

ANEXO 6

Estructura de los números de autorización e inscripción de los establecimientos e intermediarios

El número de autorización contemplado en el apartado 3 del artículo 12 y el número de inscripción contemplado en el apartado 2 del artículo 11 del Real Decreto 1191/1998 deberán presentar la siguiente estructura:

1. El carácter «α» si el establecimiento o intermediario está autorizado.
2. El código ISO correspondiente a España o el del tercer país en el que esté situado el establecimiento o el intermediario, según corresponda.
3. El número de referencia con un máximo de ocho caracteres alfanuméricos.

9657 REAL DECRETO 609/1999, de 16 de abril, por el que se modifica el 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 promulgación de 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 establecieron diversos métodos de análisis, dio origen al Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se incorporaban al ordenamiento jurídico español los métodos de análisis en ellas contemplados.

La promulgación de la Directiva 98/64/CE, de la Comisión, de 3 de septiembre, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para determinar la existencia de aminoácidos, de grasa bruta y de olaquinox en los alimentos para animales, hace necesaria la modificación del referido Real Decreto a fin de incorporar los métodos de análisis comunitarios, modificando en lo que es preciso los métodos actualmente vigentes como oficiales.

El presente Real Decreto se dicta al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.16.^a de la Constitución, que atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación general de la sanidad.

En la elaboración del presente Real Decreto han sido consultadas las Comunidades Autónomas y los sectores afectados, asimismo, ha sido sometido a informe de 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, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 16 de abril de 1999,

DISPONGO:

Artículo único. *Modificación del Real Decreto 2257/1994.*

1. 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, en el sentido siguiente:

Se añaden los métodos de análisis para la determinación de aminoácidos y olaquinox que figuran en el anexo del presente Real Decreto.

Se sustituyen los métodos números: 4(a) Grasa bruta (sin hidrólisis previa) y 4(b) Grasa bruta (con hidrólisis previa), por el método número 4. Determinación de las materias grasas brutas, que figura asimismo en el anexo del presente Real Decreto.

2. Se da nueva redacción a la disposición final primera del Real Decreto 2257/1994:

«Disposición final primera. *Facultad de desarrollo.*

Se faculta a los Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo para dictar, en el ámbito de sus respectivas competencias, las disposiciones necesarias para el cumplimiento y aplicación de lo dispuesto en el presente Real Decreto, y en particular para modificar el anexo cuando ello sea consecuencia de la modificación de la normativa comunitaria y haya de incorporarse por la Administración del Estado.»

Disposición final primera. *Facultad de desarrollo.*

Se faculta a los Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, en el ámbito de sus respectivas competencias, para el desarrollo y aplicación del presente Real Decreto.

Disposición final segunda. *Entrada en vigor.*

El presente Real Decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 16 de abril de 1999.

JUAN CARLOS R.

El Vicepresidente Primero del Gobierno
y Ministro de la Presidencia,
FRANCISCO ÁLVAREZ-CASCOS FERNÁNDEZ

ANEXO MÉTODO A

61. Determinación de aminoácidos

1. Objetivo y ámbito

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

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

2. Principio

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

2.2 Aminoácidos totales.—El procedimiento elegido depende de los aminoácidos estudiados. La cistina, cis-

teína y metionina deben oxidarse a ácido cisteico y metionina sulfona antes de la hidrólisis. La tirosina debe determinarse en hidrolizados de muestras no oxidadas. Todos los demás aminoácidos citados en el apartado 1 pueden determinarse tanto en muestras oxidadas como no oxidadas.

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

3. Reactivos

Debe utilizarse agua bidestilada o agua de calidad equivalente (conductividad $< 10 \mu\text{S}$).

