

Decreto-Lei n.º 214/2001
de 2 de Agosto

A legislação aplicável aos princípios relativos à organização dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal refere que para análise das amostras de produtos destinados à alimentação animal são utilizados os métodos oficiais de análise definidos em norma portuguesa ou por força das decisões comunitárias, aprovados mediante portaria ou decreto-lei.

O método de análise para a determinação do teor de retinol (vitamina A) nos alimentos para animais, constante da Portaria n.º 816/89, de 14 de Setembro, que estabelece os métodos de análise para o controlo oficial dos alimentos para animais, e da norma portuguesa aplicável - NP 4051 -, deixou de ser considerado adequado face à evolução dos conhecimentos científicos e técnicos, importa pois adoptar outro método oficial mais fiável.

O presente diploma visa transpor para o direito interno as disposições comunitárias constantes da Directiva n.º 2000/45/CE, da Comissão, de 6 de Julho, que estabelece métodos de análise comunitários para a determinação da vitamina A, da vitamina E e do triptofano nos alimentos para animais, a utilizar aquando da realização das determinações analíticas previstas no controlo oficial da alimentação animal.

Foram ouvidos os órgãos de governo próprio das Regiões Autónomas.

Assim:

Nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 198.º da Constituição, o Governo decreta o seguinte:

Artigo 1.º

Adopção de métodos oficiais de análise

1 - É adoptado o método oficial de análise a utilizar na determinação do teor de vitamina A (retinol) nas pré-misturas e nos alimentos compostos para animais, no âmbito dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal, constante da parte A do anexo ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

2 - É adoptado o método oficial de análise a utilizar na determinação do teor de vitamina E nas pré-misturas e nos alimentos compostos para animais, no âmbito dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal, constante da parte B do anexo ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

3 - É adoptado o método oficial de análise a utilizar na determinação do teor de triptofano livre e total nos alimentos compostos para animais, no âmbito dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal, constante da parte C do anexo ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

Artigo 2.º

Revogação de métodos oficiais de análise

É revogado o método oficial de análise relativo ao doseamento do retinol (vitamina A) nas pré-misturas e nos alimentos compostos para animais, constante do anexo à Portaria n.º 816/89, de 14 de Setembro, que estabelece os métodos de análise para o controlo oficial dos alimentos para animais.

Artigo 3.º

Não aplicabilidade das disposições constantes em norma portuguesa

As disposições constantes da norma portuguesa NP 4051 (1990), relativa à determinação do teor de retinol (vitamina A), não são aplicáveis para efeitos dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 21 de Junho de 2001. - António Manuel de Oliveira Guterres - Luís Manuel Capoulas Santos.

Promulgado em 17 de Julho de 2001.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.Referendado em 19 de Julho de 2001.

O Primeiro-Ministro, António Manuel de Oliveira Guterres.

ANEXO

Parte A

Determinação da vitamina A

1 - Objectivo e campo de aplicação. - O método permite determinar a vitamina A (retinol) em alimentos compostos para animais e pré-misturas. A «vitamina A» determinada pelo presente método compreende todo o álcool retinílico trans e os seus isómeros cis. O teor de vitamina A é expresso em unidades internacionais (UI) por quilograma. Uma unidade internacional corresponde à actividade de 0,300 (mi)g de vitamina A totalmente trans na forma de álcool ou 0,344 (mi)g de vitamina A totalmente trans na forma de acetato ou 0,550 (mi)g de vitamina A totalmente trans na forma de palmitato.

O limite de determinação é 2000 UI de vitamina A por quilograma.

2 - Princípio. - Hidrólise da amostra com solução etanólica de hidróxido de potássio e extracção da vitamina A com éter de petróleo. Remoção do solvente por evaporação e dissolução do resíduo em metanol; se necessário, diluição até à concentração requerida. Determinação do teor de vitamina A por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de fase reversa, com um detector de UV ou de fluorescência. Os parâmetros cromatográficos são escolhidos de forma a não haver separação entre a vitamina A totalmente trans na forma de álcool e os seus isómeros cis.

