

# MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

**335** *ORDEN de 29 de diciembre de 2000 por la que se modifica el anexo del Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias.*

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 las que se establecen diversos métodos de análisis, fueron incorporados al ordenamiento jurídico interno mediante Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias.

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

Aprobada la Directiva 2000/45/CE de la Comisión, de 6 de julio de 2000, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para la determinación de Vitamina A, Vitamina E y Triptófano en los alimentos para animales, es preciso proceder a su incorporación, modificando o ampliando en lo que es preciso los métodos actualmente vigentes como oficiales.

La presente Orden, que incorpora la citada Directiva 2000/45/CE, se dicta al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.16.<sup>ª</sup> de la Constitución que atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación general de la sanidad.

En la elaboración de esta disposición han sido consultadas las Comunidades Autónomas y los sectores afectados. Asimismo, ha sido sometida a informe de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria.

En su virtud, a propuesta del Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación y de la Ministra de Sanidad y Consumo,

## DISPONGO:

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

Se modifica el anexo del Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueban diversos métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias, de la siguiente forma: Se añaden los métodos para la determinación de Vitamina A, Vitamina E y Triptófano que figuran en el anexo de la presente Orden.

Disposición final única. *Entrada en vigor.*

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

Madrid, 29 de diciembre de 2000.

RAJOY BREY

Excmo. Sr. Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación y Excmo. Sra. Ministra de Sanidad y Consumo.

## ANEXO

## 68.- DETERMINACIÓN DE VITAMINA A

**1. Objetivos y campo de aplicación.**

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

El límite de determinación es de 2 000 UI de vitamina A/kg.

**2. Principio**

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

**3. Reactivos.**

- 3.1. Etanol,  $\sigma = 96\%$
- 3.2. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40°C – 60°C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Solución de hidróxido potásico  $\beta = 50$  g/100 ml
- 3.5. Solución de ascorbato sódico,  $\beta = 10$  g/100 ml (véanse las observaciones del punto 7.7)
- 3.6. Sulfuro sódico,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ )
- 3.6.1. Solución de sulfuro sódico,  $c = 0,5$  mol/l en glicerol,  $\beta = 120$  g/l para  $x = 9$  (véanse las observaciones del punto 7.8)
- 3.7. Solución de fenoltaleína,  $\beta = 2$  g/100 ml en etanol (3.1)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Fase móvil para CLAR: mezcla de metanol (3.3) y agua, p. ej. 980 + 20 (v + v). La proporción exacta se determinará en función de las características de la columna empleada
- 3.10. Nitrógeno, libre de oxígeno
- 3.11. Acetato de todo-*trans*-retinilo, extra puro, de actividad certificada, p. ej.  $2,80 \times 10^6$  UI/g
- 3.11.1. Solución madre de acetato de todo-*trans*-retinilo: Pesar, con precisión de 0,1 mg, 50 mg de acetato de todo-*trans*-retinilo (3.11) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en 2-propanol (3.8) y enrasar con el mismo disolvente. La concentración nominal de esta solución es de 1 400 UI de vitamina A por ml. El contenido exacto ha de determinarse según el punto 5.6.3.1
- 3.12. Palmitato de todo-*trans*-retinilo, extra puro, de actividad certificada, por ejemplo  $1,80 \times 10^6$  UI/g
- 3.12.1. Solución madre de palmitato de todo-*trans*-retinilo: Pesar, con precisión de 0,1 mg, 80 mg de palmitato de todo-*trans*-retinilo (3.12) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en 2-propanol (3.8) y enrasar con el mismo disolvente. La concentración nominal de esta solución es de 1 400 UI de vitamina A por ml. El contenido exacto ha de determinarse según el punto 5.6.3.2
- 3.13. 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (véanse las observaciones del punto 7.5).

**4. Equipo**

- 4.1. Evaporador rotatorio de vacío
- 4.2. Material de cristal ámbar

- 4.2.1. Matraces Erlenmeyer de fondo plano, de 500 ml, con boca esmerilada
- 4.2.2. Matraces aforados con tapón esmerilado, de cuello estrecho, de 10, 25, 100 y 500 ml
- 4.2.3. Ampollas cónicas de decantación, de 1 000 ml, con tapón esmerilado
- 4.2.4. Matraces piriformes, de 250 ml, con boca esmerilada
- 4.3. Condensador de Allihn con camisa de 300 mm de longitud, con juntas esmeriladas y adaptador para tubo de alimentación de gas
- 4.4. Papel de filtro plegado para separación de fases, de 185 mm de diámetro (por ejemplo, Schleicher & Schuell 597 HY ½)
- 4.5. Equipo de CLAR con sistema de inyección
- 4.5.1. Columna de cromatografía de líquidos, de 250 mm x 4 mm, con relleno de C<sub>18</sub> de 5 o 10 µm, o equivalente (el criterio de funcionamiento es que aparezca un solo pico para todos los isómeros del retinol en las condiciones de la CLAR)
- 4.5.2. Detector de UV o de fluorescencia, con ajuste de longitud de onda variable
- 4.6. Espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm
- 4.7. Baño María con agitador magnético
- 4.8. Aparato de extracción (véase la figura 1) con los siguientes elementos:
  - 4.8.1. Probeta de 1 litro de capacidad provista de cuello y tapón esmerilados
  - 4.8.2. Pieza esmerilada provista de brazo lateral y de un tubo ajustable que pasa por el centro. El extremo inferior del tubo ajustable debe tener forma de U, mientras que el superior debe ser una tobera, de forma que pueda pasarse la capa superior de líquido de la probeta a una ampolla de decantación.

## 5. Procedimiento

*Nota:* La vitamina A es sensible a la luz (UV) y a la oxidación. Todas las operaciones deben realizarse en ausencia de luz (utilizando material de cristal ámbar o protegido con papel de aluminio) y de oxígeno (en corriente de nitrógeno). Durante la extracción, el aire que se encuentre por encima del líquido debe ser sustituido por nitrógeno (evítese llegar a una presión excesiva aflojando el tapón de vez en cuando).

### 5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra hasta que pase por un tamiz de malla de 1 mm, procurando evitar la producción de calor. La trituración debe hacerse justo antes de la pesada y la saponificación para que no haya pérdida de vitamina A.

### 5.2. Saponificación

En función del contenido de vitamina A, pesar, con precisión de 0,01 g, entre 2 g y 25 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (4.2.1). Añadir sucesivamente, agitando circularmente, 130 ml de etanol (3.1), unos 100 mg de BHT (3.13), 2 ml de solución de ascorbato sódico (3.5) y 2 ml de solución de sulfuro sódico (3.6). Ajustar el condensador (4.3) al matraz e introducir éste en un baño María con agitador magnético (4.7). Calentar hasta ebullición y dejar hervir a reflujo durante 5 minutos. Añadir entonces 25 ml de solución de hidróxido potásico (3.4) a través del condensador (4.3) y dejar hervir a reflujo durante 25 minutos más, agitando circularmente bajo una corriente lenta de nitrógeno. Enjuagar después el condensador con unos 20 ml de agua y enfriar el contenido del matraz hasta temperatura ambiente.

