

375L0084

Nº L 32/26

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

5. 2. 75

SEXTA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN**de 20 de diciembre de 1974****sobre determinación de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal**

(75/84/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Artículo 1

Vista la Directiva del Consejo, de 20 de julio de 1970, referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal ⁽¹⁾, modificada en último lugar, por el Acta ⁽²⁾ adjunta al Tratado relativo a la adhesión de nuevos Estados miembros a la Comunidad Económica Europea y a la Comunidad Europea de la Energía Atómica ⁽³⁾ firmado en Bruselas el 22 de enero de 1972 y, en particular, su artículo 2,

Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de la alimentación animal, relativos a sus contenidos en buquinolato sulfaquinoxalina y furazolidona, sean realizados de acuerdo con los métodos descritos en el Anexo de la presente Directiva.

Las disposiciones generales que figuran en la primera parte (introducción) del Anexo de la presente Directiva nº 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971, excepto la parte referente a la preparación de la muestra por analizar, serán aplicables a los métodos descritos en el Anexo de la presente Directiva.

Considerando que la Directiva arriba mencionada prevé que los controles oficiales de la alimentación animal que comprueban el cumplimiento de las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas referentes a la calidad y la composición de los alimentos para animales, se realicen de acuerdo con los modos de toma de muestras y los métodos de análisis comunitarios;

Artículo 2

Los Estados miembros aplicarán, a más tardar, el 1 de noviembre de 1975, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva e informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Considerando que las Directivas nº 71/250/CEE, nº 71/393/CEE, nº 72/199/CEE, nº 73/46/CEE y nº 74/203/CEE de la Comisión, de los días 15 de junio de 1971 ⁽⁴⁾, 18 de noviembre de 1971 ⁽⁵⁾, 27 de abril de 1972 ⁽⁶⁾, 5 de diciembre de 1972 ⁽⁷⁾ y 25 de marzo de 1974 ⁽⁸⁾, ya han establecido determinado número de métodos de análisis comunitarios; que, teniendo en cuenta el estado de avance de los trabajos realizados desde entonces, conviene adoptar una sexta serie de métodos;

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva concuerdan con el dictamen del Comité permanente de la alimentación animal,

Hecho en Bruselas, el 20 de diciembre de 1974.

Por la Comisión

El Presidente

François-Xavier ORTOLI

⁽¹⁾ DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

⁽²⁾ DO nº L 73 de 27. 3. 1972, p. 14.

⁽³⁾ DO nº L 73 de 27. 3. 1972, p. 5.

⁽⁴⁾ DO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.

⁽⁵⁾ DO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

⁽⁶⁾ DO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

⁽⁷⁾ DO nº L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.

⁽⁸⁾ DO nº L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.

ANEXO

1. DOSIFICACIÓN DEL BUQUINOLATO

(etil-4-hidroxi-6,7-diisobutoxi-3-quinoleina carboxilato)

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite dosificar el buquinolato en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la dosificación es de 10 ppm. El decoquinato interfiere en la dosificación.

2. Principio

La muestra se somete a la extracción mediante cloroformo. El extracto se evapora en seco, el residuo se recoge mediante cloroformo y luego se somete la solución a una cromatografía en capa fina. El buquinolato es eluido con etanol y se determina mediante espectrofotofluorimetría por comparación con soluciones patrón.

3. Reactivos

- 3.1. Cloroformo p.a.
- 3.2. Etanol de 96 grados (v/v) p.a.
- 3.3. Mezcla de cloroformo y de etanol: mezclar 10 volúmenes de cloroformo (3.1) y 1 volumen de etanol (3.2).
- 3.4. Etanol de 80 grados (v/v) p.a.
- 3.5. Gel de sílice G para cromatografía en capa fina.
- 3.6. Sustancia patrón: buquinolato puro.
- 3.7. Soluciones patrón:
 - 3.7.1. Solución patrón de 0,2 mg de buquinolato por ml: Pesar, con un margen de error máximo de 0,1 mg, 50 mg de sustancia patrón (3.6). Disolver con cloroformo (3.1) en un matraz graduado de 250 ml calentado en baño de agua a 50 °C. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente, completar el volumen con cloroformo (3.1) y homogeneizar.
 - 3.7.2. Soluciones patrón de trabajo: tomar, respectivamente, unos volúmenes de 5,0-10,0-15,0-20,0 y 25,0 ml de la solución (3.7.1) e introducirlos en matraces graduados de 25 ml. Completar el volumen con cloroformo (3.1) y homogeneizar. Preparar en el momento de su utilización. Dichas soluciones contienen, respectivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 y 0,20 mg de buquinolato por ml.

