

ORDEN de 16 de febrero de 2000 por la que se modifica el anexo del Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueban los Métodos Oficiales de Análisis de Piensos o Alimentos para Animales y sus primeras materias y el Real Decreto 1999/1995, de 7 de diciembre, relativo a los alimentos para animales destinados a objetivos de nutrición específicos.

Las Directivas 92/89/CEE, de 3 de noviembre ; 92/95/CEE, de 9 de noviembre, y 94/14/CE, de 29 de marzo ; 93/70/CEE, de 28 de julio; 93/117/CEE, de 17 de diciembre y 93/28/CEE, de 4 de junio, todas de la Comisión, por la que se establecen diversos métodos de análisis, fueron incorporadas al Ordenamiento Jurídico interno mediante Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueban los Métodos Oficiales de Análisis de Piensos o Alimentos para Animales y sus primeras materias.

La disposición final primera del Real Decreto 2257/1994, modificada por el Real Decreto 609/1999, de 16 de abril, habilita a los Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo para modificar, en el ámbito de sus respectivas competencias, el anexo de dicho Real Decreto, cuando ello sea consecuencia de la normativa comunitaria.

Asimismo la disposición adicional primera del Real Decreto 2068/1999, faculta al Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación para modificar la fecha que figura en la disposición transitoria única del Real Decreto 1999/1995, de 7 de diciembre, relativa a los alimentos para animales destinados a objetivos de nutrición específicos, cuando ello sea consecuencia de la normativa comunitaria.

Aprobadas las Directivas 1999/78/CE, de 27 de julio de 1999, por la que se modifica la Directiva 95/10/CE, de 7 de abril de 1995, por la que se fija el método de cálculo del valor energético de los alimentos para perros y gatos destinados a objetivos de nutrición específicos ; 1999/79/CE, de 27 de julio de 1999, que modifica la Tercera Directiva 72/199/CEE, de 27 de abril de 1972, por la que se determinan métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales, y 1999/76/CE, de 23 de julio de 1999, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para la determinación de Lasalocid sódico en los alimentos para animales, todas ellas de la Comisión, es preciso proceder a su incorporación, modificando en lo que es preciso los métodos actualmente vigentes como oficiales.

La presente Orden, que incorpora las citadas Directivas 1999/78/CE, 1999/79/CE y 1999/76/CE, se dicta al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.13 y 16 de la Constitución, que atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación general de la actividad económica y de la sanidad, respectivamente.

En su elaboración han sido consultadas las Comunidades Autónomas y los sectores afectados, asimismo, el proyecto ha sido sometido al correspondiente informe por la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria.

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo,

D I S P O N G O :

Artículo primero. Modificación del anexo del Real Decreto 2257/1994.

Se modifica el anexo del Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueban diversos Métodos Oficiales de Análisis de Piensos o Alimentos para Animales y sus primeras materias, de la siguiente forma:

1. Se sustituye el método 34(a).-Determinación del Almidón (método polarimétrico) por el que figura en el anexo de la presente Orden.

2. Se añaden los métodos para el cálculo del valor energético de los alimentos para perros y gatos destinados a objetivos de nutrición específicos y Lasalocid sódico que figuran en el anexo de la presente Orden.

Artículo segundo. Modificación del Real Decreto 1999/1995, de 7 de diciembre.

Se modifica la fecha que figura en la disposición transitoria única del Real Decreto 1999/1995, de 7 de diciembre, por la de 30 de marzo de 2002.

Disposición final única. Entrada en vigor.

La presente Orden entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el "Boletín Oficial del Estado".

Madrid, 16 de febrero de 2000.

ÁLVAREZ-CASCOS FERNÁNDEZ

Excmos. Sres. Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo.

ANEXO

34 (a). Determinación del almidón

MÉTODO POLARIMÉTRICO

1. Objetivos y campo de aplicación.

El método permite determinar el contenido en almidón y en productos de degradación de alto peso molecular del almidón de la alimentación animal con el objetivo de controlar el cumplimiento de la Directiva 86/174/CEE y la Directiva 96/25/CE.

2. Principio.

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

En la segunda, la muestra se extrae mediante el etanol al 40 por 100. Tras la acidificación del filtrado por el ácido clorhídrico, defecación y filtración, se mide el poder rotatorio en las mismas condiciones que cuando la primera determinación.

