

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

(Texto pertinente a los fines del EEE)

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 Acta de adhesión de Austria, de Finlandia y de Suecia, y, en particular, su artículo 2,

- (1) Considerando que la Directiva 70/373/CEE establece que los controles oficiales de los alimentos para animales, dirigidos a comprobar la observancia de las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas referentes a la calidad y a la composición de dichos alimentos, deben efectuarse según métodos de toma de muestras y de análisis comunitarios;
- (2) Considerando que la Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal⁽²⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 45/1999 de la Comisión⁽³⁾, dispone que el contenido de amprolio y diclazurilo debe señalarse en el etiquetado cuando dichas sustancias se añadan a las premezclas y alimentos para animales; que la autorización para la utilización de carbadox como aditivo en la alimentación animal fue retirada en virtud del Reglamento (CE) n° 2788/98 de la Comisión, de 22 de diciembre de 1998, por el que se modifica la Directiva 70/524/CEE del Consejo sobre los aditivos en la alimentación animal, en lo que respecta a la revocación de la autorización de determinados factores de crecimiento⁽⁴⁾ y que es necesario controlar oficialmente el posible uso ilegal de las sustancias prohibidas;
- (3) Considerando que es necesario fijar métodos de análisis comunitarios para el control de estas sustancias;
- (4) Considerando que la primera Directiva 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971, por la que se determinan métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales⁽⁵⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 98/54/CE⁽⁶⁾, establece métodos de análisis para, entre otros fines, la determinación de la esencia de mostaza y la teobroma;

mina; que, a la vista de la evolución del conocimiento científico y técnico, los métodos descritos ya no son válidos para sus fines previstos; que, por lo tanto, es oportuno suprimir esos métodos;

- (5) Considerando que la cuarta Directiva 73/46/CEE de la Comisión, de 5 de diciembre de 1972, por la que se determinan métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales⁽⁷⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 98/54/CE, establece métodos de análisis para, entre otros fines, la determinación del retinol (vitamina A); que, a la vista de la evolución del conocimiento científico y técnico, el método descrito ya no es válido para su fin previsto; que, por lo tanto, es oportuno suprimir el método para el retinol;
- (6) Considerando que la quinta Directiva 74/203/CEE de la Comisión, de 25 de marzo de 1974, por la que se determinan los métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales⁽⁸⁾, modificado por la Directiva 81/680/CEE⁽⁹⁾, establece los métodos de análisis para la determinación del almidón y de los productos de degradación de alto peso molecular de almidón de los alimentos que contengan peladuras, pulpas, hojas o cuellos secos de remolachas, pulpas de patatas, levaduras deshidratadas, productos ricos en inulina o chicharrones, amprolio, etopabato, dinitolmida, nicarbacina y menadiona (vitamina K3); que, a la vista de la evolución del conocimiento científico y técnico, los métodos descritos en dicha Directiva ya no son válidos para sus fines previstos; que, por lo tanto, es oportuno derogar dicha Directiva;
- (7) Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros dispondrán que los análisis realizados en relación con los controles oficiales del contenido en amprolio, diclazurilo y carbadox de los alimentos para animales y premezclas, se efectúen siguiendo los métodos que se describen en el anexo.

⁽¹⁾ DO L 170 de 3.8.1970, p. 2.⁽²⁾ DO L 270 de 14.12.1970, p. 1.⁽³⁾ DO L 6 de 12.1.1999, p. 3.⁽⁴⁾ DO L 347 de 23.12.1998, p. 31.⁽⁵⁾ DO L 155 de 12.7.1971, p. 13.⁽⁶⁾ DO L 208 de 24.7.1998, p. 49.⁽⁷⁾ DO L 83 de 30.3.1973, p. 21.⁽⁸⁾ DO L 108 de 22.4.1974, p. 7.⁽⁹⁾ DO L 246 de 29.8.1981, p. 32.

Artículo 2

La Directiva 71/250/CEE quedará modificada como sigue:

- 1) En el artículo 1 se suprimirán las palabras «esencia de mostaza» y «teobromina».
- 2) Se suprimirán los puntos 8 y 13 del anexo.

Artículo 3

La Directiva 73/46/CEE quedará modificada como sigue:

- 1) Se suprimirá el artículo 2.
- 2) Se suprimirá el anexo II.

Artículo 4

Queda derogada la quinta Directiva 74/203/CEE.

Artículo 5

A más tardar el 31 de octubre de 1999, los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo dispuesto en la presente Directiva. Informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Aplicarán dichas medidas a partir del 1 de noviembre de 1999.

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 6

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

Artículo 7

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 20 de abril de 1999.

Por la Comisión

Franz FISCHLER

Miembro de la Comisión

ANEXO

PARTE A

DETERMINACIÓN DE AMPROLIO

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

1. Finalidad y campo de aplicación

El presente método permite la determinación del amprolio en los alimentos para animales y premezclas. El límite de detección es de 1 mg/kg; el de determinación, de 25 mg/kg.

2. Principio

La muestra se somete a extracción con una mezcla de agua y metanol. Tras dilución con la fase móvil y filtración por membrana, se determina el contenido de amprolio por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de intercambio catiónico con detección UV.

