

**DÉCIMA SEGUNDA DIRECTIVA 93/117/CE DA COMISSÃO**

de 17 de Dezembro de 1993

**que fixa métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais**

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 70/373/CEE do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais <sup>(1)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) n.º 3768/85 do Conselho <sup>(2)</sup>, e, nomeadamente, o seu artigo 2.º,

Considerando que a referida Directiva 70/373/CEE prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais destinados a verificar o respeito das condições prescritas em virtude das disposições legislativas, regulamentares ou administrativas quanto à qualidade e composição dos alimentos para animais, sejam efectuados segundo modos de colheita de amostras e métodos de análise comunitários;

Considerando que, para controlar a observação das condições de utilização de robenidina e metilbenzoquato nos alimentos para animais, é conveniente estabelecer a nível comunitário métodos de análise para esses aditivos;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

*Artigo 1.º*

Os Estados-membros prescreverão que as análises previstas para os controlos oficiais dos alimentos para

animais, no que diz respeito ao teor em robenidina e em metilbenzoquato, sejam efectuadas segundo os métodos correspondentes descritos no anexo.

*Artigo 2.º*

Os Estados-membros porão em vigor, o mais tardar em 30 de Novembro de 1994, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

As disposições adoptadas pelos Estados-membros devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

*Artigo 3.º*

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

Feito em Bruxelas, em 17 de Dezembro de 1993.

*Pela Comissão*

René STEICHEN

*Membro da Comissão*

<sup>(1)</sup> JO n.º L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

<sup>(2)</sup> JO n.º L 362 de 31. 12. 1985, p. 8.

## ANEXO

## 1. DETERMINAÇÃO DA ROBENIDINA

## Cloridrato de 1,3-Bis[4-clorobenzilideno]amino]guanidina

## 1. Objectivo e campo de aplicação

O presente método destina-se à determinação de robenidina em alimentos para animais. O limite inferior de determinação é de 5 mg/kg.

## 2. Princípio

A amostra é extraída com metanol acidificado. O extracto é seco, sendo uma alíquota submetida a purificação numa coluna de óxido de alumínio. A robenidina é eluída da coluna com metanol, concentrada e posteriormente diluída com fase móvel para um volume adequado. O teor de robenidina é determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, utilizando um detector de ultravioleta.

## 3. Reagentes

3.1. *Metanol*3.2. *Metanol acidificado*

Transferir 4,0 ml de ácido clorídrico ( $\rho_{20}$  ca 1,18 g/ml) para um balão graduado de 500 ml, completando até ao traço com metanol (3.1) e agitar. A solução deve ser preparada antes de cada uso.

3.3. *Acetonitrilo de qualidade para HPLC*3.4. *Crivo molecular*

Tipo 3A, partículas 8-12 mesh (partículas de aluminossilicato com 1,6-2,5 mm de diâmetro e poros com 0,3 mm de diâmetro).

3.5. *Óxido de alumínio ácido, de grau de actividade I, para cromatografia em coluna*

Transferir 100 g de óxido de alumínio para um recipiente adequado e adicionar 2,0 ml de água. Tapar e agitar durante cerca de 20 minutos. Guardar num recipiente bem rolhado.

3.6. *Solução de dihidrogenofosfato de potássio,  $c = 0,025$  mol/l*

Dissolver, num balão graduado de 1 000 ml, 3,40 g de dihidrogenofosfato de potássio em água de qualidade para HPLC, completando até ao traço de referência e agitar.

3.7. *Solução de hidrogenofosfato dissódico,  $c = 0,025$  mol/l*

Dissolver, num balão graduado de 1 000 ml, 3,55 g de hidrogenofosfato dissódico anidro (ou 4,45 g de hidrogenofosfato dissódico bi-hidratado, ou ainda 8,95 g de hidrogenofosfato dissódico dodeca-hidratado) em água de qualidade para HPLC, completando até ao traço de referência e agitar.