### 5.3. Extracción

Pasar cuantitativamente por decantación la solución de saponificación, enjuagando con un volumen total de 250 ml de agua, a una ampolla de decantación de 1 000 ml (4.2.3) o al aparato de extracción (4.8). Lavar el matraz de saponificación sucesivamente con 25 ml de etanol (3.1) y 100 ml de éter de petróleo (3.2) y pasar los líquidos de lavado a la ampolla de decantación o al aparato de extracción. La proporción de agua y etanol en las soluciones combinadas debe ser aproximadamente de 2:1. Sacudir enérgicamente durante 2 minutos y dejar reposar durante otros 2 minutos.

#### 5.3.1. Extracción con ampolla de decantación (4.2.3)

Cuando se hayan separado las fases (véanse las observaciones del punto 7.3) pasar la capa de éter de petróleo a otra ampolla de decantación (4.2.3). Repetir dos veces esta extracción con 100 ml de éter de petróleo (3.2) y dos veces con 50 ml de éter de petróleo (3.2)

Lavar dos veces los extractos combinados girando suavemente (para evitar la formación de emulsiones) con sendos volúmenes de 100 ml de agua y sacudir después repetidamente con más porciones de 100 ml de agua hasta que el agua no se coloree al añadir solución de fenoltaleína (3.7) (normalmente es suficiente con lavar cuatro veces). Pasar a un matraz aforado de 500 ml (4.2.2) el extracto lavado, a través de un filtro plegado seco para separación de fases (4.4) a fin de eliminar el agua que pudiera haber en suspensión. Lavar la ampolla de decantación y el filtro de 50 ml de éter de petróleo (3.2), enrasar con éter de petróleo (3.2) y mezclar bien.

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

Cuando se hayan separado las capas (véanse las observaciones del punto 7.3) cambiar el tapón de la probeta (4.8.1) por la pieza esmerilada (4.8.2) y colocar el extremo inferior con forma de U del tubo ajustable de manera que quede justo por encima del nivel de la interfase. Aplicando nitrógeno a presión en el brazo lateral, pasar la capa superior de éter de petróleo a una ampolla de decantación de 1 000 ml (4.2.3). Añadir 100 ml de éter de petróleo (3.2) a la bureta, tapar y sacudir bien. Dejar que se separen las fases y pasar la capa superior a la ampolla de decantación como antes. Repetir el procedimiento de extracción con otros 100 ml de éter de petróleo (3.2), y después con dos porciones de 50 ml de éter de petróleo (3.2); añadir las fases de éter de petróleo a la ampolla de decantación.

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

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

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

#### 5.5. Determinación por CLAR

La vitamina A se separa en una columna de fase inversa de  $C_{18}$  (4.5.1) y se mide su concentración mediante un detector de UV (325 nm) o un detector de fluorescencia (excitación: 325 nm, emisión: 475 nm) (4.5.2).

Inyectar una porción alícuota (por ejemplo 20  $\mu$ l) de la solución metanólica obtenida en 5.4 y eluir con la fase móvil (3.9). Calcular la altura (área) media del pico con varias inyecciones de la misma solución de muestra, así como la altura (área) media del pico con varias inyecciones de las soluciones de calibrado (5.6.2).

#### Condiciones de CLAR

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

|   |   |
|---|---|
| Columna de cromatografía de líquidos (4.5.1): | 250 mm x 4 mm, relleno de $C_{18}$ 5 o 10 $\mu$ m, o equivalente                |
| Fase móvil (3.9):                             | Mezcla de metanol (3.3) y agua por ejemplo 980 + 20 (v+v)                       |
| Flujo:  | 1-2 ml/min  |
| Detector (4.5.2):                             | Detector de UV (325 nm) o de fluorescencia (excitación: 325 nm/emisión: 475 nm) |

#### 5.6. Calibrado

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

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

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

## 5.6.2. Preparación de las soluciones de calibrado y curva de calibrado

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

Inyectar varias veces 20 µl de cada solución de calibrado y determinar las altura (áreas) medias de los picos. Utilizando estos datos, trazar la curva de calibrado teniendo en cuenta los resultados del control de UV (5.6.3.3.).

## 5.6.3. Normalización UV de las soluciones patrón

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

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

Cálculo del contenido de vitamina A:

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

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

## 5.6.3.2. Solución madre de palmitato de vitamina A

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

Cálculo del contenido de vitamina A:

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

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

## 5.6.3.3. Solución patrón de trabajo de vitamina A

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

Cálculo del contenido de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

(  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  de la vitamina A como alcohol = 1 821 a 325 nm en 2-propanol)

## 6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de vitamina A de la solución de la muestra, determinar la concentración de la solución de la muestra en UI/ml mediante la curva de calibrado (5.6.2).

El contenido  $w$  de vitamina A de la muestra, expresado en UI/kg, se obtiene mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

$\beta$  = concentración de vitamina A en la solución de la muestra (5.4) expresada en UI/ml

$V_1$  = volumen de la solución de la muestra (5.4) en ml

$V_2$  = volumen de la alícuota tomada en 5.4 en ml

$m$  = masa de la porción de la muestra en g

## 7. Observaciones

- 7.1. En caso de muestras con baja concentración de vitamina A puede ser útil combinar los extractos de éter de petróleo con las dos cargas de saponificación (cantidad pesada: 25 g) en una única solución de muestra para la determinación por CLAR.
- 7.2. El peso de la muestra tomada para el análisis no debe contener más de 2 g de grasa.
- 7.3. Si no se produce la separación de las fases, añadir unos 10 ml de etanol (3.1) para romper la emulsión.
- 7.4. Con aceite de hígado de bacalao y otras grasas puras, el tiempo de saponificación tiene que prolongarse hasta 45-60 minutos.
- 7.5. Puede utilizarse hidroquinona en lugar del BHT.
- 7.6. Es posible la separación de los isómeros del retinol utilizando una columna de fase normal.
- 7.7. Pueden utilizarse unos 150 mg de ácido ascórbico en lugar de la solución de ascorbato sódico.
- 7.8. Pueden utilizarse unos 50 mg de EDTA en lugar de la solución de sulfuro sódico.