3 - Reagentes:

3.1 - Etanol, (sigma) = 96%;

3.2 - Éter de petróleo com ponto de ebulição compreendido entre 40°C e 60°C;

3.3 - Metanol;

3.4 - Solução de hidróxido de potássio, (beta) = 50 g/100 ml;

3.5 - Solução de ascorbato de sódio, (beta) = 10 g/100 ml (v. as observações do ponto 7.7);

3.6 - Sulfureto de sódio, Na(índice 2)SxH(índice 2)O (x = 7 - 9);

3.6.1 - Solução de sulfureto de sódio, c = 0,5 mol/l em glicerol, (beta) = 120 g/l (para x = 9) (v. as observações do ponto 7.8);

3.7 - Solução de fenoltaleína, (beta) = 2 g/100 ml em etanol (3.1);

3.8 - 2-propanol;

3.9 - Fase móvel para a HPLC: mistura de metanol (3.3) e água, por exemplo 980 + 20 (v + v). A proporção exacta dependerá das características da coluna utilizada;

3.10 - Azoto isento de oxigénio;

3.11 - Vitamina A totalmente trans na forma de acetato, extrapura, de actividade certificada, por exemplo 2,80 x 10(elevado a 6)UI/g;

3.11.1 - Solução de reserva de vitamina A totalmente trans na forma de acetato: em balão aferido de 100 ml, pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 50 mg de vitamina A na forma de acetato (3.11). Homogeneizar. Dissolver com 2-propanol (3.8) e completar o volume com o mesmo solvente até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 1400 UI de vitamina A por mililitro. A concentração exacta é determinada conforme descrito em 5.6.3.1;

3.12 - Vitamina A totalmente trans na forma de palmitato: extrapura, de actividade certificada, por exemplo 1,80 x 10(elevado a 6) UI/g;

3.12.1 - Solução de reserva de vitamina A totalmente trans na forma de palmitato: em balão aferido de 100 ml, pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 80 mg de vitamina A na forma de palmitato (3.12). Dissolver com 2-propanol (3.8) e completar o volume com o mesmo

solvente até ao traço. Homogeneizar. A concentração nominal desta solução é de 1400 UI de vitamina A por mililitro. A concentração exacta é determinada conforme descrito em 5.6.3.2;

3.13 - 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (v. as observações do ponto 7.5).

4 - Equipamento:

4.1 - Evaporador rotativo sob vácuo;

4.2 - Material de vidro ambarizado;

4.2.1 - Balões de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer, com colo esmerilado e tampa;

4.2.2 - Balões aferidos de 10 ml, 25 ml, 100 ml e 500 ml, com colo estreito esmerilado e tampa;

4.2.3 - Ampolas de decantação, de 1000 ml, com colo esmerilado e tampa;

4.2.4 - Balões em forma de pêra, de 250 ml, com colo esmerilado e tampa;

4.3 - Condensador de Allihn, com camisa de 300 mm, com colo esmerilado e adaptador para alimentação de gás;

4.4 - Papel de filtro de pregas, com 185 mm de diâmetro, para a separação de fases (por exemplo, Schleicher & Schuell 597 HY 1/2);

4.5 - Equipamento de HPLC:

4.5.1 - Coluna para cromatografia líquida, com 250 mm x 4 mm, enchimento C(índice 18) de 5 (mi)m ou 10 (mi)m, ou equivalente (critério de eficiência: pico único para todos os isómeros do retinol nas condições de HPLC escolhidas);

4.5.2 - Detector de UV ou de fluorescência, com comprimento de onda regulável;

4.6 - Espectrofotómetro com células de quartzo de 10 mm;

4.7 - Banho de água equipado com um agitador magnético;

4.8 - Aparelho de extracção, constituído por (v. a figura 1):

4.8.1 - Cilindro de vidro de 1 l com colo esmerilado e tampa;

4.8.2 - Dispositivo de vidro com colo esmerilado, adaptável ao precedente, com uma tubuladura lateral e um tubo axial ajustável. O tubo ajustável termina em U na extremidade inferior e é afilado na extremidade oposta, para permitir a transferência da fase líquida superior no cilindro para uma ampola de decantação.