3.8. *Fase móvel para HPLC*

Misturar os seguintes reagentes :

650 ml de acetonitrilo (3.3)

250 ml de água (qualidade para HPLC )

50 ml de solução dihidrogenofosfato de potássio (3.6)

50 ml de solução de hidrogenofosfato dissódico (3.7)

Filtrar num filtro de 0,22  $\mu$ m (4.6) e degaseificar a solução (nomeadamente por recurso a um banho de ultrassons durante 10 minutos).

3.9. *Substância padrão*

Robenidina pura : cloridrato de 1,3-Bis[4-clorobenzilideno]amino]guanidina, E 758.

3.9.1. Solução-mãe padrão de robenidina : 300 µg/ml

Pesar, com aproximação a 0,1 g, 30 mg de robenidina padrão (3.9). Dissolver em metanol acidificado (3.2) num balão graduado de 100 ml, completando até ao traço de referência com o mesmo solvente e agitar. Envolver o balão em folha de alumínio e guardar ao abrigo da luz.

3.9.2. Solução padrão intermédia de robenidina : 12 µg/ml

Transferir 10,0 ml de solução-mãe padrão (3.9.1) para um balão graduado de 250 ml, completando até ao traço de referência com fase móvel (3.8) e agitar. Envolver o balão em folha de alumínio e armazenar ao abrigo da luz.

3.9.3. Soluções de calibração

Transferir, respectivamente, 5,0 ; 10,0 ; 15,0 ; 20,0 e 25,0 ml de solução padrão intermédia (3.9.2) para baldes calibrados de 50 ml. Completar até ao traço de referência com fase móvel (3.8) e agitar. As soluções assim obtidas contêm, respectivamente, 1,2 ; 2,4 ; 3,6 ; 4,8 e 6,0 µg/ml de robenidina, devendo ser preparadas antes de cada uso.

#### 4. Equipamento

4.1. *Coluna de vidro*

Coluna de vidro ambarizado, equipada com torneira e reservatório de cerca de 150 ml, possuindo 10-15 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento.

4.2. *Agitador de laboratório com movimento de pulso*

4.3. *Evaporador rotativo*

4.4. *Aparelho para HPLC com detector de ultravioleta de comprimento de onda variável ou detector de díodos adequado para determinações na gama de comprimentos de onda entre 250-400 nm*

4.4.1. *Coluna para cromatografia líquida : 300 mm × 4 mm, com enchimento de C<sub>18</sub> de 10 µm, ou equivalente.*

4.5. *Filtro de fibra de vidro (Whatman GF/A ou equivalente)*

4.6. *Filtros de membrana de 0,22 µm*

4.7. *Filtros de membrana de 0,45 µm*

#### 5. Procedimento

*Nota* : A robenidina é fotossensível, devendo utilizar-se material de vidro ambarizado para todas as operações.

5.1. *Generalidades*

5.1.1. De modo a comprovar a ausência de robenidina e outras substâncias susceptíveis de interferir no processo, deve proceder-se à análise de uma amostra de alimento para animais (ensaio em branco).

5.1.2. Deve-se efectuar um ensaio de recuperação, mediante a análise da amostra do ensaio em branco (5.1.1), adicionada de uma quantidade conhecida de robenidina, semelhante à quantidade presente na amostra. Para obter uma concentração de robenidina de 60 mg/kg, transferir 3,0 ml de solução-mãe padrão (3.9.1) para um erlenmeyer de 250 ml. Evaporar a solução por recurso a uma corrente de azoto até obter um volume aproximado de 0,5 ml. Adicionar 15 g de alimento para animais em branco, misturar e esperar 10 minutos antes de iniciar a extracção (5.2).

*Nota* : Para os fins do presente método, a amostra utilizada no ensaio em branco deve ter uma composição semelhante à da amostra em análise e não deve acusar a presença de robenidina.