## 8. Repetibilidad

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

## 9. Resultados de un estudio entre varios laboratorios <sup>(1)</sup>

|               | Premezcla           | Pienso premezclado  | Concentrado mineral | Pienso proteínico | Lechón |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------|
| L             | 13                  | 12                  | 13                  | 12                | 13     |
| n             | 48                  | 45                  | 47                  | 46                | 49     |
| Media [UI/kg] | $17,02 \times 10^6$ | $1,21 \times 10^6$  | 537 100             | 151 800           | 18 070 |
| $s_r$ [UI/kg] | $0,51 \times 10^6$  | $0,039 \times 10^6$ | 22 080              | 12 280            | 682    |
| $r$ [UI/kg]   | $1,43 \times 10^6$  | $0,109 \times 10^6$ | 61 824              | 34 384            | 1 910  |
| $CV_r$ [%]    | 3,0                 | 3,5                 | 4,1                 | 8,1               | 3,8    |
| $S_R$ [UI/kg] | $1,36 \times 10^6$  | $0,069 \times 10^6$ | 46 300              | 23 060            | 3 614  |
| $R$ [UI/kg]   | $3,81 \times 10^6$  | $0,193 \times 10^6$ | 129 640             | 64 568            | 10 119 |
| $CV_R$ [%]    | 8,0                 | 6,2                 | 8,6                 | 15                | 20     |

L: número de laboratorios

n: número de valores individuales

$s_r$ : desviación típica de la repetibilidad

$s_R$ : desviación típica de la reproducibilidad

$r$ : repetibilidad

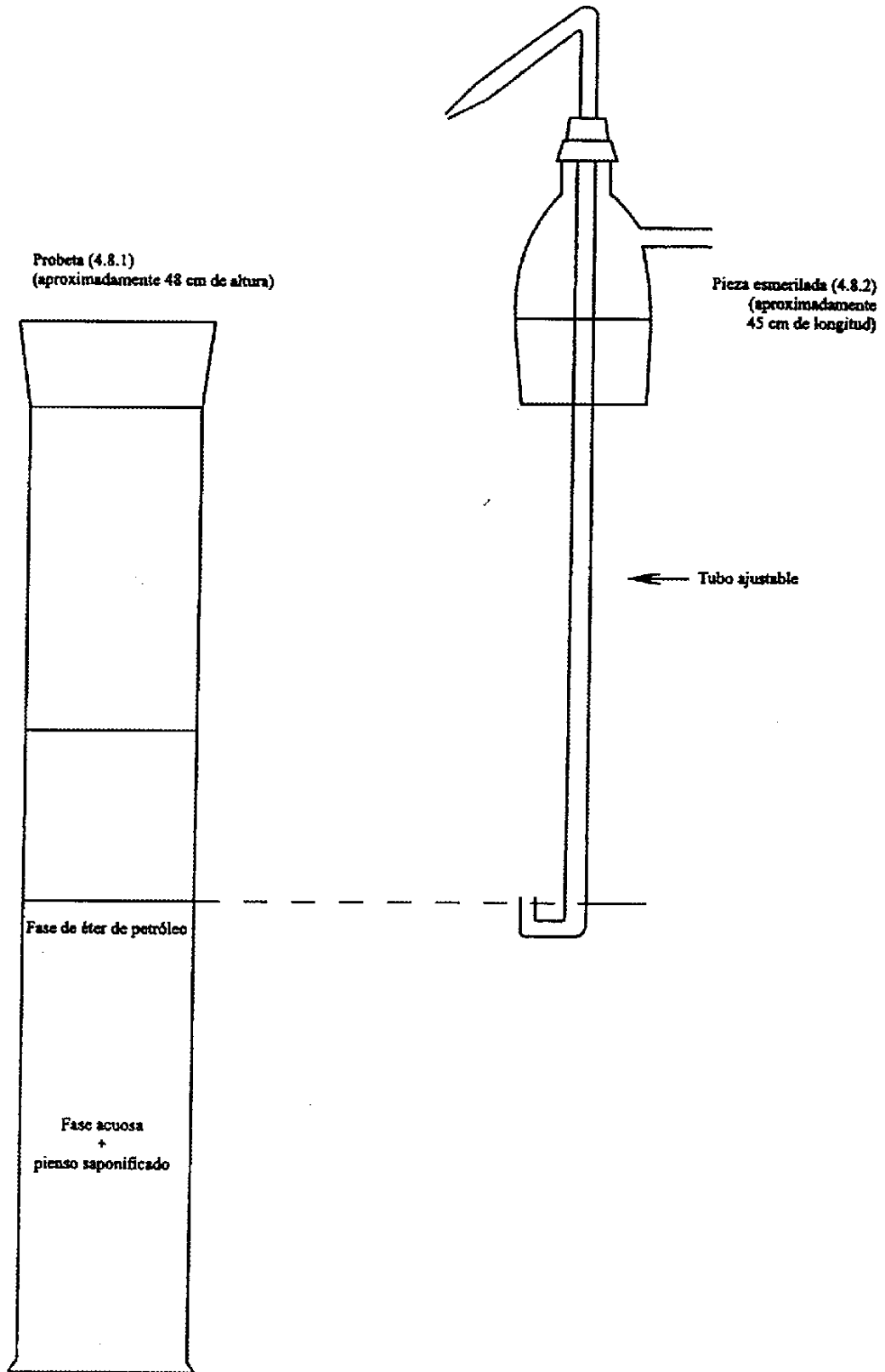
$R$ : reproducibilidad

$CV_r$ : coeficiente de variación de la repetibilidad

$CV_R$ : coeficiente de variación de la reproducibilidad

(1) Realizado por el Grupo de trabajo sobre piensos de la asociación Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFa).

Figura 1: Aparato de extracción (4.8)



## 69.- DETERMINACIÓN DE VITAMINA E

**1. Objetivos y campo de aplicación.**

El método permite la determinación de vitamina E en los piensos y premezclas. El contenido de vitamina E se expresa en mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por kg. Un mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol corresponde 0,91 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).

El límite de determinación es de 2 mg de vitamina E/kg.

**2. Principio**

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

**3. Reactivos.**

- 3.1. Etanol,  $\sigma = 96\%$
- 3.2. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40°C - 60°C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Solución de hidróxido potásico  $\beta = 50$  g/100 ml
- 3.5. Solución de ascorbato sódico,  $\beta = 10$  g/100 ml (véanse las observaciones del punto 7.7)
- 3.6. Sulfuro sódico,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ )
- 3.6.1. Solución de sulfuro sódico,  $c = 0,5$  mol/l en glicerol,  $\beta = 120$  g/l para  $x = 9$ ) (véanse las observaciones del punto 7.8)
- 3.7. Solución de fenoltaleína,  $\beta = 2$  g/100 ml en etanol (3.1)
- 3.8. Fase móvil para CLAR: mezcla de metanol (3.3) y agua, p. ej. 980 + 20 (v + v). La proporción exacta se determinará en función de las características de la columna empleada
- 3.9. Nitrógeno, libre de oxígeno
- 3.10. Acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol, extra puro, de actividad certificada.
- 3.10.1. Solución madre de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol: Pesar, con precisión de 0,1 mg, 100 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.10) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en etanol (3.1) y enrasar con el mismo disolvente. La concentración nominal de esta solución es de 1 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml (para el control de UV, véase el punto 5.6.1.3; véanse las observaciones del punto 7.4).
- 3.11. DL- $\alpha$ -tocoferol, extra puro, de actividad certificada
- 3.11.1. Pesar, con precisión de 0,1 mg, 100 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.10) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en etanol (3.1) y enrasar con el mismo disolvente. La concentración de esta solución es de 1 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml (para el control de UV, véase el punto 5.6.2.3; para la estabilización, véanse las observaciones del punto 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT).

