31993L0117

A DOUĂSPREZECEA DIRECTIVĂ 93/117/CE A COMISIEI din 17 decembrie 1993 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor [1], modificată ultima dată de Regulamentul (CEE) nr. 3768/85 [2], în special articolul 2,

întrucât Directiva 70/373/CEE prevede controale oficiale ale furajelor pentru a se verifica dacă sunt conforme cu cerințele actelor cu putere de lege și actelor administrative referitoare la calitate și compoziție, iar aceste controale se vor efectua pe baza modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză;

întrucât, în legătură cu aditivii robenidină și metil benzocat, trebuie stabilite metode comunitare de analiză pentru a se verifica dacă sunt în conformitate cu condițiile în care pot fi utilizate în furaje;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre dispun ca analizele efectuate în cursul verificărilor oficiale ale furajelor pentru identificarea conținutului de robenidină și metil benzocat să se efectueze pe baza metodei descrisă în anexă.

Articolul 2

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 30 noiembrie 1994 și informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, ele conțin o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

Articolul 3

Prezenta Directivă intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Adoptată la Bruxelles, 17 decembrie 1993.

Pentru Comisie

René STEICHEN

Membru al Comisiei

[1] JO L 170, 3.8.1970, p. 2.
[2] JO L 362, 31.12.1985, p. 8.

ANEXĂ

1. **DETERMINAREA ROBENIDINEI**

1,3-bis[(4-clorbenziliden)amino] guanidină-clorhidrică

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă se folosește pentru determinarea prezenței robenidinei în hrana pentru animale. Limita inferioară a determinării este de 5 mg/kg

2. **Principiu**

Proba se prelevează cu metanol oxidat. Extractul se usucă și o cotă-parte se spală într-o coloană de oxid de aluminiu. Robenidina se eluează din coloană cu metanol, se concentrează și se completează până la un volum adecvat cu ajutorul fazei mobile. Conținutul de robenidină se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversă (HPLC), utilizând un detector de radiații UV.

3. **Reactivi**

3.1. *Metanol*

3.2. *Metanol oxidat*

Se transferă 4,0 ml acid clorhidric ($P_{20}c$ 1,18 g/ml) într-un balon gradat de 500 ml, se completează până la marcaj cu metanol (3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de folosire.

3.3. *Acetonitril, gradul HPLC*

3.4. *Sită moleculară*

Tip 3A, ochiurile plasei: 8-12 (ochiuri de 1,6–2,5 mm, silicat de alumină cristalin, diametrul porilor: 0,3 mm)

3.5. *Oxid de aluminiu: activitate acidă grad I pentru cromatografia în coloană*

Se transferă 100 g oxid de aluminiu într-un container adecvat și se adaugă 2,0 ml de apă. Se închide și se agită timp de aproximativ 20 minute. Se păstrează într-un container bine închis.

3.6. *Soluție de dihidrogenfosfat de potasiu, c = 0,025 mol/l*

Se dizolvă 3,40 g de dihidrogenfosfat de potasiu în apă (puritate HPLC), într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la marcaj și se amestecă.

3.7. *Soluție de fosfat hidrogenat di-sodic, c = 0,025 mol/l*

Se dizolvă 3,55 g fosfat hidrogenat di-sodic (sau 4,45 g de dihidrat sau 8,95 g de dodecahidrat) anhidru în apă (puritate HPLC), într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la marcaj și se amestecă.

3.8. *Faza mobilă HPLC*

Se amestecă următorii reactivi:

650 ml de acetonitril (3.3),

250 ml apă (de puritate HPLC),

50 ml soluție de dihidrogenofosfat de potasiu (3.6)

50 ml soluție de fosfat hidrogenat di-sodic (3.7).

Se filtrează printr-un filtru de 0,22 μm (4.6) și se degazează soluția (de exemplu prin expunere la ultrasunete timp de 10 minute).

3.9. *Substanța standard*

Robenidină pură: 1,3-bis[4-clorobenziliden)amino] guanidină hidroclorhidrică, E 750.

3.9.1. Soluția-mamă standard de robenidină: 300 µg/ml

Se cântăresc, cu toleranță de 0,1 mg, 30 mg de substanță standard de robenidină (3.9). Se dizolvă în metanol oxidat (3.2) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la marcaj cu același solvent și se amestecă. Se acoperă balonul cu folie de aluminiu și se păstrează la întuneric.