5 - Técnica.

Nota. - A vitamina A é sensível à luz (ultravioleta) e à oxidação. Efectuar todas as operações na ausência de luz (utilizando material de vidro ambarizado ou protegido com folha de alumínio) e de oxigénio (sob corrente de azoto). Durante a extracção, o ar acima do líquido deve ser substituído por azoto (para evitar excessos de pressão, soltar a tampa de vez em quando).

5.1 - Preparação da amostra. - Moer a amostra de forma a poder passá-la por um crivo de 1 mm, tomando as devidas precauções para evitar a formação de calor. Efectuar a moagem imediatamente antes da pesagem e saponificação, caso contrário, pode haver perdas de vitamina A.

5.2 - Saponificação. - Em função do teor de vitamina A, pesar, com a aproximação de 0,01 g, 2 g a 25 g de amostra num balão de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer (4.2.1). Adicionar sucessivamente, sob agitação, 130 ml de etanol (3.1), aproximadamente 100 mg de BHT (3.13), 2 ml da solução de ascorbato de sódio (3.5) e 2 ml da solução de sulfureto de sódio (3.6). Adaptar o condensador (4.3) ao balão e mergulhar este último no banho de água equipado com um agitador magnético (4.7). Aquecer até à ebulição e deixar em refluxo durante cinco minutos. Adicionar em seguida, pelo condensador (4.3), 25 ml da solução de hidróxido de potássio (3.4) e deixar em refluxo durante mais vinte e cinco minutos, com agitação e sob uma corrente ligeira de azoto. Lavar o condensador com cerca de 20 ml de água e arrefecer o conteúdo do balão até à temperatura ambiente.

5.3 - Extracção. - Transferir quantitativamente a solução de saponificação para uma ampola de decantação de 1000 ml (4.2.3) ou para o aparelho de extracção (4.8), lavando com um

volume total de 250 ml de água. Lavar o balão de saponificação sucessivamente com 25 ml de etanol (3.1) e 100 ml de éter de petróleo (3.2) e transferir os líquidos de lavagem para a ampola de decantação ou aparelho de extracção. A proporção de água e etanol na solução combinada assim constituída deve ser aproximadamente de 2:1.

Agitar vigorosamente durante dois minutos e deixar em repouso durante dois minutos.

5.3.1 - Extracção com uma ampola de decantação (4.2.3). - Depois da separação das fases (v. as observações do ponto 7.3), transferir a fase etérea para outra ampola de decantação (4.2.3). Repetir duas vezes a operação de extracção com 100 ml de éter de petróleo (3.2) e mais duas vezes com 50 ml de éter de petróleo (3.2).

Lavar os extractos combinados na ampola de decantação por duas vezes, com volumes de 100 ml de água cada, agitando suavemente por rotação (para evitar a formação de emulsões), e, em seguida, agitar vigorosamente com mais volumes de 100 ml de água até esta permanecer incolor à solução de fenolftaleína (3.7) (quatro lavagens são normalmente suficientes). Filtrar o extracto lavado por filtro de pregas de separação de fases (4.4) seco para um balão aferido de 500 ml (4.2.2), para remover alguma água ainda em suspensão. Lavar a ampola de decantação e o filtro com 50 ml de éter de petróleo (3.2), completar o volume com éter de petróleo (3.2) até ao traço e homogeneizar.

5.3.2 - Extracção com o aparelho de extracção (4.8). - Depois da separação das fases (v. as observações do ponto 7.3), substituir a tampa do cilindro de vidro (4.8.1) pelo dispositivo de vidro com esmerilado (4.8.2) e colocar a extremidade inferior em U do tubo ajustável de modo que fique imediatamente acima do nível da interface. Aumentar a pressão por alimentação de azoto através da tubuladura lateral e transferir a fase etérea superior para uma ampola de decantação de 1000 ml (4.2.3). Adicionar 100 ml de éter de petróleo (3.2) ao cilindro, tapar e agitar vigorosamente. Depois da separação das fases, transferir a fase superior para a ampola de decantação conforme descrito acima. Repetir a operação de extracção com mais 100 ml de éter de petróleo (3.2) e duas vezes com volumes de 50 ml de éter de petróleo (3.2), transferindo as fases etéreas para a ampola de decantação.