- 3.1 Peróxido de hidrógeno, $w = 30$ por 100.
- 3.2 Ácido fórmico, $w = 98-100$ por 100.
- 3.3 Fenol.
- 3.4 Disulfito sódico.
- 3.5 Hidróxido sódico.
- 3.6 Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado.
- 3.7 Ácido clorhídrico, densidad aproximada 1,18 g/ml.
- 3.8 Citrato trisódico dihidratado.
- 3.9 2,2'-Tiodietanol (tiodiglicol).
- 3.10 Cloruro sódico
- 3.11 Ninhidrina.
- 3.12 Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40-60 °C.
- 3.13 Norleucina, u otro compuesto adecuado para utilizarse como patrón interno.
- 3.14 Nitrógeno gas ($< 10 \text{ ppm}$ de oxígeno).
- 3.15 1-Octanol.
- 3.16 Aminoácidos.

3.16.1 Sustancias patrón citadas en el apartado 1. Compuestos puros sin agua de cristalización. Desecar en vacío sobre P_2O_5 o H_2SO_4 durante una semana antes de su utilización.

- 3.16.2 Ácido cisteico.
- 3.16.3 Metionina sulfona.

3.17 Solución de hidróxido sódico, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
disolver 300 gr NaOH (3.5) en agua y enrasar a 1 litro.

3.18 Solución de hidróxido sódico, $c = 1 \text{ mol/l}$:
disolver 40 gr NaOH (3.5) en agua y enrasar a 1 litro.

3.19 Solución de ácido fórmico y fenol.

Mezclar 889 gr de ácido fórmico (3.2) con 111 gr de agua y añadir 4,73 gr de fenol (3.3).

3.20 Mezcla de hidrólisis, $c = 6 \text{ mol}$ de HCl/l con 1 gr de fenol/l.

Añadir 1 gr de fenol (3.3) a 492 ml de HCl (3.7) y enrasar a 1 litro con agua.

3.21 Mezcla de extracción, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ con 2 por 100 de tiodiglicol.

Tomar 8,2 ml de HCl (3.7), mezclar en unos 900 ml de agua, añadir 20 ml de tiodiglicol (3.9) y enrasar a 1 litro con agua (no mezclar 3.7 y 3.9 directamente).

3.22 Ácido 5-sulfosalicílico, $\beta = 6$ por 100.

Disolver 60 gr de ácido 5-sulfosalicílico (3.6) en agua y enrasar a 1 litro con agua.

3.23 Mezcla de oxidación (ácido per fórmico y fenol):
mezclar 0,5 ml de peróxido de hidrógeno (3.1) con 4,5 ml de solución de ácido fórmico y fenol (3.19) en un pequeño vaso. Incubar a 20-30 °C durante una hora a fin de que se forme ácido per fórmico, enfriar a continuación sobre baño de hielo y agua (15 min) antes de añadir a la muestra.

Precaución: debe evitarse el contacto con la piel y es obligatorio llevar vestimenta de protección.

3.24 Solución tampón de citrato, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+ / 1$, $\text{pH} = 2,20$:

disolver 19,61 gr de citrato sódico (3.8), 5 ml de tiodiglicol (3.9), 1 gr de fenol (3.3) y 16,50 ml de HCl (3.7) en unos 800 ml de agua. Ajustar el pH a 2,20. Enrasar a 1 litro con agua.

3.25 Soluciones tampón de elución, preparadas según las condiciones del analizador utilizado (4.9).

3.26 Reactivo de ninhidrina, preparado según las condiciones del analizador utilizado (4.9).

3.27 Soluciones patrón de aminoácidos. Estas soluciones deben conservarse a temperatura inferior a 5 °C.

3.27.1 Solución patrón madre de aminoácidos (3.16.1) $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$ de cada uno en ácido clorhídrico.

Puede obtenerse en el comercio.

3.27.2 Solución patrón madre de ácido cisteico y metionina sulfona, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$.

Disolver 0,2115 gr de ácido cisteico (3.16.2) y 0,2265 gr de metionina sulfona (3.16.3) en solución tampón de citrato (3.24) en un matraz aforado de 1 l y enrasar con solución tampón de citrato. Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de doce meses. Esta solución no se utiliza si la solución patrón madre (3.27.1) contiene ácido cisteico y metionina sulfona.

