislación de la Unión de los FET revisados de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas exige revisar estos intervalos.

#### 7.1.5. Control de la recuperación para la limpieza

La pérdida de compuestos durante la fase de limpieza deberá comprobarse durante el procedimiento de validación. Una muestra en blanco enriquecida con una mezcla de diferentes congéneres se someterá a limpieza (n = 3 por lo menos) y la recuperación y la variabilidad se comprobarán mediante un método de confirmación. La recuperación deberá hallarse entre el 60 % y el 120 %, especialmente en el caso de los congéneres que contribuyen con más del 10 % al EQT en varias mezclas.

#### 7.1.6. Límite de notificación

Al notificar los valores EQB, se determinará un límite de notificación a partir de muestras de matriz pertinentes que incluyan patrones de congéneres tipo, y no a partir de la curva de calibración de los patrones a causa de la falta de precisión del intervalo inferior de la curva. Se tendrán en cuenta los efectos de la extracción y la limpieza. El límite de notificación se establecerá, como mínimo, en el triple del de los ensayos en blanco.

### 7.2. Utilización de muestras de referencia

7.2.1. Las muestras de referencia deberán representar la matriz de la muestra, las pautas de congénere y los intervalos de concentración de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas en torno al contenido máximo o al umbral de intervención.

7.2.2. En cada serie de ensayos se incluirán una matriz en blanco (y si no es posible, un ensayo en blanco) y una muestra de referencia con contenido máximo o en el umbral de intervención. Estas muestras deberán extraerse y analizarse al mismo tiempo y en condiciones idénticas. Como garantía de que el ensayo es adecuado, la muestra de referencia deberá presentar una respuesta claramente superior a la de la muestra en blanco. Esas muestras pueden usarse para la corrección del blanco y de la recuperación.

7.2.3. Las muestras de referencia elegidas para corregir la recuperación serán representativas de las muestras de ensayo, lo que significa que las pautas de congénere no pueden dar lugar a una subestimación de los contenidos.

7.2.4. Deberán incluirse otras muestras de referencia de, por ejemplo, 0,5 y 2 veces el contenido máximo o el umbral de intervención, a fin de demostrar el correcto funcionamiento del ensayo en el intervalo pertinente para el control del contenido máximo o del umbral de intervención. Combinadas, estas muestras pueden utilizarse para calcular los EQB en las muestras de ensayo (véase el punto 7.1.2.2).

### 7.3. Determinación de los valores de corte

Deberá establecerse la relación entre los resultados bioanalíticos en EQB y los resultados del método de confirmación en EQT, por ejemplo, mediante experimentos de calibración ajustados por matrices, con muestras de referencia enriquecidas a 0, 0,5, 1 y 2 veces el contenido máximo, y con seis repeticiones de cada nivel (n = 24). Los factores de corrección (del blanco y de la recuperación) pueden calcularse a partir de esta relación, pero se verificarán con arreglo al punto 7.2.2.

<sup>(13)</sup> Los requisitos actuales se basan en los FET publicados en: M. Van den Berg *et al.*, *Toxicol Sci* 93 (2), pp. 223–241 (2006).

Se establecerán valores de corte para decidir si una muestra es conforme a los contenidos máximos o para controlar los umbrales de intervención, si procede, con los respectivos contenidos máximos o umbrales de intervención fijados para las PCDD/PCDF y los PCB similares a las dioxinas por separado, o para la suma de los tres. Estos valores de corte representan el criterio de valoración *más bajo* de la distribución de los resultados bioanalíticos (corregidos en función del blanco y de la recuperación) correspondientes al límite de decisión del método de confirmación con un nivel de confianza del 95 %, lo que implica un porcentaje de falsos negativos < 5 %, y con una  $RSD_R < 25$  %. El límite de decisión del método de confirmación es el contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida.

El valor de corte (en EQB) puede calcularse con arreglo a uno de los métodos establecidos en los puntos 7.3.1, 7.3.2 y 7.3.3 (véase la figura 1).

