DUODÉCIMA DIRECTIVA 93/117/CE DE LA COMISIÓN

de 17 de diciembre de 1993

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

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad 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 de 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 nº 70/373/CEE prevé que los controles oficiales de los alimentos para animales, efectuados con objeto de comprobar que se cumplen las condiciones prescritas por las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas referentes a la calidad y la composición de los piensos, se efectúan siguiendo métodos comunitarios de toma de muestras y de análisis ;

Considerando que, para controlar el cumplimiento de las condiciones de uso de la robenidina y del benzocuato de metilo en la alimentación animal, conviene establecer métodos de análisis, a escala comunitaria, de estos aditivos ;

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 ordenarán que los análisis previstos para los controles oficiales de los piensos, respecto a su contenido de robenidina y benzocuato de metilo se efectúen siguiendo los métodos correspondientes que se describen 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 noviembre 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

La presente Directiva entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas.*

Hecho en Bruselas, el 17 de diciembre 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

1. DETERMINACIÓN DE LA ROBENIDINA

Clorhidrato de 1,3-bis[(4-clorobenciliden) amino] guanidina

1. **Objetivo y ámbito**

El método está concebido para la determinación de la robenidina en los alimentos para animales. El límite mínimo de determinación es de 5 mg/kg.

2. **Principio**

La muestra se extrae con metanol acidificado. Se deseca el extracto y se purifica en una columna de óxido de aluminio una parte alícuota. La robenidina se eluye de la columna con metanol, se concentra y se completa hasta un volumen adecuado con fase móvil. El contenido de robenidina se determina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC) empleando un detector ultravioleta.

3. **Reactivos**

3.1. *Metanol*

3.2. *Metanol acidificado*

Transferir 4,0 ml de ácido clorhídrico (P_{20} ca, 1,18 g/ml) a un matraz graduado de 500 ml, enrasar con metanol (3.1) y mezclar. Esta solución debe prepararse antes de cada uso.

3.3. *Acetonitrilo de calidad para HPLC*

3.4. *Tamiz molecular*

Tipo 3A, perlas de 8-12 mallas (perlas de 1,6-2,5 mm, aluminosilicato cristalino, 0,3 mm de diámetro de poro).

3.5. *Óxido de aluminio: ácido, grado de actividad I para cromatografía de columna*

Transferir 100 g de óxido de aluminio a un recipiente apropiado y añadir 2,0 ml de agua. Tapar y agitar durante 20 minutos aproximadamente. Almacenar en un recipiente bien cerrado.

3.6. *Solución de potasio dihidrógeno fosfato, c = 0,025 mol/l*

En un matraz graduado de 1 000 ml disolver 3,40 g de potasio dihidrógeno fosfato en agua (de calidad para HPLC), enrasar y mezclar.

3.7. *Solución de disodiohidrógeno fosfato, c = 0,025 mol/l*

En un matraz graduado de 1 000 ml disolver 3,55 g de fosfato monoácido de sodio anhidro (o 4,45 g de dihidrato o 8,95 g de dodecahidrato), enrasar y mezclar.

3.8. *Fase móvil de la HPLC*

Mezclar los reactivos siguientes:

650 ml acetonitrilo (3.3),

250 ml de agua (de calidad para HPLC),

50 ml de solución de potasio dihidrógeno fosfato (3.6),

50 ml de solución de disodiohidrógeno fosfato de sodio (3.7).

Filtrar por un filtro de 0,22 µm (4.6) y desgasificar la solución (por ejemplo, mediante la aplicación de ultrasonidos durante 10 minutos).

3.9. *Sustancia patrón*

Robenidina pura: Clorhidrato de 1.3-bis [(4-clorobenciliden)amino] guanidina (E 758).

3.9.1. Solución patrón madre de robenidina : 300 µg/ml.

Pesar 30 mg de sustancia patrón de robenidina (3.9) con precisión de 0,1 mg. En un matraz aforado de 100 ml disolver en metanol acidificado (3.2), enrasar con el mismo disolvente y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y guardar al abrigo de la luz.

3.9.2. Solución patrón intermedia de robenidina : 12 µg/ml.

Transferir 10,0 ml de la solución patrón madre (3.9.1) a un matraz aforado de 250 ml, enrasar con la fase móvil (3.8) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y guardar al abrigo de la luz.

3.9.3. Soluciones de calibrado

Transferir 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 y 25,0 ml de la disolución patrón intermedia (3.9.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml. Enrasar con fase móvil (3.8) y mezclar. Estas soluciones corresponden, respectivamente, a 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 y 6,0 µg/ml de robenidina. Estas soluciones deben prepararse antes de cada uso.

