371L0393

20. 12. 71 Diario Oficial de las Comunidades Europeas Nº L 279/7

SEGUNDA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 18 de noviembre de 1971

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

(71/393/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tradado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

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

Considerando que la Directiva mencionada prevé que los controles oficiales de los alimentos para animales para comprobar si se cumplen las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas relativas a la calidad y la composición de los alimentos para animales deben seguir métodos de toma de muestras y métodos de análisis comunitarios;

Considerando que la Directiva nº 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971 (2), ha establecido ya determinados métodos de análisis comunitarios; que, habida cuenta del estado de los trabajos efectuados desde entonces, es conveniente adoptar una segunda serie de métodos;

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

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales, respecto de su contenido en humedad, bases nitrogenadas, volátiles, fósforo total y materias grasas brutas se efectúen de acuerdo con los métodos descritos en el Anexo de la presente Directiva.

Serán aplicables a los métodos descritos en el Anexo de la presente Directiva las disposiciones generales que figuran en la Parte 1 del Anexo (Introducción) de la Primera Directiva nº 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971, por la que se establecen métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales.

Artículo 2

Los Estados miembros aplicarán, a más tardar el 1 de enero de 1973, las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 18 de noviembre de 1971.

Por la Comisión

El Presidente

Franco M. MALFATTI

(1) DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

(2) DO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.

ANEXO

1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

1. Objetivo y ámbito de aplicación

El método permite determinar el contenido en humedad de los alimentos para animales. No se refiere al análisis de los productos lácteos como alimentos simples de animales, al análisis de las sustancias minerales y de las mezclas esencialmente compuestas por sustancias minerales, ni al análisis de las semillas y frutos oleaginosos definidos en el Reglamento (CEE) nº 136/66/CEE Consejo, de 22 de septiembre de 1966, por el que se establece una organización común de mercados en el sector de las materias grasas (1).

La determinación del contenido en humedad de las semillas y frutos oleaginosos se regula en el Anexo III del Reglamento (CEE) nº 1470/68 de la Comisión, de 23 de septiembre de 1968, relativo a la toma y reducción de muestras a la determinación del contenido en aceite, en impurezas y en humedad de las semillas oleaginosas (2).

2. Principio

La muestra se somete a desecación en las condiciones definidas, que varía en función de la naturaleza del alimento. La pérdida de masa se determina mediante pesada. Es necesario proceder a una predesecación cuando se trate alimentos sólidos que tengan un elevado contenido en humedad.

3. Equipo

3.1. Triturador construido de material que no absorba la humedad, fácil de limpiar, que permita un triturado rápido y uniforme sin provocar un recalentamiento sensible, evite al máximo el contacto con el aire exterior y cumpla los requisitos indicados en 4.1.1 y 4.1.2 (por ej., microtituradoras de martillos o de enfriamiento por agua, molinos de conos desmontables, trituradoras de movimiento lento o de discos dentados).

3.2. Balanza analítica, precisión 0,5 mg.

3.3. Recipientes secos de metal inoxidable o de cristal, provistos de tapadera que garantice un cierre hermético; superficie útil que permita obtener un reparto de la muestra del orden de 0,3 g por cm^2.

3.4. Estufa isoterma (± 1 °C) de calentamiento eléctrico, que garantice una regulación rápida de la temperatura y convenientemente ventilada (3).

3.5. Estufa de vacío, de calentamiento eléctrico regulable, provista de una bomba de aceite y de un dispositivo para la introdución de aire caliente deshidratado o de un deshidratante (por ej., óxido de calcio).

3.6. Desecador de placa de metal o de porcelana, gruesa, perforada, que contenga un deshidratante eficaz.

4. Método operativo

NB: Las operaciones descritas en este capítulo deben efectuarse inmeditamaente después de la apertura de los envases que contienen las muestras.

Los análisis deben efectuarse por lo menos por duplicado.

(1) DO nº 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.

(2) DO nº L 239 de 28. 9. 1968, p. 2.

(3) Para la desecación de los cereales y de las harinas, graños y sémolas, la estufa debe tener una capacidad calorífica tal que, regulada previamente a una temperatura de 13 °C, puede alcanzar de nuevo dicha temperatura en menos de 45 minutos después de la colocación del número máximo de muestras que deban secarse simultáneamente. Debe tener una ventilación tal que, secando durante dos horas, todas las muestras de trigo blando que pueda contener, los resultados presenten una diferencia inferior al 0,15 % con respecto a los resultados obtenidos después de cuatro horas de secado.

