

ANNEX 5

Estructura del Registre d'establiments i intermediaris inscrits

1	2	3	4	5	6
Número de registre	Codi d'activitat (1)	Nom o denominació comercial (2)	Adreça (3)	Notes relatives a l'article 31 del Reial decret 2599/1998 (4)	Observacions

(1) A = Establiments que preveu el paràgraf a) de l'article 9 del Reial decret 1191/1998.
 B = Establiments que preveu el paràgraf b) de l'article 9 del Reial decret 1191/1998.
 C = Establiments que preveu el paràgraf c) de l'article 9 del Reial decret 1191/1998.
 D = Establiments que preveu el paràgraf c) de l'article 9 del Reial decret 1191/1998 (només fabricants per a les necessitats de la pròpia ramaderia).
 I = Intermediaris que preveu l'apartat 1 de l'article 10 del Reial decret 1191/1998.

(2) Nom o denominació comercial de l'establiment o l'intermediari i del representant, si s'escau.

(3) Adreça de l'establiment o l'intermediari i del representant, si s'escau.

(4) (1) = «Fabricants de pinsos compostos autoritzats a utilitzar una proporció mínima del 0,05 per 100 per pes de premescles» que preveu l'apartat 5 de l'article 31 del Reial decret 2599/1998, de 4 de desembre, sobre els additius en l'alimentació dels animals.

(2) = «Fabricants de pinsos compostos autoritzats a afegir coure, seleni i vitamines A i D directament als pinsos compostos» que preveu l'apartat 6.b) de l'article 31 del Reial decret 2599/1998, de 4 de desembre, sobre els additius en l'alimentació dels animals.

ANNEX 6

Estructura dels números d'autorització i inscripció dels establiments i els intermediaris

El número d'autorització que preveu l'apartat 3 de l'article 12 i el número d'inscripció que preveu l'apartat 2 de l'article 11 del Reial decret 1191/1998 han de presentar l'estructura següent:

1. El caràcter «α» si l'establiment o l'intermediari està autoritzat.
2. El codi ISO corresponent a Espanya o el del tercer país en què estigui situat l'establiment o l'intermediari, segons correspongui.
3. El número de referència de vuit caràcters alfanumèrics com a màxim.

9657 REIAL DECRET 609/1999, de 16 d'abril, pel qual es modifica el Reial decret 2257/1994, de 25 de novembre, pel qual s'aproven els mètodes oficials d'anàlisi de pinsos o aliments per a animals i les seves primeres matèries. («BOE» 103, de 30-4-1999.)

La promulgació de les directives 92/89/CEE, de 3 de novembre; 92/95/CEE, de 9 de novembre, i 94/14/CE, de 29 de març; 93/70/CEE, de 28 de juliol; 93/117/CEE, de 17 de desembre, i 93/28/CEE, de 4 de juny, totes de la Comissió, per la qual es van establir diversos mètodes d'anàlisi, va donar origen al Reial decret 2257/1994, de 25 de novembre, pel qual s'incorporen a l'ordenament jurídic espanyol els mètodes d'anàlisi que s'hi preveuen.

La promulgació de la Directiva 98/64/CE, de la Comissió, de 3 de setembre, per la qual es fixen mètodes

d'anàlisi comunitaris per determinar l'existència d'aminoàcids, de greix brut i d'olaquinox en els aliments per a animals, fa necessària la modificació del Reial decret esmentat a fi d'incorporar els mètodes d'anàlisi comunitaris, i modificar en el que calgui els mètodes vigents com a oficials actualment.

Aquest Reial decret es dicta a l'empara del que disposa l'article 149.1.16a de la Constitució, que atribueix a l'Estat la competència exclusiva en matèria de bases i coordinació general de la sanitat.

Per a l'elaboració d'aquest Reial decret s'han consultat les comunitats autònomes i els sectors afectats; així mateix, s'ha sotmès a informe de la Comissió Interministerial per a l'Ordenació Alimentària.

En virtut d'això, a proposta dels ministres d'Agricultura, Pesca i Alimentació i de Sanitat i Consum, d'acord amb el Consell d'Estat i amb la deliberació prèvia del Consell de Ministres en la reunió del dia 16 d'abril de 1999,

DISPOSO:

Article únic. *Modificació del Reial decret 2257/1994.*

1. Es modifica l'annex del Reial decret 2257/1994, de 25 de novembre, pel qual s'aproven els mètodes oficials d'anàlisi de pinsos o aliments per a animals i les seves primeres matèries, en el sentit següent:

S'hi afegixen els mètodes d'anàlisi per a la determinació d'aminoàcids i olaquinox que figuren a l'annex d'aquest Reial decret.

Se substitueixen els mètodes números: 4(a) Greix brut (sense hidròlisi prèvia) i 4(b) Greix brut (amb hidròlisi prèvia), pel mètode número 4. Determinació de les matèries grasses brutes, que també figura a l'annex d'aquest Reial decret.

2. Es fa una nova redacció de la disposició final primera del Reial decret 2257/1994:

«Disposició final primera. *Facultat de desplegament.*

Es faculden els ministres d'Agricultura, Pesca i Alimentació i de Sanitat i Consum per dictar, en l'àmbit de les seves competències respectives, les disposicions necessàries per complir i aplicar el que disposa aquest Reial decret, i en particular per modificar l'annex quan això sigui conseqüència de la modificació de la normativa comunitària i l'hagi d'incorporar l'Administració de l'Estat.»

Disposició final primera. *Facultat de desplegament.*

Es faculden els ministres d'Agricultura, Pesca i Alimentació i de Sanitat i Consum, en l'àmbit de les seves competències respectives, per desplegar i aplicar aquest Reial decret.

Disposició final segona. *Entrada en vigor.*

Aquest Reial decret entra en vigor l'endemà de la publicació en el «Butlletí Oficial de l'Estat».

Madrid, 16 d'abril de 1999.

JUAN CARLOS R.

El vicepresident primer del Govern
i ministre de la Presidència,

FRANCISCO ÁLVAREZ-CASCOS FERNÁNDEZ

ANNEX MÈTODE A

61. Determinació d'aminoàcids

1. Objectiu i àmbit

Aquest mètode serveix per a la determinació d'aminoàcids lliures (sintètics i naturals) i totals (lliures i units en pèptids) en els aliments per a animals, utilitzant un analitzador d'aminoàcids. És aplicable als aminoàcids següents: cistina i cisteïna, metionina, lisina, treonina, alanina, arginina, àcid aspàrtic, àcid glutàmic, glicina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina i valina.

El mètode no distingeix entre les sals dels aminoàcids i tampoc diferencia les formes D i L dels aminoàcids. No és vàlid per determinar el triptòfan ni els anàlegs hidroxilats dels aminoàcids.