**4. Equipo**

- 4.1. Evaporador rotatorio de vacío
- 4.2. Material de cristal ámbar
- 4.2.1. Matraces Erlenmeyer de fondo plano, de 500 ml, con boca esmerilada



- 4.2.2. Matraces aforados con tapón esmerilado, de cuello estrecho, de 10, 25, 100 y 500 ml
- 4.2.3. Ampollas cónicas de decantación, de 1 000 ml, con tapón esmerilado
- 4.2.4. Matraces piriformes, de 250 ml, con boca esmerilada
- 4.3. Condensador de Allihn con camisa de 300 mm de longitud, con juntas esmeriladas y adaptador para tubo de alimentación de gas
- 4.4. Papel de filtro plegado para separación de fases, de 185 mm de diámetro (por ejemplo, Schleicher & Schuell 597 HY ½)
- 4.5. Equipo de CLAR con sistema de inyección
- 4.5.1. Columna de cromatografía de líquidos, de 250 mm x 4 mm, con relleno de C<sub>18</sub>, de 5 o 10 µg, o equivalente
- 4.5.2. Detector de UV o de fluorescencia, con ajuste de longitud de onda variable
- 4.6. Espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm
- 4.7. Baño María con agitador magnético
- 4.8. Aparato de extracción (véase la figura 1) con los siguientes elementos:
  - 4.8.1. Probeta de 1 litro de capacidad provista de cuello y tapón esmerilados
  - 4.8.2. Pieza esmerilada provista de brazo lateral y de un tubo ajustable que pasa por el centro. El extremo inferior del tubo ajustable debe tener forma de U, mientras que el superior debe ser una tobera, de forma que pueda pasarse la capa superior de líquido de la probeta a una ampolla de decantación.

## 5. Procedimiento

*Nota:* La vitamina E es sensible a la luz (UV) y a la oxidación. Todas las operaciones deben realizarse en ausencia de luz (utilizando material de cristal ámbar o protegido con papel de aluminio) y de oxígeno (en corriente de nitrógeno). Durante la extracción, el aire que se encuentre por encima del líquido debe ser sustituido por nitrógeno (evítese llegar a una presión excesiva aflojando el tapón de vez en cuando).

### 5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra hasta que pase por un tamiz de malla de 1 mm, procurando evitar la producción de calor. La trituración debe hacerse justo antes de la pesada y la saponificación para que no haya pérdida de vitamina E.

### 5.2. Saponificación

En función del contenido de vitamina E, pesar, con precisión de 0,01 g, entre 2 g y 25 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (4.2.1). Añadir sucesivamente, agitando circularmente, 130 ml de etanol (3.1), unos 100 mg de BHT (3.12), 2 ml de solución de ascorbato sódico (3.5) y 2 ml de solución de sulfuro sódico (3.6). Ajustar el condensador (4.3) al matraz e introducir éste en un baño María con agitador magnético (4.7). Calentar hasta ebullición y dejar hervir a reflujo durante 5 minutos. Añadir entonces 25 ml de solución de hidróxido potásico (3.4) a través del condensador (4.3) y dejar hervir a reflujo durante 25 minutos más, agitando circularmente bajo una corriente lenta de nitrógeno. Enjuagar después el condensador con unos 20 ml de agua y enfriar el contenido del matraz hasta temperatura ambiente.

### 5.3. Extracción

Pasar cuantitativamente por decantación la solución de saponificación, enjuagando con un volumen total de 250 ml de agua, a una ampolla de decantación de 1 000 ml (4.2.3) o al aparato de extracción (4.8). Lavar el matraz de saponificación sucesivamente con 25 ml de etanol (3.1) y 100 ml de éter de petróleo (3.2) y pasar los líquidos de lavado a la ampolla de decantación o al aparato de extracción. La proporción de agua y etanol en las soluciones combinadas debe ser aproximadamente de 2:1. Sacudir enérgicamente durante 2 minutos y dejar reposar durante otros 2 minutos.

#### 5.3.1. Extracción con ampolla de decantación (4.2.3)

Quando se hayan separado las fases (véanse las observaciones del punto 7.3) pasar la capa de éter de petróleo a otra ampolla de decantación (4.2.3). Repetir dos veces esta extracción con 100 ml de éter de petróleo (3.2) y dos veces con 50 ml de éter de petróleo (3.2)

Lavar dos veces los extractos combinados en la ampolla de decantación girando suavemente (para evitar la formación de emulsiones) con sendos volúmenes de 100 ml de agua y sacudir después repetidamente con más porciones de 100 ml de agua hasta que el agua no se coloree al añadir solución de fenoltaleína (3.7) (normalmente es suficiente con lavar cuatro veces). Pasar a un matraz aforado de 500 ml (4.2.2) el extracto lavado, a través de un filtro plegado seco para separación de fases (4.4) a fin de eliminar el agua que pudiera haber en suspensión. Lavar la ampolla de decantación y el filtro de 50 ml con éter de petróleo (3.2), enrasar con éter de petróleo (3.2) y mezclar bien.

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

Quando se hayan separado las capas (véanse las observaciones del punto 7.3) cambiar el tapón de la probeta (4.8.1) por la pieza esmerilada (4.8.2) y colocar el extremo inferior con forma de U del tubo ajustable de manera que quede justo por encima del nivel de la interfase. Aplicando nitrógeno a presión en el brazo lateral, pasar la capa superior de éter de petróleo a una ampolla de decantación de 1.000 ml (4.2.3). Añadir 100 ml de éter de petróleo (3.2) a la bureta, tapar y sacudir bien. Dejar que se separen las fases y pasar la capa superior a la ampolla de decantación como antes. Repetir el procedimiento de extracción con otros 100 ml de éter de petróleo (3.2), y después con dos porciones de 50 ml de éter de petróleo (3.2); añadir las fases de éter de petróleo a la ampolla de decantación.

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

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

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

#### 5.5. Determinación por CLAR

La vitamina E se separa en una columna de fase inversa de  $C_{18}$  (4.5.1) y se mide su concentración mediante un detector de fluorescencia (excitación: 325 nm, emisión: 475 nm) o un detector de UV (292 nm) (4.5.2).

Inyectar una porción alícuota (por ejemplo 20  $\mu$ l) de la solución metanólica obtenida en 5.4 y eluir con la fase móvil (3.8). Calcular la altura (área) media del pico con varias inyecciones de la misma solución de muestra, así como la altura (área) media del pico con varias inyecciones de las soluciones de calibrado (5.6.2).