Lavar os extractos etéreos combinados conforme descrito em 5.3.1 e proceder conforme descrito no mesmo ponto.

5.4 - Preparação da solução da amostra para HPLC. - Pipetar uma alíquota da solução de éter de petróleo (obtida em 5.3.1 ou 5.3.2) para um balão em forma de pêra de 250 ml (4.2.4). Evaporar o solvente quase até à secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida (4.1), num banho a temperatura não superior a 40°C. Restabelecer a pressão atmosférica com uma alimentação de azoto (3.10) e retirar o balão do evaporador rotativo. Remover o solvente restante sob corrente de azoto (3.10) e dissolver imediatamente o resíduo com um volume conhecido (10 ml-100 ml) de metanol (3.3) (a concentração de vitamina A deve estar compreendida entre 5 UI/ml e 30 UI/ml).

5.5 - Determinação por HPLC. - Procede-se à separação da vitamina A numa coluna de fase reversa C(índice 18) (4.5.1) e determina-se a sua concentração com um detector de UV (325 nm) ou de fluorescência (excitação: 325 nm; emissão: 475 nm) (4.5.2).

Injectar uma alíquota (por exemplo, 20 (mi)l) da solução metanólica obtida em 5.4 e eluir com a fase móvel (3.9). Calcular a altura ou área média dos picos correspondente a várias injeções da mesma solução da amostra e a altura ou área média dos picos correspondente a várias injeções das soluções de calibração (5.6.2).

Condições de HPLC. - As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes:

Coluna de cromatografia líquida (4.5.1) - 250 mm x 4 mm, enchimento C(índice 18) de 5 (mi)m ou 10 (mi)m, ou equivalente;

Fase móvel (3.9) - mistura de metanol (3.3) e água, por exemplo 980 + 20 (v + v);

Fluxo - 1-2 ml/minutos;

Detector (4.5.2) - detector de UV (325 nm) ou de fluorescência (excitação - 325 nm; emissão - 475 nm).

5.6 - Calibração:

5.6.1 - Preparação das soluções-padrão de trabalho. - Pipetar 20 ml da solução de reserva de vitamina A na forma de acetato (3.11.1) ou 20 ml da solução de reserva de vitamina A na forma de palmitato (3.12.1) para um balão de 500 ml de fundo plano ou de Erlenmeyer (4.2.1) e efectuar a hidrólise conforme descrito em 5.2, mas sem adicionar BHT. Proceder de seguida à extracção com éter de petróleo (3.2) conforme descrito em 5.3 e completar o volume com éter de petróleo (3.2) até perfazer 500 ml. Evaporar 100 ml do extracto obtido no evaporador rotativo (v. 5.4) quase até à secura, remover o solvente restante sob corrente de azoto (3.10) e redissolver o resíduo com 10,0 ml de metanol (3.3). A concentração nominal desta solução é de 560 UI de vitamina A por mililitro. A concentração exacta é determinada conforme descrito em 5.6.3.3. Preparar a solução-padrão de trabalho imediatamente antes da sua utilização.

Pipetar 2,0 ml desta solução-padrão de trabalho para um balão aferido de 20 ml, completar o volume com metanol (3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal desta solução-padrão de trabalho diluída é de 56 UI de vitamina A por mililitro.

5.6.2 - Preparação das soluções de calibração e traçado da curva de calibração. - Pipetar 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml e 10,0 ml da solução-padrão de trabalho diluída para uma série de balões aferidos de 20 ml, completar o volume com metanol (3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal destas soluções é de 2,8 UI, 5,6 UI, 14,0 UI e 28,0 UI de vitamina A por mililitro.

