II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

UNDÉCIMA DIRECTIVA 93/70/CEE DE LA COMISIÓN

de 28 de julio de 1993

por la que se fijan métodos de análisis comunitario para el control oficial de los alimentos para animales

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos para la toma de muestras y métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal [1], cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 3768/85 [2], y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la Directiva 70/373/CEE requiere que los controles oficiales de los alimentos para animales con objeto de comprobar el cumplimiento de las condiciones establecidas en virtud de disposiciones legales, reglamentarias o administrativas referentes a la calidad y la composición de los alimentos para animales se efectúen aplicando métodos de toma de muestras y de análisis comunitarios;

Considerando que, para controlar el cumplimiento de las condiciones de uso de la halofuginona en la alimentación animal, es conveniente establecer un método de análisis comunitario de este aditivo;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros exigirán que los análisis previstos para los controles oficiales de los alimentos para animales, por lo que se refiere a su contenido de halofuginona se efectúen siguiendo el método que se describe en el Anexo.

Artículo 2

Los Estados miembros adoptarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva, a más tardar, el 30 de junio de 1994. Informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 28 de julio de 1993.

Por la Comisión

René STEICHEN

Miembro de la Comisión

---

[1] DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
[2] DO nº L 362 de 31. 12. 1985, p. 8.

ANEXO

DETERMINACIÓN DE LA HALOFUGINONA

Hidrobromuro de DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-pipiredil)acetonil]-quinazolín-4-(3H)-ona

1. **Objetivo y ámbito**

El método está concebido para la determinación de la halofuginona en los alimentos para animales. El límite mínimo de determinación es de 1 mg/kg.

2. **Principio**

Tras tratarla con agua caliente, la halofuginona se extrae como base libre con acetato de etilo, y posteriormente se pasa como clorhidrato a una solución ácida acuosa. El extracto se purifica mediante una cromatografia de intercambio iónico. El contenido de halofuginona se determina mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC = high-performance liquid chromatography) empleando un detector ultravioleta.

3. **Reactivos**

3.1. Acetonitrilo, grado HPLC

3.2. Resina amberlita XAD-2

3.3. Amonio acetato

3.4. Acetato de etilo

3.5. Ácido acético glacial

3.6. Halofuginona patrón normalizada hidrobromuro de DL-trans-7-brome-6-cloro-3-[3-hidroxi-2-piperidil) acetonil]-quinazolín-4-(3H)-ona, E 764

3.6.1. Solución patrón de reserva de halofuginona (100 µg/ml)

Pésense 50 mg de halofuginona (3.6) con una precisión de 0,1 mg en un matraz aforado de 500 ml; disuélvase el producto en solución tampón de acetato de amonio (3.18), complétese el recipiente hasta la marca con la solución tampón y mézclese. Esta solución, almacenada en la oscuridad y a 5 °C, se mantiene estable durante tres semanas.

3.6.2. Soluciones de calibrado

Viértanse 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 6,0 ml de la solución normalizada de reserva (3.6.1) en una serie de matraces aforados de 100 ml. Rellénense hasta la marca con fase móvil (3.21) y mézclense los líquidos. Estas soluciones tienen concentraciones de halofuginona de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 6,0 µg/ml respectivamente. Estas soluciones han de prepararse cada vez que se vayan a usar.

3.7. Ácido clorhídrico (ρ_{20} ca. 1,16 g/ml).

3.8. Metanol

3.9. Nitrato de plata

3.10. Ascorbato sódico

3.11. Carbonato sódico

3.12. Cloruro sódico

3.13. EDTA (ácido etilendiaminotetracético, sal disódica)

3.14. Agua, grado HPLC

3.15. Solución de carbonato sódico, 6 = 10 g/100 ml

3.16. Solución de carbonato sódico saturada de cloruro sódico, 6 = 5 g/100 ml

Disuélvanse 50 g de carbonato sódico (3.11) en agua, diluyáse hasta completar un litro y añádase cloruro de solio (3.12) hasta que la solución esté saturada.

3.17. Ácido clorhídrico, ca. 0,1 mol/l

Dilúyanse 10 ml de ácido clorhídrico (3.7) con agua, hasta un litro.

3.18. Solución tampón de acetato amónico, ca. 0,25 mol/litro

Disuélvanse 19,3 g de acetato amónico (3.3) y 30 ml de ácido acético (3.5) en agua (3.14), y dilúyase hasta un litro.

3.19. Preparación de resina amberlita XAD-2

Lávese la cantidad adecuada de resina (3.2) con agua hasta que se hayan eliminado todos los iones cloruro, lo cual se comprobará mediante una prueba con nitrato de plata (3.20) en la fase acuosa descartada. Posteriormente lávese la resina con 50 ml de metanol (3.8), descártese el metanol y resérvese la resina bajo metanol nuevo.

3.20. Solución de nitrato de plata, ca. 0,1 mol/l

Disuélvanse 0,17 g de nitrato de plata (3.9) en 10 ml de agua.