#### Condiciones de CLAR

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

|   |   |
|---|---|
| Columna de cromatografía de líquidos (4.5.1): | 250 mm x 4 mm, relleno de $C_{18}$ 5 o 10 $\mu$ m, o equivalente                |
| Fase móvil (3.8):                             | Mezcla de metanol (3.3) y agua por ejemplo 980 + 20 (v+v)                       |
| Flujo:  | 1-2 ml/min  |
| Detector (4.5.2):                             | Detector de fluorescencia (excitación: 295 nm/emisión: 330 nm) o de UV (292 nm) |

#### 5.6. Calibrado (acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol o DL- $\alpha$ -tocoferol)

##### 5.6.1. Patrón de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol

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

Pasar con pipeta a un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (4.2.1) 25 ml de la solución madre de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.10.1); realizar la hidrólisis según se describe en el punto 5.2. Extraer después con éter de petróleo (3.2) según el punto 5.3 y enrasar con 500 ml de éter de petróleo. Evaporar 25 ml de este extracto en el evaporador rotatorio (véase el punto 5.4) casi totalmente, eliminar el disolvente restante con una serie de nitrógeno (3.9) y volver a disolver el residuo en 25,0 ml de metanol (3.3). La concentración nominal de esta solución es de 45,5  $\mu$ g de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml, equivalentes a 50  $\mu$ g de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

#### 5.6.1.2. Preparación de las soluciones de calibrado y curva de calibrado

Pasar 1,0, 2,0, 4,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo diluida a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,5, 5,0 10,0 y 25,0  $\mu$ g de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml, equivalentes a 2,28, 4,55, 9,10 y 22,8  $\mu$ g de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml.

Inyectar varias veces 20  $\mu$ l de cada solución de calibrado y determinar las alturas (áreas) medias de los picos. Utilizando estos datos, trazar la curva de calibrado.

#### 5.6.1.3. Normalización UV de la solución madre de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.10.1).

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

El máximo de extinción debe encontrarse a 284 nm.

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

A esta dilución debe obtenerse un valor de extinción entre 0,84 y 0,88.

#### 5.6.2. Patrón de DL- $\alpha$ -tocoferol.

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

Pasar con pipeta 2 ml de la solución madre de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.11.1) a un matraz aforado de 50 ml, disolver con metanol (3.3) y enrasar con metanol. La concentración nominal de esta solución es de 40  $\mu$ g de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml, equivalentes a 44,0  $\mu$ g de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

##### 5.6.2.2. Preparación de las soluciones de calibrado y curva de calibrado

Pasar 1,0, 2,0 4,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,0, 4,0, 8,0 y 20,0  $\mu$ g de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml, equivalentes a 2,20, 4,40, 8,79 y 22,0  $\mu$ g de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por ml.

Inyectar varias veces 20  $\mu$ g de cada solución de calibrado y determinar las alturas (áreas) medias de los picos. Utilizando estos datos, trazar la curva de calibrado.

##### 5.6.2.3. Normalización UV de la solución madre de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.11.1)

Diluir 2,0 ml de la solución madre de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.11.1) hasta 25,0 ml con etanol y medir el espectro de UV de esta solución frente al etanol (3.1) en el espectrofotómetro (4.6) entre 250 nm y 320 nm. El máximo de absorción debe encontrarse a 292 nm.

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

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

## 6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de vitamina E de la solución de la muestra, determinar la concentración de la solución de la muestra en  $\mu$ g/ml (calculada en acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol) mediante la curva de calibrado (5.6.1.2 ó 5.6.2.2).

El contenido  $w$  de vitamina E de la muestra, expresado en mg/kg, se obtiene mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

- $\beta$  = concentración de vitamina E en la solución de la muestra (5.4) expresada en  $\mu\text{g/ml}$   
 $V_1$  = volumen de la solución de la muestra (5.4) en ml  
 $V_2$  = volumen de la alícuota tomada en 5.4 en ml  
 $m$  = masa de la porción de la muestra en g

## 7. Observaciones

- 7.1. En caso de muestras con baja concentración de vitamina E puede ser útil combinar los extractos de éter de petróleo las dos cargas de saponificación (cantidad pesada: 25 g) en una única solución de muestra para la determinación por CLAR.
- 7.2. El peso de la muestra tomada para el análisis no debe contener más de 2 g de grasa.
- 7.3. Si no se produce la separación de las fases, añadir unos 10 ml de etanol (3.1) para romper la emulsión.
- 7.4. Tras la medida espectrofotométrica de la solución de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol o de DL- $\alpha$ -tocoferol según 5.6.1.3 ó 5.6.2.3, respectivamente añadir unos 10 mg de BHT (3.12) a la solución (3.10.1 ó 3.10.2) y guardar la solución en frigorífico (plazo máximo de conservación: cuatro semanas).
- 7.5. Puede utilizarse hidroquinona en lugar del BHT.
- 7.6. Es posible la separación de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ -tocoferol utilizando una columna de fase normal.
- 7.7. Pueden utilizarse unos 150 mg de ácido ascórbico en lugar de la solución de ascorbato sódico.
- 7.8. Pueden utilizarse unos 50 mg de EDTA en lugar de la solución de sulfuro sódico.

## 8. Repetibilidad

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

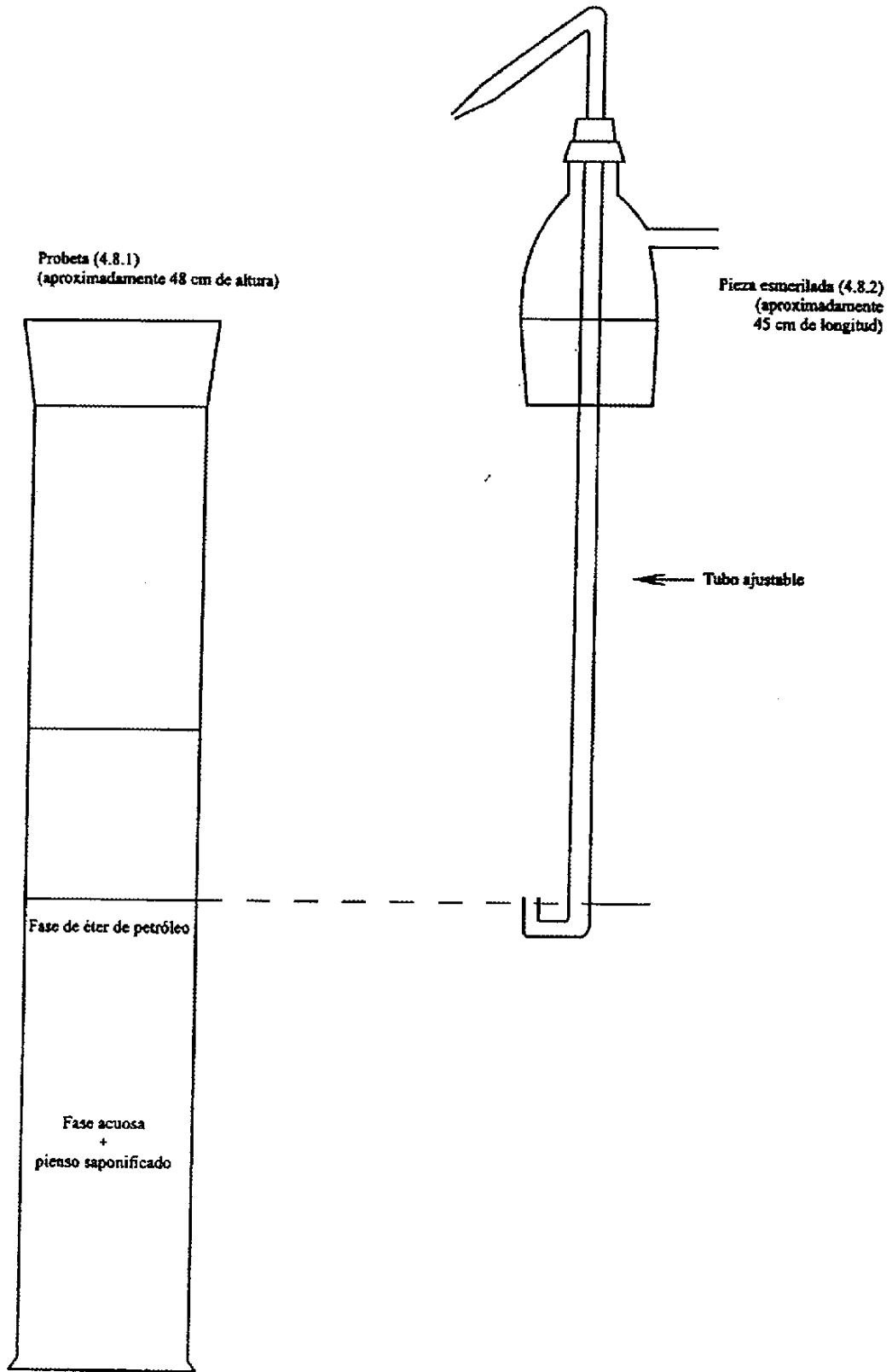
## 9. Resultados de un estudio entre varios laboratorios <sup>(1)</sup>

