

ORDEN de 28 de diciembre de 1999 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; 94/14/CE de 29 de marzo; 93/70/CEE de 28 de julio; 93/117/CEE de 17 de diciembre, y 93/28/CEE de 4 de junio, todas de la Comisión, por la que se establecen diversos métodos de análisis, fueron incorporadas al ordenamiento jurídico interno mediante Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias.

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

Aprobada la Directiva 1999/27/CE de la Comisión, de 20 de abril de 1999, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para la determinación de amprolio, diclazurilo y carbadox en los alimentos para animales y se modifican las Directivas 71/250/CEE, 73/46/CEE y se deroga la Directiva 74/203/CEE, por la que se establecen diversos métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales, es preciso proceder a su incorporación, modificando en lo que es preciso los métodos actualmente vigentes como oficiales.

La presente Orden, que incorpora la citada Directiva 1999/27/CE, se dicta al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.13.ª y 16.ª de la Constitución que atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación general de la sanidad. En su elaboración han sido consultadas las Comunidades Autónomas y los sectores afectados, asimismo, ha sido informada favorablemente por la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria.

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

1. Se añaden los métodos para la determinación de amprolio, diclazurilo y carbadox que figuran en el anexo de la presente Orden.
2. Quedan derogados los métodos números: 24. Esencia de mostaza, 34(b). Almidón (método de la pancreatina), 37. Teobromina, 38. Retinol (vitamina A), 41. Menadiona (vitamina K3), 51. Amprolio, 52. Etopabato, 53. Dinitolmida y 54. Nicarbacina, que figuraban en el anexo del mencionado Real Decreto 2257/1994.

Disposici3n final 3nica. Entrada en vigor.

La presente Orden entrar3 en vigor el d3a siguiente al de su publicaci3n en el "Bolet3n Oficial del Estado".

Madrid, 28 de diciembre de 1999.

3LVAREZ-CASCOS FERN3NDEZ

Ilmos. Sres. Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentaci3n y de Sanidad y Consumo.

"ANEXO

51. Determinaci3n de amprolio

Clorhidrato del cloruro de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)-2-picolinio]

1. Finalidad y campo de aplicaci3n.

El presente m3todo permite la determinaci3n del amprolio en los alimentos para animales y premezclas. El l3mite de detecci3n es de 1mg/kg ; el de determinaci3n, de 25 mg/kg.

2. Principio.

La muestra se somete a extracci3n con una mezcla de agua y metanol. Tras disoluci3n con la fase m3vil y filtraci3n por membrana, se determina el contenido de amprolio por cromatograf3a de l3quidos de alta resoluci3n (CLAR) de intercambio cati3nico con detecci3n UV.

3. Reactivos.

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitrilo de calidad CLAR.

3.3 Agua de calidad CLAR.

3.4 Soluci3n de ortofosfato monos3dico, $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

Disolver en agua (3.3) 13,80 g de ortofosfato monos3dico monohidratado en un matraz aforado de 1.000 ml, enrasar con agua (3.3) y mezclar.

3.5 Soluci3n de perclorato s3dico $c = 1,6 \text{ mol/l}$.

Disolver en agua (3.3) 224,74 g de perclorato s3dico monohidratado en un matraz aforado de 1.000 ml, enrasar con agua (3.3) y mezclar.

3.6 Fase m3vil para la CLAR (v3ase la observaci3n 9.1).

Mezcla de acetonitrilo (3.2), soluci3n de ortofosfato monos3dico (3.4) y soluci3n de perclorato s3dico (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V). Antes de utilizar la soluci3n, filtrarla por un filtro de membrana de 0,22 mm (4.3) y desgasificarla [por ejemplo, en ba3o de ultrasonidos (4.4) durante al menos quince minutos].

3.7 Sustancia patrón: Amprolio puro, clohidrato de cloruro de 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridina, E 750 (véase el punto 9.2).

3.7.1 Solución madre de patrón de amprolio, 500 mg/ml.

Pasar, con precisión de 0,1 mg, 50 mg de amprolio (3.7) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en 80 ml de metanol (3.1) y colocar el matraz durante diez minutos en un baño de ultrasonidos (4.4). Después del tratamiento de ultrasonidos, llevar la solución a temperatura ambiente, enrasar con agua y mezclar. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.7.2 Solución intermedia de patrón de amprolio, 50 mg/ml.

Pasar con pipeta 5,0 ml de la solución madre de patrón (3.7.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con el disolvente de extracción (3.8) y mezclar. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.7.3 Soluciones de calibración.

Pesar 0,5, 1,0 y 2,0 ml de la solución intermedia de patrón (3.7.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml. Enrasar con la fase móvil (3.6) y mezclar. Estas soluciones corresponden respectivamente a 0,5, 1,0 y 2,0 mg de amprolio por ml y deben prepararse justo antes de su utilización.

3.8 Disolvente de extracción.

Mezcla de metanol (3.1) y agua 2 + 1 (V + V).

4. Material.

4.1 Equipo para CLAR con sistema de inyección, adecuado para volúmenes de inyección de 100 ml.

4.1.1 Columna de cromatografía de líquidos de 125 mm x 4 mm, de intercambio catiónico, con empaquetamiento de nucleosil 10 SA de 10 mm, o equivalente.