7.3.1. Uso de la banda inferior del intervalo de predicción del 95 % en el límite de decisión del método de confirmación:

$$\text{Valor de corte} = EQB_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

donde:

$EQB_{LD}$	el EQB correspondiente al límite de decisión del método de confirmación es el contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida
$s_{y,x}$	desviación estándar residual
$t_{\alpha, f=m-2}$	factor t de Student ( $\alpha = 5$ %, $f =$ grados de libertad, unilateral)
$m$	número total de puntos de calibración (índice $j$ )
$n$	número de repeticiones en cada nivel
$x_i$	concentración de la muestra (en EQT) del punto de calibración $i$ determinada por un método de confirmación
$\bar{x}$	media de las concentraciones (en EQT) de todas las muestras de calibración

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \quad \text{parámetro de suma de cuadrados; } i: \text{ índice del punto de calibración } i$$

7.3.2. Cálculo a partir de resultados bioanalíticos (corregidos en función del blanco y de la recuperación) de múltiples análisis de muestras ( $n \geq 6$ ) contaminadas en el límite de decisión del método de confirmación, como valor *inferior* de la distribución de los datos en la correspondiente media de EQB:

$$\text{Valor de corte} = EQB_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

donde:

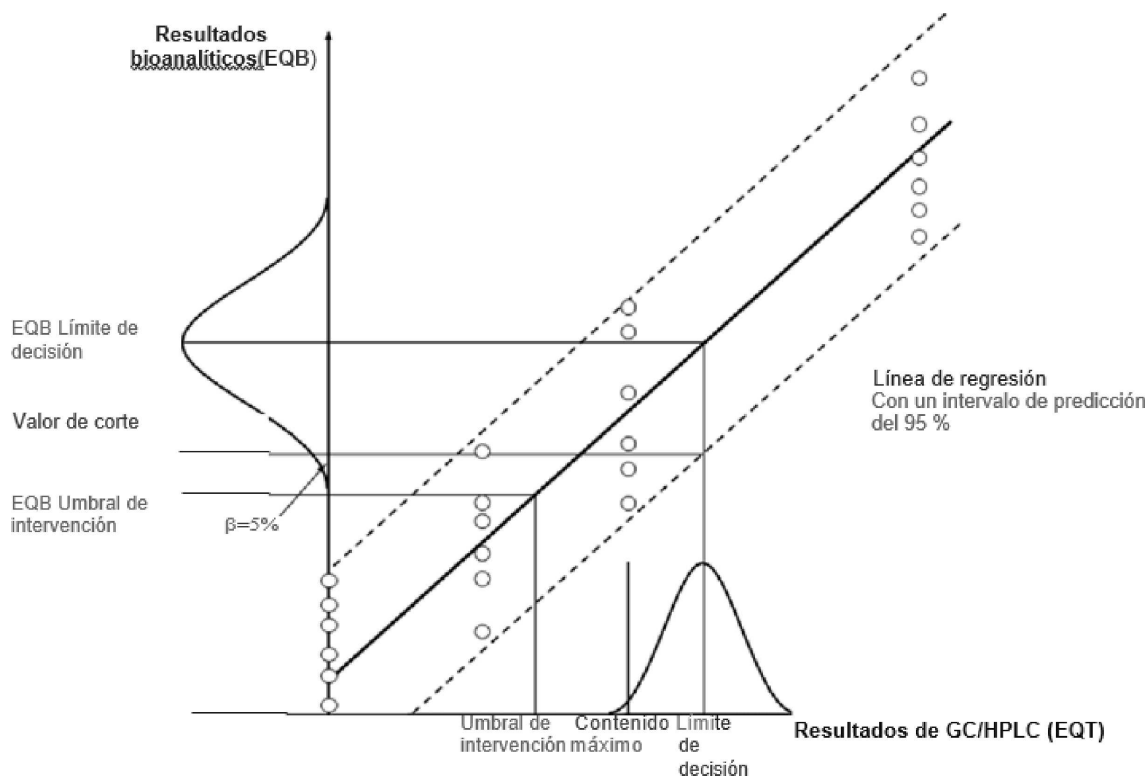
$SD_R$	desviación estándar de los resultados de los bioensayos en $EQB_{DL}$ , medidos en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio
--------	---