|                        | Premezcla | Pienso premezclado | Concentrado mineral | Pienso proteínico | Lechón |
|------------------------|-----------|--------------------|---------------------|-------------------|--------|
| L                      | 12        | 12                 | 12                  | 12                | 12     |
| n                      | 48        | 48                 | 48                  | 48                | 48     |
| Media [mg/kg]          | 17.380    | 1 187              | 926                 | 315               | 61,3   |
| $s_r$ [mg/kg]          | 384       | 45,3               | 25,2                | 13,0              | 2,3    |
| r [mg/kg]              | 1.075     | 126,8              | 70,6                | 36,4              | 6,4    |
| CV <sub>r</sub> [%]    | 2,2       | 3,8                | 2,7                 | 4,1               | 3,8    |
| S <sub>R</sub> [mg/kg] | 830       | 65,0               | 55,5                | 18,9              | 7,8    |
| R [mg/kg]              | 2 324     | 182,0              | 155,4               | 52,9              | 21,8   |
| CV <sub>R</sub> [%]    | 4,8       | 5,5                | 6,0                 | 6,0               | 12,7   |

- L : número de laboratorios  
n : número de valores individuales  
 $s_r$  : desviación típica de la repetibilidad  
 $s_R$  : desviación típica de la reproducibilidad  
r : repetibilidad  
R : reproducibilidad  
CV<sub>r</sub> : coeficiente de variación de la repetibilidad  
CV<sub>R</sub> : coeficiente de variación de la reproducibilidad

(1) Realizado por el Grupo de trabajo sobre piensos de la asociación Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFAs).

Figura 1: Aparato de extracción (4.8)



## 70. DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO

**1. Objetivos y campo de aplicación.**

El presente método permite la determinación del triptófano libre y total en los piensos. No distingue entre formas L y D.

**2. Principio**

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

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

El triptófano y el patrón interno presentes en el hidrolizado o en el extracto se determinan mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección por fluorescencia.

**3. Reactivos.**

3.1. Agua bidestilada o de calidad equivalente (conductividad < 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ )

3.2. Patrón: triptófano (pureza/contenido  $\geq 99\%$ ), desecado al vacío sobre pentóxido fosforoso.

3.3. Patrón interno:  $\alpha$ -metil-triptófano (pureza/contenido  $\geq 99\%$ ), desecado al vacío sobre pentóxido fosforoso

3.4. Hidróxido de bario octa-hidratado (debe procurarse no exponer excesivamente el  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  al aire a fin de evitarla formación de  $\text{BaCO}_3$ , que podría interferir con la determinación (véanse las observaciones del punto (9.3)

3.5. Hidróxido sódico.

3.6. Ácido ortofosfórico, w = 85%.

3.7. Ácido clorhídrico,  $d_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$ .

3.8. Metanol, grado CLAR.

3.9. Éter de petróleo, intervalo de ebullición 40-60°C

3.10. Solución de hidróxido sódico, c = 1 mol/l:

Disolver 40,0 g de  $\text{NaOH}$  (3.5) en agua y llevar hasta 1 litro con agua (3.1)

3.11. Ácido clorhídrico, c = 6 mol/l:

Tomar 492 ml de  $\text{HCl}$  (3.7) y llevar hasta 1 litro de agua

3.12. Ácido clorhídrico, c = 1 mol/l:

Tomar 82 ml de  $\text{HCl}$  (3.7) y llevar hasta 1 litro de agua

3.13. Ácido clorhídrico, c = 0,1 mol/l:

Tomar 8,2 ml de  $\text{HCl}$  (3.7) y llevar hasta 1 litro de agua

3.14. Ácido orto-fosfórico, c = 0,5 mol/l:

Tomar 34 ml de ácido orto-fosfórico (3.6) y llevar hasta 1 litro de agua

- 3.15. Solución concentrada de triptófano (3.2)  $c = 250 \mu\text{mol/ml}$ :  
En un matraz aforado de 500 ml disolver 0,2553 g de triptófano (3.2) en ácido clorhídrico (3.13) y enrasar con ácido clorhídrico (3.13). Conservar a  $-18^\circ\text{C}$  durante cuatro semanas como máximo.
- 3.16. Solución concentrada de patrón interno,  $c = 250 \mu\text{mol/ml}$ :  
En un matraz aforado de 500 ml disolver 0,2728 g de  $\alpha$ -metil-triptófano (3.3) en ácido clorhídrico (3.13) y enrasar con ácido clorhídrico (3.13). Conservar a  $-18^\circ\text{C}$  durante cuatro semanas como máximo.
- 3.17. Solución patrón de calibrado de triptófano y de patrón interno:  
Tomar 2,00 ml de solución concentrada de triptófano (3.15) y 2,00 de solución concentrada de patrón interno de ( $\alpha$ -metil-triptófano) (3.16). Diluir con agua (3.1) y metano (3.8) hasta conseguir aproximadamente el mismo volumen y la misma concentración de metanol (10-30 %) que en el hidrolizado final.  
Esta solución debe prepararse poco antes de su utilización.  
Proteger de la luz solar directa durante su preparación.
- 3.18. Ácido acético
- 3.19. 1,1,1-tricoloro-2-metil-2-propanol.
- 3.20. Etanolamina > 98 %.
- 3.21. Solución de 1 g de 1,1,1-tricoloro-2-metil-2-propanol (3.19) en 100 ml de metanol (3.8).
- 3.22. Fase móvil para CLAR: 3,00 g de ácido acético (3.18) + 900 ml de agua (3.1) + 50,0 ml de solución (3.21) de 1,1,1-tricoloro-2-metil-2-propanol (3.19) en metanol (3.8) (1 g/100 ml). Ajustar el pH a 5,00 con etanolamina (3.20). Llevar a 1 000 ml con agua (3.1).