3.27.3 Solución patrón madre del patrón interno, por ejemplo, norleucina, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

Disolver 0,6560 gr de norleucina (3.13) en solución tampón de citrato (3.24) en un matraz aforado y enrasar a 250,0 ml con solución tampón de citrato. Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de seis meses.

Véanse asimismo las observaciones del punto 9.1.

3.27.4 Solución de calibración de los aminoácidos patrón para utilizar con los hidrolizados, $c = 5 \mu\text{mol}/50 \text{ ml}$ de ácido cisteico y metionina sulfona y $c = 10 \mu\text{mol}/50 \text{ ml}$ de los demás aminoácidos.

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

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

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

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

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

4. Equipo

4.1 Matraz redondo de 100 ó 250 ml con condensador de reflujo.

4.2 Frasco de vidrio borosilicatado de 100 ml con tapón de rosca con junta de goma/teflón (por ejemplo Duran, Schott) para utilizar en estufa.

4.3 Estufa con ventilación forzada y con una regulación de la temperatura que presente una precisión superior a ± 2 °C.

4.4 pH-metro (lectura con tres decimales).

4.5 Filtro de membrana (0,2 mm).

4.6 Centrífuga.

4.7 Evaporador rotatorio de vacío.

4.8 Agitador mecánico o magnético.

4.9 Analizador de aminoácidos o equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución con columna de intercambio de iones con sistemaresimas de derivación post columna con ninhidrina y detector fotométrico.

La columna se rellena con resinas de poliestireno sulfonado capaces de separar los aminoácidos entre sí y de otros materiales que reaccionen con la ninhidrina. El flujo de la solución tampón y de la solución de ninhidrina se regula mediante bombas con una estabilidad del flujo de $\pm 0,5$ por 100, en el período que abarca tanto la fase de calibración del patrón como el análisis de la muestra.

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

5. Procedimiento

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

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

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

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

Pasar a la fase de cromatografía según el punto 5.4.

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

5.3 Determinación de los aminoácidos totales.

5.3.1 Oxidación.

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

Un matraz redondo de 100 ml (4.1) para hidrólisis abierta (5.3.2.3), o

Un matraz redondo de 250 ml (4.1) si se requiere una baja concentración de sodio (5.3.3.1), o bien

Un frasco de 100 ml con tapón de rosca (4.2) para hidrólisis cerrada (5.3.2.4).

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

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

Pasar a 5.3.2.1.

5.3.2 Hidrólisis.

5.3.2.1 Hidrólisis de las muestras oxidadas.

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

5.3.2.2 Hidrólisis de muestras no oxidadas.

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

5.3.2.3 Hidrólisis abierta.

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

5.3.2.4 Hidrólisis cerrada.

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

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

Pasar a 5.3.3.

5.3.3 Ajuste del pH.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3.4 Solución de muestra para cromatografía.

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

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

Pasar a la fase de cromatografía (5.4).

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

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

La inyección puede realizarse de forma manual o automática. Es importante que siempre se añada a la columna la misma cantidad de solución $\pm 0,5$ por 100 para el análisis de patrones y muestras, excepto cuando se utilice un patrón interno, y que la relación entre sodio y aminoácidos en las soluciones patrón y de muestra sea lo más similar posible.

La frecuencia de las calibraciones depende de la estabilidad del reactivo de ninhidrina y del sistema analítico en general. El patrón o la muestra se diluyen con solución tampón de citrato (3.24) para conseguir un área bajo el pico del patrón de 30-200 por 100 del área bajo el pico del aminoácido correspondiente de la muestra.

La cromatografía de aminoácidos puede variar ligeramente según el tipo de analizador empleado y la resina utilizada. El sistema elegido debe ser capaz de separar los aminoácidos entre sí y de otros materiales que reaccionan con la ninhidrina. En el intervalo de funciona-

miento, el sistema cromatográfico debe proporcionar una respuesta lineal a los cambios en las cantidades de aminoácidos que se añadan a la columna.