3.9.2. Soluție intermediară standard de robenidină: 12 µg/ml

Se transferă 10,0 ml de soluție-mamă standard (3.9.1) într-un balon gradat de 250 ml, se completează până la marcaj cu faza mobilă (3.8) și se amestecă. Se acoperă balonul cu folie de aluminiu și se păstrează la întuneric.

3.9.3. Soluții de calibrare

În baloane gradate de 50 ml se transferă 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 și 25,0 ml de soluție intermediară standard (3.9.2). Se completează până la marcaj prin adăugarea de fază mobilă (3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund valorilor de 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 și 6,0 µg/ml de robenidină. Aceste soluții se prepară imediat înainte de a fi utilizate.

4. **Aparatură**

4.1. *Coloana de sticlă*

Construită din sticlă de chihlimbar, prevăzută cu robinet de închidere și rezervor cu capacitatea de aproximativ 150 ml, diametru interior 10–15 mm, lungime 250 mm.

4.2. *Agitator manual de laborator*

4.3. *Evaporator de film rotativ*

4.4. *Echipament HPLC cu detector de radiații UV variabile sau detector cu sistem de diode care funcționează în intervalul 250-400 mm*

4.4.1. Coloană de cromatografie lichidă: 300 mm × 4 mm, C_{18}, căptușeală de 10 µm sau o coloană echivalentă.

4.5. *Hârtie de filtru din fibră de sticlă (Whatman GF/A sau echivalentă)*

4.6. *Filtre cu membrană, 0,22 µm*

4.7. *Filtre cu membrană, 0,45 µm*

5. **Procedură**

Notă: Robenidina este sensibilă la lumină. La toate operațiile trebuie să se folosească sticla de chihlimbar.

5.1. *Generalități*

5.1.1. Se analizează o porție martor pentru a verifica absența robenidinei și a substanțelor de interferență.

5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea porției martor care a fost întărită prin adăugarea unei cantități de robenidină, similară cu cea prezentă în probă. Pentru întărirea până la un nivel de 60 mg/kg, se transferă 3,0 ml din soluția-mamă standard (3.9.1) într-un balon conic de 250 ml. Se evaporă soluția până la c. 0,5 ml într-un curent de azot. Se adaugă 1,5 g porție martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (5.2).

Notă: pentru scopul urmărit de această metodă, porția martor trebuie să fie de același tip cu proba, iar la analiză robenidina nu trebuie să fie detectată.

5.2 *Extracția*

Se cântăresc cu toleranță de 0,01 mg aproximativ 15 g de probă preparată. Se transferă într-un balon conic de 250 ml și se adaugă 100,0 ml metanol oxidat (3.2), se închide și se agită timp de 1 oră în agitator (4.2). Se filtrează soluția prin hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.5) și se colectează întregul filtrat într-un balon conic de 150 ml. Se adaugă o sită moleculară de 7,5 g (3.4), se închide și se agită 5 minute. Se filtrează imediat prin hârtie de filtru din fibră de sticlă. Această soluție se păstrează pentru etapa de purificare (5.3).

5.3. *Purificarea*

5.3.1. Pregătirea coloanei de oxid de aluminiu

Se introduce un tampon mic de vată de sticlă în capătul inferior al coloanei de sticlă (4.1) și se tasează cu ajutorul unei baghete de sticlă. Se cântăresc 11,0 g de oxid de aluminiu preparat (3.5) și se transferă în coloană. Pe parcursul acestei etape se acordă atenție minimizării expunerii la aer. Se lovește ușor coloana încărcată în partea inferioară pentru a permite stabilizarea oxidului de aluminiu.

5.3.2. Purificarea probei

Se transferă în coloană cu ajutorul pipetei 5,0 ml din extractul de probă preparat la (5.2). Se așează vârful pipetei lângă peretele coloanei și se lasă soluția să fie absorbită în oxidul de aluminiu. Se eluează robenidina din coloană folosind 100 ml metanol (3.1), cu un debit de 2-3 ml/min și se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se evaporă soluția de metanol până la uscare prin reducerea presiunii la temperatura de 40 °C cu ajutorul unui evaporator de film rotativ (4.3). Se redizolvă reziduul în 3-4 ml de fază mobilă (3.8) și se transferă cantitatea obținută într-un balon gradat de 10 ml. Se clătește balonul de mai multe ori cu cantități de 1-2 ml fază mobilă și se transferă soluțiile obținute în balonul gradat. Se completează până la marcaj cu același solvent și se amestecă. Se filtrează o cotă-parte printr-un filtru de 0,45 µm (4.7). Această soluție se păstrează pentru determinare HPLC (5.4).