7.3.3. Cálculo como valor medio de los resultados bioanalíticos (en EQB, corregidos en función del blanco y de la recuperación) de múltiples análisis de muestras ( $n \geq 6$ ) contaminadas a dos tercios del contenido máximo o del umbral de intervención, pues se observa que este contenido se halla en torno al valor de corte determinado con arreglo al punto 7.3.1 o al punto 7.3.2:

Cálculo de los valores de corte con un nivel de confianza del 95 %, lo que implica un porcentaje de falsos negativos < 5 %, y con una  $RSD_R < 25$  %:

- 1) A partir de la banda *inferior* del intervalo de predicción del 95 % en el límite de decisión del método de confirmación.
- 2) A partir de múltiples análisis de muestras ( $n \geq 6$ ) contaminadas en el límite de decisión del método de confirmación, como el valor *inferior* de la distribución de los datos (representado en la figura 1 por una curva en forma de campana) en la correspondiente media de EQB.

Figura 1



#### 7.3.4. Restricciones de los valores de corte:

Los valores de corte basados en el EQB y calculados a partir de la  $RSD_R$  obtenida durante la validación utilizando un reducido número de muestras con diferentes pautas de matriz o de congéneres pueden ser superiores a los contenidos máximos o umbrales de intervención basados en EQT, pues así se alcanza más precisión que en los análisis sistemáticos cuando hay que controlar un espectro desconocido de posibles pautas de congéneres. En tales casos, los valores de corte se calcularán a partir de una  $RSD_R = 25\%$ , o, mejor, de dos tercios del contenido máximo o del umbral de intervención.

#### 7.4. Características de funcionamiento

- 7.4.1. Puesto que en los métodos bioanalíticos no pueden utilizarse patrones internos, deberán efectuarse ensayos de la repetibilidad de los métodos bioanalíticos para obtener datos sobre la desviación estándar en una serie de ensayos y entre las mismas series. La repetibilidad debe ser inferior al 20 %, y la reproducibilidad intralaboratorio inferior al 25 %, sobre la base de los niveles calculados en EQB tras la corrección en función del blanco y de la recuperación.
- 7.4.2. Como parte del proceso de validación, tendrá que demostrarse que los ensayos permiten discriminar entre una muestra en blanco y un contenido en el valor de corte, de modo que puedan identificarse las muestras con contenido superior al correspondiente valor de corte (véase el punto 7.1.2).
- 7.4.3. Deberán identificarse claramente los compuestos objeto de estudio, las posibles interferencias y los contenidos máximos tolerables de blanco.
- 7.4.4. La desviación estándar de la respuesta o la concentración calculada a partir de la respuesta (solo posible en el intervalo de trabajo) de una determinación por triplicado de un extracto de muestra no podrá ser superior al 15 %.
- 7.4.5. Los resultados no corregidos de la muestra o las muestras de referencia expresados en EQB (en blanco y en el contenido máximo o umbral de intervención) se utilizarán para evaluar el funcionamiento del método bioanalítico durante un período de tiempo constante.

- 7.4.6. Los ensayos en blanco y cada tipo de muestras de referencia se registrarán en fichas de control y se comprobarán para verificar que el análisis cumple los requisitos de funcionamiento; los ensayos en blanco, en particular, con respecto a la requerida diferencia mínima con el extremo inferior del intervalo de trabajo, y las muestras de referencia, en cuanto a la reproducibilidad intralaboratorio. Los ensayos en blanco se controlarán de modo que se eviten los falsos negativos al sustraer los valores.
- 7.4.7. Los resultados de los métodos de confirmación de muestras sospechosas y entre el 2 % y el 10 % de las muestras conformes (mínimo de veinte muestras por matriz) se recopilarán y utilizarán para evaluar el funcionamiento del método de cribado y la relación entre EQB y EQT. Esta base de datos puede utilizarse para evaluar de nuevo los valores de corte aplicables a las muestras sistemáticas de las matrices validadas.
- 7.4.8. También se puede demostrar el funcionamiento satisfactorio del método participando en ensayos interlaboratorios. Los resultados de las muestras analizadas en ensayos interlaboratorios que cubran un intervalo de concentración de hasta, por ejemplo, dos veces el contenido máximo, podrán tenerse en cuenta para evaluar el porcentaje de falsos negativos, una vez que un laboratorio haya demostrado su correcto funcionamiento. Las muestras cubrirán los patrones de congéneres más frecuentes que representen diversas fuentes.
- 7.4.9. Durante los incidentes, se pueden volver a evaluar los valores de corte, para reflejar la matriz y los patrones de congéneres específicos de ese mismo incidente.