5.2. *Extracção*

Pesar, com aproximação a 0,01 g, cerca de 15 g de amostra preparada. Transferir para um erlenmeyer de 250 ml e adicionar 100,0 ml de metanol acidificado (3.2). Tapar e agitar durante 1 hora no agitador (4.2). Filtrar a solução num filtro de fibra de vidro (4.5) e recolher a totalidade do filtrado num erlenmeyer de 150 ml. Adicionar 7,5 g de crivo molecular (3.4), tapar e agitar durante 5 minutos. Filtrar imediatamente num filtro de fibra de vidro. Guardar esta solução para as operações de purificação (5.3).

### 5.3. Purificação

#### 5.3.1. Preparação da coluna de óxido de alumínio

Colocar um tampão de fibra de vidro na extremidade inferior de uma coluna de vidro (4.1), comprimindo-o com o auxílio de uma vareta de vidro. Pesar 11,0 g de óxido de alumínio preparado de acordo com 3.5. e transferi-lo para a coluna. Devem-se tomar precauções no sentido de minimizar a exposição ao ar no decurso destas operações. Bater levemente na extremidade inferior da coluna para depositar o óxido de alumínio.

#### 5.3.2. Purificação da amostra

Pipetar para a coluna 5,0 ml de extracto de amostra preparado de acordo com 5.2. Colocar a ponta da pipeta junto da parede da coluna e esperar que a solução seja absorvida pelo óxido de alumínio. Eluir a robenidina da coluna por recurso a 100 ml de metanol (3.1), a um fluxo de 2-3 ml/minuto, recolhendo o eluído num balão de fundo redondo de 250 ml. Evaporar à secura a solução de metanol, sob pressão reduzida a 40° C, com o auxílio de um evaporador rotativo (4.3). Dissolver o resíduo em 3-4 ml de fase móvel (3.8) e transferir quantitativamente para um balão graduado de 10 ml. Lavar o balão de fundo redondo com diversas porções de 1-2 ml de fase móvel, transferindo as mesmas para o balão graduado. Completar até ao traço de referência com o mesmo solvente e agitar. Filtrar uma alíquota num filtro de 0,45 µm (4.7). Guardar esta solução para a análise por HPLC (5.4).

### 5.4. Análise por HPLC

#### 5.4.1. Parâmetros

As condições que se seguem são fornecidas a título indicativo, podendo ser utilizadas outras condições que forneçam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (4.4.1)

Fase móvel para HPLC (3.8)

Fluxo: 1,5 a 2 ml/min

Comprimento de onda de detecção: 317 nm

Volume a injectar: 20 a 50 µl

Verificar a estabilidade do sistema cromatográfico mediante a injeção repetida da solução de calibração (3.9.3), que contém 3,6 µg/ml de robenidina, até obter picos com alturas (ou áreas) e tempos de retenção reproduzíveis.

#### 5.4.2. Curva de calibração

Injectar várias vezes cada solução de calibração (3.9.3) e medir a altura (ou área) dos picos correspondentes a cada concentração. Traçar uma curva de calibração, colocando a altura (ou área) média dos picos das soluções de calibração em ordenadas e as concentrações correspondentes, expressas em µg/ml, em abcissas.

#### 5.4.3. Solução de amostra

Injectar várias vezes o extracto de amostra (5.3.2), utilizando o mesmo volume utilizado para as soluções de calibração, e determinar a altura (ou área) média dos picos correspondentes à robenidina.

### 6. Cálculo dos resultados

Com base na altura (ou área) média dos picos da solução de amostra relativos à robenidina, determinar a concentração da mesma solução, expressa em µg/ml, por recurso à curva de calibração (5.4.2).

O teor de robenidina da amostra, w, expresso em mg/kg, é dado pela fórmula:

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

Em que:

c = concentração de robenidina da solução de amostra, expressa em µg/ml

m = massa da toma de ensaio, expressa em gramas.

### 7. Confirmação dos resultados

#### 7.1. Identidade

A identidade da substância a analisar pode ser confirmada por co-cromatografia ou por recurso a um detector de díodos, comparando os espectros do extracto de amostra e da solução de calibração (3.9.3) que contém 6 µg/ml de robenidina.