5.4 *Determinarea HPLC*

5.4.1. Parametrii

Următoarele condiții sunt orientative, se pot folosi și alte condiții dacă duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.4.1).

Fază mobilă HPLC (3.8).

Debit: 1,5-2 ml/min.

Detector pentru lungimea de undă: 317 nm.

Volumul de injectare: 20-50 µl.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (3.9.3) care conține 3,6 µg/ml până la atingerea unor valori constante pentru punctele de maxim și timpii de retenție.

5.4.2. Graficul de calibrare

Se injectează de mai multe ori fiecare soluție de calibrare (3.9.3) și se măsoară punctele (platourile) maxime pentru fiecare concentrație. Se trasează curba de calibrare folosind valorile medii ale punctelor sau platourilor maxime ale soluției de calibrare pe ordonată și concentrațiile corespunzătoare în µg/ml pe abscisă.

5.4.3. Soluția probă

Se injectează de mai multe ori extractul de probă (5.3.2) folosind același volum ca și în cazul soluțiilor de calibrare și se determină valoarea medie a punctului (platoului) maxim din punctele de maxim de robenidină.

6. **Calcularea rezultatelor**

Din valoarea medie a punctelor (platourilor) maxime ale robenidinei din soluția probă se determină concentrația în µg/ml a soluției probă prin trimitere la graficul de calibrare (5.4.2).

Conținutul de robenidină w (mg/kg) din probă este dat de formula următoare:

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

unde:

c = concentrația de robenidină din soluția probă, în µg/ml

m = masa porției de testat, în grame.

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. *Identitatea*

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin folosirea unui detector cu sistem de diode, cu care se compară spectrul extractului de probă și cel al soluției de calibrare (3.9.3), care conține 6 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Extractul de probă se întărește prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (3.9.3). Cantitatea de robenidină adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de robenidină găsită în extractul de probă.

Se mărește numai punctul maxim al robenidinei după ce s-au luat în considerare atât cantitatea adăugată, cât și diluția extractului. Adâncimea punctului, la jumătatea înălțimii maxime, trebuie să fie de aproximativ 10 % din adâncimea originală.

7.1.2. Detectorul cu sistem de diode

Rezultatele se evaluează în conformitate cu următoarele criterii:

(a) lungimea de undă a absorbției maxime a probei și a spectrului standard, înregistrată la apexul punctului de maxim pe cromatogramă, trebuie să se încadreze în aceeași marjă determinată de puterea de precizie a sistemului de detectare. Pentru detectarea cu sistem de diode, aceasta este în mod normal de aproximativ 2 nm;

(b) între 250 și 400 nm, proba și spectrul standard înregistrate la apexul punctului maxim, pe cromatogramă, nu trebuie să fie diferite de acele părți ale spectrului cuprinse în intervalul 10-100 % al absorbției relative. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când în nici un punct observabil deviația dintre cele două spectre nu depășește 15 % din absorbția analitului standard;

(c) între 250 și 400 nm, spectrele din partea de sus a curbei, apex și partea de jos a curbei punctului de maxim, produse de extractul de probă, nu trebuie să fie diferite pentru părțile spectrului cuprinse în intervalul de 10-100 % al absorbției relative. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când în nici un punct observabil deviația dintre cele două spectre nu depășește 15 % din absorbția spectrului apexului.

În cazul în care unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, realizate pe aceeași probă, nu trebuie să depășească 10 % din rezultatul maxim pentru un conținut de robenidină mai mare de 15 mg/kg.

7.3. *Recuperare*

Pentru proba martor întărită, recuperarea trebuie să fie de cel puțin 85 %.