## 8. Comunicación de los resultados

### 8.1. Métodos de confirmación

- 8.1.1. Los resultados del análisis incluirán los contenidos de los congéneres individuales de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas y se indicarán como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de incluir el máximo de información posible en la comunicación de los resultados, lo que permitirá así interpretarlos en función de los requisitos específicos.
- 8.1.2. En el informe se indicará el método utilizado para la extracción de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas.
- 8.1.3. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno cuando estén fuera del intervalo mencionado en el punto 6.2.5 o se supere el contenido máximo (en este caso, los porcentajes de recuperación de uno de los dos análisis duplicados), así como en otros casos cuando se solicite.
- 8.1.4. Puesto que, al decidir sobre la conformidad de una muestra, se ha de tener en cuenta la incertidumbre de medida expandida, también se indicará este parámetro. Así pues, los resultados analíticos deberán expresarse como  $x \pm U$ , donde  $x$  es el resultado analítico y  $U$  es la incertidumbre de medida expandida, aplicando un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %. Si se determinan por separado las PCDD/PCDF y los PCB similares a las dioxinas, para establecer su suma se utilizará la suma de la incertidumbre expandida estimada de los resultados analíticos obtenidos por separado de cada uno de ellos.
- 8.1.5. Los resultados deberán expresarse en las mismas unidades y, como mínimo, con el mismo número de cifras significativas que los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE.

### 8.2. Métodos bioanalíticos de cribado

- 8.2.1. El resultado del cribado se expresará como “conforme” o “presuntamente no conforme” (“sospechoso”).
- 8.2.2. Además, podrá darse un resultado indicativo de PCDD/PCDF o PCB similares a las dioxinas expresado en EQB, y no en EQT.
- 8.2.3. Las muestras con contenido “inferior al límite de notificación” se indicarán como tales. Las muestras cuya respuesta sea superior al intervalo de trabajo se notificarán como muestras que “superan el intervalo de trabajo” y el contenido correspondiente al límite superior del intervalo de trabajo se expresará en EQB.
- 8.2.4. Para cada tipo de matriz de la muestra, el informe mencionará el contenido máximo o el umbral de intervención en el que se basa la evaluación.

- 8.2.5. El informe mencionará el tipo de ensayo realizado, sus principios básicos y el tipo de calibración.
- 8.2.6. En el informe se indicará el método utilizado para la extracción de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas.
- 8.2.7. En el caso de las muestras presuntamente no conformes, el informe debe incluir una nota sobre las medidas que deben tomarse. La concentración de PCDD/PCDF y de la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas en esas muestras con contenidos elevados debe determinarse o confirmarse mediante un método de confirmación.
- 8.2.8. Los resultados no conformes únicamente se notificarán a partir de análisis de confirmación.
- 8.3. *Métodos fisicoquímicos de cribado*
- 8.3.1. El resultado del cribado se expresará como “conforme” o “presuntamente no conforme” (“sospechoso”).
- 8.3.2. Para cada tipo de matriz de la muestra, el informe mencionará el contenido máximo o el umbral de intervención en el que se basa la evaluación.
- 8.3.3. Además, podrán indicarse los contenidos de los congéneres individuales de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas, así como los valores EQT, como límite inferior, límite superior y límite intermedio. Los resultados deberán expresarse en las mismas unidades y, como mínimo, con el mismo número de cifras significativas que los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE.
- 8.3.4. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno cuando estén fuera del intervalo mencionado en el punto 6.2.5 o se supere el contenido máximo (en este caso, los porcentajes de recuperación de uno de los dos análisis duplicados), así como en otros casos cuando se solicite.
- 8.3.5. El informe mencionará el método GC-MS aplicado.
- 8.3.6. En el informe se indicará el método utilizado para la extracción de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas.
- 8.3.7. En el caso de las muestras presuntamente no conformes, el informe debe incluir una nota sobre las medidas que deben tomarse. La concentración de PCDD/PCDF y de la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas en esas muestras con contenidos elevados debe determinarse o confirmarse mediante un método de confirmación.
- 8.3.8. La no conformidad únicamente se decidirá después de un análisis de confirmación.