2. Principi

2.1 Aminoàcids lliures.—Els aminoàcids lliures s'extreuen amb àcid clorhídric diluït. Les macromolècules nitrogenades extretes alhora es precipiten amb àcid sulfosalicílic i s'eliminen mitjançant filtració. El pH de la solució filtrada s'ajusta a 2,20. Els aminoàcids se separen per cromatografia d'intercanvi iònic i es determinen mitjançant reacció amb ninhidrina amb detecció fotomètrica a 570 nm.

2.2 Aminoàcids totals.—El procediment elegit depèn dels aminoàcids estudiats. La cistina, la cisteïna i la metionina s'han d'oxidar a àcid cisteic i metionina sulfona abans de la hidròlisi. La tirosina s'ha de determinar en hidrolitzats de mostres no oxidades. Tots els altres aminoàcids esmentats a l'apartat 1 es poden determinar tant en mostres oxidades com no oxidades.

L'oxidació es produeix a 0 °C amb una mescla d'àcid perfòrmic/fenol. L'excés de reactiu oxidant es descompon amb disulfid sòdic. La mostra oxidada o no oxidada

s'hidrolitza amb àcid clorhídric ($c = 6$ mol/l) durant vint-i-tres hores. El pH de l'hidrolitzat s'ajusta a 2,20. Els aminoàcids se separen per cromatografia d'intercanvi iònic i es determinen mitjançant una reacció amb ninhidrina utilitzant detecció fotomètrica a 570 nm (440 nm en el cas de la prolina).

3. Reactius

S'ha d'utilitzar aigua bidestil·lada o aigua d'una qualitat equivalent (conductivitat $< 10 \mu\text{S}$).

- 3.1 Peròxid d'hidrogen, $w = 30$ per 100.
- 3.2 Àcid fòrmic, $w = 98-100$ per 100.
- 3.3 Fenol.
- 3.4 Disulfid sòdic.
- 3.5 Hidròxid sòdic.
- 3.6 Àcid 5-sulfosalicílic dihidratat.
- 3.7 Àcid clorhídric, densitat aproximada 1,18 g/ml.
- 3.8 Citrat trisòdic dihidratat.
- 3.9 2,2'-Tiodietanol (tiodiglicol).
- 3.10 Clorur sòdic
- 3.11 Ninhidrina.
- 3.12 Èter de petroli, interval d'ebullició 40-60 °C.
- 3.13 Norleucina, o un altre compost adequat per utilitzar com a patró intern.
- 3.14 Nitrogen gas (< 10 ppm d'oxigen).
- 3.15 1-Octanol.
- 3.16 Aminoàcids.

3.16.1 Substàncies patró esmentades a l'apartat 1. Compostos purs sense aigua de cristallització. Es deseca en buit sobre P_2O_5 o H_2SO_4 durant una setmana abans de la seva utilització.

- 3.16.2 Àcid cisteic.
- 3.16.3 Metionina sulfona.

3.17 Solució d'hidròxid sòdic, $c = 7,5$ mol/l:

es dissolen 300 gr NaOH (3.5) en aigua i s'enrasa a 1 litre.

3.18 Solució d'hidròxid sòdic, $c = 1$ mol/l:

es dissolen 40 gr NaOH (3.5) en aigua i s'enrasa a 1 litre.

3.19 Solució d'àcid fòrmic i fenol.

Es mesclen 889 gr d'àcid fòrmic (3.2) amb 111 gr d'aigua i s'hi afegeixen 4,73 gr de fenol (3.3).

3.20 Mescla d'hidròlisi, $c = 6$ mol de HCl/l amb 1 gr de fenol/l.

S'afegeix 1 gr de fenol (3.3) a 492 ml d'HCl (3.7) i s'enrasa a 1 litre amb aigua.

3.21 Mescla d'extracció, $c = 0,1$ mol HCl/l amb 2 per 100 de tiodiglicolol.

S'agafen 8,2 ml d'HCl (3.7), es mesclen en uns 900 ml d'aigua, s'hi afegeixen 20 ml de tiodiglicol (3.9) i s'enrasa a 1 litre amb aigua (no s'han de mesclar 3.7 i 3.9 directament).

3.22 Àcid 5-sulfosalicílic, $\beta = 6$ per 100.

Es dissolen 60 gr d'àcid 5-sulfosalicílic (3.6) en aigua i s'enrasa a 1 litre amb aigua.

3.23 Mescla d'oxidació (àcid perfòrmic i fenol):

es mesclen 0,5 ml de peròxid d'hidrogen (3.1) amb 4,5 ml de solució d'àcid fòrmic i fenol (3.19) en un got petit. S'incuba a 20-30 °C durant una hora perquè es formi àcid perfòrmic, a continuació es refreda sobre

un bany de gel i aigua (15 min) abans d'afegir-ho a la mostra.

Precaució: s'ha d'evitar el contacte amb la pell i és obligatori portar vestimenta de protecció.

3.24 Solució tampó de citrat, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/1$, $\text{pH} = 2,20$:

es dissolen 19,61 gr de citrat sòdic (3.8), 5 ml de tioglicol (3.9), 1 gr de fenol (3.3) i 16,50 ml d'HCl (3.7) en uns 800 ml d'aigua. S'ajusta el pH a 2,20. S'enrasa a 1 litre amb aigua.

3.25 Solucions tampó d'elució, preparades segons les condicions de l'analitzador utilitzat (4.9).

3.26 Reactiu de ninhidrina, preparat segons les condicions de l'analitzador utilitzat (4.9).

3.27 Solucions patró d'aminoàcids. Aquestes solucions s'han de conservar a una temperatura inferior a 5 °C.

3.27.1 Solució patró mare d'aminoàcids (3.16.1) $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ de cada un en àcid clorhídric.

Es pot obtenir en el comerç.

3.27.2 Solució patró mare d'àcid cisteic i metionina sulfona, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Es dissolen 0,2115 gr d'àcid cisteic (3.16.2) i 0,2265 gr de metionina sulfona (3.16.3) en una solució tampó de citrat (3.24) en un matràs aforat d'1 l i s'enrasa amb una solució tampó de citrat. Es conserva a menys de 5 °C durant un període màxim de dotze mesos. Aquesta solució no s'utilitza si la solució patró mare (3.27.1) conté àcid cisteic i metionina sulfona.

3.27.3 Solució patró mare del patró intern, per exemple, norleucina, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Es dissolen 0,6560 gr de norleucina (3.13) en una solució tampó de citrat (3.24) en un matràs aforat i s'enrasa a 250,0 ml amb una solució tampó de citrat. Es conserva a menys de 5 °C durant un període màxim de sis mesos.

Vegeu també les observacions del punt 9.1.

3.27.4 Solució de calibratge dels aminoàcids patró per utilitzar amb els hidrolitzats, $c = 5 \text{ } \mu\text{mol}/50 \text{ ml}$ d'àcid cisteic i metionina sulfona i $c = 10 \text{ } \mu\text{mol}/50 \text{ ml}$ dels altres aminoàcids.

