II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DÉCIMA PRIMEIRA DIRECTIVA 93/70/CEE DA COMISSÃO

de 28 de Julho de 1993

que fixa métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 70/373/CEE do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais [1], com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 3768/85 do Conselho [2], e, nomeadamente, o seu artigo 2º,

Considerando que a Directiva 70/373/CEE prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais destinados a verificar o respeito das condições prescritas em virtude das disposições legislativas, regulamentares ou administrativas relativas à qualidade e composição dos alimentos para animais, sejam efectuados segundo modos de colheita de amostras e métodos de análise comunitários;

Considerando que, para controlar a observação das condições de utilização de halofuginona na alimentação para animais, é conveniente estabelecer a nível comunitário um método de análise para este aditivo;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité permanente dos alimentos para animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

Os Estados-membros prescreverão que as análises previstas para os controlos oficiais dos alimentos para animais, no que diz respeito ao teor em halofuginona, sejam efectuadas segundo o método descrito no anexo.

Artigo 2º

Os Estados-membros porão em vigor, o mais tardar em 30 de Junho de 1994, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Sempre que os Estados-membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As normas relativas a essa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

Artigo 3º

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 28 de Julho de 1993.

Pela Comissão

René STEICHEN

Membro da Comissão

---

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

ANEXO

DETERMINAÇÃO DA HALOFUGINONA

Bromidrato de DL-*trans*-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil) acetonil]-quinazolina-4-(3H)-ona

1. **Objectivo e campo de aplicação**

O presente método destina-se à determinação de halofuginona em alimentos para animais. O limite inferior de determinação é de 1 mg/kg.

2. **Princípio**

Após tratamento com água quente, a halofuginona é extraída por acetato de etilo sob a forma de base livre e posteriormente transferida por partição, sob a forma de cloridrato, para uma solução aquosa de ácido acético. O extracto é purificado por cromatografia de troca iónica, sendo o teor de halofuginona determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reserva, utilizando um detector de ultravioleta.

3. **Reagentes**

3.1. Acetonitrilo de qualidade para HPLC

3.2. Resina Amberlite XAD-2

3.3. Acetato de amónio

3.4. Acetato de etilo

3.5. Ácido acético

3.6. Substância padrão de halofuginona (bromidrato de DL-*trans*-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]-quinazolina-4-(3H)-ona, E 764)

3.6.1. Solução-mãe padrão de halofuginona, 100 µg/ml

Pesar, com aproximação de ± 0,1 mg, 50 mg de halofuginona (3.6) num balão graduado de 500 ml. Dissolver com solução-tampão de acetato de amónio (3.18), completar até ao traço de referência com a mesma solução e agitar. Esta solução mantém-se estável durante três semanas, a 5 °C, na ausência de luz.

3.6.2. Soluções de calibração

Transferir, respectivamente, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 ml de solução-mãe padrão de halofuginona (3.6.1) para uma série de balões graduados de 100 ml. Completar até ao traço de referência com a fase móvel (3.21) e agitar. As soluções resultantes possuem concentrações de halofuginona de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 µg/ml, respectivamente. Estas soluções tem que ser preparadas antes de cada utilização.

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

3.8. Metanol

3.9. Nitrato de prata

3.10. Ascorbato de sódio

3.11. Carbonato de sódio

3.12. Cloreto de sódio

3.13. EDTA (sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético)

3.14. Água de pureza para HPLC

3.15. Solução de carbonato de sódio, 6 = 10 g/100 ml

3.16. Solução de carbonato de sódio saturada com cloreto de sódio, 6 = 5 g/100 ml

Dissolver 50 g de carbonato de sódio (3.11) em água, diluir para 1 l e adicionar cloreto de sódio (3.12) até obter uma solução saturada.

3.17. Ácido clorídrico, ca. 0,1 mol/l

Diluir 10 ml de HCl (3.7) em água até perfazer 1 l.

3.18. Solução-tampão de acetato de amónio, ca. 0,25 mol/l

Dissolver 19,3 g de acetado de amónio (3.3) e 30 ml de ácido acético (3.5) em água (3.14), diluindo para 1 l.

3.19. Preparação da resina Amberlite XAD-2

Lavar com água uma quantidade adequada de Amberlite (3.2), até à remoção completa dos iões cloreto, verificada através da realização do teste com nitrato de prata (3.20) com a fase aquosa recolhida. Seguidamente, lavar a resina com 50 ml de metanol (3.8), desprezar o metanol e armazenar a resina numa nova porção de metanol.

3.20. Solução de nitrato de prata, ca. 0,1 mol/l

Dissolver 0,17 g de nitrato de prata (3.9) em 10 ml de água.

3.21. Fase móvel para HPLC

Misturar 500 ml de acetonitrilo (3.1) com 300 ml de solução-tampão de acetato de amónio (3.18) e 1 200 ml de água (3.14). Ajustar o pH para 4,3, por recurso a ácido (3.5). Filtrar num filtro de 0,22 µm (4.8) e remover os gases da solução (por exemplo, através da acção de ultra-sons durante 10 minutos). A solução permanece estável durante um mês, se for armazenada na ausência de luz e num recipiente fechado.