### CAPÍTULO III

#### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y REQUISITOS APLICABLES A LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS EN EL CONTROL OFICIAL DE LOS CONTENIDOS DE PCB NO SIMILARES A LAS DIOXINAS EN LOS PIENSOS

##### 1. **Ámbito de aplicación**

Los requisitos establecidos en el presente capítulo se aplicarán al análisis de piensos realizado para el control oficial de los contenidos de PCB no similares a las dioxinas en lo que respecta a la preparación de las muestras y los requisitos analíticos con otros fines reglamentarios, incluidos los controles llevados a cabo por el explotador de la empresa de piensos para garantizar el cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 1831/2005.

##### 2. **Métodos de detección aplicables**

Cromatografía de gases con detección por captura electrónica (GC/ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS o métodos equivalentes.

##### 3. **Identificación y confirmación de los analitos de interés**

- 3.1. Tiempo relativo de retención en relación con patrones internos o patrones de referencia (desviación tolerable de  $\pm 0,25$  %).

3.2. Separación por cromatografía de gases de los PCB no similares a las dioxinas de sustancias interfirientes, especialmente los PCB que eluyen conjuntamente, sobre todo si los contenidos de las muestras están dentro de los límites legales y debe confirmarse la no conformidad <sup>(13)</sup>.

3.3. Requisitos para las técnicas de GC-MS

Control de al menos el siguiente número de iones moleculares o iones característicos del agregado molecular:

- a) dos iones específicos en el caso de la HRMS,
- b) tres iones específicos en el caso de la LRMS,
- c) dos iones precursores específicos, cada uno con un ion producto de transición específico en el caso de MS-MS.

Tolerancias máximas permitidas para las relaciones de abundancia relativas a fragmentos de masa seleccionados:

Desviación relativa de la relación de abundancia de los fragmentos de masa seleccionados respecto de la abundancia teórica o el patrón de calibración para el ion objetivo (el ion más abundante controlado) y el ion o los iones cualificadores:  $\pm 15\%$ .

3.4. Requisitos para las técnicas de GC-ECD

Los resultados que superen el contenido máximo se confirmarán mediante dos columnas de GC con fases estacionarias de polaridad diferente.

4. **Demostración del funcionamiento del método**

El funcionamiento del método deberá validarse en el intervalo del contenido máximo (de 0,5 a 2 veces el contenido máximo), con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos (véanse los requisitos de precisión intermedia en el punto 9).

5. **Límite de cuantificación**

La suma de los límites de cuantificación <sup>(14)</sup> de los PCB no similares a las dioxinas no deberá superar un tercio del contenido máximo <sup>(15)</sup>.

6. **Control de calidad**

Controles en blanco a intervalos regulares, análisis de muestras enriquecidas, muestras para el control de la calidad y participación en estudios interlaboratorios con las matrices pertinentes.

7. **Control de la recuperación**

7.1. Se utilizarán patrones internos adecuados con propiedades fisicoquímicas comparables a las de los analitos de interés.

7.2. Adición de patrones internos:  
se añaden a los productos (antes del proceso de extracción y limpieza).

7.3. Requisitos para los métodos que utilizan los seis congéneres de PCB no similares a las dioxinas marcados con isótopos:

- a) se corregirán los resultados en función de la recuperación de los patrones internos;
- b) la recuperación de los patrones internos marcados con isótopos deberá situarse entre el 60 % y el 120 %;
- c) son aceptables recuperaciones superiores o inferiores de congéneres cuya contribución a la suma de los PCB no similares a las dioxinas sea inferior al 10 %.