Durante la fase de cromatografía, se aplicarán las relaciones altura del valle/altura del pico que se mencionan más abajo, cuando se analice una solución equimolar (de los aminoácidos determinados). Esta solución equimolar debe contener al menos el 30 por 100 de la carga máxima de cada aminoácido que puede medirse con precisión mediante el sistema de análisis y de aminoácidos (4.9).

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

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

6. Cálculo de los resultados

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

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1.000} = \text{gr de aminoácido por kg de muestra}$$

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

A = área del pico, hidrolizado o extracto.

B = área del pico, solución patrón de calibración.

C = área del pico, patrón interno en la hidrolizado o extracto.

D = área del pico, patrón interno, solución patrón de calibración.

MW = peso molecular.

E = concentración del patrón en $\mu\text{mol/ml}$.

W = peso de la muestra (gr) (corregido para obtener el peso original si se ha realizado algún proceso de desecado o desengrasado).

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

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

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

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

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

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

V = volumen de extracto final.

7. Evaluación del método

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

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

n = número de laboratorios participantes.

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

Desviación típica dentro del laboratorio (S_t) en gr/kg:

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

n = número de laboratorios participantes.

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

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

n = número de laboratorios participantes.

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

Desviación típica entre laboratorios (S_t) en gr/kg:

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

n = número de laboratorios participantes.

Coeficiente de variación (%) de la desviación típica entre laboratorios (S_t):

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

n = número de laboratorios participantes.

8. Uso de materiales de referencia

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

9. Observaciones

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

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

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

9.2 Cuando se use un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución para analizar los hidrolizados, deben optimizarse las condiciones experimentales de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

9.3 Si se aplica este método a alimentos que contengan más de un 1 por 100 de cloruro (concentrados, alimentos minerales, complementos), es posible que los valores correspondientes a la metionina queden indicados por debajo del nivel real, por lo que es necesario utilizar un tratamiento especial.

MÉTODO B

4. Determinación de las materias grasas brutas

1. Objeto y ámbito de aplicación

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

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

1.1 Procedimiento A. Materias grasas directamente extraíbles.—El procedimiento es aplicable a las materias simples de origen vegetal, excepto las incluidas en el ámbito de aplicación del procedimiento B.

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

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

2. Principio

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

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

3. Reactivos

3.1 Éter de petróleo, intervalo de ebullición: 40 a 60 °C. El índice de bromo debe ser inferior a 1 y el residuo en evaporación inferior a 2 mg/100 ml.

3.2 Sulfato de sodio, anhidro.

3.3 Ácido clorhídrico 3 M.

3.4 Coadyudante de filtración, como, por ejemplo, tierra de diatomeas, Hiflo-superpel.

4. Aparatos

4.1 Extractor. Si el aparato está provisto de un sifón (aparato Soxhlet), el caudal de reflujo debe regularse de forma que se obtengan por lo menos 10 ciclos por hora. Si se trata de un aparato sin sifón, el caudal líquido refluído debe ser de alrededor de 10 ml por minuto.

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

4.3 Estufa de secado, bien por vacío a 75 °C ± 3 °C, bien a presión atmosférica a 100 °C ± 3 °C.

5. Modo de operación

5.1 Procedimiento A (véase la observación 8.1).

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

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

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

5.2 Procedimiento B.

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

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

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

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

6. Cálculo de los resultados

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

7. Repetibilidad

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

0,2 por 100 en valor absoluto, para los contenidos de materias grasas brutas inferiores al 5 por 100.

4,0 por 100 del resultado más elevado para los contenidos del 5 al 10 por 100.

0,4 por 100 en valor absoluto, para los contenidos superiores al 10 por 100.

8. Observaciones

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

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

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

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

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

en la que:

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

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

8.2 La cantidad para ensayo de los productos pobres en materias grasas puede aumentarse a 5 gr.

8.3 Es posible que los piensos para animales de compañía con un alto contenido en agua deban ser mezclados con sulfato de sodio anhidro antes de la hidrólisis y extracción realizada según el procedimiento B.