#### 4. Equipo

- 4.1. Equipo de CLAR con detector por espectrofluorometría.
- 4.2. Columna de cromatografía de líquidos, de 125 mm x 4 mm, con relleno de  $\text{C}_{18}$ , de  $3 \mu\text{m}$ , o equivalente.
- 4.3. pH-metro
- 4.4. Matraz de propileno, de 125 ml de capacidad, boca ancha y tapón de rosca.
- 4.5. Filtro de membrana,  $0,45 \mu\text{m}$ .
- 4.6. Autoclave,  $110 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ ,  $1,4 (\pm 0,1) \text{ bar}$ .
- 4.7. Agitador mecánico o magnético.
- 4.8. Mezclador de torbellino.

#### 5. Procedimiento

##### 5.1. Preparación de la muestra

La muestra se tritura para que pase por un tamiz de 0,5 mm. Las muestras muy húmedas deben secarse al aire a una temperatura no superior a  $50^\circ\text{C}$  o bien liofilizarse antes de la trituración. Las muestras con un elevado contenido de grasa deben someterse a extracción con éter de petróleo (3.9) antes de la trituración.

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

Pesar en un matraz Erlenmeyer, con precisión de 1 mg, una cantidad adecuada (1-5 g) de la muestra preparada (5.1). Añadir 100,0 ml de ácido clorhídrico,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$  (3.13) y 5,00 ml de solución concentrada de patrón interno (3.16). Agitar u homogeneizar durante 60 minutos utilizando un agitador magnético o mecánico (4.7). Dejar sedimentar y pasar con pipeta a un vaso de precipitados 10,0 ml de la solución sobrenadante. Añadir 5 ml

de ácido orto-fosfórico,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  (3.14). Ajustar el pH a 3 utilizando hidróxido sódico,  $c = 1,0 \text{ mol/l}$  (3.10). Añadir suficiente metanol (3.8) para obtener una concentración de metanol entre el 10 y el 30 % en el volumen final. Pasar a un matraz aforado de capacidad adecuada y diluir con agua hasta conseguir un volumen apropiado para la cromatografía [aproximadamente el mismo volumen que la solución patrón de calibrado (3.17)].

Filtrar unos cuantos ml de la solución a través de un filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  (4.5) antes de la inyección en la columna de CLAR. Realizar la cromatografía de acuerdo con el punto 5.4.

Proteger la solución patrón y los extractos de la luz solar directa. Si no es posible analizar los extractos el mismo día pueden conservarse a  $5^\circ\text{C}$  durante tres días como máximo.

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

Pesar en el matraz de polipropileno (4.4), con precisión de 0,20 mg, entre 0,1 y 1 g de la muestra preparada (5.1). La porción pesada de muestra debe tener un contenido de nitrógeno de unos 10 mg. Añadir 8,4 g de hidróxido de bario octa-hidratado (3.4) y 10 ml de agua. Homogeneizar con un mezclador de torbellino (4.8) o un agitador magnético (4.7). Dejar dentro de la mezcla un imán recubierto de teflón. Lavar las paredes del recipiente con 4 ml de agua. Poner el tapón de rosca y cerrar sin apretar. Pasar al autoclave (4.6) con agua hirviendo y dejar en el vapor durante 30-60 minutos. Cerrar el autoclave y dejar a  $100 (\pm 2)^\circ\text{C}$  durante 20 horas.

Antes de abrir el autoclave reducir la temperatura hasta justo por debajo de  $100^\circ\text{C}$ . Para evitar la cristalización del  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ , añadir a la mezcla caliente 30 ml de agua que esté a temperatura ambiente. Agitar o girar suavemente. Añadir 2,00 ml de solución concentrada (3.16) de patrón interno ( $\alpha$ -metil-triptófano). Enfriar los recipientes en baño de agua/hielo durante 15 minutos.

A continuación, añadir 5 ml de ácido orto-fosfórico,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  (3.14). Mantener el recipiente en el baño frío y neutralizar con HCl,  $c = 6 \text{ mol/l}$  (3.11) mientras se sigue girando: ajustar el pH a 3,0 con HCl,  $c = 1 \text{ mol/l}$  (3.12). Añadir suficiente metanol para obtener una concentración de metanol entre el 10 y el 30 % en el volumen final. Pasar a un matraz aforado de capacidad adecuada y diluir con agua hasta conseguir el volumen definido necesario para la cromatografía (por ejemplo 100 ml). La adición de metanol no debe producir precipitación.

Filtrar unos cuantos ml de la solución a través de un filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  (4.5) antes de la inyección en la columna de CLAR. Realizar la cromatografía de acuerdo con el punto 5.4.

Proteger la solución patrón y los extractos de la luz solar directa. Si no es posible analizar los extractos el mismo día pueden conservarse a  $5^\circ\text{C}$  durante tres días como máximo.

### 5.4. Determinación por CLAR

Las siguientes condiciones de elución isocrática se proponen con carácter indicativo, por lo que podrán aplicarse otras si ofrecen resultados equivalentes (véanse también las observaciones de los puntos 9.1 y 9.2).

|   |   |
|---|---|
| Columna de cromatografía de líquidos (4.2): | 125 mm x 4 mm, relleno de $\text{C}_{18}$ , $3 \mu\text{m}$ , o equivalente   |
| Temperatura de la columna:                  | Temperatura ambiente  |
| Fase móvil (3.22):                          | 3,00 g de ácido acético (3.18) + 900 ml de agua (3.1) + 50,0 ml de solución (3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (3.19) en metanol (3.8) (1 g/100 ml). Ajustar el pH a 5,00 con etanolamina (3.20). Llevar a 1 000 ml con agua (3.1) |
| Flujo:                                      | 1 ml/min  |
| Tiempo total del ciclo:                     | unos 34 min   |
| Longitud de onda de detección:              | excitación: 280 nm, emisión 356 nm  |
| Volumen de inyección:                       | 20 $\mu\text{l}$  |

### 6.2. Cálculo de los resultados

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{g de triptófano por 100 g de muestra}$$