Es dissolen 2,2 gr de clorur sòdic (3.10) en un got de 100 ml amb 30 ml d'una solució tampó de citrat (3.24). S'afegeixen 4,00 ml de solució patró mare d'aminoàcids (3.27.1), 4,00 ml de solució patró mare d'àcid cisteic i metionina sulfona (3.27.2) i 0,50 ml d'una solució patró mare de patró intern (3.27.3) si se n'utilitzen. S'ajusta el pH a 2,20 amb hidròxid sòdic (3.18).

Es passa quantitativament a un matràs aforat de 50 ml, s'enrasa amb una solució tampó de citrat (3.24) i s'homogeneïtza.

S'ha de conservar a menys de 5 °C durant un període màxim de tres mesos.

3.27.5 Solució de calibratge dels aminoàcids patró per utilitzar amb els hidrolitzats preparats segons l'apartat 5.3.3.1 i per utilitzar amb els extractes (5.2). La solució de calibratge es prepara d'acord amb 3.27.4, però s'omet el clorur sòdic.

S'ha de conservar a menys de 5 °C durant un període màxim de tres mesos.

4. Equip

4.1 Matràs rodó de 100 o 250 ml amb condensador de reflux.

4.2 Pot de vidre borosilicatat de 100 ml amb tap de rosca i una junta de goma/tefló (per exemple Duran, Schott) per utilitzar en estufa.

4.3 Estufa amb ventilació forçada i amb una regulació de la temperatura que tingui una precisió superior a $\pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$.

4.4 pH-metre (lectura amb tres decimals).

4.5 Filtre de membrana (0,2 mm).

4.6 Centrífuga.

4.7 Evaporador rotatori de buit.

4.8 Agitador mecànic o magnètic.

4.9 Analitzador d'aminoàcids o equip de cromatografia de líquids d'alta resolució amb una columna d'intercanvi d'ions amb sistemarsimes de derivació postcolumna amb ninhidrina i detector fotomètric.

La columna s'emplena amb resines de poliestirè sulfonat capaces de separar els aminoàcids entre si i d'altres materials que reaccionin amb la ninhidrina. El flux de la solució tampó i de la solució de ninhidrina es regula mitjançant bombes amb una estabilitat del flux de $\pm 0,5$ per 100, en el període que inclou tant la fase de calibratge del patró com l'anàlisi de la mostra.

Amb alguns analitzadors d'aminoàcids es poden utilitzar mètodes d'hidròlisi en què l'hidrolitzat presenta una concentració de sodi de $c = 0,8 \text{ mol/l}$ i conté tot l'àcid fòrmic residual de la fase d'oxidació. Altres no proporcionen una separació satisfactòria de determinats aminoàcids si l'hidrolitzat conté àcid fòrmic en excés o elevades concentracions d'ió sodi. En aquest cas, el volum d'àcid es redueix per evaporació aproximadament fins a 5 ml després de la hidròlisi i abans de l'ajust del pH. L'evaporació s'ha de fer en buit a 40 °C com a màxim.

5. Procediment

5.1 Preparació de la mostra.—La mostra es tritura fins que passi per un tamís de 0,5 mm. Les mostres amb humitat elevada s'han d'assecar a l'aire a una temperatura no superior a 50 °C o bé s'han de liofilitzar abans de la trituració. Les mostres amb un contingut elevat en greixos s'han de sotmetre a extracció amb èter de petroli (3.12) abans de la trituració.

5.2 Determinació dels aminoàcids lliures en aliments per a animals i premescles.—Es pesa amb una precisió de 0,2 mg una quantitat adequada (1-5 gr) de la mostra preparada (5.1), en un matràs cònic, i s'hi afegeixen 100,0 ml de mescla d'extracció (3.21). S'agita la mescla durant 60 min per mitjà d'un agitador mecànic o magnètic (4.8). Es deixa que sedimenti i es passen amb pipeta 10,0 ml de la solució sobrenedant a un got de 100 ml.

S'afegeixen 5,0 ml de solució d'àcid sulfosalicílic (3.22); s'agita i es prolonga l'agitació amb agitador magnètic durant 5 min. Es filtra o se centrifuga el sobrenedant per eliminar el possible precipitat. Es posen 10,0 ml de la solució resultant en un got de 100 ml i s'ajusta el pH a 2,20 amb una solució d'hidròxid sòdic (3.18), es passa a un matràs aforat d'un volum adequat amb una solució tampó de citrat (3.24) i s'enrasa amb aquesta mateixa solució tampó.

Si s'utilitza un patró intern, s'afegeix 1,00 ml de patró intern (3.27.3) per cada 100 ml de solució final i s'enrasa amb la solució tampó (3.24).

Es passa a la fase de cromatografia segons el punt 5.4.

Si els extractes no se sotmeten a cromatografia el mateix dia, s'han de conservar a menys de 5 °C.

5.3 Determinació dels aminoàcids totals.

5.3.1 Oxidació.

Es pesen amb una precisió de 0,2 mg entre 0,1 i 1 gr de la mostra preparada (5.1) en:

Un matràs rodó de 100 ml (4.1) per a hidròlisi oberta (5.3.2.3), o

Un matràs rodó de 250 ml (4.1) si es requereix una baixa concentració de sodi (5.3.3.1), o bé

Un pot de 100 ml amb tap de rosca (4.2) per a hidròlisi tancada (5.3.2.4).

La mostra pesada ha de tenir un contingut en nitrogen d'uns 10 mg i un contingut en aigua no superior a 100 mg.

Es col·loca el pot o el matràs en un bany de gel i aigua a 0 °C, s'hi afegeixen 5 ml de mescla d'oxidació (3.23) i es mescla amb una espàtula de vidre amb l'extrem doblegat. Es tanca el pot/matràs, amb l'espàtula dins, mitjançant una pel·lícula impermeable a l'aire, es col·loca el bany de gel i aigua amb el recipient tancat en un frigorífic a 0 °C i es deixa durant setze hores. Després d'aquest temps, es treu del frigorífic i es descompon l'excés de reactiu d'oxidació mitjançant l'addició de 0,84 g de disulfít sòdic (3.4).

Passeu a 5.3.2.1.

5.3.2 Hidròlisi.

5.3.2.1 Hidròlisi de les mostres oxidades.

S'afegeixen 25 ml de mescla d'hidròlisi (3.20) a la mostra oxidada preparada segons 5.3.1; s'ha de procurar treure qualsevol residu de mostra que hagi quedat adherit a les parets del recipient i a l'espàtula. Segons el procediment d'hidròlisi utilitzat, passeu a 5.3.2.3 o a 5.3.2.4.