8.4 En el punto 5.2, el uso de agua caliente en vez de agua fría para lavar los residuos tras la filtración puede resultar más efectivo.

8.5 Puede que se necesite ampliar el tiempo de secado una hora y media para algunos piensos. Se debe evitar el secado en exceso ya que puede producir bajos resultados. También se puede utilizar un horno microondas.

8.6 Se recomienda utilizar la pre-extracción por medio del procedimiento A antes de la hidrólisis y la re-extracción por medio del procedimiento B, si el contenido en materias grasas brutas es superior al 15 por 100. Hasta cierto punto, esto depende de la naturaleza de los piensos y de la naturaleza de las materias grasas de éstos.

MÉTODO C

62. Determinación de olaquinox

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

1. Finalidad y campo de aplicación

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

2. Principio

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

3. Reactivos

3.1 Metanol.

3.2 Metanol de calidad CLAR.

3.3 Agua de calidad CLAR.

3.4 Fase móvil para la CLAR.

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

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

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

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

3.5.2 Solución patrón intermedia de olaquinox, 25 g/ml:

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

3.5.3 Soluciones patrón de trabajo:

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

4. Material

4.1 Baño ultrasónico.

4.2 Agitador mecánico.

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

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

4.4 Filtros de membrana de 0,45 µm.

5. Procedimiento

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

5.1 Consideraciones generales.

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

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

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

5.2 Extracción.—Pesar, con un margen de error de 0,01 g, aproximadamente 50 gr de la muestra. Transferir a un matraz cónico de 1.000 ml, añadir 100 ml de metanol (3.1) y colocar el matraz durante 5 minutos en un baño ultrasónico (4.1). Añadir 410 ml de agua y dejarlo en el baño ultrasónico durante 15 minutos más. Retirar el matraz del baño ultrasónico, agitarlo durante 30 minutos en el agitador (4.2) y filtrarlo a través de un filtro de pliegues. Transferir 10,0 ml del líquido filtrado a un matraz graduado de 20 ml, añadir agua hasta llegar a la señal y mezclar. Una parte alícuota se filtra a través de un filtro de membrana (4.4) (véase la observación 9). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3 Determinación mediante CLAR.

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

Columna de análisis (4.3.1).

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

Flujo: 1,5-2 ml/minuto.

Longitud de onda de detección: 380 nm.

Volumen de inyección: 20 µl-100 µl.

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

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

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

6. Expresión de los resultados

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

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

$$p = \frac{c \times 1.000}{m}$$

en la cual:

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

m = masa de la muestra en gr.

7. Validación de los resultados

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

7.1.1 Cocromatografía.

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

Solamente debe aumentar la altura del pico de olaquinox teniendo en cuenta la cantidad añadida y la dilución del extracto. La anchura del pico a la mitad de su altura debe situarse aproximadamente ± 10 por 100 de la anchura inicial del pico de olaquinox del extracto de la muestra antes de ser enriquecido.

7.1.2 Detección por red de diodos.

Los resultados deben evaluarse de acuerdo con los siguientes criterios:

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

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

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

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

7.2 Repetibilidad.—La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe rebasar en un 15 por 100 el resultado superior para los contenidos de olaquinox entre 10 y 200 mg/kg.

7.3 Rendimiento.—En el caso de una muestra enriquecida, el rendimiento debe ser como mínimo del 90 por 100.

8. Resultados de un estudio entre varios laboratorios

Se ha organizado un estudio entre varios laboratorios comunitarios durante el cual cuatro muestras de piensos para cochinitos —incluido un pienso de referencia— han sido analizadas por 13 laboratorios. A continuación figuran los resultados del estudio:

	Muestra número 1	Muestra número 2	Muestra número 3	Muestra número 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Media (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
S _t (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S _r (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
CV _t (porcentaje)	—	5,6	4,3	6,7
CV _r (porcentaje)	—	11,1	8,9	8,8
Contenido nominal (mg/kg)	—	15	50	100
Recuperación (porcentaje)	—	97,3	96,0	95,4

L: número de laboratorios.

n: número de valores individuales.