3. Reactivos

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitrilo de calidad CLAR.

3.3. Agua de calidad CLAR.

3.4. Solución de ortofosfato monosódico, $c = 0,1$ mol/l.

Disolver en agua (3.3) 13,80 g de ortofosfato monosódico monohidratado en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con agua (3.3) y mezclar.

3.5. Solución de perclorato sódico $c = 1,6$ mol/l.

Disolver en agua (3.3) 224,74 g de perclorato sódico monohidratado en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con agua (3.3) y mezclar.

3.6. Fase móvil para la CLAR (véase la observación 9.1).

Mezcla de acetonitrilo (3.2), solución de ortofosfato monosódico (3.4) y solución de perclorato sódico (3.5), $450 + 450 + 100$ (V + V + V). Antes de utilizar la solución, filtrarla por un filtro de membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (4.3) y desgasificarla (por ejemplo, en baño de ultrasonidos (4.4) durante al menos 15 minutos).

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

3.7.1. Solución madre de patrón de amprolio, 500 $\mu\text{g/ml}$.

Pesar, 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 10 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 $\leq 4^\circ\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.7.2. Solución intermedia de patrón de amprolio, 50 $\mu\text{g/ml}$.

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 $\leq 4^\circ\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.7.3. Soluciones de calibración.

Pasar 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 μg 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 µl.

4.1.1. Columna de cromatografía de líquidos de 125 mm x 4 mm, de intercambio catiónico, con empacamiento de Nucleosil 10 SA de 10 µm, o equivalente.

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

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

4.3. Filtro de membrana, 0,22 µm.

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 de 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 10 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 amprolio similar a la que ya esté 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 % 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 15 minutos en el baño de ultrasonidos (4.4). Retirar el matraz del baño de ultrasonidos y agitarlo durante 1 h 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 µg/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 \geq 1 % 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 15 minutos en el baño de ultrasonidos (4.4). Retirar el matraz del baño de ultrasonidos y agitarlo durante 1 h 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 µg/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 × 4 mm, de intercambio catiónico, con empaquetamiento de Nucleosil 10 SA de 10 µm, 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 µg/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) medias de los picos de las soluciones de calibración en ordenadas y las concentraciones correspondientes en µg/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 µg/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:

$$w = \frac{V \cdot \delta \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

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

δ = concentración de amprolio en el extracto de la muestra (5.2) en µg/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 µg/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 % 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 % y el 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 % 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 % y el 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 % 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 % 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 % 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 %.

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:

	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
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV_r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	—	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.

s_r : desviación típica de la repetibilidad.

CV_r : coeficiente de variación de la repetibilidad.

s_R : desviación típica de la reproducibilidad.

CV_R : 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 % 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 ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) en 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.

PARTE B**DETERMINACIÓN DE DICLAZURILO**

2,6 cloro-alfa-(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 con 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, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.
- 3.8. Sustancia patrón: diclazurilo II-24, (2,6 cloro-alfa-(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 $\mu\text{g/ml}$.

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 $\leq 4^\circ\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.8.2. Solución de patrón de diclazurilo, 50 µg/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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

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

3.9.1. Solución madre de patrón interno, 500 µg/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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.9.2. Solución de patrón interno, 50 µg/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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.9.3. Solución de patrón interno para premezclas, p/1000 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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.10. Solución de calibración, 2 µg/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 µm, de 110 mm x 4,6 mm, o equivalente.

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

4.3. Evaporador rotatorio de vacío.

4.4. Filtro de membrana, 0,45 µm.

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 de 1 mg/kg, poner 0,1 ml de la solución madre de patrón (3.8.1) con 50 g del pienso en blanco y mezclar cuidadosamente; dejar en reposo durante 10 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 esté 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 taponar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante 10 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 taponar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante 10 minutos. Pasar 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 × 4,6 mm, con relleno de Hypersil ODS de 3 µm, 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 10 min, elución en gradiente durante 30 min hasta:
 $A + B + C = 45 + 20 + 35$ (V + V + V)
 Lavar con B durante 10 min
- Flujo: 1,5 – 2 ml/min
- Volumen de inyección: 20 µl
- Longitud de onda del detector: 280 µm

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

5.3.2. Solución 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 o 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. Piensos

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

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\theta_{d,c} \cdot 10V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

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).
 $\theta_{d,c}$ = concentración de diclazurilo en la solución de calibración en µg/ml (3.10).
 m = masa de la porción de muestra en g.
 V = volumen del extracto de la muestra 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;

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\theta_{d,c} \cdot 0,02V \cdot p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

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).
 $\theta_{d,c}$ = concentración de diclazurilo en la solución de calibración (3.10).
 m = masa de la porción de muestra en g.
 V = volumen del extracto de la muestra 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 o 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 o 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 $\pm 10\%$ 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 % y el 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 % 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 % y el 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 % 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 % del resultado superior en caso de contenido de diclazurilo entre 0,5 y 2,5 mg/kg,
- los 0,75 mg/kg en caso de contenido de diclazurilo entre 2,5 y 5 mg/kg,
- el 15 % del resultado superior en caso de contenido de diclazurilo mayor de 5 mg/kg.