La diferencia entre ambas multiplicada por un factor común da como resultado el contenido en almidón de la muestra.

### 3. Reactivos.

3.1 Ácido clorhídrico al 25 por 100 (p/p), d: 1,126.

3.2 Ácido clorhídrico al 1,128 por 100 (p/v).

La concentración debe comprobarse mediante trituration con la ayuda de una solución de hidróxido de sodio 0,1 N en presencia de rojo de metilo al 0,1 por 100 (p/v) en el etanol al 94 por 100 (v/v).  
10 ml = 30,94 ml de NaOH 0,1 N.

3.3 Solución de Carrez I: Disolver en el agua 21,9 g de acetato de zinc  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  y 3 g de ácido acético glacal. Completar a 100 ml con agua.

3.4 Solución de Carrez II: Disolver en el agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio  $[K_4Fe(CN)_6]$  Completar a 100 ml con agua.

3.5 Etanol al 40 por 100 (v/v), de: 0,948 a 20 °C.

### 4. Equipo.

4.1 Erlenmeyer de 250 ml de esmerilado normalizado, con refrigerante de reflujo.

4.2 Polarímetro o sacarímetro.

### 5. Método operatorio.

#### 5.1 Preparación de la muestra.

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

5.2 Determinación del poder rotatorio total (P o S) (véase el punto 7.1).

Pesar, con 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 un buen reparto de la toma de muestras y añadir de nuevo 25 ml de ácido clorhídrico (punto 3.2).

Sumergir el matraz en un baño de agua hirviendo y, durante los tres primeros minutos siguientes, agitar enérgicamente y con regularidad para evitar la formación de aglomerados. La cantidad de agua del baño debe

ser suficiente para permitir mantener el baño en ebullición cuando el matraz esté sumergido en él. Este no podrá ser retirado del baño a lo largo de la agitación. Después de quince minutos exactamente, retirar el matraz del baño, añadir a ello 30 ml de agua fría y refrigerar inmediatamente hasta 20 °C.

Añadir a continuación 5 ml de solución de Carrez II (punto 3.4) y agitar de nuevo durante un minuto.

Completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar: Si el filtrado no está perfectamente limpido (lo que es poco frecuente), volver a comenzar el análisis empleando una cantidad mayor de las soluciones de Carrez I y II, por ejemplo 10 ml.

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

5.3 Determinación del poder rotatorio (P' o S') de las sustancias solubles en el etanol al 40 por 100.

Pesar, con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra, introducirlos en un matraz aforado de 100 ml y añadir 8 ml aproximadamente de etanol (punto 3.5) (véase el punto 7.2). Dejar el matraz en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente: A lo largo de este lapso de tiempo, proceder 6 veces a una agitación enérgica de forma que la toma de muestra esté bien mezclada con el etanol. Llevar después el volumen con el etanol (punto 3.5), homogeneizar y filtrar. Introducir mediante la pipeta 50 ml del filtrado (= 2,5 g de la muestra) en un erlenmeyer de 250 ml, añadir 2,1 ml de ácido clorhídrico (punto 3.1) y agitar enérgicamente. Ajustar un refrigerante a reflujo al erlenmeyer y sumergirlo en un baño de agua hirviendo. Después del baño, retirar el erlenmeyer del baño, transvasar su contenido a un matraz aforado de 100 ml limpiando con un poco de agua fría, y refrigerar hasta 20 °C. Defecar a continuación con ayuda de las soluciones de Carrez I (punto 3.3) y II (punto 3.4), completar el volumen con agua, homogeneizar, filtrar y medir el poder rotatorio como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.2.

## 6. Cálculo de los resultados

El contenido en almidón por ciento de la muestra se calcula de la manera siguiente:

6.1 Mediciones efectuadas con polarímetro:

2000 (P - P') Porcentaje de almidón [α]<sub>20 °C D</sub>

P = poder rotatorio total en grados de arco.

P' = poder rotatorio en grados de arco dado para las sustancias solubles en el etanol al 40 por 100.

[α]<sub>20 °C D</sub> = poder rotatorio específico del almidón puro.