4. Material

4.1. *Columna de vidrio*

Columna de vidrio ámbar provista de llave y de un depósito de 150 ml de capacidad aproximadamente, con un diámetro interior de 10,15 mm y una longitud de 250 mm.

4.2. *Agitador oscilante de laboratorio*

4.3. *Evaporador rotatorio*

4.4. *Equipo de HPLC con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos que funcione en el intervalo 250-400 nm*

4.4.1. Columna para cromatografía de líquidos : 300 mm × 4 mm, con relleno de 10 µm de C_{18} o equivalente.

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

4.6. *Filtros de membrana de 0,22 µm*

4.7. *Filtros de membrana de 0,45 µm*

5. Procedimiento

Nota : La robenidina es sensible a la luz. Deberá utilizarse material de vidrio ámbar en todas las operaciones.

5.1. *General*

5.1.1. Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar que no contiene ni robenidina ni sustancias interferentes.

5.1.2. Deberá efectuarse un ensayo de recuperación, que consistirá en analizar el pienso en blanco enriquecido con la adición de una cantidad de robenidina similar a la que contenga la muestra. Para enriquecer a un nivel de 60 mg/kg, transferir 3,0 ml de la solución patrón madre (3.9.1) a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Evaporar la solución en una corriente de nitrógeno hasta que resten 0,5 ml aproximadamente. Añadir 15 g del pienso en blanco, mezclar y esperar 10 minutos antes de efectuar la extracción (5.2).

Nota : a efectos del presente método, el pienso en blanco debe ser de tipo similar al de la muestra y no debe detectarse robenidina en su análisis.

5.2. *Extracción*

Pesar, con precisión de 0,01 g, 15 g aproximadamente de la muestra preparada. Transferir a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y añadir 100,0 ml de metanol acidificado (3.2), tapar y agitar durante una hora en el agitador (4.2). Filtrar la solución por un papel de filtro de fibra de vidrio (4.5) y recoger todo el filtrado en un matraz Erlenmeyer de 150 ml. Añadir 7,5 g del tamiz molecular, tapar y agitar durante 5 minutos. Filtrar inmediatamente por un papel de filtro de fibra de vidrio. Conservar esta solución para la fase de purificación (5.3).

5.3. *Purificación*

5.3.1. Preparación de la columna de óxido de aluminio.

Introducir un pequeño tapón de fibra de vidrio en el extremo inferior de la columna de vidrio. Pesar 11,0 g del óxido de aluminio preparado (3.5) y transferir a la columna. Durante esta fase, deberá procurarse reducir al máximo la exposición a la atmósfera. Golpear suavemente el extremo inferior de la columna cargada a fin de que se sedimente el óxido de aluminio.

5.3.2. Purificación de la muestra.

Transferir con una pipeta a la columna 5,0 ml del extracto de muestra preparado en el punto (5.2). Colocar la punta de la pipeta cerca de la pared de la columna y dejar que la solución quede absorbida en el óxido de aluminio. Eluir la robenidina de la columna con 100 ml de metanol (3.1), manteniendo un flujo de 2-3 ml/minuto, y recoger el eluido en un matraz redondo de 250 ml. Evaporar hasta sequedad la solución de metanol a presión reducida y a una temperatura de 40° C, utilizando un evaporador rotatorio (4.3). Disolver nuevamente el residuo en 3-4 ml de fase móvil (3.8) y transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml. Lavar el matraz con varias porciones de 1-2 ml de fase móvil y transferir los lavados al matraz graduado. Enrasar con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar una alícuota por un filtro de 0,45 µm (4.7). Conservar esta solución para la determinación mediante HPLC (5.4).

5.4. *Determinación mediante HPLC*

5.4.1. Parámetros.

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

Columna para cromatografía de líquidos (4.4.1)

Fase móvil HPLC (3.8)

Flujo : de 1,5 a 2 ml por minuto

Longitud de onda del detector : 317 nm

Volumen de inyección : de 20 a 50 µl.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibrado (3.9.3) con un contenido de 3,6 µg/ml, hasta que se hayan alcanzado alturas o áreas de pico y tiempos de retención constantes.

5.4.2. Curva de calibrado.

Inyectar varias veces cada solución de calibrado (3.9.3) y medir las alturas (áreas) de pico para cada concentración. Trazar 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.