4.1.2 Detector de UV con ajuste de longitud de onda variable o detector de red de diodos.

4.2 Filtro de membrana, material de teflón, 0,45 mm.

4.3 Filtro de membrana, 0,22 mm.

4.4 Baño de ultrasonidos.

4.5 Agitador mecánico o magnético.

5. Procedimiento.

5.1 Consideraciones generales.

5.1.1 Prueba en blanco.

Para la prueba de recuperación (5.1.2), debe analizarse un pienso en blanco a fin de comprobar la ausencia de amprolio y de sustancias interferentes. El pienso en blanco debe ser de tipo similar a la muestra y en él no debe detectarse amprolio ni sustancias que interfieran.

5.1.2 Prueba de recuperación.

Debe realizarse una prueba de recuperación analizando el pienso en blanco que se habrá enriquecido por adición de una cantidad de amprolio similar a la presente en la muestra. Para añadir una concentración del 100 mg/kg, transferir 10,0 ml de la solución madre de patrón (3.7.1) a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y concentrar la solución por evaporación hasta llegar a unos 0,5 ml. Añadir 50 g del pienso en blanco mezclar cuidadosamente ; dejar en reposo durante diez minutos, volviendo a mezclar varias veces, y pasar a la fase de extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), otra posibilidad consiste en realizar una prueba de recuperación mediante el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que deben analizarse se enriquece con una cantidad de amprolio similar a la que ya está presente en la misma. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación se calcula por sustracción.

5.2 Extracción.

5.2.1 Premezclas (contenido < 1 por 100 de amprolio) y alimentos para animales.

Pesar, con precisión de 0,01 g, 5-40 g de la muestra, según el contenido en amprolio, en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y añadir 200 ml de disolvente de extracción (3.8). Poner el matraz durante quince minutos en el baño de ultrasonidos (4.4). Retirar el matraz del baño de ultrasonidos y agitarlo durante una hora con agitación mecánica (4.5). Diluir una alícuota del extracto con la fase móvil (3.6) hasta conseguir un contenido de amprolio de 0,5-2 mg/ml y mezclar (véase la observación 9.3). Filtrar 5-10 ml de esta solución diluida a través de un filtro de membrana (4.2). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.2.2 Premezclas (contenido >/- 1 por 100 de amprolio).

Pesar, con precisión de 0,001 g, 1-4 g de la premezcla, según el contenido en amprolio, en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y añadir 200 ml de disolvente de extracción (3.8). Poner el matraz durante quince minutos en el baño de ultrasonidos (4.4). Retirar el matraz del baño de ultrasonidos y agitarlo durante una hora con agitación mecánica o magnética (4.5). Diluir una alícuota del extracto con la fase móvil (3.6) hasta conseguir un contenido de amprolio de 0,5-2 mg/ml y mezclar. Filtrar 5-10 ml de esta solución diluida a través de un filtro de membrana (4.2). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3 Determinación mediante CLAR.

5.3.1 Parámetros.

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

Columna de cromatografía de líquidos (4.1.1): 125 mm x 4 mm, de intercambio catiónico, con empaquetamiento de nucleosil 10 SA de 10 mm, o equivalente.

Fase móvil (3.6): Mezcla de acetonitrilo (3.2), solución de ortofosfato monosódico (3.4) y solución de perclorato sódico (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V).

Flujo: 0,7-1 ml/min.

Longitud de onda de detección: 264 nm.

Volumen de inyección: 100 µl.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.7.3) con 1,0 mg/ml, hasta obtener alturas de pico y tiempos de retención constantes.

5.3.2 Curva de calibración.

Inyectar cada solución de calibración (3.7.3) varias veces y determinar las alturas (áreas) medias de los picos correspondientes a cada concentración. Trazar una curva de calibración poniendo las alturas (áreas) media de los picos de las soluciones de calibración en ordenadas y las concentraciones correspondientes en mg/ml en abscisas.

5.3.3 Solución de la muestra.

Inyectar varias veces el extracto de la muestra (5.2) utilizando el mismo volumen que el empleado para las soluciones de calibración y determinar la altura (área) media de los picos de amprolio.

6. Cálculo de los resultados.

A partir de la altura (área) media de los picos de amprolio de la solución de la muestra, determinar la concentración de la solución de la muestra en mg/ml mediante la curva de calibración (5.3.2).

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

(VER IMAGEN PÁGINA 261)

$$w = V - B - f / m \text{ [mg/kg]}$$

donde:

V = volumen del disolvente de extracción (3.8) en ml de acuerdo con 5.2 (es decir ; 200 ml).

B = concentración de amprolio en el extracto de la muestra (5.2) en mg/ml.

f = factor de dilución de acuerdo con 5.2.

m = masa de la porción de muestra en g.

7. Validación de los resultados.

7.1 Identidad.

La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía o mediante un detector de red de diodos que permita comparar los espectros del extracto de la muestra (5.2) y de la solución de calibración (3.7.3) con 2,0 mg/ml.