4.1. *Preparación*

4.1.1. *Alimentos excepto los mencionados en 4.1.2 y 4.1.3*

Tomar por los menos 50 g de la muestra. Si fuera necesario, triturarla o dividirla de forma adecuada para evitar cualquier variación del contenido en humedad (ver 6).

4.1.2. *Cereales y grañones*

Tomar por lo menos 50 g de la muestra. Moler en partículas de forma que por lo menos el 50 % pase por un tamiz de mallas de 0,5 mm y no queden más del 10 % sobre el tamiz de mallas redondas de 1 mm.

4.1.3. *Alimentos líquidos o pastosos, alimentos contituidos esencialmente por materias grasas*

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

4.2. *Desecación*

4.2.1. *Alimentos, excepto los mencionados en 4.2.2 y 4.2.3*

Tarar, con una precisión de 0,5 mg, un recipiente (3.3) provisto de tapadera. Pesar, con precisión de 1 mg, en el recipiente tarado 5 g aproximadamente de la muestra y repartirla uniformemente. Colocar el recipiente en la estufa previamente calentada 103 °C, con la tapadera levantada. Para evitar que la temperatura de la estufa descienda demasiado, introducir el recipiente en un tiempo mínimo. Dejar secar durante cuatro horas a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo la temperatura de 102 °C. Volver a colocar la tapadera sobre el recipiente, retirarlo de la estufa, dejar enfriar durante 30 a 45 minutos en el desecador (3.6) y pesar, con precisión de 1 mg.

En el caso de los alimentos constituidos esencialmente por materias grasas, efectuar una desecación complementaria de 30 minutos en la estufa a 103 °C. La diferencia entre las dos pesadas no deberá exceder del 0,1 % de humedad.

4.2.2. *Cereales, harinas, grañones y sémolas*

Tarar, con precisión de 0,5 mg, un recipiente (3.3) provisto de tapadera. Pesa, con precisión de 1 mg, en el recipiente tarado 5 g aproximadamente de la muestra triturada y repartirla unifomemente. Colocar el recipiente en la estufa previamente calentada a 130 °C, con la tapadera levantada. Para evitar que la temperatura de la estufa descienda demasiado, introducir el recipiente en un tiempo mínimo. Dejar secar durante dos horas a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo la temperatura de 130 °C. Volver a colocar la tapadera sobre el recipiente, retirarlo de la estufa, dejar enfriar de 30 a 45 minutos en el desecador (3.6) y pesar con una precisión de 1 mg.

4.2.3. *Piensos compuestos con un contenido mayor del 4 % de sacarosa o de lactosa: alimentos simples tales como algarrobos, productos de cereales hidrolizados, gérmenes de malta, peladuras de remolacha, solubles de pescado, azúcares; piensos compuestos con un contenido mayor del 25 % de sales minerales que contengan agua de cristalización*

Tarar, con precisión de 0,5 mg, un recipiente (3.3) provisto de tapadera. Pesar, con precisión de 1 mg, en el recipiente tarado 5 g aproximadamente de la muestra y repartirla uniformemente. Colocar el recipiente en la estufa de vacío (3.5) previamente calentada a una tempera-

tura de 80 a 85 °C, con la tapadera levantada. Para evitar que la temperatura de la estufa descienda en exceso, introducir el recipiente en un tiempo mínimo.

Llevar la presión a 100 Torrs y dejar secar a dicha presión durante cuatro horas, bien bajo una corriente de aire seco y caliente, bien mediante la utilización de un deshidratante (300 g aproximadamente para 20 muestras). En este último caso, interrumpir la conexión con la bomba de vacío cuando se haya alzanzado la presión establecida. Contar la duración del secado a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo la temperatura de 80 a 85 °C. A continuación, y con precaución, restablecer la presión atmosférica en la estufa. Abrir la estufa, cubrir inmediatamente el recipiente con su tapadera, retirar el recipiente de la estufa, dejar enfriar durante 30 a 45 minutos en el desecador (3.6) y pesar con precisión de 1 mg. Proceder a una desecación complementaria de 30 minutos en la estufa de vacío a la temperatura de 80 a 85 °C y pesar de nuevo. La diferencia entre las dos pesadas no deberá exceder del 0,1 % de humedada.