- A = área del pico de patrón interno, solución patrón de calibrado (3.17)
- B = área del pico de triptófano, extracto (5.2) o hidrolizado (5.3)
- C = volumen en ml (2 ml) de la solución concentrada de triptófano (3.15) añadida a la solución de calibrado (3.17)
- D = concentración en  $\mu\text{mol/ml}$  (= 2,50) de la solución concentrada de triptófano (3.15) añadida a la solución de calibrado
- E = volumen en ml de la solución concentrada de patrón interno (3.16) añadida al extracto (5.2) (= 5,00 ml) o al hidrolizado (5.3) (= 2,00ml)
- F = área del pico del patrón interno, extracto (5.2) o hidrolizado (5.3)
- G = área del pico de triptófano , solución patrón de calibrado (3.17)
- H = volumen en ml (= 2,00 ml) de la solución concentrada de patrón interno (3.16) añadida a la solución patrón de calibrado (3.17)
- W = peso de la muestra en g (corregido al peso original si se le ha quitado la humedad o la grasa)
- MW = peso molecular del triptófano (= 204,23)

#### 7. Repetibilidad

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

#### 8. Resultados de un estudio entre varios laboratorios

Se organizó un estudio entre varios laboratorios de la Comunidad (cuarta comparación) en el cual hasta doce laboratorios analizaron tres muestras para certificar el método en cuanto a la hidrólisis. De cada muestra se hicieron cinco análisis. Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

|              | Muestra 1<br>Pienso para cerdos | Muestra 2<br>Pienso para cerdos con<br>suplemento de L-triptófano | Muestra 3<br>Pienso concentrado<br>para cerdos |
|--------------|---------------------------------|---|--|
| L            | 12                              | 12  | 12   |
| n            | 50                              | 55  | 50   |
| Media [g/kg] | 2,42                            | 3,40  | 4,22   |
| $S_r$ [g/kg] | 0,05                            | 0,05  | 0,08   |
| R [g/kg]     | 0,14                            | 0,14  | 0,22   |
| $CV_r$ [%]   | 1,9                             | 1,6   | 1,19   |
| $S_R$ [g/kg] | 0,15                            | 0,20  | 0,09   |
| R [g/kg]     | 0,42                            | 0,56  | 0,25   |
| $CV_R$ [%]   | 6,3                             | 6,0   | 2,2  |

L : número de laboratorios

N : número de valores individuales aceptados tras eliminar los valores aberrantes (identificados por la prueba de valores aberrantes de Cochran-Dixon)

$S_r$  : desviación típica de la repetibilidad

$S_R$  : desviación típica de la reproducibilidad

r : repetibilidad

R : reproducibilidad

$CV_r$  : coeficiente de variación de la repetibilidad, en %

$CV_R$  : coeficiente de variación de la reproducibilidad, en %

Se organizó otro estudio entre varios laboratorios de la Comunidad (tercera comparación) en el cual hasta trece laboratorios analizaron dos muestras para certificar el método en cuanto a la extracción de triptófano libre. De cada muestra se hicieron cinco análisis. Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

|                       | Muestra 1<br>Mezcla de trigo y soja | Muestra 2<br>Mezcla de trigo y soja (= muestra 4) con<br>triptófano añadido (0,457 g/kg) |
|-----------------------|-------------------------------------|--|
| L                     | 12                                  | 12   |
| N                     | 55                                  | 60   |
| Media [g/kg]          | 0,391                               | 0,931  |
| S <sub>r</sub> [g/kg] | 0,005                               | 0,012  |
| R [g/kg]              | 0,014                               | 0,034  |
| CV <sub>r</sub> [%]   | 1,34                                | 1,34   |
| S <sub>R</sub> [g/kg] | 0,018                               | 0,048  |
| R [g/kg]              | 0,050                               | 0,134  |
| CV <sub>R</sub> [%]   | 4,71                                | 5,11   |

L: número de laboratorios  
 N: número de valores individuales aceptados tras eliminar los valores aberrantes (identificados por la prueba de valores aberrantes de Cochran-Dixon)  
 S<sub>r</sub>: desviación típica de la repetibilidad  
 S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad  
 r: repetibilidad  
 R: reproducibilidad  
 CV<sub>r</sub>: coeficiente de variación de la repetibilidad, en %  
 CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad, en %

Se organizó otro estudio de comparación entre varios laboratorios de la Comunidad en el cual hasta siete laboratorios analizaron tres muestras para certificar el método en cuanto a la hidrólisis del triptófano. De cada muestra se hicieron cinco análisis. Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

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

L: número de laboratorios  
 N: número de valores individuales aceptados tras eliminar los valores aberrantes (identificados por la prueba de valores aberrantes de Cochran-Dixon)  
 S<sub>r</sub>: desviación típica de la repetibilidad  
 S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad  
 R: repetibilidad  
 R: reproducibilidad  
 CV<sub>r</sub>: coeficiente de variación de la repetibilidad, en %  
 CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad, en %

## 9. Observaciones

- 9.1. Las siguientes condiciones cromatográficas pueden dar una mejor separación entre el triptófano y el  $\alpha$ -metil-triptófano.

Elución isocrática seguida por lavado de la columna en gradiente:

Columna de cromatografía de líquidos (4.2): 125 mm x 4 mm, relleno de  $C_{18}$  5  $\mu$ m, o equivalente

Temperatura de la columna: 32°C

Fase móvil (3.22): A: 0,01 mol/l  $KH_2PO_4$ /metanol, 95+5 (V + V).

B: metanol

|                        |        |         |        |
|------------------------|--------|---------|--------|
| Programa de gradiente: | 0 min  | 100 % A | 0 % B  |
|                        | 15 min | 100 % A | 0 % B  |
|                        | 17 min | 60 % A  | 40 % B |
|                        | 19 min | 60 % A  | 40 % B |
|                        | 21 min | 100 % A | 0 % B  |
|                        | 33 min | 100 % A | 0 % B  |

Flujo: 1,2 ml/min

Duración total del ciclo: unos 33 min

- 9.2. La cromatografía varía en función del tipo de CLAR y del material de relleno de la columna que se utilice. El sistema elegido debe proporcionar una separación en la línea de base entre el triptófano y el patrón interno. Es asimismo importante que los productos de degradación se separen bien del triptófano y del patrón interno. Deben pasarse hidrolizados sin patrón interno para comprobar las impurezas de la línea de base bajo el patrón interno. Es importante que el ciclo dure suficiente para que se eluyan todos los productos de degradación; en caso contrario, los picos de elución tardía pueden interferir con los ciclos cromatográficos posteriores.

En la fase de funcionamiento, el sistema cromatográfico debe dar una respuesta lineal. Ésta ha de medirse con una concentración constante (la normal) del patrón interno y con concentraciones variables de triptófano. Es importante que el tamaño de los picos tanto de triptófano como de patrón interno estén dentro de la banda lineal del sistema de CLAR/fluorescencia. Si los picos del triptófano o de patrón interno fueran demasiado grandes o demasiado pequeños, habría que repetir el análisis con una muestra de otro tamaño o con un volumen final distinto.

- 9.3. Hidróxido de bario

Con el tiempo, se va haciendo más difícil disolver el hidróxido de bario. Esto hace que la solución para la determinación por CLAR esté turbia, lo que puede provocar unos resultados bajos en cuanto al triptófano.