## 7.1.1. Co-cromatografia

Reforçar um extracto de amostra com a adição de uma quantidade adequada de solução de calibração (3.9.3). A quantidade de robenidina adicionada deve ser idêntica à quantidade de robenidina presumida no extracto de amostra.

Apenas a altura do pico correspondente à robenidina deverá exibir um aumento adequado, tendo em conta a quantidade adicionada e a diluição do extracto. A largura do pico a meia altura deverá ser igual a  $\pm 10\%$  da largura original.

## 7.1.2. Detecção com um detector de díodos

Os resultados são avaliados de acordo com os seguintes critérios :

- a) O comprimento de onda máximo de absorção do espectro da amostra e do padrão, registado no máximo do pico cromatográfico, deve ser igual com uma margem determinada pelo poder de resolução do sistema de detecção. No caso de um detector de díodos, esta margem é, em geral, de  $\pm 2$  nm.
- b) Entre 250 e 400 nm, os espectros da amostra e do padrão, registados no máximo dos picos cromatográficos, não devem diferir no que respeita às zonas do espectro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério é observado nos casos em que se encontrarem presentes os mesmos máximos e a diferença entre ambos os espectros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância da solução-padrão.
- c) Entre 250 e 400 nm, os espectros na zona crescente, no máximo e na zona decrescente do pico cromatográfico da amostra não devem diferir uns dos outros no que respeita às regiões do espectro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério é observado nos casos em que se encontrarem presentes os mesmos máximos e a diferença entre os espectros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do espectro do máximo do pico.

Se um dos referidos critérios não for observado, a presença da substância a analisar não pode ser confirmada.

## 7.2. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve exceder 10 % relativo ao resultado mais elevado, para teores de robenidina superiores a 15 mg/kg.

## 7.3. Recuperação

A taxa de recuperação da amostra em branco reforçada deve ser de, pelo menos, 85 %.

## 8. Resultados de um estudo de colaboração interlaboratorial

Num estudo de colaboração interlaboratorial promovido pela CEE, procedeu-se à análise por 12 laboratórios de 4 amostras de alimentos para aves de capoeira e coelhos, sob a forma de farinha e granulado. Para cada amostra, foram efectuadas análises em duplicado. Os resultados obtidos foram os seguintes :

	Aves de capoeira		Coelhos	
	Farinha	Granulado	Farinha	Granulado
MED (mg/kg)	27,00	27,99	43,6	40,1
S <sub>r</sub> (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV <sub>r</sub> (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S <sub>R</sub> (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV <sub>R</sub> (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Recup. (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S<sub>r</sub> = desvio-padrão da repetibilidade

CV<sub>r</sub> = coeficiente de variação da repetibilidade

S<sub>R</sub> = desvio-padrão da reprodutibilidade

CV<sub>R</sub> = coeficiente de variação da reprodutibilidade

## 2. DETERMINAÇÃO DO METILBENZOQUATO

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

#### 1. Objectivo e campo de aplicação

O presente método destina-se à determinação de metilbenzoquato em alimentos para animais. O limite inferior de determinação é de 1 mg/kg.

#### 2. Princípio

O metilbenzoquato é extraído da amostra por recurso a uma solução metanólica de ácido metanossulfónico. O extracto é purificado com diclorometano e por cromatografia de permuta iónica, seguindo-se nova purificação com diclorometano. O teor de metilbenzoquato é determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, utilizando um detector de ultravioleta.

#### 3. Reagentes

##### 3.1. Diclorometano

##### 3.2. Metanol de qualidade para HPLC.

##### 3.3. Fase móvel para HPLC

mistura de metanol (3.2) e água de qualidade para HPLC, 75 + 25 (V + V).

Filtrar num filtro de 0,22 µm (4.5) e desgaseificar a solução (nomeadamente por recurso a um banho de ultrassons durante 10 minutos).

##### 3.4. Solução de ácido metanossulfónico, $\sigma = 2\%$

Diluir com metanol (3.2) 20,0 ml de ácido metanossulfónico para 1 000 ml.