4.3. *Predesecación*

4.3.1. *Alimentos, excepto los mencionados en 4.3.2*

Los alimentos sólidos, de contenido en humedad elevado y que por tanto hacen difícil el triturado, deben predesecarse tal como se indica a continuación. Pesar, con precisión de 10 mg, 50 g de la muestra *no triturada* (si fuere necesario, puede efectuarse una división elemental, en el caso de alimentos comprimidos o aglomerados) en un recipiente apropiado (por ejemplo, placa de aluminio de 20 × 12 cm con un borde de 0,5 cm). Dejar secar en una estufa a temperatura de 60 a 70 °C, hasta que el contenido en humedad se reduzca a un valor comprendido entre el 8 y el 12 %. Retirar de la estufa, dejar enfriar al descubierto en el laboratorio durante una hora y pesar con una precisión de 10 mg. Triturar inmediatamente después, tal como se indica en 4.1.1 y efectuar la desecación como se indica en 4.2.1 o en 4.2.3, según la naturaleza del alimento.

4.3.2. Cereales

Las semillas con un índice de humedad inferior al 17 % deben predesecarse tal como se indica a continuación:

Pesar, con precisión de 10 mg, 50 g de la semilla *sin moler* en un recipiente adecuado (por ejemplo, placa de aluminio de 20 × 12 cm con un borde de 0,5 cm). Dejar secar en una estufa durante 5 a 7 minutos a una temperatura de 130 °C. Retirar de la estufa, dejar enfriar al descubierto en el laboratorio durante dos horas y pesar con precisión de 10 mg. Moler inmediatamente después, tal como se indica en 4.1.2 y efectuar la desecación como se indica en 4.2.2.

5. **Cálculo de los resultados**

El contenido en humedad, en porcentaje de muestra, se calcula con las fórmulas siguientes:

5.1. Desecación sin predesecación

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

donde:

E = masa inicial, en gramos, de la muestra,

m = masa, en gramos, de la muestra seca.

5.2. *Desecación con predesecación*

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

donde:

E = masa inicial, en gramos, de la muestra,

M = masa, en gramos de la muestra después de la predesecación,

M' = masa, en gramos, de la muestra después de triturada o molida,

m = masa, en gramos, de la muestra seca.

5.3 *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no deberá exceder del 0,2 % de humedad.

6. **Observación**

Cuando resulte necesario efectuar una trituración y ésta implique una variación del contenido en humedad del producto, los resultados del análisis relativo a los componentes del alimento deben convertirse con arreglo al contenido en humedad de la muestra inicial.

2. DETERMINACIÓN DE LAS BASES NITROGENADAS VOLÁTILES

A. POR MICRODIFUSIÓN

1. **Objetivo y ámbito de aplicación**

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

2. **Principio**

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

3. **Reactivos**

3.1. Solución al 20 % (p/v) de ádico tricloracético.

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

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

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

3.5. Acido sulfúrico 0,02 N.

4. **Equipo**

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

4.2. Celulas de Conway (v. esquema), de vidrio o de material plástico.

4.3. Microburetas, graduadas a 1/100 ml.

5. **Método operatorio**

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

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

Titular las bases volátiles en la solución de ácido bórico con ácido sulfúrico 0,02 N (3.5) empleando una microcubeta (4.3).

Efectuar *una prueba en blanco* aplicando el mismo método operatorio, sin la muestra que deba analizarse.

6. **Cálculo de los resultados**

1 ml de H_2SO_4 0,02 N corresponde a 0,34 mg de amoníaco.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