7.1.1 Cocromatografía.

Se enriquece un extracto de la muestra (5.2) mediante adición de una cantidad adecuada de la solución de calibración (3.7.3). La cantidad de amprolio añadida debe ser similar a la cantidad de amprolio que se encuentre en el extracto de la muestra.

Solamente debe aumentar la altura del pico de amprolio, teniendo en cuenta la cantidad añadida y la dilución del extracto. La anchura del pico a la mitad de su altura debe estar dentro del margen del +/- 10 por 100 de la anchura inicial del pico de amprolio del extracto de la muestra antes de ser enriquecido.

7.1.2 Detección por red de diodos.

Los resultados deben evaluarse de acuerdo con los siguientes criterios:

a) La longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección. En el caso de la detección por red de diodos se sitúa generalmente en +/- 2 nm.

b) Entre 210 y 320 nm, los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, no deben ser diferentes en las partes del espectro situadas entre el 10 por 100 y el 100 por 100 de la absorbancia relativa. Este criterio se cumple cuando están presentes los mismos máximos y la desviación entre los dos espectros no supera en ningún punto observado el 15 por 100 de la absorbancia del analito patrón.

c) Entre 210 y 320 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de la muestra no deben ser diferentes entre sí en las partes del espectro situadas entre el 10 por 100 y el 100 por 100 de la absorbancia relativa. Este criterio se cumple cuando están presentes los mismos máximos y la desviación entre los espectros no supera en ningún

punto observado el 15 por 100 de la absorbancia del espectro del vértice del pico.

La presencia del analito sólo se considera confirmada cuando se cumplen todos estos criterios.

7.2 Repetibilidad.

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

El 15 por 100 del resultado superior en caso de contenido de amprolio entre 25 y 500 mg/kg.

Los 75 mg/kg en caso de contenido de amprolio entre 500 y 1.000 mg/kg.

El 7,5 por 100 del resultado superior en caso de contenido de amprolio mayor de 1.000 mg/kg.

7.3 Recuperación.

En el caso de una muestra enriquecida (virgen), la recuperación debe ser como mínimo del 90 por 100.

8. Resultados de un estudio colaborativo.

Se organizó un estudio en colaborativo en el que se analizaron tres piensos para aves de corral (muestras 1-3), un pienso mineral (muestra 4) y una premezcla (muestra 5). Los resultados se recogen en el siguiente cuadro:

(VER IMAGEN PÁGINA 262)

Muestra 1 (pienso en blanco)	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
L				
14 14 14 14 15				
n				
56 56 56 56 60				
Media (mg/kg)				 - 45,5 188
5.129 25.140				
Sr (mg/kg)				 -
2,26 3,57 178 550				
CVr (Porcentaje)				 - 4,95
1,90 3,46 2,20				
SR (mg/kg)				 - 2,95
11,8 266 760				
CVR (Porcentaje)				 - 6,47
6,27 5,19 3,00				
Contenido nominal (mg/kg)				 - 50 200 5.000
25.000				

L: número de laboratorios.

n: número de valores individuales.

Sr: desviación típica de la repetibilidad.

CVR: coeficiente de variación de la repetibilidad.

SR: desviación típica de la reproducibilidad.

CVR: coeficiente de variación de la reproducibilidad.

9. Observaciones.

9.1 Si la muestra contiene tiamina, el pico de ésta aparece en el cromatograma precediendo de cerca al pico de amprolio. Según este método, el amprolio y la tiamina deben separarse. Si la columna (4.1.1) utilizada en este método no separa el amprolio de la tiamina, sustituir hasta el 50 por 100 del acetonitrilo de la fase móvil (3.6) por metanol.

9.2 De acuerdo con la British Pharmacopoeia, el espectro de una solución de amprolio ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) de ácido clorhídrico ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) presenta máximos a 246 nm y 262 nm. La absorbancia es de 0,84 a 246 nm y de 0,80 a 262 nm.

9.3 El extracto debe estar siempre diluido con la fase móvil ; en caso contrario, el tiempo de retención del pico de amprolio puede variar significativamente debido a cambios en la fuerza iónica.

64. Determinación de diclazurilo

2, 6 dicloro-a-(4-clorofenil)-4-[4, 5-dihidro-3,5-dioxo-1,2, 4-triacina-2(3H)-il]benceno-acetonitrilo

1. Finalidad y campo de aplicación.

El presente método permite la determinación del diclazurilo en los alimentos para animales y premezclas. El límite de detección es de 0,1 mg/kg ; el de determinación, de 0,5 mg/kg.

2. Principio.

Tras la adición de un patrón interno, la muestra se somete a extracción con metanol acidificado. En caso de alimentos para animales, se purifica una alícuota del extracto en un cartucho de extracción en fase sólida de C18. El diclazurilo se eluye de un cartucho de una mezcla de metanol acidificado y agua. Previa evaporación, el residuo se disuelve en DMF/agua. En caso de premezclas, el extracto se evapora y el residuo se disuelve en DMF/agua. El contenido de diclazurilo se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase inversa y gradiente ternario con detección de UV.