5.3.2.2 Hidròlisi de mostres no oxidades.

Es pesen en un matràs rodó de 100 ml o 250 ml (4.1) o en un pot de 100 ml amb tap de rosca (4.2), amb una precisió de 0,2 mg, entre 0,1 i 1 gr de la mostra preparada (5.1). La porció pesada de la mostra ha de tenir un contingut en nitrogen d'uns 10 mg. S'hi afegeixen amb cura 25 ml de la mescla d'hidròlisi (3.20) i s'homogeneïtza amb la mostra. Passeu al punt 5.3.2.3 o al 5.3.2.4, segons convingui.

5.3.2.3 Hidròlisi oberta.

S'afegeixen 3 perles de vidre a la mescla del matràs (preparada segons 5.3.2.1 o 5.3.2.2) i es porta a ebullició amb borbolleig continu i reflux durant vint-i-tres hores. En acabar la hidròlisi, es renta el condensador amb 5 ml de solució tampó de citrat (3.24). Es desconnecta el matràs i es refreda en un bany de gel. Passeu a 5.3.3.

5.3.2.4 Hidròlisi tancada.

Es col·loca el pot amb la mescla preparada segons 5.3.2.1 o el 5.3.2.2 en una estufa (4.3) a 110 °C. Durant la primera hora, a fi d'evitar que es generi pressió (a causa de la producció de substàncies gasoses) i hi hagi perill d'explosió, es posa el tap de rosca a sobre del recipient, sense tancar-lo. Al cap d'una hora es tanca el pot amb el tap i es deixa a l'estufa (4.3) durant vint-i-tres hores. Una vegada acabada la hidròlisi, es treu el pot de l'estufa, s'obre curosament el tap del pot i es col·loca en un bany de gel i aigua. Es deixa refredar.

En funció del mètode d'ajust del pH (5.3.3), es passa quantitativament el contingut del pot a un got de 250 ml o a un matràs rodó de 250 ml, utilitzant una solució tampó de citrat (3.24).

Passeu a 5.3.3.

5.3.3 Ajust del pH.

En funció de la tolerància al sodi de l'analitzador d'aminoàcids (4.9) passeu a 5.3.3.1 o a 5.3.3.2 per ajustar el pH.

5.3.3.1 En cas de sistemes cromatogràfics (4.9) que requereixin una baixa concentració de sodi:

És recomanable utilitzar una solució mare del patró intern (3.27.3) si s'utilitzen analitzadors d'aminoàcids

que requereixin una baixa concentració de sodi (quan s'hagi de reduir el volum d'àcid).

En aquest cas, s'afegeixen 2,00 ml de la solució mare de patró intern (3.27.3) a l'hidrolitzat abans o després de l'evaporació.

S'afegeixen 2 gotes d'1-octanol (3.15) a l'hidrolitzat obtingut segons 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

Mitjançant un evaporador rotatori (4.7), es redueix el volum a 5-10 ml en buit a 40 °C. Si el volum es redueix accidentalment a menys de 5 ml, s'ha de rebutjar l'hidrolitzat i tornar a començar l'anàlisi.

Després d'ajustar el pH a 2,20 amb una solució d'hidròxid sòdic (3.18), passeu a 5.3.4.

5.3.3.2 En cas de qualsevol altre analitzador d'aminoàcids (4.9):

S'agafen els hidrolitzats obtinguts d'acord amb 5.3.2.3 o 5.3.2.4 i es neutralitzen parcialment mitjançant l'addició amb cura i amb agitació de 17 ml de solució d'hidròxid sòdic (3.17); s'ha de vigilar que la temperatura es mantingui per sota de 40 °C.

S'ajusta el pH a 2,20 a temperatura ambient amb una solució d'hidròxid sòdic (3.17) i una solució d'hidròxid sòdic (3.18). Passeu a 5.3.4.

5.3.4 Solució de mostra per a cromatografia.

Es passa quantitativament l'hidrolitzat amb el pH ajustat (5.3.3.1 o 5.3.3.2) amb una solució tampó de citrat (3.24) a un matràs aforat de 200 ml i s'enrasa amb una solució tampó (3.24).

Si encara no s'ha utilitzat un patró intern, s'han d'afegir 2,00 ml de patró intern (3.27.3) i s'ha d'enrasar amb solució tampó de citrat (3.4). S'homogeneïtza perfectament.

Passeu a la fase de cromatografia (5.4).

Si les solucions de mostra no s'han de cromatografiar el mateix dia, s'han de conservar a menys de 5 °C.

5.4 Cromatografia.—Abans de fer la cromatografia, es porta l'extracte (5.2) o l'hidrolitzat (5.3.4) a temperatura ambient. S'agita la mescla i es filtra una quantitat adequada a través d'un filtre de membrana de 0,2 mm (4.5). La solució clara obtinguda se sotmet a cromatografia d'intercanvi iònic; s'utilitza un analitzador d'aminoàcids (4.9).

La injecció es pot fer de manera manual o automàtica. És important que sempre s'afegeixi a la columna la mateixa quantitat de solució $\pm 0,5$ per 100 per a l'anàlisi de patrons i mostres, excepte quan s'utilitzi un patró intern, i que la relació entre sodi i aminoàcids en les solucions patró i de mostra sigui al més similar possible.

La freqüència dels calibratges depèn de l'estabilitat del reactiu de ninhidrina i del sistema analític en general. El patró o la mostra es dilueixen amb solució tampó de citrat (3.24) per aconseguir una àrea sota el pic del patró de 30-200 per 100 de l'àrea sota el pic de l'aminoàcid corresponent de la mostra.

La cromatografia d'aminoàcids pot variar lleugerament segons el tipus d'analitzador emprat i la resina utilitzada. El sistema elegit ha de ser capaç de separar els aminoàcids entre si i altres materials que reaccionen amb la ninhidrina. En l'interval de funcionament, el sistema cromatogràfic ha de proporcionar una resposta lineal als canvis en les quantitats d'aminoàcids que s'afegeixen a la columna.

Durant la fase de cromatografia, s'apliquen les relacions altura de la vall/altura del pic que s'esmenten més avall, quan s'analitza una solució equimolar (dels aminoàcids determinats). Aquesta solució equimolar ha de contenir almenys el 30 per 100 de la càrrega màxima de cada aminoàcid que es pot mesurar amb precisió mitjançant el sistema d'anàlisi i d'aminoàcids (4.9).

Per separar la treonina de la serina, la relació altura de la vall/altura del pic del més baix dels dos aminoàcids que s'ajunten en el cromatograma no ha de passar de 2/10 (si només es determinen cistina, cisteïna, metionina, treonina i lisina, la insuficient separació entre pics consecutius afecta negativament el resultat de la determinació). Respecte als altres aminoàcids, la separació ha de ser millor que 1/10.

El sistema ha de garantir que la lisina se separa dels «artefactes de lisina» i de l'ornitina.

6. Càlcul dels resultats

Les àrees dels pics corresponents a la mostra i al patró es mesuren per a cada aminoàcid i es calcula la quantitat corresponent en grams d'aminoàcids per quilogram de mostra.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1.000} = \text{gr d'aminoàcid per kg de mostra}$$

Si s'utilitza un patró intern, s'ha de multiplicar per $\frac{D}{C}$

A = àrea del pic, hidrolitzat o extracte.