##### 3.5. Solução de ácido clorídrico, $\sigma = 10\%$

Diluir com água 100 ml de ácido clorídrico ( $\rho_{20}$  ca. 1,18 g/ml) para 1 000 ml.

##### 3.6. Resina de permuta catiónica Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh

Tratamento da resina antes do uso : agitar 100 g de resina em 500 ml de solução de ácido clorídrico (3.5) e aquecer à ebulição, agitando continuamente. Deixar arrefecer e decantar o ácido. Filtrar num filtro de papel, sob vácuo. Lavar a resina com duas porções de 500 ml de água, seguidas de 250 ml de metanol (3.2). Lavar a resina com uma nova porção de 250 ml de metanol e secar, mediante a passagem de uma corrente de ar através da resina presente no filtro. Guardar a resina num recipiente rolhado.

##### 3.7. Substância padrão : metilbenzoquato puro (7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-quinolona).

##### 3.7.1. Solução-mãe padrão de metilbenzoquato, 500 µg/ml

Pesar, com aproximação a 0,1 mg, 50 mg de substância padrão (3.7). Dissolver em solução de ácido metanossulfónico (3.4), num balão graduado de 100 ml. Completar até ao traço de referência e agitar.

##### 3.7.2. Solução padrão intermédia de metilbenzoquato, 50 µg/ml

Transferir 5,0 ml de solução-mãe padrão de metilbenzoquato (3.7.1) para um balão graduado de 50 ml. Completar até ao traço de referência com metanol (3.2) e agitar.

##### 3.7.3. Soluções de calibração

Transferir, respectivamente, 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 e 5,0 ml de solução padrão intermédia de metilbenzoquato (3.7.2) para balões calibrados de 25 ml. Completar até ao traço de referência com fase móvel (3.3) e agitar. As soluções assim obtidas possuem concentrações de metilbenzoquato de 2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 8,0 e 10,0 µg/ml, respectivamente, devendo ser preparadas antes de cada uso.

#### 4. Equipamento

##### 4.1. Agitador

- 4.2. *Evaporador rotativo*
- 4.3. *Coluna de vidro (250 mm × 15 mm) munida de torneira e reservatório de cerca de 200 ml*
- 4.4. *Aparelho para HPLC com detector de ultravioletas de comprimento de onda variável ou detector de díodos*
- 4.4.1. *Coluna para cromatografia líquida : 300 mm × 4 mm, com enchimento de C<sub>18</sub> de 10 µm ou equivalente.*
- 4.5. *Filtros de membrana de 0,22 µm*
- 4.6. *Filtros de membrana de 0,45 µm*

## 5. Procedimento

### 5.1. Generalidades

- 5.1.1. De modo a comprovar a ausência de metilbenzoato e outras substâncias susceptíveis de interferir no processo, deve-se proceder à análise de uma amostra de alimento para animais (ensaio em branco).
- 5.1.2. Deve-se efectuar um ensaio de recuperação, mediante a análise de uma amostra do ensaio em branco, adicionada de uma quantidade conhecida de metilbenzoato, semelhante à quantidade presente na amostra. Para obter uma concentração de metilbenzoato de 15 mg/kg, adicionar 600 µl de solução-mãe padrão (3.7.1) a 20 g de alimento para animais em branco, misturar e esperar 10 minutos antes de iniciar a extracção (5.2).

*Nota :* Para os fins do presente método, a amostra utilizada no ensaio em branco deve ter uma composição semelhante à da amostra em análise e não deve acusar a presença de benzoato de metilo.

### 5.2. Extracção

Pesar, com aproximação a 0,01 g, cerca de 20 g de amostra preparada e transferir para um erlenmeyer de 250 ml. Adicionar 100,0 ml de solução de ácido metanossulfónico (3.4) e agitar durante 30 minutos com o agitador (4.1). Filtrar a solução num filtro de papel e guardar a solução para a cromatografia da partição (5.3).