<sup>(13)</sup> Entre los congéneres que suelen eluir conjuntamente figuran, por ejemplo, PCB 28/31, PCB 52/69 y PCB 138/163/164. En los análisis por GC-MS también hay que tener en cuenta posibles interferencias de fragmentos de congéneres más clorados.

<sup>(14)</sup> Deberán aplicarse, cuando proceda, los principios que se describen en el "Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>).

<sup>(15)</sup> Es altamente recomendable tener una contribución del contenido de blanco de reactivo inferior al contenido de un contaminante en una muestra. Corresponde al laboratorio controlar la variación de contenidos de blanco, en particular si esos contenidos se restan.

- 7.4. Requisitos para los métodos que no utilizan los seis patrones internos marcados con isótopos u otros patrones internos:
- se controlará la recuperación de los patrones internos en cada muestra;
  - la recuperación de los patrones internos deberá situarse entre el 60 % y el 120 %;
  - se corregirán los resultados en función de la recuperación de los patrones internos.
- 7.5. Las recuperaciones de congéneres no marcados deberán comprobarse por medio de muestras enriquecidas o de muestras de control de calidad con concentraciones en el intervalo del contenido máximo. Serán aceptables para estos congéneres recuperaciones situadas entre el 60 % y el 120 %.

#### 8. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2017/625, los laboratorios deberán estar acreditados por un organismo reconocido que opere de conformidad con la Guía ISO/IEC 58, de modo que esté garantizado que aplican un aseguramiento de la calidad analítica. Dicha acreditación deberá efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025. Además, deberán aplicarse los principios que se describen en las orientaciones técnicas para la estimación de la incertidumbre de medida y los límites de cuantificación para el análisis de PCB <sup>(16)</sup>.

#### 9. Características de funcionamiento: criterios para la suma de PCB no similares a las dioxinas en el contenido máximo:

	Espectrometría de masas con dilución isotópica (*)	Otras técnicas
Veracidad	- 20 % a + 20 %	- 30 % a + 30 %
Precisión intermedia (RSD)	≤ 15 %	≤ 20 %
Diferencia entre el cálculo del límite superior y del límite inferior	≤ 20 %	≤ 20 %

(\*) Es preciso utilizar los seis análogos marcados con <sup>13</sup>C como patrones internos.

#### 10. Comunicación de los resultados

- 10.1. Los resultados del análisis incluirán los contenidos de los congéneres individuales de PCB no similares a las dioxinas y la suma de ellos, y se indicarán como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de incluir el máximo de información posible en la comunicación de los resultados, lo que permitirá así interpretarlos en función de los requisitos específicos.
- 10.2. El informe indicará el método utilizado para la extracción de PCB.
- 10.3. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno en caso de que estén fuera del intervalo mencionado en el punto 7 o de que se supere el contenido máximo, así como en otros casos cuando se solicite.
- 10.4. Puesto que, al decidir sobre la conformidad de una muestra, se ha de tener en cuenta la incertidumbre de medida expandida, también se indicará ese parámetro. Así pues, los resultados analíticos deberán expresarse como  $x \pm U$ , donde  $x$  es el resultado analítico y  $U$  es la incertidumbre de medida expandida, aplicando un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %.
- 10.5. Los resultados deberán expresarse en las mismas unidades y, como mínimo, con el mismo número de cifras significativas que los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE.

<sup>(16)</sup> Véase la nota a pie de página n.º 9.

## B. NORMAS EN

Para la aplicación del artículo 34, apartado 2, letra a), del Reglamento (UE) 2017/625 son pertinentes las siguientes normas EN:

EN 17194: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de deoxivalenol, aflatoxina B1, fumonisina B1 y B2, toxinas T-2 y HT-2, zearalenona y ocratoxina A en materias primas para piensos y los piensos compuestos por LC-MS/MS.

EN 17270: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de la teobromina en piensos y piensos compuestos, incluidos los ingredientes derivados del cacao, mediante cromatografía líquida.