3. Reactivos.

3.1 Agua de calidad CLAR.

3.2 Acetato de amonio.

3.3 Sulfato de hidrógeno y tetrabutilamonio (SHTB).

3.4 Acetonitrilo de calidad CLAR.

3.5 Metanol de calidad CLAR.

3.6 N,N-dimetilformamida (DMF).

3.7 Ácido clorhídrico, R20 = 1,19 g/ml.

3.8 Sustancia patrón diclazurilo II-24: 2,6 dicloro-a-(4-clorofenil)-4-[4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2, 4-triacina-2(3H)-il]benceno-acetonitrilo, de pureza garantizada, E 771.

3.8.1 Solución madre de patrón de diclazurilo, 500 mg/ml.

Pesar, con precisión de 0,1 mg, 25 mg de sustancia patrón de diclazurilo (3.8) en un matraz aforado de 50 ml, disolver y enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz en papel de aluminio o utilizar un matraz de color ámbar y guardar en frigorífico. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.8.2 Solución de patrón de diclazurilo, 50 mg/ml.

Pasar 5,00 ml de la solución madre de patrón (3.8.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz en papel de aluminio o utilizar un matraz de color ámbar y guardar en frigorífico. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.9 Sustancia patrón interno: 2,6 dicloro-a-(4-clorofenil)-4-[4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2, 4-triacina-2(3H)-il]-a-metilbenceno-acetonitrilo.

3.9.1 Solución madre de patrón interno, 500 mg/ml.

Pesar, con precisión de 0,1 mg, 25 mg de sustancia patrón interno (3.9) en un matraz aforado de 50 ml, disolver y enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz en papel de aluminio o utilizar un matraz de color ámbar y guardar en frigorífico. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.9.2 Solución de patrón interno, 50 mg/ml.

Pasar 5,00 ml de la solución madre de patrón interno (3.9.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz en papel de aluminio o utilizar un matraz de color ámbar y guardar en frigorífico. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.9.3 Solución de patrón interno, para premezclas, p/1.000 mg/ml (p = contenido nominal de diclazurilo en la premezcla, expresado en mg/kg).

Pesar, con precisión de 0,1 mg, p/10 mg de sustancia patrón interno en un matraz aforado de 100 ml, disolver en DMF (3.6) en un baño de ultrasonidos (4.6) y mezclar. Envolver el matraz en papel de aluminio o utilizar un matraz de color ámbar y guardar en frigorífico. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.10 Soluciones de calibración, 2 mg/ml.

Pasar con pipeta 2,00 ml de la solución de patrón de diclazurilo (3.8.2) y 2,00 ml de la solución de patrón interno (3.9.2) a un matraz aforado de 50 ml. Añadir 16 ml de DMF (3.6), enrasar y mezclar. Esta solución debe prepararse justo antes de su utilización.

3.11 Cartucho de extracción en fase sólida C18 ; por ejemplo, Bond Elut, tamaño 1 cc, masa de sorbente: 100 mg.

3.12 Disolvente de extracción: Metanol acidificado.

Poner con pipeta 5,0 ml de ácido clorhídrico (3.7) en 1.000 ml de metanol (3.5) y mezclar.

3.13 Fase móvil para la CLAR.

Eluyente A: Solución de acetato de amonio y sulfato de hidrógeno y tetrabutilamonio.

3.13.1 Disolver 5 g de acetato de amonio (3.2) y 3,4 g de SHTB (3.3) en 1.000 ml de agua (3.1) y mezclar.

3.13.2 Eluyente B: Acetonitrilo (3.4).

3.13.3 Eluyente C: Metanol (3.5).

4. Material.

4.1 Agitador mecánico.

4.2 Equipo para CLAR con capacidad de gradientes ternarios.

4.2.1 Columna de cromatografía de líquidos, con relleno de hypersil ODS de 3 mm, de 100 mm x 4,6 mm o equivalente.

4.2.2 Detector de UV con ajuste de longitud de onda variable o detector de red de diodos.

4.3 Evaporador rotatorio de vacío.

4.4 Filtro de membrana, 0,45 mm.

4.5 Colector de vacío.

4.6 Baño de ultrasonidos.

5. Procedimiento.

5.1 Consideraciones generales.

5.1.1 Prueba en blanco.

Debe analizarse un pienso en blanco a fin de comprobar la ausencia de diclazurilo y de sustancias que interfieran. El pienso en blanco debe ser de tipo similar a la muestra y en su análisis no debe detectarse diclazurilo ni sustancias que interfieran.

5.1.2 Prueba de recuperación.

Debe realizarse una prueba de recuperación analizando el pienso en blanco que se habrá enriquecido por adición de una cantidad de diclazurilo similar a la presente en la muestra. Para añadir una concentración del 1 mg/kg, transferir 0,1 ml de la solución madre del patrón (3.8.1) con 50 g del pienso en blanco y mezclar cuidadosamente ; dejar en reposo durante diez minutos, volviendo a mezclar varias veces, y pasar a la fase de extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), otra posibilidad consiste en realizar una prueba de recuperación mediante el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de diclazurilo similar a la que ya está presente en la misma. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación se calcula por sustracción.