4. Equipamento

4.1. Banho de ultra-sons

4.2. Evaporador rotativo

4.3. Centrifugadora

4.4. Aparelho para HPLC equipado com um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável ou um detector de díodos

4.4.1. Coluna para cromatografia líquida, de 300 mm × 4 mm, com enchimento de C 18 de 10 µm, ou equivalente

4.5. Coluna de vidro (300 mm × 10 mm), equipada com um filtro de vidro sinterizado e torneira

4.6. Filtros de fibra de vidro de 150 mm de diâmetro

4.7. Filtros de membrana, de 0,45 µm

4.8. Filtros de membrana, de 0,22 µm

5. Procedimento

Nota: Sob a forma de base livre, a halofuginona é instável em soluções alcalinas e em acetato de etilo, não devendo permanecer neste último durante mais de 30 minutos.

5.1. Generalidades

5.1.1. Deve-se analisar uma amostra de alimento composto para verificar a ausência de halofuginona ou de qualquer substância interferente no processo (ensaio em branco).

5.1.2. Deve-se efectuar um teste de recuperação utilizando a amostra do ensaio em branco, adicionada de uma quantidade conhecida de halofuginona semelhante à contida na amostra em análise. Para obter 3 mg/kg de halofuginona adicionam-se 300 µl de solução-mãe padrão (3.6.1). Misturar, deixar em repouso 10 minutos, e proceder à extracção (5.2).

Nota: Para os fins do presente método, a amostra para o ensaio em branco deve ter composição semelhante à da amostra em análise e não deve acusar a presença de halofuginona.

5.2. Extracção

Pesar para um tubo de centrífuga 200 ml, com uma aproximação de ± 0,01 g, 10 g da amostra previamente preparada. Adicionar 0,5 g de ascorbato de sódio (3.10), 0,5 g de EDTA (3.13) e 20 ml de água, agitando. Colocar o tubo num banho de água a 80 °C, durante 5 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionar 20 ml de solução de carbonato de sódio (3.15), agitando. Adicionar imediatamente 100 ml de acetato de etilo (3.4) e agitar manualmente com vigor durante 15 segundos. Colocar o tubo durante 3 minutos num banho de ultra-sons (4.1), tirando a rolha. Centrifugar durante 2 minutos e decantar a camada de acetato de etilo, através de um filtro de fibra de vidro (4.6), para uma ampola de decantação de 500 ml. Repartir a extracção da amostra com uma segunda porção de 100 ml de acetato de etilo. Lavar os extractos combinados durante 1 minuto com 50 ml de solução de carbonato de sódio saturada com cloreto de sódio (3.16), desprezando a fase aquosa.

Extrair a fase orgânica durante 1 minuto com 50 ml de ácido clorídrico (3.17). Transferir a camada inferior de ácido para uma ampola de decantação de 250 ml e extrair novamente durante 1,5 minutos com uma nova porção de 50 ml de ácido clorídrico, combinando com o primeiro extracto. Lavar por agitação, com 10 ml de acetato de etilo (3.4), durante cerca de 10 segundos, os extractos ácidos combinados.

Transferir quantitativamente a fase aquosa para um balão de fundo redondo de 250 ml, desprezando a fase orgânica. Evaporar o acetato de etilo remanescente da solução ácida, por recurso a um evaporador rotativo (4.2). A temperatura do banho de água não deve exceder 40 °C. A uma pressão aproximada de 25 mbar, todo o acetato de etilo residual deverá ser removido em 5 minutos, a 38 °C.

5.3. Purificação

5.3.1. Preparação da coluna de Amberlite

Deve preparar-se uma coluna de XAD-2 para cada extracto de amostra. Com o auxílio de metanol (3.8), transferir para uma coluna de vidro (4,5) 10 g de Amberlite preparada (3.19). Colocar uma pequena porção de lã de vidro no topo da camada de resina. Remover o metanol da coluna e lavar a resina com 100 ml de água, suspendendo o fluxo quando o nível de líquido atingir o topo da camada de resina. Equilibrar durante 10 minutos antes da utilização. Não permitir, em caso algum, a secagem da coluna.

5.3.2. Purificação da amostra

Transferir quantitativamente o extracto (5.2) para a coluna de Amberlite preparada (5.3.1) e eluir, desprezando o eluído. A taxa de eluição não deverá exceder 20 ml/min. Lavar o balão de fundo redondo com 20 ml de ácido clorídrico (3.17), aproveitando a solução residual para lavar a coluna de resina. Remover quaisquer resíduos de solução ácida por recurso a uma corrente de ar. Desprezar os resíduos de lavagem. Adicionar à coluna 100 ml de metanol (3.8) e deixar eluir 5/10 ml, recolhendo o eluído num balão de fundo redondo de 250 ml. Equilibrar a resina com o metanol remanescente durante 10 minutos e continuar a eluição a uma taxa não superior a 20 ml/min, recolhendo o eluído no mesmo balão de fundo redondo. Evaporar o metanol no evaporador rotativo (4.2); a temperatura do banho de água não deverá exceder 40 °C. Com o auxílio da fase móvel (3.21), transferir quantitativamente o resíduo para um balão graduado de 10 ml. Completar até ao traço de referência com fase móvel e agitar. Filtrar uma alíquota num filtro de membrana (4.7), destinando esta solução à análise por HPLC (5.4).

