

REGULAMENTO (CE) N.º 1459/98 DA COMISSÃO**de 8 de Julho de 1998****que estabelece um método de referência para a determinação do teor de vanilina na manteiga concentrada, na manteiga ou na nata**

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CEE) n.º 804/68 do Conselho, de 27 de Junho de 1968, que estabelece a organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1587/96⁽²⁾, e, nomeadamente, o n.º 6 do seu artigo 6.º e o n.º 3 do seu artigo 12.º

Considerando que o Regulamento (CE) n.º 2571/97 da Comissão, de 15 de Dezembro de 1997, relativo à venda a preço reduzido de manteiga e à concessão de uma ajuda à nata, à manteiga e à manteiga concentrada destinadas ao fabrico de produtos de pastelaria, de gelados alimentares e de outros produtos alimentares⁽³⁾ prevê a marcação da nata, da manteiga e da manteiga concentrada em determinadas circunstâncias, para garantir a correcta utilização final destes produtos;

Considerando que, atendendo à importância da marcação para o bom funcionamento do regime, e de modo a garantir a igualdade de tratamento dos operadores que nele participam, é conveniente estabelecer métodos comuns para a determinação dos marcadores referidos no Regulamento (CE) n.º 2571/97;

Considerando que é difícil estabelecer em simultâneo métodos de referência para todos os marcadores; que o facto de se estabelecer um método de referência para a

determinação do teor de vanilina na manteiga concentrada, na manteiga e na nata constitui um passo nesse sentido;

Considerando que as medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão do Leite e dos Produtos Lácteos,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O método de referência a aplicar na determinação do teor de vanilina na manteiga, na manteiga concentrada e na nata no âmbito do Regulamento (CE) n.º 2571/97 é o método de análise descrito no anexo.

A manteiga, a manteiga concentrada e a nata terão sido marcadas em conformidade com o artigo 6.º do Regulamento (CE) n.º 2571/97 se os resultados obtidos satisfizerem o especificado no ponto 8 do anexo.

Artigo 2.º

O presente regulamento entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

É aplicável a partir de 1 de Junho de 1998.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-membros.

Feito em Bruxelas, em 8 de Julho de 1998.

Pela Comissão

Franz FISCHLER

Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.

⁽²⁾ JO L 206 de 16. 8. 1996, p. 21.

⁽³⁾ JO L 350 de 20. 12. 1997, p. 3.

ANEXO

Determinação do teor de vanilina na manteiga concentrada, na manteiga ou na nata por cromatografia líquida de alta eficiência1. *Objectivo e campo de aplicação*

Este método descreve um processo de determinação quantitativa do teor de vanilina na manteiga concentrada, na manteiga ou na nata.

É aplicável às amostras recebidas no âmbito do Regulamento (CE) n.º 2571/97.

2. *Resumo do processo*

Extracção de uma quantidade conhecida de amostra com uma mistura 1:1:2 de isopropanol, etanol e acetonitrilo. Precipitação da maior parte da matéria gorda por arrefecimento a uma temperatura compreendida entre -15°C e -20°C , seguido de centrifugação. Diluição com água e determinação do teor de vanilina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. *Aparelhos e utensílios*

Material corrente de laboratório e, especificamente:

- 3.1. Frigorífico capaz de manter uma temperatura compreendida entre -15°C e -20°C ;
- 3.2. Seringas descartáveis de 2 ml de capacidade;
- 3.3. Microfiltros de membrana com poros de $0,45\ \mu\text{m}$, resistentes a uma solução com 5 % de solução de extracção (4.4);
- 3.4. Sistema de cromatografia líquida constituído por uma bomba (caudal de 1,0 ml/minuto), um injector (injecção automática ou manual de 20 μl), um detector de UV (regulado para 306 nm, com 0,01 UA para toda a escala), um registador ou integrador e um termóstato de coluna regulado para 25°C ;
- 3.5. Coluna analítica (250 mm \times 4,6 mm de diâmetro interno) com enchimento LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) ou equivalente;
- 3.6. Pré-coluna (cerca de 20 mm \times 3 mm de diâmetro interno) com enchimento a seco de Perisorb RP 18 (30-40 μm) ou equivalente.

4. *Reagentes*

Os reagentes serão todos de qualidade analítica reconhecida.