5.2 Extracción.

5.2.1 Alimentos para animales.

Pesar, con precisión de 0,01 g, unos 50 g de la muestra. Pasar a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, añadir 1,00 ml de la solución de patrón interno (3.9.2), 200 ml de disolvente de extracción (3.12) y tapar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante diez minutos. Pasar una alícuota de 20 ml del sobrenadante a un recipiente adecuado de vidrio y diluir con 20 ml de agua. Pasar esta solución a un cartucho de extracción (3.11) y hacer que lo atraviese aplicando vacío (4.5). Lavar el cartucho con 25 ml de una mezcla de disolvente de extracción (3.12) y agua, 65 + 35 (V + V). Desechar las fracciones recogidas y eluir los compuestos con 25 ml de una mezcla de disolvente de extracción (3.12) y agua 80 + 20 (V + V). Evaporar esta fracción hasta llegar justo a la sequedad mediante el evaporador rotatorio (4.3) a 60 °C. Disolver el residuo en 1,0 ml de DMF (3.6), añadir 1,5 ml de agua (3.1) y mezclar. Filtrar a través de un filtro de membrana (4.4). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.2.2 Premezclas.

Pesar, con precisión de 0,001 g, aproximadamente, 1 g de la muestra. Pasar a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, añadir 1,00 ml de la solución de patrón interno (3.9.3), 200 ml de disolvente de extracción (3.12) y tapar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante diez minutos. Transferir una alícuota de 10.000 p/ml (p = contenido nominal de diclazurilo en la premezcla, expresado en mg/kg) del sobrenadante a un matraz redondo de tamaño adecuado. Evaporar hasta llegar justo a la sequedad a presión reducida, a 60 °C, mediante el evaporador rotatorio (4.3). Volver a disolver el residuo en 10,0 ml de DMF (3.6), añadir 15,0 ml de agua (3.1) y mezclar. Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3 Determinación mediante CLAR.

5.3.1 Parámetros.

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

Columna de cromatografía de líquidos (4.2.1): 100 mm x 4,6 mm, con relleno de hypersil ODS de 3 mm, o equivalente

Fase móvil:

Eluyente A (3.13.1): Solución acuosa de acetato de amonio y sulfato de hidrógeno y tetrabutilamonio.

Eluyente B (3.13.2): Acetonitrilo.

Eluyente C (3.13.3): Metanol.

Modo de elución:

Gradiente lineal.

Condiciones iniciales A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V).

Tras diez minutos elución en gradiente durante treinta minutos hasta: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V).

Lavar con B durante diez minutos.

Flujo: 1,5-2 ml/min.

Volumen de inyección: 20 µl.

Longitud de onda del detector: 280 nm.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.10) con 2 mg/ml, hasta obtener alturas de pico y tiempos de retención constantes.

5.3.2 Curva de calibración.

Inyectar 20 µl de la solución de calibración (3.10) varias veces y determinar las alturas (áreas) medias de los picos correspondientes al diclazurilo y al patrón interno.

5.3.3 Solución de la muestra.

Inyectar 20 µl de la solución de la muestra (5.2.1 y 5.2.2) varias veces y determinar las alturas (áreas) medias de los picos correspondientes al diclazurilo y al patrón interno.

6. Cálculo de los resultados.

6.1 Píensos.

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

(VER IMAGEN PÁGINA 264)

$$W = h_{d,s} \times h_{i,c} / h_{i,s} \times h_{d,c} \times B_{d,c} \cdot 10^6 / m \text{ mg/kg}$$

donde:

$h_{d,s}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de la muestra (5.2.1).

$h_{i,s}$ = altura (área) del pico del patrón interno en la solución de la muestra (5.2.1).

$h_{d,c}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de calibración (3.10).

$h_{i,c}$ = altura (área) del pico del patrón interno en la solución de calibración (3.10).

$B_{d,c}$ = concentración de diclazurilo en la solución de calibración en mg/ml (3.10).

m = masa de la porción de muestra en g.

V = volumen del extracto según 5.2.1 (es decir, 2,5 ml).

6.2 Premezclas.

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

(VER IMAGEN PÁGINA 264)

$$W = h_{d,s} \times h_{i,c} / h_{i,s} \times h_{d,c} \times B_{d,c} \times 0,02 \cdot p / m \text{ [mg/kg]}$$

donde:

$h_{d,c}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de calibración (3.10).

$h_{i,c}$ = altura (área) del pico del patrón interno en la solución de calibración (3.10).

$h_{d,s}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de la muestra (5.2.2).

$h_{i,s}$ = altura (área) del pico del patrón interno en la solución de la muestra (5.2.2).

$B_{d,c}$ = concentración de diclazurilo en la solución de calibración (3.10).

m = masa de la porción de muestra en g.

V = volumen del extracto según 5.2.2 (es decir, 25 ml).

p = contenido nominal de diclazurilo en la premezcla, expresado en mg/kg.

7. Validación de los resultados.

7.1 Identidad.

La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía o mediante un detector de red de diodos que permita comparar los espectros

del extracto de la muestra (5.2.1 y 5.2.2) y de la solución de calibración (3.10).