B = àrea del pic, solució patró de calibratge.

C = àrea del pic, patró intern en l'hidrolitzat o l'extracte.

D = àrea del pic, patró intern, solució patró de calibratge.

MW = pes molecular.

E = concentració del patró en $\mu\text{mol/ml}$.

W = pes de la mostra (gr) (corregit per obtenir el pes original si s'ha dut a terme algun procés de dessecament o desgreixatge).

F = ml d'hidrolitzat total (5.3.4) o ml de volum calculat de dilució total de l'extracte (6.1).

La cistina i la cisteïna es determinen com a àcid cisteic en hidrolitzats de la mostra oxidada, però es calculen en cistina ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, MW 240,30) utilitzant MW 120,15 (= $0,5 \times 240,30$).

La metionina es determina com a metionina sulfona en hidrolitzats de mostra oxidada, però es calcula en metionina utilitzant el MW de la metionina: 149,21.

La metionina lliure afegida es determina després d'extreure's com a metionina, utilitzant per al càlcul el mateix MW.

6.1 El volum total de dilució dels extractes (F) per a la determinació dels aminoàcids lliures (5.2) es calcula de la manera següent:

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

V = volum d'extracte final.

7. Avaluació del mètode

El mètode s'ha comprovat en un estudi intercomparatiu dut a terme internacionalment el 1990 amb diferents pinsos (pinso mesclat per a porcs, pinso compost per a pollastres, concentrat de proteïnes, premescla). Els resultats, després de descartar les dades aberrants, de la mitjana i de la desviació típica, s'indiquen en el quadre següent:

Material de referència	Aminoàcids			
	Treonina	Cistina/cisteïna	Metionina	Lisina
Pinso mesclat per a porcs	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Compost per a pollastres	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentrat de proteïnes	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premescla	58,42 n = 16	— —	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = nombre de laboratoris participants.

7.1 Repetibilitat.—S'indiquen les xifres de la repetibilitat corresponents als aminoàcids estudiats. La repetibilitat, expressada com a «desviació típica dins del laboratori», de l'estudi intercomparatiu esmentat, s'indica en els quadres següents:

Desviació típica dins del laboratori (S_t) en gr/kg:

Material de referència	Aminoàcids			
	Treonina	Cistina/cisteïna	Metionina	Lisina
Pinso mesclat per a porcs	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Compost per a pollastres	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Concentrat de proteïnes	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premescla	1,30 n = 16	— —	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = nombre de laboratoris participants.

Coefficient de variació (%) de la desviació típica dins del laboratori (S_t):

Material de referència	Aminoàcids			
	Treonina	Cistina/cisteïna	Metionina	Lisina
Pinso mesclat per a porcs	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Compost per a pollastres	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentrat de proteïnes	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premescla	2,2 n = 16	— —	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = nombre de laboratoris participants.

7.2 Reproductibilitat.—En el quadre següent s'indiquen els resultats de la desviació típica entre laboratoris obtinguda en l'estudi intercomparatiu:

Desviació típica entre laboratoris (S_t) en gr/kg:

Material de referència	Aminoàcids			
	Treonina	Cistina/cisteïna	Metionina	Lisina
Pinso mesclat per a porcs	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Compost per a pollastres	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Concentrat de proteïnes	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premescla	2,49 n = 16	— —	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = nombre de laboratoris participants.

Coefficient de variació (%) de la desviació típica entre laboratoris (S_t):

Material de referència	Aminoàcids			
	Treonina	Cistina/cisteïna	Metionina	Lisina
Pinso mesclat per a porcs	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Compost per a pollastres	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentrat de proteïnes	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premescla	4,3 n = 16	— —	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = nombre de laboratoris participants.

8. Ús de materials de referència

L'aplicació correcta del mètode es verifica fent mesuraments duplicats de materials certificats de referència, quan estiguin disponibles. Es recomana el calibratge amb solucions certificades de calibratge d'aminoàcids.

9. Observacions

9.1 A causa de les diferències entre els analitzadors d'aminoàcids, les concentracions finals de les solucions de calibratge d'aminoàcids patró (vegeu 3.27.4 i 3.27.5) i de l'hidrolitzat (vegeu 5.3.4) s'han de considerar orientatives.

La gamma de resposta lineal de l'aparell s'ha de comprovar per a tots els aminoàcids.

La solució patró es dilueix amb un amortidor de citrat per detectar les àrees sota el pic al centre de la gamma.

9.2 Quan es faci servir un equip de cromatografia de líquids d'alta resolució per analitzar els hidrolitzats, s'han d'optimitzar les condicions experimentals d'acord amb les instruccions del fabricant.

9.3 Si s'aplica aquest mètode a aliments que continguin més d'un 1 per 100 de clorur (concentrats, aliments minerals, complementos), és possible que els valors corresponents a la metionina quedin indicats per sota del nivell real, per la qual cosa cal utilitzar un tractament especial.

MÈTODE B

4. Determinació de les matèries grasses brutes

1. Objecte i àmbit d'aplicació

El mètode serveix per determinar el contingut de matèries grasses brutes dels pinsos. No és vàlid per a l'anàlisi de les llavors i les fruites oleaginoses que defineix el Reglament número 136/66/CEE, del Consell, de 22 de setembre de 1996.

L'aplicació d'un o altre dels dos procediments que es descriuen a continuació depèn de la naturalesa i la composició del pinso i de la raó per la qual es du a terme l'anàlisi.

1.1 Procediment A. Matèries grasses directament extraïbles.—El procediment és aplicable a les matèries simples d'origen vegetal, excepte les incloses en l'àmbit d'aplicació del procediment B.

1.2 Procediment B. Matèries grasses brutes totals.—El procediment és aplicable als pinsos simples d'origen animal i als pinsos compostos. S'ha d'utilitzar per a tots els materials amb matèries grasses que no es puguin extreure completament sense hidròlisi prèvia, per exemple, els glútenos, els llevats, les proteïnes de patates i els productes subjectes a processos com l'extrusió, la floculació i l'escalfament.

1.3 Interpretació dels resultats.—Els casos en què el resultat obtingut amb el procediment B sigui millor que l'obtingut amb el procediment A s'accepten com el valor real.

2. Principi

2.1 Procediment A.—S'extreu la mostra per mitjà d'èter de petroli. Es destil·la el dissolvent i s'asseca i es pesa el residu.

2.2 Procediment B.—Es tracta la mostra en calent mitjançant àcid clorhídric. Es refreda i es filtra la mescla. Després de rentar-lo i assecat-lo, el residu se sotmet a l'anàlisi segons el procediment A.

3. Reactius

3.1 Èter de petroli, interval d'ebullició: 40 a 60 °C. L'índex de brom ha de ser inferior a 1 i el residu en evaporació, inferior a 2 mg/100 ml.