Inyectar varias veces el extracto de muestra (5.3.2), empleando el mismo volumen utilizado para las soluciones de calibrado y determinar la altura (o área) media de los picos de robenidina.

6. Cálculo de los resultados

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

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

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

siendo :

c = concentración de robenidina de la solución de muestra en µg/ml,

m = masa, en gramos, de la muestra utilizada para el ensayo.

7. Validación de los resultados

7.1. *Identidad*

La identidad del analito se puede confirmar mediante una co-cromatografía, o utilizando un detector de red de diodos, mediante el cual se comparan los espectros del extracto de la muestra y de la solución de calibrado (3.9.3) con un contenido de 6,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografía

Reforzar un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibrado (3.9.3). La cantidad de robenidina añadida deberá ser similar a la cantidad calculada de robenidina hallada en el extracto de la muestra.

Sólo deberá aumentar la altura del pico de robenidina, teniendo en cuenta tanto la cantidad añadida como la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, deberá estar comprendida dentro del ± 10 % de la anchura original.

7.1.2. Detección por red de diodos

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

a) La longitud de onda a la que se da la absorción máxima 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 red de diodos, el margen está situado generalmente en ± 2 nm.

b) Entre 250 y 400 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 el 100 % de absorbancia relativa. Este criterio se cumple cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón.

c) Entre 250 y 400 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 entre el 10 % y el 100 % de absorbancia relativa. Este criterio se cumple cuanto están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del ápice del pico.

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

7.2. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas llevadas a cabo con la misma muestra no deberá superar el 10 % relativo al resultado más alto obtenido para contenidos de robenidina superiores a 15 mg/kg.

7.3. *Recuperación*

La recuperación de la muestra en blanco reforzada deberá ser al menos del 85 %.

8. **Resultados de un estudio colaborativo**

La CEE organizó un estudio colaborativo en el que se analizaron en 12 laboratorios 4 muestras de piensos para aves de corral y conejos, tanto en forma de harinas como de « pellets ». Se efectuaron análisis duplicados de cada muestra y se obtuvieron los siguientes resultados:

	Aves de corral		Conejos	
	Harina	Gránulos	Harina	Gránulos
Media mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
S_r (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S_r (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Recuperación (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r = desviación estándar de la repetibilidad,
CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad,
S_R = desviación estándar de la reproducibilidad,
CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad.

2. DETERMINACIÓN DEL BENZOCUATO DE MITILO

7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-quinolona

1. Objeto y ámbito

El método está concebido para la determinación de benzocuato de metilo en los alimentos para animales. El límite inferior de determinación es 1 mg/kg.

2. Principio

El benzocuato de metilo se extrae de la muestra con solución metanólica de ácido metanosulfónico. El extracto se purifica por partición con diclorometano y cromatografía de intercambio iónico y, a continuación, por nueva extracción con diclorometano. El contenido de benzocuato de metilo se determina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (HPLC) empleando un detector ultravioleta.

3. Reactivos

3.1. *Diclorometano*

3.2. Metanol, de calidad para HPLC

3.3. *Fase móvil de HPLC*

Mezcla de metanol (3.2) y agua (calidad para HPLC) 75 + 25 (V + V).

Filtrar a través de un filtro de 0,22 µm (4.5) y desgasificar la solución (por ejemplo, mediante tratamiento con ultrasonidos durante 10 minutos).

3.4. *Solución de ácido metansulfónico,* $\sigma = 2\ \%$

Diluir 20,0 ml de ácido metanosulfónico a 1 000 ml con metanol (3.2).

3.5. *Solución de ácido clorhídrico,* $\sigma = 10\ \%$

Diluir 100 ml de ácido clorhídrico (p_{20} ca. 1,18 g/ml) a 1 000 ml con agua.

3.6. *Resina de intercambio catiónico Amberlita CG-120 (Na), 100-200 mallas*

La resina debe tratarse antes de su utilización : hacer una lechada con 100 g de resina y 500 ml de solución de ácido clorhídrico (3.5) y llevar a ebullición en una placa caliente, agitando continuamente. Dejar enfriar y decantar el ácido. Filtrar en vacío a través de un papel de filtro. Enjuagar la resina dos veces con porciones de agua de 500 ml y, a continuación, con 250 ml de metanol (3.2). Enjuagar la resina con otra porción de 250 ml de metanol y secar haciendo pasar aire a través de la torta de filtro. Guardar la resina desecada en una botella tapada.