### 5.3. Partição líquido-líquido

Transferir 25,0 ml do filtrado obtido em (5.2) para uma ampola de decantação de 500 ml contendo 100 ml de solução de ácido clorídrico (3.5). Adicionar 100 ml de diclorometano (3.1) e agitar a ampola durante 1 minuto. Esperar a separação das camadas e escoar a camada inferior (diclorometano) para um balão de fundo redondo de 500 ml. Repetir a extracção da fase aquosa com duas novas porções de 40 ml de diclorometano e combinar os extractos resultantes com o primeiro extracto, no balão de fundo redondo. Evaporar o extracto de diclorometano à secura, no evaporador rotativo (4.2), a 40 °C, sob pressão reduzida. Dissolver o resíduo em 20-25 ml de metanol (3.2), tapar o balão e guardar a totalidade do extracto para a cromatografia de permuta iónica (5.4).

### 5.4. Cromatografia de permuta iónica

#### 5.4.1. Preparação da coluna de permuta catiónica

Colocar um tampão de fibra de vidro na extremidade inferior de uma coluna de vidro (4.3). Preparar uma suspensão de 5,0 g de resina de permuta catiónica tratada (3.6) em 50 ml de ácido clorídrico (3.5), verter na coluna de vidro e deixar depositar. Escoar o excesso de ácido, até o nível deste último se situar ligeiramente acima da superfície da resina, e lavar a coluna com água até o eluído apresentar reacção neutra ao tornesol. Verter na coluna 50 ml de metanol (3.2) e deixar escoar até à superfície da resina.

#### 5.4.2. Cromatografia em coluna

Com o auxílio de uma pipeta, transferir cuidadosamente para a coluna o extracto obtido em (5.3). Lavar o balão de fundo redondo com duas porções de 5-10 ml de metanol (3.2), transferindo as mesmas para a coluna. Deixar impregnar o extracto até à superfície da resina. Lavar a coluna com 50 ml de metanol, tomando precauções para que o fluxo não exceda 5 ml por minuto. Rejeitar o eluído. Eluir o metilbenzoato com 150 ml de solução de ácido metanossulfónico (3.4), recolhendo o eluído num erlenmeyer de 250 ml.

### 5.5. *Partição líquido-líquido*

Transferir para uma ampola de decantação de 1 litro o eluído de acordo com (5.4.2). Lavar o erlenmeyer com 5-10 ml de metanol (3.2) que se adicionam ao conteúdo da ampola de decantação. Adicionar 300 ml de solução de ácido clorídrico (3.5) e 130 ml de diclorometano (3.1). Agitar durante um minuto e esperar a separação das fases. Escoar a camada inferior (diclorometano) para um balão de fundo redondo de 500 ml. Repetir a extracção da fase aquosa com duas novas porções de 70 ml de diclorometano, combinando estes extractos com o primeiro, no balão de fundo redondo.

Evaporar à secura o extracto de diclorometano, no evaporador rotativo (4.2), a 40 °C, sob pressão reduzida. Dissolver o resíduo do balão em cerca de 5 ml de metanol (3.2) e transferir quantitativamente esta solução para um balão graduado de 10 ml. Lavar o balão de fundo redondo com duas novas porções de 1-2 ml de metanol e transferir para o balão graduado. Completar até ao traço de referência com metanol e agitar. Filtrar uma alíquota num filtro de membrana (4.6). Guardar esta solução para a análise por HPLC (5.6).

### 5.6. *Análise por HPLC*

#### 5.6.1. Parâmetros

As condições que se seguem são fornecidas a título indicativo, podendo ser utilizadas outras condições que forneçam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (4.4.1)

Fase móvel para HPLC: mistura metanol-água (3.3)

Fluxo: 1 a 1,5 ml/min

Comprimento de onda de detecção: 265 nm

Volume a injectar: 20 a 50 µl.

Verificar a estabilidade do sistema cromatográfico mediante a injeção repetida da solução de calibração (3.7.3), que contém 4 µg/ml de metilbenzoquato, até obter picos com alturas (ou áreas) e tempos de retenção reprodutíveis.