3.2 Sulfat de sodi, anhidre.

3.3 Àcid clorhídric 3 M.

3.4 Coadjuvant de filtració, com ara terra de diatomees, Hiflo-supercel.

4. Aparells

4.1 Extractor. Si l'aparell està proveït d'un sifó (aparell Soxhlet), el cabal de reflux s'ha de regular de manera que s'obtinguin almenys 10 cicles per hora. Si es tracta d'un aparell sense sifó, el cabal líquid refluït ha de ser del voltant de 10 ml per minut.

4.2 Cartutxos d'extracció, exempts de substàncies solubles a l'èter de petroli, la porositat dels quals sigui compatible amb les exigències del punt 4.1.

4.3 Estufa d'assecatge, bé per buit a 75 °C ± 3 °C, bé a pressió atmosfèrica a 100 °C ± 3 °C.

5. Mode d'operació

5.1 Procediment A (vegeu l'observació 8.1).

Es pesen, amb un error no superior a 1 mg, 5 gr de mostra, s'introdueixen en un cartutx d'extracció (4.2) i es cobreixen amb un tampó de cotó desgreixat.

Es col·loca el cartutx en un extractor (4.1) i s'extreu durant sis hores per mitjà d'èter de petroli (3.1). Es recull l'extracte d'èter de petroli en un matràs sec proveït de pedra tosca (1) i tarat.

S'elimina el dissolvent per destil·lació. S'asseca el residu mitjançant la col·locació del matràs durant una hora i mitja en una estufa d'assecatge (4.3). Es deixa refredar en un assecador i es pesa. Es torna a assecatge durant trenta minuts per assegurar que el pes de la matèria grassa es manté constant (la pèrdua de pes entre dos mesuraments successius ha de ser inferior a 1 mg).

5.2 Procediment B.

Es pesen, amb un error inferior a 1 mg, 2,5 gr de la mostra (vegeu l'observació 8.2), s'introdueixen en un cilindre de 400 ml o en un matràs cònic de 300 ml i s'afegeixen 100 ml d'àcid clorhídric 3 M (3.3) i alguns fragments de pedra tosca. Es cobreix el cilindre amb un vidre de rellotge o es dota el matràs cònic d'un refrigerador de reflux. Es porta la mescla a ebullició suau amb l'ajut d'una flama petita o d'una placa elèctrica, i es manté així durant una hora. Cal evitar que el producte s'enganxi a les parets del recipient.

Es refreda i s'afegeix una quantitat de coadjuvant de filtració (3.4) suficient per evitar qualsevol pèrdua de matèria grassa en el moment de la filtració. Es filtra en un paper filtre doble humitejat, sense matèries grasses. Es renta el residu amb aigua freda fins que s'arriba a la neutralitat del filtrat. Es comprova que el filtrat no conté matèries grasses. La presència d'aquestes matèries indica que s'ha de fer una extracció de la mostra mitjançant èter de petroli, segons el procediment A, abans de la hidròlisi.

Es col·loca el paper filtre doble que conté el residu en un vidre de rellotge, i s'asseca durant una hora i mitja a l'estufa a 100 °C ± 3 °C.

S'introdueix el paper filtre doble que conté el residu sec en un cartutx d'extracció (4.2) i es cobreix amb un tampó de cotó desgreixat. Es col·loca el cartutx en un extractor (4.1) i es continua l'operació tal com s'indica en els paràgrafs segon i tercer del punt 5.1.

6. Càlcul dels resultats

S'expressa el resultat de la pesada en parts per cent de mostra.

7. Repetibilitat

La diferència entre dues determinacions paral·leles efectuades en una mateixa mostra mitjançant la mateixa anàlisi no ha de superar:

0,2 per 100 en valor absolut, per als continguts de matèries grasses brutes inferiors al 5 per 100.

4,0 per 100 del resultat més elevat per als continguts del 5 al 10 per 100.

0,4 per 100 en valor absolut, per als continguts superiors al 10 per 100.

8. Observacions

8.1 Per als productes amb un alt contingut de matèries grasses, difícils de diluir o no apropiats per a l'obtenció d'una mostra d'assaig reduïda homogènia, s'ha de procedir de la manera següent:

Es pesen, amb un error inferior a 1 mg, 20 gr de la mostra i es mesclen amb 10 gr o més de sulfat de sodi anhidre (3.2). S'extreu mitjançant èter de petroli (3.1) tal com indica el punt 5.1. Es completa l'extracte obtingut fins a 500 ml amb èter de petroli (3.1) i es mescla. S'introdueixen 50 ml de la solució en un matràs petit sec, proveït d'alguns fragments de pedra tosca (1) i tarat. S'elimina el dissolvent per destil·lació, s'asseca i es continua l'operació tal com indica l'últim paràgraf del punt 5.1.

S'elimina el dissolvent del residu d'extracció present en el cartutx, es redueix el residu a un gruix d'1 mm, es torna a col·locar al cartutx (no s'afegeix sulfat de sodi) i es continua l'operació tal com indiquen els paràgrafs segon i tercer del punt 5.1.

El contingut de matèries grasses brutes en parts per cent de mostres es determina mitjançant la fórmula:

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

en què:

a = massa, en grams, del residu de la primera extracció (part alíquota de l'extracte).

b = massa, en grams, del residu de la segona extracció.

8.2 La quantitat per a assaig dels productes pobres en matèries grasses es pot augmentar a 5 gr.

8.3 És possible que els pinsos per a animals de companyia amb un alt contingut d'aigua s'hagin de mesclar amb sulfat de sodi anhidre abans de la hidròlisi i l'extracció feta segons el procediment B.

8.4 En el punt 5.2, l'ús d'aigua calenta en comptes d'aigua freda per rentar els residus després de la filtració pot resultar més efectiu.

8.5 Pot ser que calgui ampliar el temps d'assecatge una hora i mitja per a alguns pinsos. S'ha d'evitar l'assecament en excés ja que pot produir baixos resultats. També es pot utilitzar un forn microones.

8.6 Es recomana utilitzar la preextracció per mitjà del procediment A abans de la hidròlisi i la reextracció per mitjà del procediment B, si el contingut de matèries grasses brutes és superior al 15 per 100. Fins a cert punt, això depèn de la naturalesa dels pinsos i de la naturalesa de les matèries grasses que continguin.

(1) Els fragments de pedra tosca s'han de substituir per perles de vidre si la matèria grassa s'ha de sotmetre a exàmens qualitius ulteriors.

MÈTODE C

62. Determinació d'olaquindox

(N¹,N⁴-(diòxid de 2-[N-2'-(hidroxietil)carbamoi]-3-metilquinoxalina-)

1. Finalitat i camp d'aplicació

Aquest mètode permet de determinar l'olaquindox dels pinsos. El límit de determinació és de 5 mg/kg.