EN 17504: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de gopipol en semillas de algodón y piensos mediante LC-MS/MS.

EN 17362: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de pentaclorofenol (PCP) en materias primas para piensos y piensos compuestos por LC-MS/MS.

EN 16279: Piensos para animales. Determinación del contenido de fluoruro tras tratamiento con ácido clorhídrico mediante método de electrodo sensible a los iones (ISE).

EN 17053: Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de elementos traza, metales pesados y otros elementos en los alimentos para animales por ICP-MS (multimétodo).

EN 15550 Alimentos para animales. Métodos de muestreo y análisis. Determinación de cadmio y plomo por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GF-AAS) tras digestión a presión.

EN 16206 Alimentos para animales. Determinación de arsénico mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruro (HGAAS) tras digestión a presión por microondas (extracción con ácido nítrico al 65 % y peróxido de hidrógeno al 30 %).

EN 16277 Alimentos para animales. Determinación de mercurio mediante espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS) tras digestión a presión con microondas (extracción con ácido nítrico al 65 % y peróxido de hidrógeno al 30 %).

EN 16278 Alimentos para animales. Determinación de arsénico inorgánico mediante generación de hidruro por espectrometría de absorción atómica (HG-AAS) tras extracción por microondas y separación mediante extracción en fase sólida (SPE).

EN 17374 Alimentos para animales. Métodos de toma de muestras y análisis. Determinación de arsénico inorgánico en alimentos para animales mediante HPLC de intercambio aniónico-ICP-MS.».

---



## ANEXO VI

## «ANEXO VII

**MÉTODO DE CÁLCULO DEL VALOR ENERGÉTICO DE LOS PIENSOS PARA AVES DE CORRAL**

## 1. MÉTODO DE CÁLCULO Y EXPRESIÓN DEL VALOR ENERGÉTICO

El valor energético de los piensos compuestos para aves de corral debe calcularse según la fórmula que figura más abajo, sobre la base de los porcentajes de determinados componentes analíticos de los piensos. Este valor ha de expresarse en megajulios (MJ) de energía metabolizable (EM), corregida en nitrógeno, por kilogramo de pienso compuesto:

$\text{MJ/kg de EM} = 0,1551 \times \% \text{ proteína bruta} + 0,3431 \times \% \text{ grasa bruta} + 0,1669 \times \% \text{ almidón} + 0,1301 \times \% \text{ azúcar total}$   
(expresada en sacarosa).

## 2. TOLERANCIAS APLICABLES A LOS VALORES DECLARADOS

Si la inspección oficial pone de manifiesto una discrepancia (valor energético del pienso aumentado o reducido) entre el resultado de la inspección y el valor energético declarado, se aplicará una tolerancia de 0,4 MJ/kg de EM.

## 3. EXPRESIÓN DEL RESULTADO

El resultado obtenido tras aplicar la fórmula anteriormente indicada se expresará con un decimal.

## 4. MÉTODOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS

El muestreo del pienso compuesto y la determinación del contenido de los compuestos analíticos indicados en el método de cálculo deben realizarse de conformidad, respectivamente, con los métodos comunitarios de muestreo y los métodos comunitarios de análisis para el control oficial de los piensos.

Han de aplicarse:

- para la determinación del contenido de grasa bruta: el procedimiento B del método para la determinación de la materia grasa bruta, establecido en la parte G del anexo III;
- para la determinación del contenido de almidón: el método polarimétrico establecido en la parte K del anexo III.

**MÉTODO DE CÁLCULO DEL VALOR ENERGÉTICO DE LAS MATERIAS PRIMAS PARA PIENSOS Y LOS PIENSOS COMPUESTOS PARA GATOS Y PERROS**

El valor energético de las materias primas para piensos y los piensos compuestos para gatos y perros debe calcularse de conformidad con la norma EN 16967: Alimentos para animales. Métodos para la toma de muestra y el análisis. Ecuaciones predictivas para energía metabolizable en materias primas para piensos y alimentos compuestos (alimentos para mascotas) para gatos y perros, incluyendo alimentos dietéticos.».