7.1.1 Cocromatografía.

Se enriquece un extracto de la muestra (5.2.1 y 5.2.2) mediante adición de una cantidad adecuada de la solución de calibración (3.10). La cantidad de diclazurilo añadida debe ser similar a la cantidad de diclazurilo que se encuentre en el extracto de la muestra.

Solamente debe aumentar la altura de los picos de diclazurilo y de patrón interno, teniendo en cuenta la cantidad añadida y la dilución del extracto. La anchura del pico a la mitad de su altura debe estar dentro del margen del ± 10 por 100 de la anchura inicial del pico de diclazurilo o de patrón interno del extracto de la muestra antes de ser enriquecido.

7.1.2 Detección por red de diodos.

Los resultados deben evaluarse de acuerdo con los siguientes criterios:

- a) La longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección. En el caso de la detección por red de diodos se sitúa generalmente en ± 2 nm.
- b) Entre 230 y 320 nm, los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, no deben ser diferentes en las partes del espectro situadas entre el 10 por 100 y el 100 por 100 de la absorbancia relativa. Este criterio se cumple cuando están presentes los mismos máximos y la desviación entre los dos espectros no supera en ningún punto observado el 15 por 100 de la absorbancia del analito patrón.
- c) Entre 230 y 320 nm, los espectros de la pendiente ascendente del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de la muestra no deben ser diferentes entre sí en las partes del espectro situadas entre el 10 por 100 y el 100 por 100 de la absorbancia relativa. Este criterio se cumple cuando están presentes los mismos máximos y la desviación entre los espectros no supera en ningún punto observado el 15 por 100 de la absorbancia del espectro del vértice del pico.

La presencia del analito sólo se considera confirmada cuando se cumplen todos estos criterios.

7.2 Repetibilidad.

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

El 30 por 100 del resultado superior en caso de contenido de diclazurilo entre 0,5 y 2,5 mg/kg.

Debe demostrarse previamente que la respuesta del diclazurilo es lineal a lo largo de la gama de concentraciones que se midan.

65. Determinación de carbadox

Metil 3-(2-quinoxalinilmetileno)carbazato N1, N4-dióxido

1. Finalidad y campo de aplicación.

El presente método permite la determinación del carbadox en los alimentos para animales, premezclas y formulaciones. El límite de detección es de 1 mg/kg ; el de determinación, de 10 mg/kg.

2. Principio.

La muestra se equilibra con agua y se somete a extracción con metanol-acetonitrilo. En caso de alimentos para animales, una parte alícuota del extracto filtrado se purifica en una columna de óxido de aluminio. En caso de premezclas y formulaciones, una porción alícuota del extracto filtrado se diluye con agua, metanol y acetonitrilo hasta una concentración adecuada. El contenido de carbadox se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase inversa con detección de UV.

3. Reactivos.

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitrilo de calidad CLAR.

3.3 Ácido acético, W = 100 por 100.

3.4 Óxido de aluminio neutro, de grado I de actividad.

3.5 Metanol-acetonitrilo 1 + 1 (V + V).

Mezclar 500 ml de metanol (3.1) con 500 ml de acetonitrilo (3.2).

3.6 Ácido acético, r = 10 por 100.

Diluir 10 ml de ácido acético (3.3) con agua hasta llegar a 100 ml.

3.7 Acetato de sodio, CH₃COONa.

3.8 Agua de calidad CLAR.

3.9 Solución amortiguadora de acetato, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.

Disolver 0,82 g de acetato de sodio (3.7) en 700 ml de agua (3.8) y ajustar el pH a 6,0 con ácido acético (3.6). Pasar a un matraz aforado de 1.000 ml, enrasar con agua (3.8) y mezclar.

3.10 Fase móvil para la CLAR.

Mezclar 825 ml de solución amortiguadora de acetato (3.9) con 175 ml de acetonitrilo (3.2). Filtrar por filtro de 0,22 µm (4.5) y degasificar la

solución (por ejemplo, poniéndola en baño de ultrasonidos durante diez minutos).

3.11 Sustancia patrón.

Carbadox puro: Metil-3-2(2-quinoxalinilmetileno) carbazato N1, N4-dióxido, E 850.

3.11.1 Solución madre de patrón de carbadox, 100 mg/ml (véase el punto 5. Procedimiento).

Pesar, con precisión de 0,1 mg, 25 mg de sustancia patrón de carbadox (3.11) en un matraz aforado de 250 ml. Disolver con metanol-acetonitrilo (3.5) en baño de ultrasonidos (4.7). A continuación, llevar la solución a temperatura ambiente, enrasar con metanol-acetonitrilo (3.5) y mezclar. Envolver el matraz en papel de aluminio o utilizar un matraz de color ámbar y guardar en frigorífico. A una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.11.2 Soluciones de calibración.

Pasar 2,0, 5,0, 10,0 y 20,0 ml de la solución de madre de patrón (3.11.1) a una serie de matraces aforados de 100 ml. Añadir 30 ml de agua, enrasar con metanol-acetonitrilo (3.5) y mezclar. Envolver los matraces en papel de aluminio. Estas soluciones corresponden respectivamente a 2,0, 5,0, 10,0 y 20,0 mg/ml de carbadox por ml y deben prepararse justo antes de su utilización.