2. Principi

La mostra s'extreu mitjançant una mescla d'aigua i metanol. El contingut d'olaquindox es determina per cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR) en fase inversa amb detecció UV.

3. Reactius

3.1 Metanol.

3.2 Metanol de qualitat CLAR.

3.3 Aigua de qualitat CLAR.

3.4 Fase mòbil per a la CLAR.

Mescla d'aigua (3.3)-metanol (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5 Substància patró: olaquindox pur N¹,N⁴-diòxid de 2-[N-2'-(hidroxietil)carbamoi]-3-metilquinoxalina, E 851.

3.5.1 Solució patró mare d'olaquindox, 250 gr/ml.

Es pesen, amb un marge d'error de 0,1 mg, 50 mg d'olaquindox (3.5) en un matràs graduat de 200 ml i s'hi afegeixen aproximadament 190 ml d'aigua. Es col·loca el matràs durant 20 minuts en un bany ultrasònic (4.1). Després del tractament ultrasònic, es porta la solució a temperatura ambient, s'hi afegeix aigua fins a enrasar i es barreja. S'embolica el matràs amb paper d'alumini i es col·loca al refrigerador. Es prepara cada mes.

3.5.2 Solució patró intermèdia d'olaquindox, 25 g/ml:

Es transfereixen 10,0 ml de la solució patró mare (3.5.1) a un matràs graduat de 100 ml, s'hi afegeix la fase mòbil (3.4) fins a enrasar i es mescla. S'embolica el matràs amb paper d'alumini i es col·loca al refrigerador. Es prepara cada dia.

3.5.3 Solucions patró de treball:

En una sèrie de matrassos graduats de 50 ml, es transfereixen 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 ml de solució patró intermèdia (3.5.2). S'afegeix la fase mòbil (3.4) fins a arribar al senyal i es mescla. S'embolica el matràs amb paper d'alumini. Aquestes solucions corresponen respectivament a 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10,0 gr d'olaquindox per ml. Les solucions s'han de preparar cada dia.

4. Material

4.1 Bany ultrasònic.

4.2 Agitador mecànic.

4.3 Equip per a CLAR amb detector ultraviolat de longitud d'ona variable o detector de xarxa de díodes.

4.3.1 Columna de cromatografia de 250 mm × 4 mm, C18, mida de partícula 10 µm, o equivalent.

4.4 Filtres de membrana de 0,45 µm.

5. Procediment

Nota: l'olaquindox és sensible a la llum. Totes les operacions s'han de fer amb llum tènue o utilitzant vidre de color ambrat.

5.1 Consideracions generals.

5.1.1 Prova en blanc d'un pinso de referència per comprovar l'absència d'olaquindox o de substàncies interferents.

5.1.2 S'efectua un test de recuperació analitzant el pinso de referència al qual s'ha afegit una quantitat s'olaquindox determinada, similar a la que hi ha a la mostra. Per obtenir una concentració de 50 mg/kg, es transfereixen 10,0 ml de la solució patró mare (3.5.1) a un matràs cònic de 250 ml i es concentra la solució per evaporació a uns 0,5 ml. S'afegeixen 50 g del pinso de referència, es mesclen amb cura i al cap de 10 minuts es tornen a mesclar diverses vegades abans de procedir a l'extracció (5.2).

Nota: per dur a terme aquest mètode, el pinso de referència ha de ser de característiques similars al de la mostra i no s'hi ha de detectar la presència d'olaquindox.

5.2 Extracció.—Es pesen, amb un marge d'error de 0,01 g, aproximadament 50 gr de la mostra. Es transfereixen a un matràs cònic de 1.000 ml, s'hi afegeixen 100 ml de metanol (3.1) i es col·loca el matràs durant 5 minuts en un bany ultrasònic (4.1). S'hi afegeixen 410 ml d'aigua i es deixa al bany ultrasònic durant 15 minuts més. Es retira el matràs del bany ultrasònic, s'agita durant 30 minuts en l'agitador (4.2) i es filtra a través d'un filtre de plecs. Es transfereixen 10,0 ml del líquid filtrat a un matràs graduat de 20 ml, s'hi afegeix aigua fins a arribar al senyal i es mescla. Una part alíquota es filtra a través d'un filtre de membrana (4.4) (vegeu l'observació 9). Es procedeix a la determinació mitjançant CLAR (5.3).

5.3 Determinació mitjançant CLAR.

5.3.1 Paràmetres.—Les condicions següents es proposen amb caràcter indicatiu, per la qual cosa se'n poden aplicar altres si ofereixen resultats equivalents.

Columna d'anàlisi (4.3.1).

Fase mòbil (3.4): mescla d'aigua (3.3) i de metanol (3.2), 900 (V + V).

Flux: 1,5-2 ml/minut.

Longitud d'ona de detecció: 380 nm.

Volum d'injecció: 20 µml-100 µml.

Comprovar l'estabilitat del sistema cromatogràfic injectant diverses vegades la solució patró de treball (3.5.3) de 2,5 gr/ml fins a obtenir altures de pic i temps de retenció constants.

5.3.2 Corba de calibratge.—S'injecta cada solució patró de treball (3.5.3) diverses vegades i es determinen les altures (àrees) mitjanes dels pics per a cada concentració. Es traça una corba de calibratge utilitzant les altures (àrees) mitjanes dels pics de les solucions patró de treball com a ordenades i les concentracions corresponents en µg/ml com a abscisses.

5.3.3 Solució de la mostra.—S'injecta l'extracte de la mostra (5.2) diverses vegades utilitzant el mateix volum que l'emprat per a les solucions patró de treball i es determina l'altura (àrea) mitjana dels pics de l'olaquindox.

6. Expressió dels resultats

A partir de l'altura (àrea) mitjana dels pics de l'olaquindox de la solució de la mostra, es determina la concentració de la solució de la mostra en µg/ml per referència a la corba de calibratge (5.3.2).

El contingut p d'olaquindox de la mostra, expressat en mg/kg, s'obté mitjançant la fórmula següent:

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

en què:

c = concentració d'olaquindox a l'extracte de la mostra (5.2) en µg/ml.

m = massa de la mostra en gr.

7. Validació dels resultats

7.1 Identitat.—La identitat de l'analit pot ser confirmada per cromatografia o mitjançant un detector de xarxa de díodes que permet comparar els espectres de l'extracte de la mostra (5.2) i de la solució patró de treball (3.5.3) de 5,0 µg/ml.

7.1.1 Cocromatografia.

S'enriqueix amb una quantitat adequada de la solució patró de treball (3.5.3) un extracte de la mostra (5.2). La quantitat d'olaquindox afegida ha de ser similar a la quantitat d'olaquindox trobada a l'extracte de la mostra.

Només ha d'augmentar l'altura del pic d'olaquindox tenint en compte la quantitat afegida i la dilució de l'extracte. L'amplada del pic a la meitat de la seva altura s'ha de situar aproximadament ± 10 per 100 de l'amplada inicial del pic d'olaquindox de l'extracte de la mostra abans de ser enriquit.