3.7. *Sustancia patrón : benzocuato de metilo puro (7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-quinolona)*

3.7.1. Solución patrón madre de benzocuato de metilo, 500 µg/ml.

Pesar 50 mg de la sustancia patrón (3.7) con precisión de 0,1 mg, disolver en solución de ácido metanosulfónico (3.4) en un matraz aforado de 100 ml, enrasar y mezclar.

3.7.2. Solución patrón intermedia de benzocuato de metilo, 50 µg/ml.

Pasar 5,0 ml de la solución patrón madre de benzocuato de metilo (3.7.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con metanol (3.2) y mezclar.

3.7.3. Soluciones de calibrado.

Transferir 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 ml de la solución patrón intermedia de benzocuato de metilo (3.7.2) a una serie de matraces aforados de 25 ml. Enrasar con fase móvil (3.3) y mezclar. Estas soluciones tienen concentraciones de benzocuato de metilo de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 µg/ml respectivamente. Estas soluciones han de prepararse cada vez que se vayan a usar.

4. Aparatos

4.1. *Agitador de laboratorio*

4.2. *Evaporador rotatorio*

4.3. *Columna de vidrio (250 mm × 15 mm) provista de una llave y de un depósito de 200 ml de capacidad, aproximadamente*

4.4. *Equipo HPLC con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos*

4.4.1. Columna para cromatografía líquida de 300 mm × 4 mm, con relleno de C_{18} de 10 µm, o equivalente.

4.5. *Filtros de membrana de 0,22 µm*

4.6. *Filtros de membrana de 0,45 µm*

5. Procedimiento

5.1. *General*

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

5.1.2. Se debe llevar a cabo un ensayo de recuperación, analizando el pienso en blanco después de enriquecerlo por adición de una cantidad de benzocuato de metilo similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 15 mg/kg, añadir 600 µl de la solución patrón madre (3.7.1) a 20 g del pienso en blanco, mezclar y esperar 10 minutos antes de proceder a la extracción (5.2).

Nota : A los efectos de este método, el pienso en blanco debe ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no se debe detectar benzocuato de metilo.

5.2. *Extracción*

Pesar con precisión de 0,01 g aproximadamente 20 g de la muestra preparada y transferir a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 100,0 ml de la solución de ácido metanosulfórico (3.4) y agitar mecánicamente (4.1) durante 30 minutos. Filtrar la solución a través de papel de filtro y conservar el filtrado para la fase de partición líquido-líquido (5.3).

5.3. *Partición líquido-líquido*

Transferir 25,0 ml del filtrado obtenido en el punto 5.2 a una ampolla de decantación de 500 ml que contenga 100 ml de solución de ácido clorhídrico (3.5). Añadir 100 ml de diclorometano (3.1) a la ampolla y agitar durante 1 minuto. Esperar a que se produzca la separación de las capas y verter la capa inferior (diclorometano) en un matraz redondo de 500 ml. Repetir la extracción de la fase acuosa con otras dos porciones de 40 ml de diclorometano y combinarlas con el primer extracto contenido en el matraz redondo. Evaporar el extracto de diclorometano hasta sequedad en el evaporador rotatorio (4.2) a 40 °C a presión reducida. Disolver el residuo en 20-25 ml de metanol (3.2), tapar el matraz y guardar todo el extracto para la cromatografía de intercambio iónico (5.4).

5.4. *Cromatografía de intercambio iónico*

5.4.1. Preparación de la columna de intercambio catiónico.

Taponar con lana de vidrio el extremo inferior de la columna de vidrio (4.2). Preparar una lechada con 5,0 g de la resina de intercambio catiónico tratada (3.6) y 50 ml de ácido clorhídrico (3.5), verter en la columna de vidrio y dejar reposar. Eliminar el ácido sobrante, hasta que su nivel se sitúe apenas por encima de la superficie de resina y lavar la columna con agua hasta que el eluido dé neutro al tornasol. Transferir 50 ml de metanol (3.2) a la columna y dejar eluir hasta la superficie de la resina.

5.4.2. Cromatografía de columna.

Mediante una pipeta, transferir cuidadosamente el extracto obtenido en el punto 5.3 a la columna. Enjuagar el matraz redondo con dos porciones de 5 a 10 ml de metanol (3.2) y transferir estos líquidos de lavado a la columna. Dejar pasar el extracto hasta la superficie de resina y lavar la columna con 50 ml de metanol, asegurándose de que el flujo no sea superior a 5 ml por minuto. Descartar el eluido. Eluir el benzocuato de metilo de la columna utilizando 150 ml de solución de ácido metasulfónico (3.4) y recoger el eluido de la columna en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.