S_t (mg/kg): desviación típica repetibilidad.

S_r (mg/kg): desviación típica reproducibilidad.

CV_t (porcentaje): coeficiente de variación de la repetibilidad.

CV_r (porcentaje): coeficiente de variación de la reproducibilidad.

9. Observación

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

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

9658 *CORRECCIÓN de errores del Real Decreto 258/1999, de 12 de febrero, por el que se establecen condiciones mínimas sobre la protección de la salud y la asistencia médica de los trabajadores del mar.*

Advertidos errores en el texto del Real Decreto 258/1999, de 12 de febrero, por el que se establecen condiciones mínimas sobre la protección de la salud y la asistencia médica de los trabajadores del mar, publicado en el «Boletín Oficial del Estado» número 47, de 24 de febrero de 1999, se procede a efectuar las oportunas modificaciones:

En la página 7616, primera columna, apartado b), segunda línea, donde dice: «... los médicos facultativos competentes.», debe decir: «... los médicos facultativos competentes o por el personal sanitario designado por el Instituto Social de la Marina.».

En la página 7619, anexo II, botiquín A, cajón 1, en el 01.2.02.1 Nitroglicerina, en el código debe aparecer 01.2.01.1.

En la página 7621, anexo II, botiquín A, hay un (*) con la leyenda: «Estos medicamentos debe conservarse en nevera frigorífica y bajo custodia del capitán o responsable del botiquín», debe decir: «Estos medicamentos deben conservarse bajo custodia del capitán o responsable del botiquín».

En la página 7630, anexo II, botiquín A, fuera de cajones, insecticidas en polvo, en el apartado de 15-20 tripulantes pone «31 Kg», debe decir «3 Kg».

En la página 7633, anexo II, botiquín B, hay un (*) con la leyenda: «Este medicamento debe conservarse en nevera frigorífica y bajo custodia del capitán o responsable del botiquín», debe decir: «Este medicamento debe conservarse bajo custodia del capitán o responsable del botiquín».

En la página 7642, anexo II, botiquín C, en material médico, los apósitos autoadhesivos estériles, aparecen dos unidades y debe ser una.

En la página 7642, anexo II, botiquín C, en material médico, la manta para quemados y supervivientes termoaislante oro-plata, aparecen dos unidades y debe ser una.

En la página 7642, anexo II, botiquín de balsas, en material médico, la manta para quemados y supervivientes termoaislante oro-plata, aparecen dos unidades y debe ser una.

En la página 7645, anexo III, último párrafo, línea segunda, donde dice: «... se especifican en el anexo VI (dotación de antidotos)...», debe decir: «... se especifican en el anexo IV (dotación de antidotos) del presente Real Decreto».

En la página 7651, anexo VI, botiquín A, cajón 1, el 01.3.01.2 furosemida, respecto a la cantidad para > 20 tripulantes, en vez de dos debe ser uno.

En la página 7651, anexo VI, botiquín A, cajón 1, el 01.4.03.4 gelatina hemostática, respecto a la cantidad para > 20 tripulantes, en vez de dos debe ser uno.

En la página 7651, anexo VI, botiquín A, cajón 2, el 02.2.03.2 ranitidina, en el código debe poner 02.1.03.2.

En la página 7652, anexo VI, botiquín A, cajón 3, el 03.1.10.1 metamizol 20 cápsulas de 500 mg, debe decir 575 mg.

En la página 7653, anexo VI, botiquín A, cajón 6, el 06.1.02.1 salbutamol 0.5% solución inhal. 10 ml, debe decir «100 MCG/puls 20 AERO 200».