7.1.2 Detecció per xarxa de díodes.

Els resultats s'han d'avaluar d'acord amb els criteris següents:

a) La longitud d'ona d'absorció màxima dels espectres de la mostra i de la solució patró, registrada en el vèrtex del pic en el cromatograma, s'ha d'establir dins d'un marge determinat pel poder de resolució del sistema de detecció. Per a la detecció per xarxa de díodes, se situa generalment en ± 2 nm.

b) Entre 220 i 400 nm, els espectres de la mostra i de la solució patró, registrats en el vèrtex del pic del cromatograma, no han de ser diferents a les parts de l'espectre situades entre el 10 per 100 i el 100 per 100 de l'absorbància relativa. Aquesta condició es compleix quan hi són presents els mateixos màxims i la desviació observada entre els espectres no supera en cap punt el 15 per 100 de l'absorbància de l'analit patró.

c) Entre 220 i 400 nm, els espectres del pendent ascendent de l'àpex i del pendent descendent del pic produïts per l'extracte de la mostra no han de ser diferents a les parts de l'espectre situades entre el 10 per 100 i el 100 per 100 de l'absorbància relativa. Aquesta condició es compleix quan hi són presents els mateixos màxims i en tots els punts observats la desviació entre els espectres no supera el 15 per 100 de l'absorbància de l'espectre del vèrtex del pic.

Si no es compleix una d'aquestes dues condicions, no s'ha pogut confirmar la presència de l'analit.

7.2 Repetibilitat.—La diferència entre els resultats de dues determinacions paral·leles efectuades sobre la mateixa mostra no ha de superar en un 15 per 100 el resultat superior per als continguts d'olaquinox entre 10 i 200 mg/kg.

7.3 Rendiment.—En el cas d'una mostra enriquida, el rendiment ha de ser com a mínim del 90 per 100.

8. Resultats d'un estudi entre diversos laboratoris

S'ha fet un estudi entre diversos laboratoris comunitaris en el qual quatre mostres de pinsos per a garrins —inclòs un pinso de referència— han estat analitzades per 13 laboratoris. A continuació figuren els resultats de l'estudi:

	Mostra número 1	Mostra número 2	Mostra número 3	Mostra número 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Mitja (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 (percentatge)	—	5,6	4,3	6,7
CV _r (percentatge)	—	11,1	8,9	8,8
Contingut nominal (mg/kg)	—	15	50	100
Recuperació (percentatge)	—	97,3	96,0	95,4

L: nombre de laboratoris.

n: nombre de valors individuals.

S_t (mg/kg): desviació típica repetibilitat.

S_r (mg/kg): desviació típica reproductibilitat.

CV_t (percentatge): coeficient de variació de la repetibilitat.

CV_r (percentatge): coeficient de variació de la reproductibilitat.

9. Observació

Encara que el mètode no ha estat validat per a pinsos amb un contingut d'olaquinox més alt de 100 mg/kg, seria possible obtenir resultats satisfactoris agafant un pes menor de la mostra o diluint l'extracte (5.2) per aconseguir una concentració dins del rang de les solucions de calibratge (5.3.2).

9658 *CORRECCIÓ d'errades del Reial decret 258/1999, de 12 de febrer, pel qual s'estableixen condicions mínimes sobre la protecció de la salut i l'assistència mèdica dels treballadors del mar.* («BOE» 103, de 30-4-1999.)

Havent observat errades en el text del Reial decret 258/1999, de 12 de febrer, pel qual s'estableixen condicions mínimes sobre la protecció de la salut i l'assistència mèdica dels treballadors del mar, publicat en el «Butlletí Oficial de l'Estat» número 47, de 24 de febrer de 1999, i en el suplement en català número 6, de 23 de març de 1999, es procedeix a fer-ne les modificacions oportunes referides a la versió en llengua catalana:

A la pàgina 436, primera columna, article 8, apartat b), segona línia, on diu: «... pels metges facultatius competents.», hi ha de dir: «... pels metges facultatius competents o pel personal sanitari designat per l'Institut Social de la Marina.»

A la pàgina 439, annex II, botiquí A, cajón 1, 01.2.02.1 Nitroglicerina, el codi ha de ser 01.2.01.1.

A la pàgina 441, annex II, botiquí A, on hi ha un (*) amb la llegenda: «Estos medicamentos deben conservarse en nevera frigorífica y bajo custodia del capitán o responsable del botiquín», hi ha de dir: «Estos medicamentos deben conservarse bajo custodia del capitán o responsable del botiquín.»

A la pàgina 450, annex II, botiquí A, fuera de cajones, insecticidas en polvo, apartat de 15-20 tripulants, on diu: «31 kg», hi ha de dir: «3 kg».

A la pàgina 453, annex II, botiquí B, on hi ha un (*) amb la llegenda: «Este medicamento debe conservarse en nevera frigorífica y bajo custodia del capitán o responsable del botiquín», hi ha de dir: «Este medicamento debe conservarse bajo custodia del capitán o responsable del botiquín.»

A la pàgina 462, annex II, botiquí C, secció III, material médico, apósitos autoadhesivos estériles, on diu: «dos unidades» hi ha de dir: «una unidad».

A la pàgina 462, annex II, botiquí C, secció III, material médico, manta para quemados y supervivientes termoaislante oro-plata, on diu: «dos unidades» hi ha de dir: «una unidad».

A la pàgina 462, annex II, botiquí C, secció III, material médico, mantas para quemados y supervivientes termoaislante oro-plata, on diu: «dos unidades» hi ha de dir: «una unidad».

A la pàgina 465, annex III, darrer paràgraf, línia segona, on diu: «... se especifican en el anexo VI (dotación de antidotos)...», hi ha de dir: «... se especifican en el anexo IV (dotación de antidotos) del presente Real Decreto».

A la pàgina 471, annex VI, botiquí A, cajón 1, 01.3.01.2 furosema, quantitat exigida > 20 tripulants, on diu: «2 cajas», hi ha de dir «1 caja».

A la pàgina 471, annex VI, botiquí A, cajón 1, 01.4.03.4 gelatina hemostática, quantitat exigida > 20 tripulants, on diu: «2 cajas», ha de dir «1 caja».

A la pàgina 471, annex VI, botiquí A, cajón 2, 02.2.03.2 ranitidina, el codi ha de ser 02.1.03.2.

A la pàgina 472, annex VI, botiquí A, cajón 3, 03.1.10.1 metamizol, 20 cápsulas 500 mg, hi ha de dir: «20 cápsulas 575 mg».

A la pàgina 473, annex VI, botiquí A, cajón 6, 06.1.02.1 salbutamol, 0,5% solución inhal. 10 ml, hi ha de dir: «100 MCG/puls 20 AERO 200».