8. **Rezultatele unui studiu prin colaborare**

Comunitatea a efectuat un studiu prin colaborare, în care au fost analizate de către 12 laboratoare patru mostre sub formă de făină sau pelete de hrană pentru păsări de curte și iepuri. Pe fiecare mostră au fost efectuate câte două seturi de analize. Rezultatele obținute sunt date în tabelul prezentat în continuare:

	Păsări de curte		Pelete	
	Iepuri	Făină	Făină	Pelete
Valoare medie 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
Recuperare (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r = deviația standard a repetabilității.
CV_r = coeficient de variație a repetabilității.
S_R = deviația standard a reproductibilității.
CV_R = coeficient de variație a reproductibilității.

2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE METIL BENZOCAT

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

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă se folosește pentru determinarea prezenței de metil benzocat în hrana pentru animale. Limita inferioară a determinării este de 1 mg/kg

2. **Principiu**

Se extrage metil benzocat din probă cu ajutorul unei soluții metanolice de acid metansulfonic. Extractul este purificat cu diclorometan, prin cromatografie cu transfer de ioni apoi din nou cu diclorometan. Conținutul de metil benzocat se determină cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță cu fază inversă (HPLC), utilizând un detector de radiații UV.

3. **Reactivi**

3.1. *Diclorometan*

3.2. *Metanol, gradul HPLC*

3.3. *Faza mobilă HPLC:*

amestec de metanol (3.2) și apă (puritate HPLC) 75 + 25 (v + v).

Se filtrează printr-un filtru de 0,22 μm (4.5) și se degazează soluția (de exemplu prin expunere la ultrasunete timp de 10 minute).

3.4. *Soluție de acid metansulfonic, σ = 2 %*

Se diluează 20,0 ml acid metansulfonic până la 1 000 ml cu metanol (3.2).

3.5. *Soluție de acid clorhidric, σ = 10 %*

Se diluează 100 ml acid clorhidric (P_{20} c. 1,18 g/ml) până la 1 000 ml, cu apă.

3.6. *Rășină Amberlită schimbătoare de cationi CG-120 (Na), 100 la 200 ochiuri*

Rășina se pretratează înainte de utilizare: se întind 100 g de rășină cu 500 ml soluție de acid clorhidric (3.5) și se încălzește pe o placă fierbinte până la fierbere, agitând continuu. Se lasă să se răcească și se decantează acidul. Se filtrează printr-un filtru de hârtie, sub vid. Se spală rășina de două ori, cu câte 500 ml apă și apoi cu 250 ml metanol (3.2). Se clătește rășina cu încă 250 ml metanol și se usucă cu ajutorul unui curent de aer trecut prin filtru. Rășina uscată se păstrează într-o sticlă închisă.

3.7. *Substanța standard: metil benzocat pur (7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-quinolonă)*

3.7.1. Soluția-mamă standard de metil benzocat, 500 μg/ml

Se cântăresc, cu toleranță de 0,1 mg, 50 mg de substanță standard (3.7), se dizolvă în soluție de acid metansulfonic (3.4) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la marcaj și se amestecă.

3.7.2. Soluție intermediară standard de metil benzocat, 50 μg/ml

Se transferă 5,0 ml de soluție-mamă standard de metil benzocat (3.7.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la marcaj cu metanol (3.2) și se amestecă.

3.7.3. Soluții de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 5,0 ml de soluție intermediară standard de metil benzocat (3.7.2) în baloane gradate de 25 ml. Se completează până la marcaj prin adăugarea de fază mobilă (3.3) și se amestecă. Aceste soluții au concentrații de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 și 10,0 μg/ml în metil benzocat. Aceste soluții se prepară imediat înainte de a fi utilizate.

4. **Aparatură**

4.1. *Agitator de laborator*

4.2. *Evaporator de film rotativ*

4.3. *Coloană de sticlă (250 mm × 15 mm) prevăzută cu robinet de închidere și rezervor cu capacitatea aproximativă de 200 ml*

4.4. *Echipament HPLC cu detector de radiații UV cu lungime de undă variabilă sau detector cu sistem de diode*

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm × 4 mm, C 18, căptușeală de 10 µm sau o coloană echivalentă

4.5. *Filtre cu membrană, 0,22 µm*

4.6. *Filtre cu membrană, 0,45 µm*

5. **Procedură**

5.1. *Generalități*

5.1.1. Se analizează o porție martor pentru a verifica prezența metil benzocat-ului și a substanțelor de interferență.

5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea porției martor care a fost întărită prin adăugarea unei cantități de metil benzocat, similară cu cea prezentă în probă. Pentru întărirea până la un nivel de 15 mg/kg, se adaugă 600 µl din soluția-mamă standard (3.7.1) la 20 g de porție martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute, înainte de a începe etapa de extracție (5.2).