Repetibilidad

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

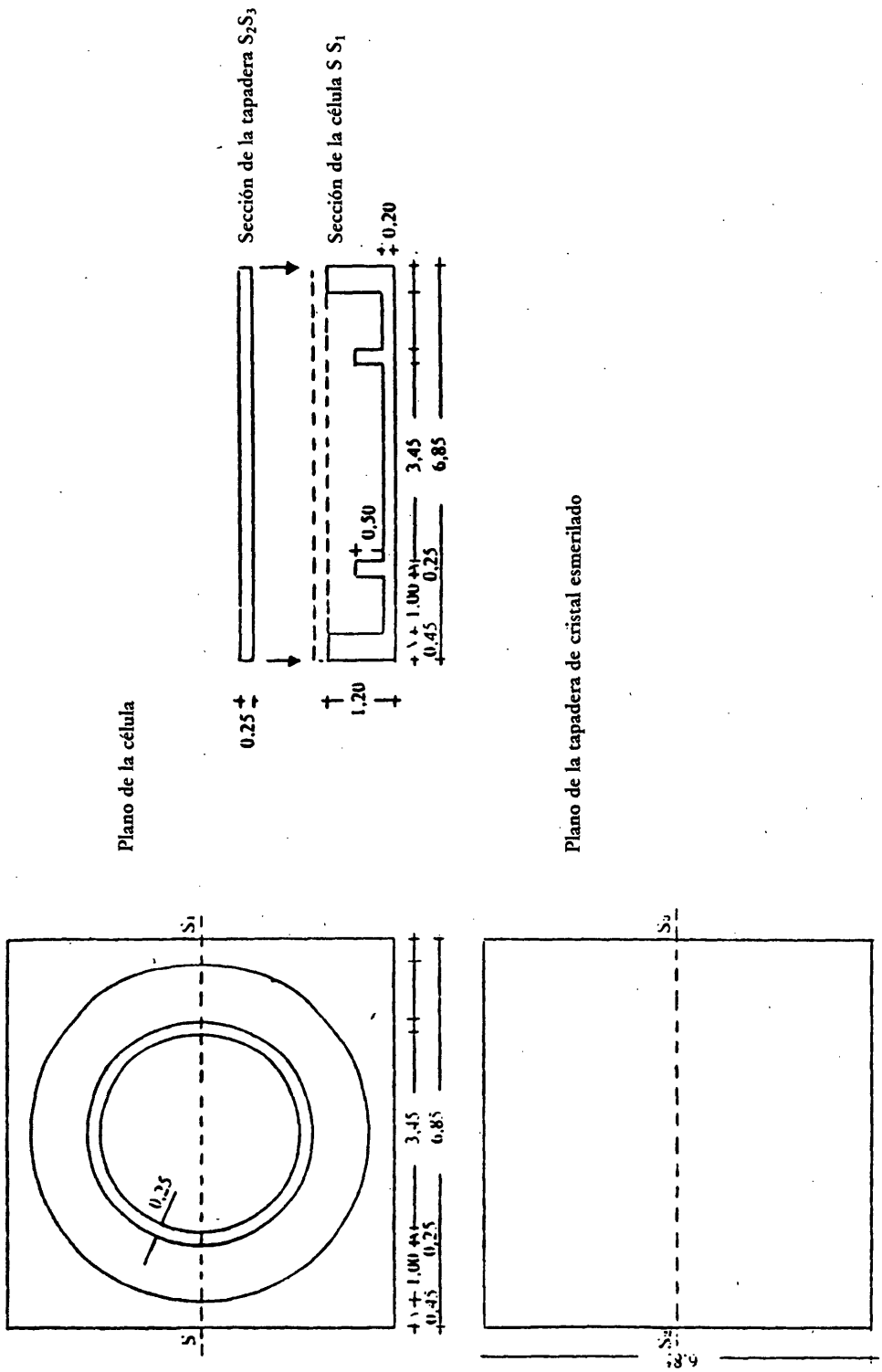
del 10 % en valor relativo para los contenidos en amoníaco inferiores al 1,0 %; 0,1 en valor absoluto para los contenidos en amoníaco iguales o superiores al 1,0 %.

7. **Observación**

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

CÉLULA DE CONWAY

Escala 1/1



B. POR DESTILACIÓN

1. Objetivo y ámbito aplicación

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

2. Principio

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

3. Reactivos

3.1. solución al 20 % (p/v) de ácido tricloracético.

3.2. Oxido de magnesio p.a.

3.3. Emulsión de antiespuma (por ej.: silicona).

3.4. Acido sulfúrico 0,1 N.

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

3.6. Solución al 0,3 % (p/v) de rojo de metilo en el etanol al 95-96 % (v/v).

4. Equipo

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

4.2 Aparato de destilación del tipo Kjeldahl.

5. Modo operatorio

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

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

Efectuar *un ensayo en blanco* aplicando el mismo método operatorio, sin la muestra que debe analizarse.