Nota: Para la determinación de carbadox en alimentos para animales que contengan menos de 10 mg/kg, deben prepararse soluciones de calibración con una concentración inferior a 2,0 mg/ml.

3.12 Mezcla agua-[metanol-acetonitrilo] (3.5), 300 + 700 (V + V).

Mezclar 300 ml de agua con 700 ml de la mezcla metanol-acetonitrilo (3.5).

4. Material.

4.1 Agitador mecánico o magnético de laboratorio.

4.2 Papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A o equivalente).

4.3 Columna de vidrio (300 a 400 mm de longitud, 10 mm aproximadamente de diámetro interior) con fritado de vidrio sinterizado y llave de extracción.

Nota: También puede utilizarse una columna de vidrio provista de una llave de cierre o una columna de vidrio con un extremo cónico, en este caso, se introduce un tapón de fibra de vidrio hasta el extremo inferior y se comprime con una varilla de vidrio.

4.4 Equipo para CLAR con sistema de inyección que permita unos volúmenes de inyección de 20 ml.

4.4.1 Columna de cromatografía de líquidos de 300 mm x 4 mm, C18, con relleno de 10 mm, o equivalente.

4.4.2 Detector de UV con ajuste de longitud de onda variable o detector por red de diodos que funcione en la gama de 225 a 400 nm.

4.5 Filtro de membrana, 0,22 mm.

4.6 Filtro de membrana, 0,45 mm.

4.7 Baño de ultrasonidos.

5. Procedimiento.

Nota: El carbadox es sensible a la luz. Todas las operaciones deben realizarse con luz tenue, o utilizando material de vidrio de color ámbar o envuelto en papel de aluminio.

5.1 Consideraciones generales.

5.1.1 Prueba en blanco.

Para la realización de la prueba de recuperación (5.1.2) debe analizarse un pienso en blanco a fin de comprobar la ausencia de carbadox y de sustancias que interfieran. El pienso en blanco debe ser de tipo similar a la muestra y en su análisis no debe detectarse carbadox ni sustancias que interfieran.

5.1.2 Prueba de recuperación.

Debe realizarse una prueba de recuperación analizando el pienso en blanco (5.1.1) que se habrá enriquecido por adición de una cantidad de carbadox similar a la presente en la muestra. Para añadir una concentración de 50 mg/kg, poner 5,0 ml de la solución madre de patrón (3.11.1) en un matraz Erlenmeyer de 200 ml. Evaporar la solución en corriente de nitrógeno hasta que queden unos 0,5 ml. Añadir 10 g del pienso en blanco, mezclar y esperar diez minutos antes de pasar a la fase de extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), otra posibilidad consiste en realizar una prueba de recuperación mediante el método de adición de patrón. En este caso, la muestra se enriquece con una cantidad de carbadox similar a la que ya está presente en la misma. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación se calcula por sustracción.

5.2 Extracción.

5.2.1 Alimentos para animales.

Pesar, con precisión de 0,01 g, unos 10 g de la muestra. Pasar a un matraz Erlenmeyer de 200 ml, añadir 15,0 ml de agua, mezclar y equilibrar durante cinco minutos. Añadir 35,0 ml de metanol-acetonitrilo (3.5), tapar y agitar durante treinta minutos con el agitador mecánico o magnético (4.1). Filtrar la solución a través de un papel de filtro de

fibra de vidrio (4.2). Conservar esta solución para la fase de purificación (5.3).

5.2.2 Premezclas (0,1-2,0 por 100).

Pesar, con precisión de 0,001 g, aproximadamente 1 g de la muestra. Pasar a un matraz Erlenmeyer de 200 ml, añadir 15,0 ml de agua, mezclar y equilibrar durante cinco minutos. Añadir 35,0 ml de metanol-acetonitrilo (3.5), tapar y agitar durante treinta minutos con el agitador mecánico o magnético (4.1). Filtrar la solución a través de un papel de filtro de fibra de vidrio (4.2). Pasar con pipeta una alícuota del filtrado a un matraz aforado de 50 ml. Añadir 15,0 ml de agua, enrasar con metanol-acetonitrilo (3.5) y mezclar. La concentración de carbadox en la solución final debe ser de unos 10 mg/ml. Se filtra una alícuota a través del filtro de 0,45 mm (4.6). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.4).

5.2.3 Formulaciones (>2 por 100).

Pesar, con precisión de 0,001 g, aproximadamente 0,2 g de la muestra sin triturar. Pasar a un matraz Erlenmeyer de 250 ml, añadir 45,0 ml de agua, mezclar y equilibrar durante cinco minutos. Añadir 105,0 ml de metanol-acetonitrilo (3.5), tapar y homogeneizar. Poner en el baño de ultrasonidos (4.7) durante quince minutos y agitar a continuación durante quince minutos con el agitador mecánico o magnético (4.1). Filtrar la solución a través de un papel de filtro de fibra de vidrio (4.2). Diluir una alícuota del filtrado con la mezcla agua-metanol-acetonitrilo (3.12) hasta conseguir una concentración final de carbadox de 10-15 µg/ml (en caso de preparado al 10 por 100, el factor de dilución es 10). Se filtra una alícuota a través del filtro de 0,45 mm (4.6). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.4).