Los valores convencionalmente admitidos para dicho factor son los siguientes:

+ 185,90: almidón de arroz.

+ 185,40: almidón de patata.

+ 184,60: almidón de maíz.

+ 182,70: almidón de trigo.

+ 181,50: almidón de cebada.

+ 181,30: almidón de avena.

+ 184,00: otros tipos de almidón, así como mezclas de almidones de los piensos completos compuestos.

6.2 Mediciones efectuadas mediante sacarímetro:

2000 (P - P') Porcentaje de  $^{[a]_{20} \text{ oC D}}$

$$(2N \wedge 0,665) \wedge (S - S') 26,6 N \wedge (S - S') \wedge -100 \text{ [a]}_{20} \text{ oC D}$$

S = poder rotatorio total en grados sacarímetros.

S' = poder rotatorio en grados sacarímetros dado por las sustancias solubles en el etanol al 40 por 100.

N = peso en g de sacarosa en 100 ml de agua dando bajo un espesor de 200 mm un poder rotatorio de 100º sacarímetros.

16,29 g para los sacarímetros franceses.

26,00 g para los sacarímetros alemanes.

20,00 g para los sacarímetros mixtos.

[a]<sub>20</sub> oC =D poder rotatorio específico del almidón puro (véase el punto 6.1).

6.3 Repetibilidad.-La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder del 0,4 en valor absoluto para los contenidos en almidón inferiores al 40 por 100, 1,1 por 100 en valor relativo para los contenidos en almidón iguales o superiores al 40 por 100.

## 7. Observaciones

7.1 Cuando la muestra contenga más del 6 por 100 de los carbonatos, calculados en carbonato de calcio, éstos deben ser destruidos mediante un tratamiento con ayuda de una cantidad exactamente apropiada del ácido sulfúrico diluido, antes de la determinación del poder rotatorio total.

7.2 En el caso de los productos de elevado contenido en lactosa, tales como el polvo de suero láctico o de leche descremada, proceder como sigue según la adición de los 80 ml de etanol (punto 3.5). Ajustar al matraz un refrigerante de reflujo, sumergir el matraz durante treinta minutos en un baño de agua a 50 oC.



cenizas brutas, de proteína bruta, de materias grasas brutas y de celulosa bruta.

## 2. Tolerancias aplicables a los valores declarados

Si los controles oficiales establecidos en el artículo 12 de la Directiva 79/373/CEE arrojan una diferencia entre el resultado del control y el valor energético declarado que suponga un incremento o una disminución del valor energético del alimento, se aplicará una tolerancia del 15 por 100.

## 3. Expresión del resultado

El resultado obtenido después de la aplicación de la fórmula antes mencionada se expresará con un decimal.

## 4. Procedimiento de toma de muestras y métodos de análisis aplicables

La toma de muestras del alimento compuesto y la determinación de los contenidos de los componentes analíticos indicados en el método de cálculo se realizarán, respectivamente, de acuerdo con los procedimientos de toma de muestras y los métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales.

## 67. Determinación de lasalocid sódico

SAL SÓDICA DE UN POLÍTER DE ÁCIDO MONOCARBOXÍLICO PRODUCIDO POR STREPTOMYCES LASALIENSIS

### 1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente método permite la determinación de lasalocid sódico en los alimentos para animales y premezclas.

El límite de detección es de 5 mg/kg ; el de determinación de 30 mg/kg.

### 2. Principio

El lasalocid sódico se extrae de la muestra con metanol acidulado y su contenido se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase inversa con detección espectrofluorimétrica.

### 3. Reactivos

3.1 Fosfato de dihidrógeno y potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

3.2 Ácido ortofosfórico, w = 85 por 100.

3.3 Solución de ácido ortofosfórico,  $\rho = 20$  por 100.

Diluir 23,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) con agua hasta llegar a 100 ml.

3.4 6-metil-2-heptilamina (1,5-dimetilhexilamina), w = 99 por 100.



4.3 Equipo para CLAR con sistema de inyección que permita unos volúmenes de inyección de 20  $\mu$ l.

4.3.1 Columna de cromatografía de líquidos de 125 mm x 4 mm, de fase inversa C18, con empacamiento de 5  $\mu$ m o equivalente.