4. Equipo

- 4.1. Frascos cónicos de 50 y 250 ml, con tapón esmerilado.
- 4.2. Agitador
- 4.3. Centrifugadora, con tubos de 15 ml, con tapón esmerilado.
- 4.4. Baño de agua a 50 °C.
- 4.5. Equipo para cromatografía en capa fina.
- 4.6. Placas de vidrio para cromatografía en capa fina, 200 × 200 mm, preparadas de la siguiente manera: extender uniformemente sobre las placas una capa de 0,5 mm de espesor de gel de sílice G (3.5) y dejar secar al aire durante 15 minutos. Luego, mantener las placas durante 2 horas en la estufa (4.11), después trasladarlas a un desecador provisto de gel de sílice deshidratante. Las placas preparadas para su utilización son convenientes en la medida en que dan resultados similares a los de las placas tratadas como arriba se indica.
- 4.7. Micropipetas de 0,50 ml.
- 4.8. Colector de zonas para cromatografía en capa fina.

- 4.9. Lámpara UV de onda corta.
- 4.10. Espectrofotofluorímetro dotado de una lámpara Xenon y de dos monocromadores.
- 4.11. Estufa dotada de un ventilador y regulada a 100 °C.
- 4.12. Aparato rotativo de evaporación en vacío con matraz de 250 ml.

5. Modo de operar

5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra de manera que pase en su totalidad a través de un tamiz de malla de 1 mm (conforme a la recomendación ISO R 565).

5.2. Extracción

Pesar, con un margen de error máximo de 1 mg, una cantidad de muestra dividida y homogeneizada que contenga alrededor de 1,25 mg de buquinolato. Introducir la tona de muestra en un frasco cónico de 250 ml (4.1) y agregar 100,0 ml de cloroformo (3.1). Mezclar, tapar el frasco y agitar con el agitador (4.2) durante una hora. Dejar decantar, filtrar y eliminar los primeros ml de líquido filtrado.

Introducir 80,0 ml de líquido filtrado limpio en una copa de vidrio de 150 ml o en el matraz del aparato rotativo (4.12). Evaporar casi hasta secar en baño de agua (4.4), volver a poner el residuo aceitoso, repetidas veces, en unos ml de cloroformo (3.1) y trasvasar cuantitativamente los líquidos a un matraz graduado de 10 ml, por medio de un embudo de conducto fino. Completar el volumen con cloroformo (3.1) y homogeneizar. Si la solución no está limpia, centrifugar durante 3 minutos a 3 000 t/m tubo tapado.

5.3. Cromatografía en capa fina

Depositar puntualmente sobre una placa para cromatografía en capa fina (4.6), mediante una micropipetea (4.7) y a unas distancias respectivas de 2 cm, unos volúmenes de 0,25 ml del extracto obtenido en 5.2 y cinco soluciones patrón de trabajo (3.7.2).

Revelar el cromatograma con cloroformo (3.1) hasta que el frente del disolvente alcance prácticamente el borde superior de la placa, luego secar mediante una corriente de aire. Luego, revelar con la mezcla cloroformo/etanol (3.3) hasta que el frente del disolvente se haya desplazado alrededor de 12 cm. Dejar evaporar los disolventes. Irradiar el cromatograma con la luz UV (4.9) y delimitar las manchas de buquinolato (valor R_f: 0,4 a 0,6) por medio de una aguja.

5.4. Elución

Recoger la sílice de cada zona delimitada, por medio de un colector de zonas (4.8), en un tubo de centrifugación (4.3). Agregar en cada tubo 10,0 ml de etanol (3.4), agitar durante 20 minutos, luego, centrifugar durante 5 minutos a 3 000 t/m. Decantar las soluciones limpias en unos frascos cónicos de 50 ml (4.1).