Injectar vários volumes de 20 (mi)l de cada solução de calibração e determinar as alturas ou áreas médias dos picos. Traçar uma curva de calibração com base nas alturas ou áreas médias dos picos e nos resultados obtidos na padronização no ultravioleta (5.6.3.3).

5.6.3 - Padronização das soluções-padrão no UV:

5.6.3.1 - Solução de reserva de vitamina A na forma de acetato. - Pipetar 2,0 ml da solução de reserva de vitamina A na forma de acetato (3.11.1) para um balão aferido de 50 ml (4.2.2) e completar o volume com 2-propanol (3.8) até ao traço. Homogeneizar. A concentração nominal desta solução é de 56 UI de vitamina A por mililitro. Pipetar 3,0 ml desta solução diluída de vitamina A na forma de acetato para um balão aferido de 25 ml e completar o volume com 2-propanol (3.8) até ao traço. Homogeneizar. A concentração nominal desta solução é de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Traçar o espectro de UV desta solução no espectrofotómetro (4.6), entre 300 nm e 400 nm, em relação ao 2-propanol (3.8). O máximo de absorção deve estar compreendido entre 325 nm e 327 nm.

Cálculo do teor de vitamina A:

UI de vitamina A/ml = $E(\text{índice } 326) \times 19,0$.

($E(1\%)/(1 \text{ cm})$ da vitamina A na forma de acetato = 1530 nm a 326 nm, em 2-propanol.)

5.6.3.2 - Solução de reserva de vitamina A na forma de palmitato. - Pipetar 2,0 ml da solução de reserva de vitamina A na forma de palmitato (3.12.1) para um balão aferido de 50 ml (4.2.2) e completar o volume com 2-propanol (3.8) até ao traço. Homogeneizar. A concentração nominal desta solução é de 56 UI de vitamina A por mililitro. Pipetar 3,0 ml desta solução diluída de vitamina A na forma de palmitato para um balão aferido de 25 ml e completar o volume com 2-propanol (3.8) até ao traço. Homogeneizar. A concentração nominal desta solução é de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Traçar o espectro de UV desta solução no espectrofotómetro (4.6), entre 300 nm e 400 nm, em relação ao 2-propanol (3.8). O máximo de absorção deve estar compreendido entre 325 nm e 327 nm.

Cálculo do teor de vitamina A:

UI de vitamina A/ml = $E(\text{índice } 326) \times 19,0$.

($E(1\%)/(1 \text{ cm})$ da vitamina A na forma de palmitato = 957 nm a 326 nm, em 2-propanol.)

5.6.3.3 - Solução-padrão de trabalho de vitamina A. - Pipetar 3,0 ml da solução-padrão de trabalho não diluída de vitamina A, preparada conforme descrito em 5.6.1, para um balão aferido de 50 ml (4.2.2) e completar o volume com 2-propanol (3.8) até ao traço. Homogeneizar. Pipetar 5,0 ml desta solução para um balão aferido de 25 ml e completar o volume com 2-propanol (3.8) até ao traço. Homogeneizar. A concentração nominal desta solução é de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Traçar o espectro de UV desta solução no espectrofotómetro (4.6), entre 300 nm e 400 nm, em relação ao 2-propanol (3.8). O máximo de absorção deve estar compreendido entre 325 nm e 327 nm.

Cálculo do teor de vitamina A:

UI de vitamina A/ml = E(índice 325) x 18,3.

(E (1%)/(1 cm) da vitamina A na forma de álcool = 1821 nm a 325 nm, em 2-propanol.)

6 - Cálculo dos resultados. - A partir da altura ou área média dos picos da vitamina A da solução da amostra, determinar a concentração desta em UI/ml com base na curva de calibração (5.6.2).