Notă: pentru scopul urmărit de această metodă, porția martor trebuie să fie de același tip cu proba, iar la analiză, metil benzocat-ul nu trebuie să fie detectat.

5.2. *Extracția*

Se cântăresc, cu toleranță de 0,01 mg, aproximativ 20 g de probă preparată și se transferă într-un balon conic de 250 ml. Se adaugă 100,0 ml de soluție de acid metansulfonic (3.4) și se agită mecanic (4.1) timp de 30 minute. Se filtrează soluția prin hârtie de filtru și se păstrează filtratul pentru etapa de separare lichid-lichid (5.3).

5.3. *Separarea lichid-lichid*

Într-o pâlnie de separare de 500 ml care conține 100 ml soluție de acid clorhidric (3.5) se transferă 25,0 ml de filtrat obținut la (5.2). Se adaugă 100 ml diclorometan (3.1) prin pâlnie și se agită timp de 1 minut. Se așteaptă până la separarea straturilor și se scurge stratul cel mai de jos (diclorometan) într-un balon de 500 ml cu fundul rotund. Se repetă extracția fazei apoase cu încă două porții de câte 40 ml de diclorometan și se combină acestea cu primul extract în balonul cu fundul rotund. Se evaporă extractul de diclorometan până la uscare în evaporatorul rotativ (4.2), care funcționează la presiune scăzută și la temperatură de 40 °C. Se dizolvă reziduul în 20-25 ml metanol (3.2), se închide balonul și se păstrează întregul extract pentru cromatografia cu transfer de ioni (5.4).

5.4. *Cromatografia cu transfer de ioni*

5.4.1. Pregătirea coloanei de transfer de cationi

Se introduce un dop de fibră de sticlă în capătul inferior al coloanei de sticlă (4.3). Se întinde un amestec de 5,0 g de rășină tratată cu transfer de cationi (3.6) cu 50 ml acid clorhidric (3.5), se toarnă în coloana de sticlă și se lasă să se stabilizeze. Se îndepărtează acidul în exces până se ajunge la suprafața patului de rășină și se spală coloana cu apă până când efluentul devine neutru. Se transferă 50 ml metanol (3.2) în coloană și se lasă să se dreneze pe suprafața patului de rășină.

5.4.2. Cromatografia cu coloană

Cu ajutorul pipetei se transferă cu grijă în coloană extractul obținut la (5.3). Se clătește balonul cu fund rotund cu două porții de 5-10 ml metanol (3.2) și se transferă acestea în coloană. Se întinde extractul pe suprafața patului de rășină și se spală coloana cu 50 ml metanol, având grijă ca debitul să nu depășească 5 ml pe minut. Se îndepărtează efluentul. Se eluează metil benzocatul din coloană folosind 150 ml de soluție de acid metansulfonic (3.4) și se colectează eluatul din coloană într-un balon conic de 250 ml.

5.5. *Separarea lichid-lichid*

Se transferă eluatul obținut la (5.4.2) într-o pâlnie de separare de 1 litru. Se clătește balonul conic cu 5-10 ml metanol (3.2) și se combină soluțiile astfel obținute cu conținutul pâlnia de separare. Se adaugă 300 ml soluție de acid clorhidric (3.5) și 130 ml de diclorometan (3.1). Se agită timp de 1 minut și se așteaptă separarea fazelor. Se evacuează stratul inferior (diclorometan) într-un balon cu fundul rotund de 500 ml. Se repetă extracția fazei apoase în alte două porții de 70 ml de diclorometan și se combină aceste extracte cu primul în balonul cu fund rotund.

Se evaporă extractul de diclorometan până la uscare într-un evaporator rotativ (4.2), care funcționează la presiune scăzută și la temperatură de 40 °C. Se dizolvă reziduul din balon cu aproximativ 5 ml de metanol (3.2) și se transferă această soluție într-un balon gradat de 10 ml. Se clătește balonul cu fund rotund cu alte două porții de 1-2 ml metanol, apoi acestea se transferă în balonul gradat. Se completează cu metanol până la marcaj și se amestecă. Se filtrează o cotă-parte printr-un filtru cu membrană (4.6). Se păstrează această soluție pentru determinare HPLC (5.6).