#### 5.6.2. Curvas de calibração

Injectar várias vezes cada solução de calibração (3.7.3) e medir a altura (ou área) dos picos correspondentes a cada concentração. Traçar uma curva de calibração, colocando a altura (ou área) média dos picos das soluções de calibração em ordenadas e as concentrações correspondentes, expressas em µg/ml, em abcissas.

#### 5.6.3. Solução de amostra

Injectar várias vezes o extracto de amostra (5.5), utilizando o mesmo volume utilizado para as soluções de calibração e determinar a altura (ou área) média dos picos correspondentes ao metilbenzoquato.

### 6. *Cálculo dos resultados*

Com base na altura (ou área) média dos picos de solução de amostra relativos ao metilbenzoquato, determinar a concentração da mesma solução, expressa em µg/ml, por recurso à curva de calibração (5.6.2).

O teor de metilbenzoquato da amostra,  $w$ , expresso em mg/kg, é dado pela fórmula:

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

Em que:

$c$  = concentração de metilbenzoquato da solução da amostra, expressa em µg/ml

$m$  = massa da toma de ensaio, expressa em gramas.

### 7. *Confirmação dos resultados*

#### 7.1. *Identidade*

A identidade da substância a analisar pode ser confirmada por co-cromatografia ou por recurso a um detector de díodos, comparando os espectros do extracto de amostra e da solução de calibração (3.9.3) que contém 10 µg/ml de metilbenzoquato.



## 7.1.1. Co-cromatografia

Reforçar um extracto da amostra com a adição de uma quantidade adequada de solução padrão intermédia (3.7.2). A quantidade de metilbenzoquato adicionada deve ser idêntica à quantidade de metilbenzoquato presumida no extracto de amostra.

Apenas a altura do pico correspondente ao metilbenzoquato deverá exibir um aumento adequado, tendo em conta a quantidade adicionada e a diluição do extracto. A largura do pico a meia altura deverá ser igual a  $\pm 10\%$  da largura original.

## 7.1.2. Detecção com um detector de díodos

Os resultados são avaliados de acordo com os seguintes critérios:

- a) O comprimento de onda máximo de absorção do espectro da amostra e do padrão, registado no máximo do pico cromatográfico, deve ser igual com uma margem determinada pelo poder de resolução do sistema de detecção. No caso de um detector de díodos, esta margem é, em geral, de  $\pm 2$  nm.
- b) Entre 220 e 350 nm, os espectros da amostra e do padrão, registados no máximo dos picos cromatográficos, não devem diferir no que respeita às zonas do espectro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério é observado nos casos em que se encontrarem presentes os mesmos máximos e a diferença entre ambos os espectros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância da solução-padrão.
- c) Entre 220 e 350 nm, os espectros na zona crescente, no máximo e na zona decrescente do pico cromatográfico da amostra não devem diferir uns dos outros no que respeita às regiões do espectro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério é observado nos casos em que se encontrarem presentes os mesmos máximos e a diferença entre os espectros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do espectro do máximo do pico.

Se um dos referidos critérios não for observado, a presença da substância a analisar não pode ser confirmada.

## 7.2. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve exceder 10 % relativo ao resultado mais elevado, para teores de metilbenzoquato compreendidos entre 4 e 20 mg/kg.

## 7.3. Recuperação

A taxa de recuperação da amostra em branco reforçada deve ser de, pelo menos, 90 %.

## 8. Resultados de um estudo de colaboração interlaboratorial

Procedeu-se à análise de 5 amostras por 10 laboratórios. Para cada amostra, foram efectuadas análises em duplicado.

## Resultados

	Branco	Farinha 1	Granulado 1	Farinha 2	Granulado 2
Media (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
rec. (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

n.d.: não detectado

$S_r$ : = desvio-padrão da repetibilidade

$CV_r$ : = coeficiente de variação da repetibilidade

$S_R$ : = desvio-padrão da reprodutibilidade

$CV_R$ : = coeficiente de variação da reprodutibilidade