4.3.2 Espectrofluorómetro con ajuste variable de las longitudes de onda de excitación y de emisión.

## 5. Procedimiento

### 5.1 Consideraciones generales.

5.1.1 Prueba en blanco.-Para la prueba de recuperación (5.1.2) debe analizarse un pienso en blanco a fin de comprobar la ausencia de lasalocid sódico y de sustancias de interferencia. El pienso en blanco debe ser de tipo similar a la muestra y en él no debe detectarse lasalocid sódico ni sustancias de interferencia.

5.1.2 Prueba de recuperación.-Debe realizarse una prueba de recuperación analizando el pienso en blanco que se habrá enriquecido por adición de una cantidad de lasalocid sódico similar a la presente en la muestra.

Para añadir una concentración de 100 mg/kg, poner 10,0 ml de la solución madre de patrón (3.10.1) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y evaporar la solución hasta que queden unos 0,5 ml ; añadir 50 g del pienso en blanco y mezclar cuidadosamente ; dejar en reposo durante diez minutos, volviendo a mezclar varias veces, y pasar a la fase de extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), otra posibilidad consiste en realizar una prueba de recuperación mediante 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 está presente en la misma. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación se calcula por sustracción.

### 5.2 Extracción.

5.2.1 Alimentos para animales.-Pesar, con precisión de 0,01 g, entre 5 y 10 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón. Añadir con pipeta 100,0 ml de metanol acidulado (3.8). Tapar sin apretar el tapón y agitar para dispersar. Poner el matraz en un baño de ultrasonidos (4.1) a unos 40  $^{\circ}$ C durante veinte minutos ; sacarlo después y enfriar a temperatura ambiente. Dejar en reposo durante una hora hasta que sedimente la materia en suspensión ; pasar después una parte alícuota a través de un filtro de membrana de 0,45  $\mu$ m (4.2) a un recipiente apropiado. Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.2.2 Premezclas.-Pesar, con precisión de 0,001 g, unos 2 g de la premezcla sin triturar en un matraz aforado de 250 ml. Añadir 100,0 ml de metanol acidulado (3.8) y agitar para dispersar. Poner el matraz y su contenido en un baño de ultrasonidos (4.1) a unos 40  $^{\circ}$ C durante veinte



$$w = v V_1 \text{ (mg/kg) } m$$

donde:

v = concentración de lasalocid sódico en la solución de la muestra (5.2.1) en lg/ml.

V = volumen del extracto de la muestra según 5.2.1 en ml (es decir, 100).

m = masa de la porción de muestra en g.

6.2 Premezclas.-El contenido w de lasalocid sódico de la muestra, expresado en mg/kg, se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$w = v V_2 f \text{ [mg/kg] } m$$

donde:

v = concentración de lasalocid sódico en la solución de la muestra (5.2.2) en lg/ml.

V = volumen del extracto de la muestra según 5.2.2 en ml (es decir, 250).

f = factor de dilución de acuerdo con 5.2.2.

m = masa de la porción de muestra en g.

## 7. Validación de los resultados

7.1 Identidad.-Los métodos basados en espectrofluorimetría están menos expuestos a sufrir interferencias que los que utilizan detección por UV. La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía.

7.1.1 Cocromatografía. Se enriquece un extracto de la muestra (5.2.1 y 5.2.2) mediante adición de una cantidad adecuada de una solución de calibración (3.10.3).

La cantidad de lasalocid sódico añadido debe ser similar a la cantidad de lasalocid sódico que se encuentre en el extracto de la muestra. Solamente debe aumentar la altura del pico de lasalocid sódico, en una proporción basada en la cantidad añadida y en la dilución del extracto. La anchura del pico a la mitad de su altura debe estar dentro del margen del >10 por 100 de la anchura inicial del pico de lasalocid sódico del extracto de la muestra antes de ser enriquecido.

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

El 15 por 100 del resultado superior en caso de contenido de lasalocid sódico entre 30 y 100 mg/kg.

15 mg/kg en caso de contenido de lasalocid sódico entre 100 y 200 mg/kg.

El 7,5 por 100 del resultado superior en caso de contenido de lasalocid sódico mayor de 200 mg/kg.