5.5. Medida de la fluorescencia

Regular en 100 la escala del espectrofotofluorímetro (4.10) por medio del eluido (5.4) procedente de la solución patrón más concentrada, utilizando para la estimulación la extensión de onda comprendida entre 200 y 280 nm que dan la fluorescencia más intensa y, para la emisión, la extensión de onda de 375 nm.

Medir, en estas condiciones, la intensidad de la fluorescencia de los otros eluidos (5.4). Determinar, a partir de los valores encontrados, la cantidad (A) de buquinolato en mg contenido en los 10 ml del eluido procedente de la muestra.

6. Cálculo de resultados

El contenido en mg de buquinolato por kg de muestra se expresa con la fórmula

$$\frac{A}{P} \cdot 50\,000$$

en la cual:

A — cantidad en mg de buquinolato determinada por la medida espectrofluorimétrica.

P — peso en g de la toma de muestra.

7. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas realizadas sobre la misma muestra no debe sobrepasar:

- el 50 % del resultado más elevado para los contenidos en buquinolato comprendidos entre 10 y 20 ppm;
- 10 ppm, en valor absoluto, para los contenidos entre 20 y 100 ppm;
- el 10 % del resultado más elevado para los contenidos comprendidos entre 100 y 5 000 ppm;
- 500 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5 000 y 10 000 ppm;
- el 5 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 10 000 ppm.

2. DOSIFICACIÓN DE LA SULFAQUINOXALINA

(2-sulfanilamidoquinóxalina)

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite dosificar la sulfaquinóxalina en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la dosificación es de 20 ppm. Otras sulfonamidas, así como el ácido arsánico interfieren en la dosificación.

2. Principio

La muestra se somete a la extracción mediante la dimetilformamida y el cloroformo. La sulfaquinóxalina se hidroliza en medio alcalino. Después de la neutralización, el derivado aminado que se ha formado, se diazota y acopla a la N-(1-naftil) etilenodiamina. La densidad óptica de la solución se mide en 545 nm.

3. Reactivos

- 3.1. N,N-dimetilformamida p.a.
- 3.2. Cloroformo p.a.
- 3.3. Etanol absoluto.
- 3.4. Lejía alcalina: disolver en agua 10 mg de hidróxido de sodio p.a. y 25 de cloruro de sodio p.a. Completar los 500 ml con agua y homogeneizar.
- 3.5. Ácido clorídrico concentrado p.a. ($d = 1,18$).
- 3.6. Solución de 0,1 % (p/v) de nitrito de sodio: disolver en agua 100 mg de nitrito de sodio p.a., completar los 100 ml con agua y homogeneizar. Preparar inmediatamente antes de su utilización.
- 3.7. Solución de 0,5 % (p/v) de sulfamato de amonio: disolver en el agua 500 mg de sulfamato de amonio p.a., completar los 100 ml con agua y homogeneizar. Preparar inmediatamente antes de su utilización.
- 3.8. Solución de 0,1 por ciento (p/v) de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilenodiamina: disolver en ácido clorídrico p.a. de 0,1 % (v/v) 100 mg de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilenodiamina p.a., completar los 100 ml con el mismo ácido y homogeneizar. Preparar inmediatamente antes de su utilización.
- 3.9. Sustancia patrón: sulfaquinóxalina pura.
- 3.10. Solución patrón: pesar, con un margen de error máximo de 0,1 mg, 250 mg de sustancia patrón (3.9). Disolver en 50 ml de una solución de hidróxido de sodio (25 ml de solución de hidróxido de sodio p.a. 0,1 N + 25 ml de agua), completar los 500 ml con agua y homogeneizar. Tomar 5,0 ml de dicha solución y diluir con agua hasta los 100 ml. Un ml de dicha solución contiene 25 microgramos de sulfaquinóxalina.

4. Equipo

- 4.1. Frascos cónicos de 250 ml, de esmerilado normal.
- 4.2. Agitador
- 4.3. Crisol filtrante, porosidad 3, diámetro: 80 mm, con frasco en vacío.
- 4.4. Ampollas de decantación de 250 ml.