6. Cálculo de los resultados

1 ml de H_2SO_4 0,1 N corresponde a 1,7 mg de amoníaco.

Expresar el resultado en porcentaje de muestra.

Repetibilidad

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

3. DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO TOTAL

Método fotométrico

1. **Objetivo y ámbito de aplicación**

El método permite determinar el contenido en fósforo total de los alimentos para animales. 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 vía seca (para los alimentos orgánicos), bien por vía húmeda (para los compuestos minerales y los alimentos líquidos) y se pone en solución ácida. La solución de trata con el reactivo vanado-molíbdico. La densidad óptica de la solución amarilla así formada se mide en el espectrofotómetro de 430 nm.

3. **Reactivos**

3.1. Cabarnato de calcio p.a.

3.2. Ácido clorhídrico p.a., d: 1,1 (6 N aproximadamente).

3.3. Ácido nítrico p.a., d: 1,045.

3.4. Ácido nítrico p.a., d: 1,38 a 1,42.

3.5. Ácido sulfúrico p.a., d: 1,84.

3.6. Reactivo vanado-molíbdico: mezclar 200 ml de solución de heptamolibdato de amonio (3.6.1), 200 ml de solución de monovanadato de amonio (3.6.2) y 134 ml de ácido nítrico (3.4) en un matraz aforado de 1 l. Completar el volumen con agua.

3.6.1. Solución de heptamolibdato de amonio: Disolver en agua caliente 100 g de heptamolibdato de amonio p. a. $(NH_4)\ 6Mo_7\ O_{24} \cdot 4\ H_2O$. Añadir 10 ml de amoníaco (d : 0,91) y completar hasta 1 l con agua.

3.6.2. Solución de monovanadato de amonio: Disolver en 400 ml de agua caliente 2,35 g de monovanadato de amonio p.a. NH_4VO_3. Añadir lentamente y agitándolo al mismo tiempo 20 ml de ácido nítrico diluido (7 ml de HNO_3 (3.4) + 13 ml de H_2O) y completar a 1 l con agua.

3.7. Solución patrón de 1 mg de fósforo por ml: Disolver en el agua 4,387 g de dihidrogenofosfato de potasio p.a. KH_2PO_4. Completar hasta 1 l con agua.

4. **Equipo**

4.1. Crisoles de incineración, de cuarzo o porcelana.

4.2. Horno para barro eléctrico, provisto de un termostato regulado a 550 °C.

4.3. Matraz de Kjeldahl, 250 ml.

4.4. Matraces aforados y pipetas de precisión.

4.5. Espectrofotómetro.

4.6. Tubos de ensayo, diámetro: 16 mm aproximadamente, de esmerilado normalizado 14,5; capacidad: 25 a 30 ml.

5. **Método operatorio**

5.1. *Preparación de la solución*

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

5.1.1. *Caso general*

Pesar, con precisión de 1 mg, 1 g o más de la muestra. Introducir la muestra en un matraz de Kjeldahl, añadir 20 ml de ácido sulfúrico (3.5), agitar para impregnar completamente la materia de ácido y evitar que ésta se adhiera a las paredes del matraz, calentar y mantener durante 10 minutos en ebullición. Dejar enfriar ligeramente, añadir 2 ml de ácido nítrico (3.4), calentar suavemente, dejar enfriar ligeramente, añadir de nuevo un poco de ácido nítrico (3.4) y llevar a ebullición, añadir un poco de agua, transvasar el líquido a un matraz aforado de 500 ml enjuagando el matraz con agua caliente. Dejar enfriar, completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar.

5.1.2. *Muestras que contengan materias orgánicas y que 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 íntimamente la muestra con 1 g de carbonato de calcio (3.1). Calcinar en el horno a 550 °C ± 5 °C hasta obtener cenizas blancas o grises (una pequeña cantidad de carbón no crea molestias).

Transvasar las cenizas a un vaso de 250 ml. Añadir 20 ml de agua y de ácido clorhídrico (3.2) hasta que cese la efervescencia. Añadir a continuación 10 ml de ácido clorhídrico (3.2) en exceso. Llevar el vaso sobre un baño de arena y evaporar en seco para insolubilizar la sílice. Recuperar el residuo con 10 ml de ácido nítrico (3.3) y llevar a ebullición durante 5 minutos sobre el baño de arena, sin evaporar en seco. Transvasar el líquido a un matraz aforado de 500 ml enjuagando el vaso varias veces con agua caliente. Dejar enfriar, completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar.