5.5. *Partición líquido-líquido*

Transferir el eluido obtenido en el punto 5.4.2 a una ampolla de decantación de un litro. Enjuagar el matraz Erlenmeyer con 5 a 10 ml de metanol (3.2) y mezclar los líquidos de lavado con el contenido de la ampolla de decantación. Añadir 300 ml de una solución de ácido clorhídrico (3.5) y 130 ml de diclorometano (3.1). Agitar durante un minuto y dejar que las fases se separen. Transferir la capa inferior (diclorometano) a un matraz redondo de 500 ml. Repetir la extracción de la fase acuosa con dos nuevas porciones de 70 ml de diclorometano y mezclar en el matraz redondo estos dos extractos con el primero.

Evaporar hasta sequedad el extracto de diclorometano en el evaporador rotatorio (4.2) a 40 °C y presión reducida. Disolver los residuos en el matraz con unos 5 ml de metanol (3.2) y transferir cuantitativamente esta solución a un matraz aforado de 10 ml. Enjuagar el matraz redondo con dos nuevas porciones de 1 a 2 ml de metanol y transferir estos líquidos al matraz aforado. Añadir metanol hasta el enrase y mezclar. Filtrar una porción alícuota por un filtro de membrana (4.6). Reservar esta solución para la determinación por HPLC (5.6).

5.6. *Determinación por HPLC*

5.6.1. Parámetros

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

Columna de cromatografía líquida (4.4.1)

Fase móvil HPLC: mezcla de metanol y agua (3.3)

Flujo: de 1 a 1,5 ml por minuto

Longitud de onda de detección: 265 nm

Volumen de inyección: 20 a 50 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibrado (3.7.3) con un contenido de 4 µg/ml, hasta que se hayan alcanzado alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

5.6.2. Curva de calibrado

Inyectar varias veces cada solución de calibrado (3.7.3) y medir las alturas de pico (áreas) para cada concentración. Trazar una curva de calibrado empleando las medias de las alturas o áreas de los picos de las soluciones de calibrado como ordenadas y las concentraciones correspondientes en µg/ml como abscisas.

5.6.3. Solución de muestra

Inyectar varias veces el extracto de muestra (5.5), empleando el mismo volumen utilizado para las soluciones de calibrado. Determinar la altura (o área) media de los picos de benzocuato de metilo.

6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de benzocuato de metilo de la solución de muestra, determinar la concentración de la solución de muestra en µg/ml haciendo referencia a la curva de calibrado (5.6.2).

El contenido de benzocuato de metilo w (mg/kg) se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

en la que:

c = concentración de benzocuato de metilo 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 analito se puede confirmar mediante una co-cromatografía o utilizando un detector de red de diodos, con el que se comparan los espectros del extracto de la muesta y de la solución de calibrado (3.7.3) con un contenido de 10 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografía

Reforzar un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de la solución patrón intermedia (3.7.2). La cantidad de benzocuato de metilo añadida deberá ser similar a la cantidad calculada de benzocuato de metilo hallado en el extracto de la muestra. Sólo la altura del pico de benzocuato de metilo deberá aumentar teniendo en cuenta tanto la cantidad añadida como la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, no deberá variar en ± 10 % respecto de la anchura original.

7.1.2. Detección por red de diodos

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

a) La longitud de onda del máximo de absorción 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 red de diodos, el margen está situado generalmente en ± 2 nm.

b) Entre 220 y 350 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 el 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 analito patrón.

c) Entre 220 y 350 nm, los espectros de la pendiente de subida, el ápice y la pendiente de bajada del pico del cromatograma del extracto de la muestra, non 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 de analito.

7.2. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas llevadas a cabo con la misma muestra no deberá superar el 10 % relativo al resultado más elevado para un contenido de benzocuato de metilo comprendido entre 4 y 20 mg/kg.

7.3. *Recuperación*

La recuperación de la muestra en blanco reforzada deberá ser al menos del 90 %.

8. **Resultados de un estudio colaborativo**

Se analizaron cinco muestras en diez laboratorios. Los análisis se efectuaron por duplicado para cada muestra.

Resultados

	Muestra en blanco	Harina 1	Gránulos	Harina 2	Gránulos
(mg/Kg)	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
S_r (mg/Kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r (%)	—	6,70	4,40	6,70	5,70
S_R (mg/Kg)	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Recovery (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

S_r = coeficiente de variación de la repetibilidad
CV_r = desviación típica de la reproducibilidad
S_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad
CV_R = desviación típica de la reproducibilidad.