- 4.5. Matraces graduados de 50, 100, 250 y 500 ml.
- 4.6. Tubos de ensayo, 150 mm × 25 mm.
- 4.7. Baño de agua hirviendo.
- 4.8. Espectrofotómetro, con cubeta de 20 mm de espesor.

5. Modo de operar

5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra de forma que pase en su totalidad por un tamiz de malla de 1 mm (conforme a la recomendación ISO R 565).

5.2. Extracción

Pesar, con un margen de error máximo de 1 mg, una cantidad de muestra dividida y homogeneizada que contenga de 0,25 a 1,25 mg de sulfaquinoxalina. Introducir la toma de muestra en un frasco cónico de 250 ml (4.1) y agregar 20 ml de N,N-dimetilformamida (3.1). Mezclar y calentar durante 20 minutos en baño de agua (4.7). Dejar enfriar bajo una corriente de agua fría. Agregar 60 ml de cloroformo (3.2), tapar el frasco y agitar durante 30 minutos con el agitador (4.2).

Filtrar el líquido en un crisol filtrante (4.3) aspirando levemente. Enjuagar el frasco con cuatro porciones de 5 ml de cloroformo (3.2) y trasvasar los líquidos al crisol filtrante. Luego, trasvasar el líquido a una ampolla de decantación (4.4), enjuagar el frasco con 15 ml de cloroformo (3.2) aproximadamente, y trasvasar el líquido a la ampolla.

5.3. Hidrólisis

Agregar en la ampolla 50 ml de lejía alcalina (3.4) y 5 ml de etanol (3.3). Mezclar completamente evitando la formación de emulsión, bien invirtiendo la ampolla unas veinte veces, bien haciéndola girar alrededor del eje horizontal que pasa del cuello al tapón.

Luego dejar reposar hasta la separación de las fases (generalmente la separación culmina después de 15 minutos aproximadamente).

Trasvasar la fase superior (fase acuosa) a un matraz graduado de 250 ml (4.5). Extraer nuevamente la fase clorofórmica mediante tres porciones de 50 ml de lejía alcalina (3.4) y trasvasar después de cada extracción el extracto acuoso al matraz graduado. Completar el volumen con agua y homogeneizar.

Introducir 25,0 ml de la solución en un matraz graduado de 50 ml (4.5), agregar 5,0 ml de ácido clorídrico (3.5), completar el volumen con agua y homogeneizar. Filtrar, si es necesario, y eliminar los 15 primeros ml del líquido filtrado. Introducir 10,0 ml de la solución en dos tubos de ensayo (4.6) A y B, respectivamente.

5.4. Revelado de la coloración y medida de la densidad óptica

Agregar en cada tubo, 2,0 ml de solución de nitrito de sodio (3.6), agitar y dejar reposar 3 minutos. Agregar 2,0 ml de solución de sulfamato de amonio (3.7), agitar y dejar reposar 2 minutos. Luego, agregar 1,0 ml de solución de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina (3.8) en el tubo B. Mezclar intensamente el contenido de cada tubo. Unir los tubos a una trompa de agua mediante juntas de caucho y aplicar un pequeño vacío para eliminar el nitrógeno disuelto.

Pasados 10 minutos, medir las densidades ópticas E_A y E_B de las soluciones en el espectrofotómetro (4.8) a 545 nm por comparación con el agua. Determinar a partir del valor $E_A - E_B$ la cantidad (A) de sulfaquinoxalina presente en la solución de la muestra con referencia a la curva de contraste (5.5) establecida previamente.

5.5. Curva de contraste

Introducir en los matraces graduados de 100 ml (4.5), respectivamente, los volúmenes 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 y 10,0 ml de la solución patrón (3.10) correspondientes a 50, 100, 150, 200 y 250 microgramos de sulfaquinoxalina. Agregar 8 ml de ácido clorídrico (3.5) en cada matraz, completar el volumen con agua y homogeneizar.