O teor de vitamina A, w, da amostra, expresso em UI/kg, é dado pela seguinte fórmula:

$$w = \left\{ \frac{500 (\text{beta}) V(\text{índice } 2) 1000}{[V(\text{índice } 1) m]} \right\} (\text{UI/kg})$$

em que:

(beta) = concentração, em UI/ml, de vitamina A da solução da amostra (5.4);

V(índice 1) = volume, em mililitros, de solução da amostra (5.4);

V(índice 2) = volume, em mililitros, da alíquota tomada em 5.4;

m = massa, em gramas, da toma de amostra analisada.

7 - Observações:

7.1 - No caso das amostras com baixas concentrações de vitamina A, pode ser útil combinar os extractos etéreos de duas saponificações (quantidade pesada: 25 g) numa única solução da amostra para a determinação por HPLC.

7.2 - A toma de amostra utilizada na análise não deve conter mais de 2 g de matérias gordas.

7.3 - Se não se der a separação de fases, adicionar aproximadamente 10 ml de etanol (3.1), para desfazer a emulsão.

7.4 - No caso do óleo de fígado de bacalhau e outras matérias gordas puras, o tempo de saponificação deve ser aumentado para 45-60 minutos.

7.5 - Em vez de BHT, pode utilizar-se hidroquinona.

7.6 - É possível separar os isómeros do retinol (com uma coluna de fase normal).

7.7 - Em vez da solução de ascorbato de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 150 mg de ácido ascórbico.

7.8 - Em vez da solução de sulfureto de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 50 mg de EDTA.

8 - Repetibilidade. - A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas para a mesma amostra não deve exceder 15% do maior dos valores.

9 - Resultados de um estudo interlaboratorial (ver nota 1):

(ver quadro no documento original)

(nota 1) Organizado pelo grupo de trabalho «Alimentos para animais» do Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten (VDLUFA).

(ver notas no documento original)

Figura 1

Aparelho de extracção (4.8)

(ver figura no documento original)

Parte B

Determinação da vitamina E1 - Objectivo e campo de aplicação. - O método permite determinar a vitamina E em alimentos compostos para animais e pré-misturas. O teor de

vitamina E é expresso em miligramas de acetato de DL-(alfa)-tocoferol por quilograma. 1 mg de acetato de DL-(alfa)-tocoferol corresponde a 0,91 mg de DL-(alfa)-tocoferol (vitamina E). O limite de determinação é de 2 mg de vitamina E por quilograma.

2 - Princípio. - Hidrólise da amostra com solução etanólica de hidróxido de potássio e extracção da vitamina E com éter de petróleo. Remoção do solvente por evaporação e dissolução do resíduo em metanol; se necessário, diluição até à concentração requerida. Determinação do teor de vitamina E por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de fase reversa, com um detector de fluorescência ou de UV.

3 - Reagentes:

3.1 - Etanol, (sigma) = 96%;

3.2 - Éter de petróleo com ponto de ebulição compreendido entre 40°C e 60°C;

3.3 - Metanol;

3.4 - Solução de hidróxido de potássio, (beta) = 50 g/100 ml;

3.5 - Solução de ascorbato de sódio, (beta) = 10 g/100 ml (v. as observações do ponto 7.7);

3.6 - Sulfureto de sódio, Na(índice 2)SxH(índice 2)O (x = 7-9);

3.6.1 - Solução de sulfureto de sódio, c = 0,5 mol/l em glicerol, (beta) = 120 g/l (para x = 9) (v. as observações do ponto 7.8);

3.7 - Solução de fenoltaleína, (beta) = 2 g/100 ml em etanol (3.1);

3.8 - Fase móvel para a HPLC: mistura de metanol (3.3) e água, por exemplo 980 + 20 (v + v). A proporção exacta dependerá das características da coluna utilizada;

3.9 - Azoto isento de oxigénio;

3.10 - Acetato de DL-(alfa)-tocoferol, extrapuro, de actividade certificada:

3.10.1 - Solução de reserva de acetato de DL-(alfa)-tocoferol: em balão aferido de 100 ml, pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 100 mg de acetato de DL-(alfa)-tocoferol (3.10). Dissolver com etanol (3.1) e completar o volume com o mesmo solvente até ao traço. Homogeneizar. 1 ml desta solução contém 1 mg de acetato de DL-(alfa)-tocoferol. (Padronização no UV: v. ponto 5.6.1.3; estabilização: v. as observações do ponto 7.4);

3.11 - DL-(alfa)-tocoferol, extrapuro, de actividade certificada:

3.11.1 - Num balão aferido de 100 ml, pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 100 mg de DL-(alfa)-tocoferol (3.10). Dissolver com etanol (3.1) e completar o volume com o mesmo solvente até ao traço. Homogeneizar. 1 ml desta solução contém 1 mg de DL-(alfa)-tocoferol (padronização no UV: v. ponto 5.6.2.3; estabilização: v. as observações do ponto 7.4);

3.12 - 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (v. as observações do ponto 7.5).

4 - Equipamento:

4.1 - Evaporador rotativo sob vácuo;

4.2 - Material de vidro ambarizado:

4.2.1 - Balões de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer, com colo esmerilado e tampa;

4.2.2 - Balões aferidos de 10 ml, 25 ml, 100 ml e 500 ml, com colo estreito esmerilado e tampa;

4.2.3 - Ampolas de decantação, de 1000 ml, com colo esmerilado e tampa;

4.2.4 - Balões em forma de pêra, de 250 ml, com colo esmerilado;

4.3 - Condensador de Allihn, com camisa de 300 mm, colo esmerilado e adaptador para alimentação de gás;

4.4 - Papel de filtro de pregas, com 185 mm de diâmetro, para a separação de fases (por exemplo, Schleicher & Schuell 597 HY 1/2);

4.5 - Equipamento de HPLC:

4.5.1 - Coluna para cromatografia líquida com 250 mm x 4 mm com enchimento de 5(mi)m ou 10(mi)m, ou equivalente;

4.5.2 - Detector de fluorescência ou de UV, com comprimento de onda regulável;

4.6 - Espectrofotómetro com células de quartzo de 10 mm;

4.7 - Banho de água equipado com um agitador magnético;

4.8 - Aparelho de extracção, constituído por (v. a figura 1):

4.8.1 - Cilindro de vidro de 1l com colo esmerilado e tampa;

4.8.2 - Dispositivo de vidro com colo esmerilado, adaptável ao precedente, com uma tubuladura lateral e um tubo axial ajustável. O tubo ajustável termina em U na extremidade inferior e é afilado na extremidade oposta para permitir a transferência da fase líquida superior do cilindro para uma ampola de decantação.

5 - Técnica.

Nota. - A vitamina E é sensível à luz (ultravioleta) e à oxidação. Efectuar todas as operações na ausência de luz (utilizando material de vidro ambarizado ou protegido com folha de alumínio) e de oxigénio (sob corrente de azoto). Durante a extracção, o ar acima do líquido deve ser substituído por azoto (para evitar excessos de pressão, soltar a tampa de vez em quando).

5.1 - Preparação da amostra. - Moer a amostra de forma a poder passá-la por um crivo de 1 mm, tomando as devidas precauções para evitar a formação de calor. Efectuar a moagem imediatamente antes da pesagem e saponificação; caso contrário, pode haver perdas de vitamina E.

5.2 - Saponificação. - Em função do teor de vitamina E, pesar com a aproximação de 0,01 g, 2 g a 25 g de amostra num balão de fundo plano ou Erlenmeyer de 500 ml (4.2.1). Adicionar sucessivamente, sob agitação, 130 ml de etanol (3.1), aproximadamente 100 mg de BHT (3.12), 2 ml da solução de ascorbato de sódio (3.5) e 2 ml da solução de sulfureto de sódio (3.6). Adaptar o condensador (4.3) ao balão e mergulhar este último no banho de água equipado com um agitador magnético (4.7). Aquecer até à ebulição e deixar em refluxo durante cinco minutos. Adicionar em seguida, pelo condensador (4.3), 25 ml da solução de hidróxido de potássio (3.4) e deixar em refluxo durante mais vinte e cinco minutos, com agitação e sob uma corrente ligeira de azoto. Lavar o condensador com cerca de 20 ml de água e arrefecer o conteúdo do balão até à temperatura ambiente.