En la página 7653, anexo VI, botiquín A, cajón 6, el 06.3.06.1 acetil cisteína 30 sobres de 5 gr, debe decir: «30 sobres de 200 mg».

En la página 7653, anexo VI, botiquín A, cajón 6, el 06.3.08.1 bromhexina solución 125 ml, debe decir «2 mgr/inh. gotas 40 ml».

En la página 7655, anexo VI, botiquín A, cajón 10, la sulfadiazina plata, no aparece el código, debe aparecer el código «91.5.02.4».

En la página 7656, anexo VI, botiquín A, cajón 11, se debe incluir antes de la guía médica el libro de revisión del botiquín.

En la página 7657, anexo VI, botiquín A, cajón 13, el 08.1.01.1 Cl sódico + Cl potásico + glucosa + bicarbonato sódico, respecto a la cantidad para 15 a 20 tripulantes, en vez de una deben ser dos.

En la página 7657, anexo VI, botiquín A, cajón 13, el 08.5.02.2 Complejo vitamínico B, respecto a la cantidad para 15 a 20 tripulantes, en vez de uno deben ser dos.

En la página 7660, anexo VI, botiquín A, fuera de cajones, insecticidas en polvo, las cantidades que aparecen son 1, 2 y 3 kg, respectivamente, deben ser 2,3 y 4 kg.

En la página 7660, anexo VI, botiquín A, hay un (*) con la leyenda: «Deben conservarse en nevera y bajo custodia directa del capitán o responsable del botiquín», debe decir: «Deben conservarse bajo custodia directa del capitán o responsable del botiquín».

En la página 7660, en el certificado de revisión, en el apartado destinado a la firma y sello del médico responsable de la revisión, se suprime la palabra médico y queda de la siguiente forma: «Firma y sello del responsable de la revisión».

En la página 7661, anexo VI, botiquín B, cajón 1, 01.3.04.1 hidrocortizida, respecto a la cantidad para > 15 tripulantes, en vez de uno deben ser dos.

En la página 7662, anexo VI, botiquín B, cajón 2, el 02.2.03.2 ranitidina, en el código debe poner «02.1.03.2».

En la página 7662, anexo VI, botiquín B, cajón 2, el 02.2.03.1 metoclopramida 30 compr. de 10 mg, respecto a la cantidad para > 15 tripulantes, en vez de dos debe ser una.

En la página 7662, anexo VI, botiquín B, cajón 3, el 03.1.10.1 metamizol 20 cápsulas de 500 mg, debe decir «575 mg».

En la página 7663, anexo VI, botiquín B, cajón 6, el 06.1.02.1 salbutamol 0.5% solución inhal. 10 ml, debe decir «100 MCG/puls 20 AERO 200».

En la página 7663, anexo VI, botiquín B, cajón 6, el 06.3.06.1 acetil cisteína 30 sobres de 5 gr, debe decir «30 sobres de 200 mg».

En la página 7664, anexo VI, botiquín B, cajón 8, el 07.2.01.1 trimetropin-sulfametoxazol, las cantidades que aparecen son 2, 3 y 4, respectivamente, deben ser «1, 2 y 3».

En la página 7664, anexo VI, botiquín B, cajón 8, el 07.4.02.1 mebendazol, las cantidades que aparecen son 1, 2 y 3, respectivamente, deben ser «1, 1 y 2».

En la página 7665 del «Boletín Oficial del Estado» hay un (*) con la leyenda: «Deben conservarse en nevera y bajo custodia directa del capitán o responsable del botiquín», debe decir: «Deben conservarse bajo custodia directa del capitán o responsable del botiquín».

En la página 7667, anexo VI, botiquín B, cajón 14, esparadrapo hipoalérgico 5 cm x 10 m, respecto a la cantidad para > 15 tripulantes, en vez de uno deben ser dos.

En la página 7667, anexo VI, botiquín B, cajón 14, guantes estériles de látex números 8-9, las cantidades que aparecen son 4, 5 y 7, respectivamente, deben ser «8, 10 y 12».