3.21. Fase móvil HPLC

Mézclense 500 ml de acetonitrilo (3.1) con 300 ml de solución tampón de acetato amónico (3.18) y 1 200 ml de agua (3.14). Ajústese el pH a 4,3 empleando ácido acético (3.5). Fíltrese la mezcla por un filtro de 0,22 µm (4.8) y desgasifíquese la solución (por ejemplo, mediante ultrasonicación durante 10 minutos). Esta solución, almacenada en la oscuridad y en un recipiente cerrado, es estable durante un mes.

4. Instrumentos

4.1. Baño ultrasónico

4.2. Evaporador rotatorio

4.3. Centrífuga

4.4. Equipo HPLC con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de array de fotodiodos

4.4.1. Columna de cromatografía líquida (300 mm × 4 mm) con relleno de C 18, de 10 µm, o columna equivalente

4.5. Columna de vidrio (300 mm × 10 mm) equipada con un filtro de vidrio fritado y una llave

4.6. Filtros de fibra de vidrio, de un diámetro de 150 mm

4.7. Filtros de membrana, de 0,45 µm

4.8. Filtros de membrana, de 0,22 µm

5. Procedimiento

Observación: La halofuginona como base libre es inestable en soluciones alcalinas y de acetato de etilo. No deberá permanecer en acetato de etilo durante más de 30 minutos.

5.1. General

5.1.1. Debe analizarse un pienso en blanco para asegurarse de que no contiene halofuginona ni sustancias interferentes.

5.1.2. Se debe llevar a cabo un test de recuperación, analizando el pienso en blanco después de enriquecerlo por adición de una cantidad de halofuginona, similar a la presente en la muestra problema. Para enriquecer a un nivel de 3 mg/kg, añadir 300 µl de la solución standard de reserva (3.6.1) a 10 g del pienso en blanco, mezclar y esperar 10 minutos antes de proceder a la extracción (5.2).

Nota: Para los efectos de este método el pienso en blanco debe ser de tipo similar al de la muestra problema y en su análisis no se debe detectar halofuginona.

5.2. Extracción

Pésense 10 g de la muestra preparada con una precisión de 0,01 g en un tubo de centrífuga de 200 ml, añádanse 0,5 g de ascorbato sódico (3.10), 0,5 g de EDTA (3.13) y 20 ml de agua, y mézclese todo. Sumérjase el tubo en un baño de agua a 80 °C durante 5 minutos. Tras enfriarlo a temperatura ambiente, añádase 20 ml de solución de carbonato sódico (3.15) y mézclese. Añádanse inmediatamente 100 ml de acetato de etilo (3.4) y agítese enérgicamente a mano durante 15 segundos. Colóquese el tubo en el baño ultrasónico (4.1) durante 3 minutos y aflójese el tapón. Centrifúguese durante 2 minutos y decántese la fase de acetato de etilo en un embudo separador de 500 ml a través de un fibra de vidrio (4.6). Repítase la extracción de la muestra con una segunda porción de 100 ml de acetato de etilo. Lávense los extractos combinados durante 1 minuto con 50 ml de solución de carbonato sódico saturada de cloruro sódico (3.16) y descártese la capa acuosa.

Extráigase la capa orgánica durante 1 minuto con 50 ml de ácido clorhídrico (3.17). Pásese la capa ácida inferior a un embudo separador de 250 ml. Extráigase de nuevo la capa orgánica durante un minuto y medio con otros 50 ml de ácido clorhídrico y combínese con el primer extracto. Lávense los dos extractos ácidos combinados agitándolos durante aproximadamente 10 segundos con 10 ml de acetato de etilo (3.4).

Transfiérase cuantitativamente la capa acuosa a un matraz de fondo redondo de 250 ml y descártese la fase orgánica. Evapórese todo el acetato de etilo que quede en la solución ácida empleando un evaporador rotatorio (4.2). La temperatura del baño de agua no deberá superar los 40 °C. A un vacío de ca 25 mbar se elimina todo el acetato de etilo residual en 5 minutos a 38 °C.

5.3. Limpieza

5.3.1. Preparación de la columna de resina amberlita

Prepárese una columna XAD-2 por cada extracto de muestra. Viértanse 10 g de resina preparada (3.19) en una columna de vidrio (4.5) empleando metanol (3.8). Colóquese un trozo pequeño de lana de vidrio en la parte superior del lecho de resina. Déjese eluir el metanol de la columna y lávese la resina con 100 ml de agua, cortando el flujo cuando el líquido alcance la parte superior del lecho de resina. Antes de emplearla, déjese la columna en reposo durante 10 minutos para equilibrarla. Nunca deberá permitirse que la columna se seque.