Tomar 10,0 ml de cada solución (10 que corresponde respectivamente a 5, 10, 15, 20 y 25 microgramos de sulfaquinoxalina) e introducirlos en tubos de ensayo (4.6). Revelar la coloración como se indica en el apartado primero 5.4. Luego, medir las densidades ópticas a 545 nm por comparación con el agua. Trazar la curva de contraste situando en ordenada los valores de la densidad óptica y en abscisa las correspondientes cantidades de sulfaquinoxalina, en microgramos.

6. Cálculo de resultados

El contenido en mg de sulfaquinoxalina por kg de muestra se expresa con la fórmula

$$\frac{A}{P} \cdot 50$$

en la cual

A = cantidad en microgramos de sulfaquinoxalina, determinada por la medida fotométrica;

P = peso en gramos de la toma de muestra.

7. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas realizadas sobre la misma muestra no debe sobrepasar:

10 ppm, en valor absoluto, para los contenidos en sulfaquinoxalina comprendidos entre 20 y 100 ppm;

el 10 % del resultado más elevado para los contenidos comprendidos entre 100 y 5 000 ppm;

500 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5 000 y 10 000 ppm;

el 5 por ciento del resultado más elevado para los contenidos superiores a 10 000 ppm.

3. DOSIFICACIÓN DE LA FURAZOLIDONA

[N-(5-nitro-2-furfurilideno)-3-amino-2-oxazolidona]

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite dosificar la furazolidona en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la dosificación es de 10 ppm.

2. Principio

La furazolidona se extrae por medio de la acetona, una vez realizado el previo desengrasado de la muestra mediante éter de petróleo. El extracto se purifica por cromatografía sobre columna de óxido de aluminio y la furazolidona se eluye con acetona. El eluido se evapora en seco y el residuo se recoge mediante alcohol amílico. La furazolidona se extrae mediante una solución de urea y la densidad óptica del extracto se mide en 375 nm.

3. Reactivos

3.1. Acetona p.a.

3.2. Óxido de aluminio para cromatografía, neutro,

granulometría: 100 a 240 mallas que se preparan de la siguiente manera: mezclar 500 g de óxido de aluminio con un l de agua destilada caliente y luego decantar el líquido que queda en la superficie. Repetir dos veces dicha operación y luego filtrar por un embudo Buchner. Secar el óxido de aluminio a 105 % °C hasta el peso constante.

3.3. Acetato de amilo p.a.

3.4. Alcohol amílico p.a. (son convenientes las mezclas de isómeros).

3.5. Éter de petróleo, eb. 40—60 °C.

3.6. Solución de urea: mezclar 90 g de urea p.a. con 100 ml de agua, calentar suavemente para que se disuelva por completo.

3.7. Sustancia patrón: furazolidona pura.

3.8. Solución patrón: pesar, con un margen de error máximo de 0,1 mg, 25 mg de sustancia patrón (3.7). Disolver con la acetona (3.1) en un matraz graduado de 250 ml (4.1), completar el volumen con acetona (3.1) y homogeneizar. Un ml de dicha solución contiene 100 microgramos de furazolidona.

4. Equipo

4.1. Matraces graduados de vidrio pardo, 100 y 250 ml.

4.2. Ampollas de decantación de vidrio pardo, 100 ml.

- 4.3. Aparatos de extracción, por ej.: Soxhlet o Twisselmann.
- 4.4. Cartuchos de extracción, 25 × 80 mm ó 28 × 100 mm.
- 4.5. Tubos de vidrio para cromatografía, diámetro interior: 10 mm; longitud: 300 mm.
- 4.6. Baño de agua hirviendo.
- 4.7. Espectrofotómetro con cubetas de 10 mm de espesor.

5. Modo de operar

NB Todas las operaciones se deben realizar fuera del alcance de la luz directa.

5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra de forma que pase en su totalidad por un tamiz de malla de 1 mm (conforme a la recomendación ISO R 565).

5.2. Extracción

Pesar, con un margen de error máximo de 1 mg, 5 a 20 g de la muestra dividida y homogeneizada (que contenga un máximo de 1 mg de furazolidona) en un cartucho de extracción (4.4), colocarla en un aparato de extracción (4.3) y extraer mediante éter de petróleo (3.5). Para el aparato de Soxhlet, se necesitan de 13 a 17 ciclos de disolvente; para otros aparatos, la duración de la extracción no debe ser inferior a 30 minutos. Luego, retirar el cartucho del aparato, eliminar el residuo de disolvente y secar el cartucho y su contenido mediante una corriente de aire caliente.