5.2. *Desarrolo de la coloración y medida de la densidad óptica*

Diluir una parte alícuota del filtrado obtenido en 5.1.1 o 5.1.2 para obtener una concentración en fósforo que alcance como máximo 40 µg/ml. Introducir 10 ml de dicha solución en un tubo de ensayo (4.6) y añadir 10 ml del reactivo vanadomolíbdico (3.6). Homogeneizar y dejar reposar 10 minutos por lo menos a una temperatura de 20 °C. Medir la densidad óptica mediante el espectrofotómetro a 430 mm por comparación con una solución obtenida por adición de 10 ml del reactivo vanadomolíbdico (3.6) en 10 ml de agua.

5.3. *Curva de calibrado*

Preparar a partir de la solución de calibrado (3.7) soluciones que contengan respectivamente 5, 10, 20, 30 y 40 µg de fósforo por ml. Tomar 10 ml de cada una de dichas soluciones y añadir 10 ml del reactivo vanadomolíbdico (3.6). Homogeneizar y dejar reposar 10 minutos por lo menos a una temperatura de 20 °C. Medir las densidades ópticas en las condiciones indicadas en 5.2.

Trazar la curva de calibrado llevando a la ordenada los valores de la densidad óptica y a la abscisa las cantidades correspondientes de fósforo. La curva es lineal para las concentraciones comprendidas entre 0 y 40 µg/ml.

6. **Cálculo de los resultados**

Determinar la cantidad de fósforo de la toma de muestra refiriéndose a la curva de calibrado.

Expresar el resultado en porcentaje de muestra.

Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de las determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder del:

3 % en valor relativo para los contenidos en fósforo inferiores al 5 %;

0,15 en valor absoluto para los contenidos en fósforo iguales o superiores al 5 %.

4. DETERMINACIÓN DE LAS MATERIAS GRASAS BRUTAS

1. Objetivo y ámbito de aplicación

El método permite determinar el contenido en materias grasas brutas de los alimentos para animales. No se refiere al análisis de las semillas y frutos oleaginosos definidos en el Reglamento 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966. La determinación del contenido en aceite de dichos productos está regulada en el Anexo V del Reglamento (CEE) n° 1470/68 de la Comisión, de 23 de septiembre de 1968.

Se prevén dos procedimientos, en función de la naturaleza del alimento.

1.1. *Procedimiento A (extracto etéreo):* aplicado a todos los alimentos salvo a los mencionados en 1.2.

1.2. *Procedimiento B:* aplicado a los alimentos cuyas materias grasas no puedan ser extraidas totalmente por el éter dietílico sin hidrólisis previa, a los alimentos de oxígeno animal, gluten, pulpas de patata desecadas, residuos desecados de cervecería y de la destilería, levaduras desecadas, desechos de galletería, de pan y alimentos cocidos, productos lácteos y alimentos que contengan una elevada proporción de los mismos (al menos en 40 %) y a los piensos compuestos enriquecidos en grasas.

2. Principio

2.1. *Procedimiento A:* Las materias grasas se extraen con éter dietílico. El disolvente se elimina y el residuo se seca y se pesa.

2.2. *Procedimiento B:* La muestra se hidroliza en frío mediante ácido clorhídrico. La solución se enfría y se filtra. El residuo, lavado y secado, se somete a la extracción con éter dietílico según el procedimiento A.

3. Reactivos

3.1. Éter dietílico, anhidro, d: 0,720, 34,5 °C prácticamente exento de paróxidos.

3.2. Sulfato de sodio, p.a., anhidro.

3.3. Ácido clorhídrico 3 N.

3.4. Adyuvante de filtración, por ej. tierra de diatomeas, Hiflo-supercel.

3.5. Tetracloruro de carbono p.a.

4. Equipo

4.1. Extractor según Soxhlet o aparato equivalente.

4.2. Aparato de calentamiento a temperatura regulable, anti-deflagrante.

4.3. Estufa de desecación por vacío (menos de 100 Torrs).

5. Método operatorio

5.1. *Procedimiento A* (ver observación 7.1)

Pesar, con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra y mezclarlos con 2 a 3 g (o más, si fuere necesario) de sulfato de sodio anhidro (3.2). Introducir la mezcla en un cartucho de extracción exento de materias grasas y recubrir con un tampón de algodón desgrasado. (La mezcla puede hacerse, si llega el caso, en el cartucho.)