5.3.2. Limpieza de la muestra

Transfiérase el extracto (5.2) cuantitativamente a la parte superior de la columna de resina preparada (5.31), y elúyase, descartando el eluído. La velocidad de elución no deberá exceder de 20 ml/minuto. Aclárese el matraz de fondo redondo con 20 ml de ácido clorhídrico (3.17) y empléese este líquido para lavar la columna de resina. Elimínese todo resto de solución ácida con un chorro de aire. Deséchense las aguas de lavado. Añádanse 100 ml de metanol (3.8) a la columna y elúyanse 5-10 ml, recogiendo el eluído en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Déjese el metanol restante durante 10 minutos para que se equilibre con la resina y continúese con la elución a un ritmo que no supere los 20 ml/minuto, recogiendo el eluato en el mismo matraz de fondo redondo. Evapórese el metanol en el evaporador rotatorio (4.2); la temperatura del baño de agua no deberá exceder de 40 °C. Transfiérase cuantitativamente el residuo a un matraz aforado de 10 ml empleando la fase móvil (3.21). Rellénese hasta el enrase con fase móvil y mézclese. Fíltrese una alícuota por un filtro de membrana (4.7). Resérvese esta solución para la determinación por HPLC (5.4).

5.4. Determinación por HPLC

5.4.1. Parámetros

Las condiciones siguientes se ofrecen como guía; pueden usarse otras condiciones siempre que den los mismos resultados

Columna de cromatografía líquida (4.4.1)

Fase móvil HPLC (3.21)

Flujo: de 1,5 a 2 ml por minuto.

Longitud de onda de detección: 243 nm

Volumen de inyección: de 40 a 100 µl

Compruébese la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibrado (3.6.2) con un contenido de 3,0 µg/ml, hasta que se hayan alcanzado alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

5.4.2. Curva de calibrado

Inyéctese varias veces cada solución de calibrado (3.6.2) y mídanse las alturas de pico (áreas) para cada concentración. Trácese una curva de calibrado empleando las alturas o áreas medias de los picos de las soluciones de calibrado como ordenadas y las correspondientes concentraciones en µg/ml como abscisas.

5.4.3. Solución de muestra

Inyéctese varias veces el extracto de muestra (5.3.2), empleando el mismo volumen que se utiliza para las soluciones de calibrado y determínese la altura (o área) media de los picos de halofuginona.

6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de halofuginona de la solución de muestra, determínese la concentración de la solución de muestra en µg/ml haciendo referencia a la curva de calibrado (5.4.2).

El contenido de halofuginona w (en mg/kg) de la muestra se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

en la que:

— c: concentración de halofuginona de la solución de muestra en µg/ml

— m: masa de la muestra utilizada para el ensayo en gramos.

7. Validación de los resultados

7.1. Identidad

La identidad del producto analizado se puede confirmar mediante una co-cromatografía, o utilizando un detector de array de diodos, mediante el cual se comparan los espectros del extracto de la muestra y de la solución de calibrado (3.6.2) con un contenido de 6,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografía

Refuércese un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibrado (3.6.2). La cantidad de halofuginona añadida deberá ser similar a la cantidad calculada de halofuginona hallada en el extracto de la muestra.

Sólo la altura (área) del pico de halofuginona deberá aumentar según la cantidad añadida, teniendo en cuenta la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, deberá ser igual ± 10 % a la anchura original.

7.1.2. Detección por array de diodos

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

a) la longitud de onda del máximo de absorción de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el ápice del pico cromatográfico, debe ser la misma, dentro de un margen determinado por la resolución del detector. En el caso del detector de array de diodos, el margen está situado generalmente en ± 2 nm;

b) entre 225 y 300 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el ápice del pico cromatográfico, no deberán ser diferentes para aquellas partes del espectro comprendidas entre el 10 y 100 % de absorción relativa. Se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorción del producto analizado patrón;

c) entre 225 y 300 nm, los espectros de la pendiente de subida, el ápice y la pendiente de bajada del pico del cromatograma del extracto de la muestra, no deben ser distintos unos de otros en lo que se refiere a las partes del espectro comprendidas en la gama del 10-100 % de absorción relativa. Este criterio se cumple cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorción del espectro en el ápice del pico.

Si no se cumple alguno de estos criterios, no se confirma la presencia del producto analizado.

7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas llevadas a cabo con la misma muestra, no deberá superar los 0,5 mg/kg para un contenido de halofuginona de hasta 3 mg/kg.

7.3. Recuperación

La recuperación de la muestra en blanco reforzada deberá ser al menos del 80 %.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo (1) en el que se analizaron tres muestras en ocho laboratorios.

Resultados

	Muestra A (blanco) tras su recepción	Muestra B (harina)		Muestra C (pellets)	
		tras su recepción	tras dos meses	tras su recepción	tras dos meses
Media (1)	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
DR	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	—	16	18	14	17
rec		86	74	88	75

(1): unidades en mg/kg.
n.d.: no se detectó.
DR: desviación standard de la reproducibilidad.
CV_R: coeficiente de variación (%).
rec: recuperación (%).

(1) *The Analyst* 1983, 108 : 1252-1256.