Luego, colocar el cartucho y su contenido en un aparato de extracción limpio y extraer con acetona (3.1). Para el aparato de Soxhlet, se necesitan, por lo menos, 25 ciclos de disolvente; para otros aparatos, las condiciones necesarias para la obtención de una extracción completa se deben determinar previamente. Evaporar el extracto acetónico en el baño de agua (4.6) hasta un volumen de 5 a 10 ml y luego dejar enfriar hasta temperatura ambiente.

5.3. Cromatografía

Introducir un tapón de lana de vidrio en la extremidad inferior de un tubo para cromatografía (4.5) y comprimir el tapón mediante una varilla adecuada para obtener un espesor de 2 a 3 mm. Luego preparar una suspensión de óxido de aluminio (3.2) en la acetona (3.1), introducir la suspensión en el tubo y dejar que se deposite. La columna así obtenida debe tener una altura de 200 mm aproximadamente. Dejar que descienda la acetona hasta la superficie superior de la columna.

Trasvasar el extracto acetónico obtenido en 5.2 sobre la columna, enjuagar el frasco varias veces con acetona (3.1) y trasvasar los líquidos sobre la columna, colocar un frasco adecuado debajo de la columna y eluir la furazolidona con acetona (3.1). El volumen total de acetona que se debe utilizar, incluido el volumen que se haya empleado para el enjuague, debe ser de 150 ml aproximadamente.

5.4. Extracción y medida de la densidad óptica

Evaporar en baño de agua (4.6) el eluido obtenido en 5.3 hasta que quede seco. (Ocasionalmente se obtiene una pequeña cantidad de diacetona-alcohol, producida por condensación de la acetona en el óxido de aluminio, que no obstaculiza las extracciones posteriores). Disolver el residuo en 10 ml de alcohol amílico (3.4) y trasvasar la solución a una ampolla de decantación (4.2). Enjuagar el frasco sucesivamente, con 10 ml de acetato de amilo (3.3) y 10 ml de solución de urea (3.6), trasvasar dichas soluciones a la ampolla de decantación y agitar enérgicamente durante 2 minutos.

Dejar reposar durante 3 ó 4 minutos y luego recoger la fase acuosa en un matraz graduado de 100 ml (4.1). Repetir el enjuague y la extracción mediante cuatro porciones de 10 ml de solución de urea (3.6) y, cada vez, recoger la fase acuosa en el matraz graduado. Completar 100 ml del contenido del matraz con la solución de urea (3.6) y homogeneizar. Medir la densidad óptica de la solución en el espectrofotómetro (4.7) en 375 nm por comparación con la solución de urea (3.6). Determinar la cantidad de furazolidona con referencia a la curva de contraste (5.5).

5.5. Curva de contraste

Preparar cuatro columnas cromatográficas de acuerdo con el modo de operar indicado en el primer apartado de 5.3. Introducir con la pipeta, en las columnas, respectivamente, unos volúmenes de 2,5 — 5,0 — 7,5 — y 10,00 ml de la solución patrón (3.8). Eluir cada columna con 150 ml de

acetona (3.1) y proseguir el modo de operar como se indica en 5.4. Trazar la curva de contraste situando en ordenada los valores de la densidad óptica y en abscisa las correspondientes cantidades de furazolidona en microgramos.

6. Cálculo de resultados

El contenido en mg de furazolidona por kg de muestra se expresa con la fórmula

$$\frac{A}{P}$$

en la cual:

A = cantidad en microgramos de furazolidano determinada por la medida fotométrica,

P = peso en gramos de la toma de muestra.

7. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas realizadas sobre la misma muestra no debe sobrepasar:

el 50 % del resultado más elevado para los contenidos en furazolidona comprendidos entre 10 y 20 ppm;

10 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 20 y 100 ppm;

el 10 % del resultado más elevado para los contenidos comprendidos entre 100 y 5 000 ppm;

500 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 5 000 y 10 000 ppm;

el 5 % del resultado más elevado para los contenidos superiores a 10 000 ppm.