Colocar el cartucho en un extractor (4.1) y extraer durante seis horas mediante el éter dietílico (3.1). Si se emplea un extractor de Soxhlet, regular el calentamiento para obtener 15 sifonados por lo menos por hora. Recoger el extracto etéreo en un matraz seco, provisto de algunos fragmentos de piedra póme (1) y tarado.

(1) Sustituir los fragmentos de piedra pómez por partes de cristal cuando la materia grasa deba ser objeto de exámenes cualitativos posteriores.

Eliminar el éter por destilación y secar a continuación el residuo de evaporación durante una hora y media en la estufa de desecación al vacío (4.3) a temperatura de 75 °C. Enfriar en un desecador y pesar. Efectuar una segunda desecación durante 30 minutos para asegurarse de que el peso de la materia grasa se mantiene constante (la pérdida de peso debe ser inferior a 1 mg).

5.2. *Procedimiento B*

Pesar, con precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra (ver observación 7.2) e introducirlos en un vaso de 400 ml o en un erlenmeyer de 300 ml. Añadir 100 ml de ácido clorhídrido 3 N (3.3) y algunos fragmentos de piedra pómez. Volver a tapar el vaso con un cristal de reloj o dotar el erlenmeyer de un refrigerante de reflujo. Llevar la mezcla a ebullición suave, con una pequeña llama o una placa calorífera, y mantenerla durante una hora. Evitar que el producto se adhiera a las paredes del recipiente.

Enfriar y añadir una cantidad de adyuvante de filtración (3.4) suficiente para evitar cualquier pérdida de materia grasa al realizar la filtración. Filtrar sobre un papel de filtro doble humedecido, exento de materias grasas. Lavar el residuo con agua fría hasta que desaparezca la reacción ácida. Comprobar que el filtrado no contiene materias grasas. La presencia de éstas en el filtrado indica que debe efectuarse antes de la hidrólisis una extracción de la muestra con éter dietílico, según el procedimiento indicado en 5.1.

Colocar el papel de filtro doble que contiene el residuo sobre un cristal de reloj y secar durante una hora y media en la estufa a la temperatura de 95 a 98 °C.

Introducir el doble filtro y el residuo seco en el cartucho de extracción, extraer con éter dietílico y continuar el método operatorio tal como se indica en el párrafo segundo del punto 5.1.

6. **Cálculo de los resultados**

Expresar el resultado en porcentaje de muestra.

Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe rebasar el 0,3 % de materia grasa.

7. **Observaciones**

7.1. Para los productos de elevado contenido en materias grasas, difíciles de triturar o no apropiadas para la toma de una muestra reducida homogénea, proceder como se indica. Pesar, con precisión de 1 mg, 20 g de la muestra y mezclarlos con 10 g o más de sulfato de sodio anhidro (3.2). Proceder a la extracción con éter dietílico (3.1) como se indica en 5.1. Completar el extracto obtenido hasta 500 ml con un tetracloruro de carbono (3.5) y homogeneizar. Tomar 50 ml de la solución y colocarlos en un pequeño matraz seco, provisto de algunos fragmentos de piedra pómez (1) y tarado. Eliminar el disolvente mediante destilación, secar y continuar con el método del producto 5.1. Eliminar el disolvente del residuo de extracción que se encuentre en el cartucho y triturar el residuo con una finura de 1 mm. Colocar de nuevo el producto en el cartucho de extracción (no añadir sulfato de sodio), extraer mediante éter dietílico y continuar con el método operatorio tal como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

Calcular el resultado en porcentaje de muestra, teniendo en cuenta la parte alícuota empleada al realizar la primera extracción de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$(10\,a + b) \cdot 5$$

en la que:

a) = extracto etéreo en gramos de la parte alícuota, tras la primera extracción,

b) = extracto etéreo en gramos tras la segunda extracción.

7.2. La muestra de los productos pobres en materias grasas y puede aumentarse a 5 g.

---

(1) Sustituir los fragmentos de piedra pómez por perlas de cristal cuando la materia grasa debe ser objeto de exámenes cualitativos ulteriores.