7.3. Recuperación

En el caso de una muestra enriquecida (virgen), la recuperación debe ser como mínimo del 80 %.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo en el que 11 laboratorios analizaron 5 muestras. De estas muestras, dos eran premezclas: una mezclada con una matriz orgánica (O 100) y la otra con una matriz inorgánica (A 100). Había también tres piensos compuestos para aves de corral, elaborados por tres productores diferentes (NL) (L1/Z1/K1). El contenido teórico era de 1 mg de diclazurilo por kg. Se dieron instrucciones a los laboratorios para que analizaran cada muestra una vez o por duplicado. (Puede encontrarse información más detallada de este estudio en el *Journal of the AOAC International*, Volumen 77, nº 6, 1994, p. 1359-1361). Los resultados se recogen en el siguiente cuadro:

	Muestra 1 A 100	Muestra 2 O 100	Muestra 3 L 1	Muestra 4 Z 1	Muestra 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Media	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r [mg/kg]	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r [%]	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R [mg/kg]	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R [%]	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Contenido nominal [mg/kg]	100	100	1	1	1

L: número de laboratorios.

n: número de valores individuales.

s_r: desviación típica de la repetibilidad.

CV_r: coeficiente de variación de la repetibilidad.

S_R: desviación típica de la reproducibilidad.

CV_R: coeficiente de variación de la reproducibilidad.

9. Observaciones

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

PARTE C

DETERMINACIÓN DE CARBADOX

Metil-3-(2quinoxalinilmetileno)carbazato N,N'-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 %.

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, σ = 10 %.

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, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.
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 desgasificar la solución (por ejemplo, poniéndola en baño de ultrasonidos durante 10 minutos).
- 3.11. Sustancia patrón.
Carbadox puro: metil-3-(2quinoxalinilmetileno)carbazato $\text{N}^{\text{r}},\text{N}^{\text{4}}$ -dióxido, E 850.
- 3.11.1. Solución madre de patrón de carbadox, 100 $\mu\text{g/ml}$ (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 $\leq 4^{\circ} \text{C}$, 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 madre de patrón (3.11.2) 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 μg de carbadox por ml y deben prepararse justo antes de su utilización.
Nota: Para la determinación de carbadox en alimentos para animales que contengan mos de 10 mg/kg, deben prepararse soluciones de calibración con una concentración inferior a 2,0 $\mu\text{g/ml}$.
- 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 un lave de cierre o una columna de vidrio con un extremo cónico; en este caso, se introduce un tapón de fibra de vidrio hasta el externo 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 μl .
- 4.4.1. Columna de cromatografía de líquidos de 300 mm x 4 mm, C18, con relleno de 10 μm , 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 μm .
- 4.6. Filtro de membrana, 0,45 μm .
- 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 10 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 esté 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 5 min. Añadir 35,0 ml de metanol-acetonitrilo (3.5), tapar y agitar durante 30 min 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 %)

Pesar, con precisión de 0,001 g, aproximadamente 1 g de la muestra sin triturar. Pasar a un matraz Erlenmeyer de 200 ml, añadir 15,0 ml de agua, mezclar y equilibrar durante 5 minutos. Añadir 35,0 ml de metanol-acetonitrilo (3.5), tapar y agitar durante 30 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 µg/ml. Se filtra una alícuota a través del filtro de 0,45 µm (4.6). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.4).

5.2.3. Formulaciones (< 2 %)

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 5 minutos. Añadir 105,0 ml de metanol-acetonitrilo (3.5), tapar y homogeneizar. Poner en el baño de ultrasonidos (4.7) durante 15 minutos y agitar a continuación durante 15 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-metanolacetonitrilo (3.12) hasta conseguir una concentración final de carbadox de 10-15 µg/ml (en caso de preparado al 10 %, el factor de dilución es 10). Se filtra una alícuota a través del filtro de 0,45 µm (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 µm (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 × 4 mm, C18, relleno de 10 µm o equivalente.
Fase móvil (3.10):	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 µl.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.11.2) con 5,0 µg/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 µg/ml en 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 µg/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:

$$w = \frac{\beta \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

β = concentración de carbadox en el extracto de la muestra (5.3.2) en µg/ml.

V_1 = volumen de extracción en ml (es decir, 50).

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

$$w = \frac{\beta \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

β = concentración de carbadox en el extracto de la muestra (5.2.2 o 5.2.3) en µg/ml.

V_2 = volumen de extracción en ml (es decir, 50 en caso de premezclas; 150 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.

Cuadro 2. Resultados del estudio en colaborativo respecto a las premezclas y formulaciones

	Premezclas				Preparados		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Media [g/kg]	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r [g/kg]	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r [%]	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R [g/kg]	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R [%]	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Contenido nominal [g/kg]	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: número de laboratorios.

n: número de valores individuales.

s_r : desviación típica de la repetibilidad.

CV_r : coeficiente de variación de la repetibilidad.

S_R : desviación típica de la reproducibilidad.

CV_R : coeficiente de variación de la reproducibilidad.