- 4.1. Isopropanol
- 4.2. Etanol a 96 % (v/v)
- 4.3. Acetonitrilo
- 4.4. Solução de extracção
Mistura 1:1:2 (v/v) de isopropanol (4.1), etanol (4.2) e acetonitrilo (4.3).
- 4.5. Vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído)
 - 4.5.1. Solução de reserva de vanilina (500 $\mu\text{g/ml}$)
Pesar com a precisão de 0,1 mg aproximadamente 50 mg (CM mg) de vanilina (4.5) num balão aferido de 100 ml; adicionar 25 ml de solução de extracção (4.4) e completar o volume com água.
 - 4.5.2. Solução-padrão de vanilina (10 $\mu\text{g/ml}$)
Pipetar 5,00 ml de solução de reserva de vanilina (4.5.1) para um balão aferido de 250 ml e completar o volume com água.
- 4.6. Metanol para HPLC
- 4.7. Ácido acético glacial
- 4.8. Água para HPLC
- 4.9. Eluente para cromatografia líquida de alta eficiência
Misturar 300 ml metanol (4.6), aproximadamente 500 ml de água (4.8) e 20,0 ml de ácido acético (4.7) num balão aferido de 1 000 ml e completar o volume com água (4.8). Filtrar com um filtro de 0,45 μm .

5. *Técnica*

5.1. Preparação da toma para análise

5.1.1. Manteiga

Aquecer a amostra até ter início a fusão, evitando sobreaquecimentos locais acima de 40°C . Quando a amostra estiver suficientemente plástica, proceder à sua homogeneização sacudindo o recipiente. Remexer a manteiga durante 15 s antes de recolher uma toma para análise. Pesar, com a precisão de 1 mg, aproximadamente 5 g (SM g) de manteiga num balão aferido de 100 ml.

5.1.2. Manteiga concentrada

Imediatamente antes da recolha da toma para análise, colocar o recipiente com a mantegia concentrada numa estufa regulada para 40-50 °C até fusão completa. Misturar a amostra, utilizando um sistema de vórtice ou remexendo moderadamente, para evitar a formação de bolhas de ar. Pesar, com a precisão de 1 mg, aproximadamente 4 g (SM g) de manteiga concentrada num balão aferido de 100 ml.

5.1.3. Nata

Aquecer a amostra num banho de água ou numa incubadora à temperatura de 35-40 °C. Homogeneizar a distribuição de matéria gorda, utilizando um sistema de vórtice e, se necessário, remexendo. Arrefecer rapidamente a amostra até à temperatura de 20 ± 2 °C. A amostra deve apresentar-se homogénea; caso contrário, repetir o processo. Pesar, com a precisão de 1 mg, aproximadamente 10 g (SM g) de nata num balão aferido de 100 ml.

5.2. Preparação da solução a analisar

Juntar aproximadamente 75 ml de solução de extracção (4.4) à toma para análise (5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3), remexer ou sacudir vigorosamente durante cerca de 15 minutos e completar o volume com solução de extracção (4.4). Transferir aproximadamente 10 ml deste extracto para um tubo de ensaio com tampa. Colocar o tubo no frigorífico (3.1) e deixar em repouso cerca de 30 minutos. Centrifugar o extracto frio durante 5 minutos a cerca de 2 000 rpm e decantar de imediato. Deixar a solução decantada arrefecer até à temperatura ambiente. Pipetar 5,00 ml desta solução para um balão aferido de 100 ml e completar o volume com água. Filtrar uma alíquota com um microfiltro de membrana (3.3), após o que o filtrado estará pronto para a determinação por HPLC.

5.3. Calibração

Pipetar 5,00 ml de solução-padrão de vanilina (4.5.2) para um balão aferido de 100 ml. Juntar 5,0 ml de solução de extracção (4.4) e completar o volume com água até ao traço de aferição. A concentração de vanilina nesta solução é de 0,5 µg/ml.

5.4. Determinação por HPLC

Estabilizar o sistema cromatográfico durante cerca de 30 minutos. Injectar a solução-padrão (5.3) e repetir o processo até que a diferença entre as áreas ou as alturas dos picos correspondentes a duas injeções consecutivas seja inferior a 2 %. Nas condições descritas, o tempo de retenção da vanilina é cerca de 9 minutos. Analisar a solução-padrão (5.3) em duplicado, injectando um volume de 20 µl. Injectar 20 µl das soluções a analisar (5.2). Determinar a área ou a altura de cada pico de vanilina obtido. Repetir o duplicado da solução-padrão (5.3) após 10 injeções de soluções a analisar (5.2).

6. Resultados

Calcular a área (ou a altura) média (AC) dos picos da vanilina correspondentes às injeções em duplicado que delimitam cada lote de soluções a analisar (quatro áreas no total).

Calcular o factor de resposta (R):

$$R = AC/CM$$

em que CM é a massa de vanilina, em mg (4.5.1).

O teor (C), em mg/kg, de vanilina na toma para análise é dado pela seguinte fórmula:

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

em que:

AS = é a área do pico de vanilina correspondente à toma para análise;

SM = é a massa da toma para análise, em g (5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3);

20 = é o factor que dá conta das diluições da solução-padrão e da toma para análise;

0,96 = é o factor de correcção decorrente do teor de matéria gorda da primeira diluição da toma para análise.