5.6. *Determinarea HPLC*

5.6.1. Parametrii

Condițiile următoare sunt orientative, pot fi aplicate și alte condiții dacă duc la rezultate echivalente:

— coloană pentru cromatografie lichidă (4.4.1);

— fază mobilă HPLC: amestec metanol-apă (3.3);

— debit: 1-1,5 ml/min;

— lungimea de undă de detectare: 265 nm;

— volumul de injectare: 20-50 µl.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (3.7.3) care conține 4 µg/ml până la atingerea unor valori constante pentru punctele de maxim și timpii de retenție.

5.6.2. Graficul de calibrare

Se injectează de mai multe ori fiecare soluție de calibrare (3.7.3) și se măsoară punctele (platourilor) maxime pentru fiecare concentrație. Se trasează curba de calibrare folosind valorile medii ale punctelor sau platourilor de maxim ale soluției de calibrare pe ordonată și concentrațiile corespunzătoare în µg/ml pe abscisă.

5.6.3. Soluția probă

Se injectează de mai multe ori extractul de probă (5.5) folosind același volum ca și în cazul soluțiilor de calibrare și se determină valoarea medie a punctului (platoului) de maxim din punctele de maxim de metil benzocat.

6. **Calcularea rezultatelor**

Din valoarea medie a punctelor (platourilor) maxime ale metil benzocatului din soluția probă se determină concentrația în µg/ml a soluției probă prin trimitere la graficul de calibrare (5.6.2).

Conținutul de metil benzocat w (mg/kg) din probă este dat de formula următoare:

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

unde:

c = concentrația de metil benzocat din soluția probă, în µg/ml

m = masa porției de testat, în grame.

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. *Identitate*

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu sistem de diode cu care se compară spectrul extractului de probă și cel al soluției de calibrare (3.7.3), care conține 10 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Extractul de probă se întărește prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție intermediară standard (3.7.2). Cantitatea de metil benzocat adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de metil benzocat din extractul de probă.

Se mărește numai punctul de maxim al metil benzocatului după ce s-au luat în considerare atât cantitatea adăugată, cât și diluția extractului. Adâncimea punctului, la jumătatea înălțimii maxime, trebuie să fie de aproximativ 10 % din adâncimea originală.

7.1.2. Detectorul cu sistem de diode

Rezultatele se evaluează în conformitate cu următoarele criterii:

(a) lungimea de undă a absorbției maxime a probei și a spectrului standard, înregistrată la apexul punctului de maxim pe cromatogramă, trebuie să se încadreze în aceeași marjă determinată de puterea de precizie a sistemului de detectare. Pentru detectarea cu sistem de diode, aceasta este în mod normal de aproximativ 2 nm;

(b) între 220 și 350 nm, proba și spectrul standard înregistrate la apexul punctului de maxim, pe cromatogramă, nu trebuie să fie diferite de acele părți ale spectrului cuprinse în intervalul 10-100 % al absorbției relative. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când în nici un punct observabil deviația dintre cele două spectre nu depășește 15 % din absorbția analitului standard;

(c) între 220 și 350 nm, spectrele din partea de sus a curbei, apex și partea de jos a curbei punctului de maxim, produse de extractul de probă, nu trebuie să fie diferite pentru părțile spectrului cuprinse în intervalul de 10-100 % al absorbției relative. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când în nici un punct observabil deviația dintre cele două spectre nu depășește 15 % din absorbția spectrului apexului.

Dacă unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, realizate pe aceeași probă, nu trebuie să depășească: 10 % din rezultatul maxim pentru conținutul de metil benzocat cuprins între 4 și 20 mg/kg.

7.3. *Recuperare*

Pentru o probă martor întărită, recuperarea trebuie să fie de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele studiului prin colaborare**

S-au analizat cinci eșantioane de către 10 laboratoare. Pentru fiecare probă s-au efectuat câte două analize.

Rezultate

	Martor	Făină 1	Pelete 1	Făină 2	Pelete 2
Valoare medie (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
Recuperare (%)	–	92,00	93,00	92,00	89,00

n.d = nedetectabil.
S_r = deviația standard a repetabilității.
CV_r = coeficient de variație a repetabilității.
S_R = deviația standard a reproductibilității.
CV_R = coeficient de variație a reproductibilității.