5.3 Purificación.

5.3.1 Preparación de la columna de óxido de aluminio.

Pesar 4 g de óxido de aluminio (3.4) y pasarlo a la columna de vidrio (4.3).

5.3.2 Purificación de la muestra.

Pasar 15 ml del extracto filtrado (5.2.1) a la columna de óxido de aluminio y desechar los 2 primeros ml de eluido. Recoger los siguientes 5 ml y filtrar una alícuota a través del filtro de 0,45 mm (4.6). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.4).

5.4 Determinación mediante CLAR.

5.4.1 Parámetros.

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

Columna de cromatografía de líquidos (4.1.1): 300 mm x 4 mm, C18, con relleno de 10 mm, o equivalente.

Fase móvil (3.1): Mezcla de solución amortiguadora de acetato (3.9) y acetonitrilo (3.2), 825 + + 175 (V + V).

Flujo: 1,5-2 ml/min.

Longitud de onda de detección: 365 nm.

Volumen de inyección: 20 ml. Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.11.2) con 5,0 mg/ml, hasta obtener alturas (áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

5.4.2 Curva de calibración.

Inyectar cada solución de calibración (3.11.2) varias veces y determinar las alturas (áreas) medias de los picos correspondientes a cada concentración. Trazar una curva de calibración poniendo las alturas o las áreas medias de los picos de las soluciones de calibración en ordenadas y las concentraciones correspondientes en mg/ml de abscisas.

5.4.3 Solución de la muestra.

Inyectar varias veces el extracto de la muestra [(5.3.2) en caso de alimentos para animales (5.2.2), en caso de premezclas y (5.2.3) en caso de formulaciones] y determinar las alturas (áreas) medias de los picos correspondientes al carbadox.

6. Cálculo de los resultados.

A partir de la altura (área) media de los picos de carbadox de la solución de la muestra, determinar la concentración de la solución de la muestra en mg/ml mediante la curva de calibración (5.4.2).

6.1 Alimentos para animales.

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

(VER IMAGEN PÉGINA 267)

$$W = B \times V_1 / m \quad [\text{mg/kg}]$$

Donde:

B = concentración de carbadox en el extracto de la muestra (5.3.2) en $\mu\text{g/ml}$.

V1 = volumen de extracción en ml (es decir, 50 ml).

m = masa de la porción de muestra en g.

6.2 Premezclas y formulaciones.

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

(VER IMAGEN PÁGINA 267)

$$W = B \times V_2 \times f / m \text{ [mg/kg]}$$

Donde:

B = concentración de carbadox en el extracto de la muestra (5.2.2 y 5.2.3) en mg/ml.

V₂ = volumen de extracción en ml (es decir, 50 ml en caso de premezclas y 150 ml en caso de preparados).

f = factor de dilución según 5.2.2 (premezclas) o 5.2.3 (preparados).

m = masa de la porción de muestra en g.

7. Validación de los resultados.

7.1 Identidad.

La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía o mediante un detector de red de diodos que permita comparar los espectros del extracto de la muestra y de la solución de calibración (3.11.2) con 10 mg/ml.

7.1.1 Cocromatografía.

Se enriquece un extracto de la muestra mediante adición de una cantidad adecuada de la solución de calibración (3.11.2). La cantidad de carbadox añadida debe ser similar a la cantidad calculada de carbadox que se encuentre en el extracto de la muestra.

Solamente debe aumentar la altura del pico de carbadox teniendo en cuenta la cantidad añadida y la dilución del extracto. La anchura del pico a la mitad de su altura máxima debe estar dentro del margen del +/- 10 por 100 de la anchura inicial.

7.1.2 Detección por red de diodos.

Los resultados deben evaluarse de acuerdo con los siguientes criterios:

a) La longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección. En el caso de la detección por red de diodos se sitúa generalmente en +/- 2 nm.

b) Entre 225 y 400 nm, los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, no deben ser diferentes en las partes del espectro situadas entre el 10 por 100 y el 100 por 100 de la absorbancia relativa. Este criterio se cumple cuando están presentes los mismos máximos y la desviación entre los dos espectros no supera en ningún punto observado el 15 por 100 de la absorbancia del analito patrón.

Premezclas Preparados

L	...	.	...	.	...	.	...	.	7	7	7	7	8	8	8
n	...	.	...	.	...	.	...	.	14	14	14	14	16	16	16
Media (mg/kg)	.	...	.	...	.	...	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104		
Sr (mg/kg)	...	.	...	.	...	.	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7		
CVR (Porcentaje)	...	.	...	.	...	.	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4		
SR (mg/kg)	.	...	.	...	.	...	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7		
CVR (Porcentaje)	.	...	.	...	.	.	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4		
Contenido nominal (mg/kg)	.	...	.	...	.	...	100	100	100	100	100	100	100		

n: número de valores individuales.

CVr: coeficiente de variación de la repetibilidad.

SR: desviación típica de la reproducibilidad.

CVR: coeficiente de variación de la reproducibilidad."