5.4. Análise por HPLC

5.4.1. Parâmetros

As condições que se seguem são fornecidas a título orientativo, mas outras condições podem ser utilizadas desde que forneçam resultados aquivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (4.4.1)

Fase móvel para HPLC (3.21)

Fluxo: 1,5 a 2 ml/min

Comprimento de onda de detecção: 243 nm

Volume a injectar: 40 a 100 µl

Verificar a estabilidade do sistema comatográfico mediante a injecção repetida da solução de calibração (3.6.2), que contém 3,0 µg/ml de halofuginona, até obter picos com alturas (ou áreas) e tempos de retenção reprodutíveis

5.4.2. Curva de calibração

Injectar várias vezes cada solução de calibração (3.6.2) e medir a altura (ou área) dos picos correspondentes a cada concentração. Traçar uma curva de calibração, colocando a altura (ou área) média dos picos das soluções de calibração em ordenadas e as concentrações correspondentes, expressas em µg/ml, em abcissas.

5.4.3. Solução de amostra

Injectar várias vezes o extracto de amostra (5.3.2), utilizando o mesmo volume utilizado para as soluções de calibração, e determinar a altura (ou área) média dos picos correspondents à halofuginona.

6. Cálculo dos resultados

Com base na altura (ou área) média dos picos de solução de amostra relativos à halofuginona, determinar a concentração da mesma solução, expressa em µg/ml, por recurso à curva de calibração (5.4.2).

O teor de halofuginona da amostra, w, expresso em mg/kg, é dado pela fórmula:

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

em que:

c: concentração de halofuginona da solução de amostra, expressa em µg/ml,

m: massa da toma de ensaio, expressa em gramas.

7. **Confirmação dos resultados**

7.1. Identidade

A identidade da substância a analisar pode ser confirmada por co-cromatografia ou por recurso a um detector de díodos, comparando os espectros do extracto de amostra e da solução de calibração (3.6.2) que contém 6,0 µg/ml de halofuginona.

7.1.1. Co-cromatografia

Reforçar um extracto de amostra com a adição de uma quantidade adequada de uma solução de calibração (3.6.2). A quantidade de halofuginona adicionada deve ser idêntica à quantidade de halofuginona presumida no extracto de amostra.

Apenas a altura do pico corespondente à halofuginona, deverá exibir um momento adequado, tendo em conta a quantidade adicionada e a diluição do extracto. A largura do pico a meia altura deverá ser igual a ± 10 % da largura original.

7.1.2. Detecção com um detector de díodos

Os resultados são avaliados de acordo com os seguints critérios:

a) O comprimento de onda máximo de absorção do espectro da amostra e do padrão, registado no máximo do pico cromatográfico, deve ser igual com uma margem determinada pelo poder de resolução do sistema de detecção. No caso de um detector de díodos, esta margem é, em geral, de ± 2 nm;

b) Entre 225 e 300 nm, os espectros da amostra e do padrão, registados no máximo dos picos cromatográficos, não devem diferir no que respeita às zonas do espectro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 e 100 %. Este critério é observado nos casos em que se encontrarem presentes os mesmos máximos e a diferença entre ambos os espectros não exceder, em caso algum, 15 % de absorvância da solução-padrão;

c) Entre 225 e 300 nm, os espectros na zona crescente, no máximo e na zona decrescente do pico cromatográfico da amostra, não devem diferir uns dos outros no que respeita às regiões do espectro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 e 100 %. Este critério é observado nos casos em que se encontrarem presentes os mesmos máximos e a diferença entre os espectros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do espectro do máximo do pico.

Se um dos referidos critérios não for observado, a presença da substância a analisar não pode ser confirmada.

7.2. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve exceder 0,5 mg/kg, para teores de halofuginona até de 3 mg/kg.

7.3. Recuperação

A taxa de recuperação da amostra em branco reforçada deve ser de, pelo menos, 80 %.

8. **Resultados de um estudo de colaboração interlaboratorial**

Num estudo de colaboração interlaboratorial (1), procedeu-se à análise de três amostras por oito laboratórios.

Resultados

	Amostra A (branco) aquando da recepção	Amostra B (moída)		Amostra C (granulada)	
		aquando da recepção	após 2 meses	aquando da recepção	após 2 meses
Média (1)	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	—	16	18	14	17
rec		86	74	88	75

(1): unidades em mg/kg
n.d.: não detectado
S_R: desvio-padrão de reprodutibilidade
CV_R: coeficiente de variação (%)
rec: recuperação (%)

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