Nota:

Em lugar da área dos picos, pode utilizar-se a altura destes (ver 8.3).

7. Precisão do método

7.1. Repetibilidade (r)

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas no mais curto intervalo de tempo possível pelo mesmo analista à mesma amostra com os mesmos aparelhos não deve exceder 16 mg/kg.

7.2. Reprodutibilidade (R)

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas à mesma amostra por analistas diferentes, em laboratórios diferentes e com aparelhos diferentes, não deve exceder 27 mg/kg.

8. Tolerâncias

- 8.1. Para verificar a homogeneidade do produto marcado, recolhem-se três amostras do mesmo.
- 8.2. Marcador obtido a partir de baunilha ou de vanilina de síntese.
- 8.2.1. A taxa de incorporação é de 250 gramas por tonelada, em 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído.
- 8.2.2. Tendo em conta a diferença crítica para um grau de probabilidade de 95 % (CrD_{95}), a média das análises singelas efectuadas a cada uma das três amostras recolhidas para verificar a homogeneidade não deve ser inferior a 236,0 mg/kg.
- 8.2.3. Além do critério estabelecido no ponto 8.2.2, o menor dos resultados obtidos na análise do produto também é utilizado para verificar a homogeneidade da distribuição do marcador. Para o efeito, procede-se a uma comparação com os seguintes limites:
- 221,5 mg/kg (95 % da taxa de incorporação mínima, tida em conta a CrD_{95} da amostra singela);
 - 159,0 mg/kg (70 % da taxa de incorporação mínima, tida em conta a CrD_{95} da amostra singela).
- A concentração do marcador na amostra com os resultados mais baixos é utilizada em conjugação com uma interpolação entre 221,5 mg/kg e 159,0 mg/kg.
- 8.3. Marcador obtido exclusivamente a partir de favas de baunilha ou de extractos integrais destas.
- 8.3.1. A taxa de incorporação é de 100 gramas por tonelada, em 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído.
- 8.3.2. Tendo em conta a diferença crítica para um grau de probabilidade de 95 % (CrD_{95}), a média das análises singelas efectuadas a cada uma das três amostras recolhidas para verificar a homogeneidade não deve ser inferior a 86,0 mg/kg.
- 8.3.3. Além do critério estabelecido no ponto 8.3.2, o menor dos resultados obtidos na análise do produto também é utilizado para verificar a homogeneidade da distribuição do marcador. Para o efeito, procede-se a uma comparação com os seguintes limites:
- 79,0 mg/kg (95 % da taxa de incorporação mínima, tida em conta a CrD_{95} da amostra singela);
 - 54,0 mg/kg (70 % da taxa de incorporação mínima, tida em conta a CrD_{95} da amostra singela).
- A concentração do marcador na amostra com os resultados mais baixos é utilizada em conjugação com uma interpolação entre 79,0 mg/kg e 54,0 mg/kg.

9. Notas

- 9.1. A repetibilidade r é o valor abaixo do qual a diferença absoluta entre dois resultados analíticos singelos obtidos por aplicação do mesmo método à mesma amostra nas mesmas condições (mesmos aparelhos, mesmo laboratório, num curto intervalo de tempo) tem uma determinada probabilidade de se situar; na falta de indicação em contrário, essa probabilidade é de 95 %.
- 9.2. A reprodutibilidade R é o valor abaixo do qual a diferença absoluta entre dois resultados analíticos singelos obtidos por aplicação do mesmo método à mesma amostra em condições diferentes (analistas diferentes, aparelhos diferentes, laboratórios diferentes e/ou momentos diferentes) tem uma determinada probabilidade de se situar; na falta de indicação em contrário, essa probabilidade é de 95 %.
- 9.3. Para uma taxa de incorporação de 250 mg/kg de *buteroil*, a taxa de recuperação de vanilina adicionada varia entre 97,0 e 103,8 %. O teor médio determinado foi de 99,9 %, com desvio-padrão de 2,7 %.
- 9.4. A solução-padrão contém 5 % de solução de extracção para compensar o alargamento dos picos provocado pela presença de 5 % da solução de extracção das tomas para análise. Tal permite que se proceda à quantificação com base na altura dos picos.
- 9.5. A análise baseia-se numa curva de calibração linear com ordenada na origem zero. Utilizando para o efeito diluições apropriadas da solução-padrão (4.5.2), deve confirmar-se a linearidade na primeira vez que se efectuam as análises e, posteriormente, a intervalos regulares e depois de qualquer modificação ou reparação do equipamento de HPLC.
-