5.3 - Extracção. - Transferir quantitativamente a solução de saponificação para uma ampola de decantação de 1000 ml (4.2.3) ou para o aparelho de extracção (4.8), lavando com um volume total de 250 ml de água. Lavar o balão de saponificação sucessivamente com 25 ml de etanol (3.1) e 100 ml de éter de petróleo (3.2) e transferir os líquidos de lavagem para a ampola de decantação ou aparelho de extracção. A proporção de água e etanol na solução combinada assim constituída deve ser aproximadamente de 2:1. Agitar vigorosamente durante dois minutos e deixar em repouso durante dois minutos.

5.3.1 - Extracção com uma ampola de decantação (4.2.3). - Depois da separação das fases (v. as observações do ponto 7.3), transferir a fase etérea para outra ampola de decantação (4.2.3). Repetir duas vezes a operação de extracção com 100 ml de éter de petróleo (3.2) e mais duas vezes com 50 ml de éter de petróleo (3.2).

Lavar os extractos combinados na ampola de decantação por duas vezes, com volumes de 100 ml de água cada, agitando suavemente por rotação (para evitar a formação de emulsões), e, em seguida, agitar vigorosamente com mais volumes de 100 ml de água até esta permanecer incolor à solução de fenoltaleína (3.7) (quatro lavagens são normalmente suficientes). Filtrar o extracto lavado por filtro de pregas de separação de fases (4.4) seco para um balão aferido de 500 ml (4.2.2), para remover alguma água ainda em suspensão. Lavar a ampola de decantação e o filtro com 50 ml de éter de petróleo (3.2), completar o volume com éter de petróleo (3.2) até ao traço e homogeneizar.

5.3.2 - Extracção com aparelho de extracção (4.8). - Depois da separação das fases (v. as observações do ponto 7.3), substituir a tampa do cilindro de vidro (4.8.1) pelo dispositivo de vidro com esmerilado (4.8.2) e colocar a extremidade inferior em U do tubo ajustável de modo a que fique imediatamente acima do nível da interface. Aumentar a pressão por

alimentação de azoto através da tubuladura lateral e transferir a fase etérea superior para uma ampola de decantação de 1000 ml (4.2.3). Adicionar 100 ml de éter de petróleo (3.2) ao cilindro, tapar e agitar vigorosamente. Depois da separação das fases, transferir a fase superior para a ampola de decantação conforme descrito acima. Repetir a operação de extracção com mais 100 ml de éter de petróleo (3.2) e duas vezes com volumes de 50 ml de éter de petróleo (3.2), transferindo as fases etéreas para a ampola de decantação.

Lavar os extractos etéreos combinados conforme descrito em 5.3.1 e proceder conforme descrito no mesmo ponto.

5.4 - Preparação da solução da amostra para HPLC. - Pipetar uma alíquota da solução de éter de petróleo (obtida em 5.3.1 ou 5.3.2) para um balão em forma de pêra de 250 ml (4.2.4). Evaporar o solvente quase até à secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida (4.1), num banho a temperatura não superior a 40°C. Restabelecer a pressão atmosférica com uma alimentação de azoto (3.9) e retirar o balão do evaporador rotativo. Remover o solvente restante sob uma corrente de azoto (3.9) e dissolver imediatamente o resíduo com um volume conhecido (10 ml-100 ml) de metanol (3.3) (a concentração de DL-(alfa)-tocoferol deve estar compreendida entre 5 (mi)g/ml e 30 (mi)g/ml).

5.5 - Determinação por HPLC. - Procede-se à separação da vitamina E numa coluna de fase reversa C(índice 18) (4.5.1) e determina-se a sua concentração com um detector de fluorescência (excitação: 295 nm; emissão: 330 nm) ou de UV (292 nm) (4.5.2).

Injectar uma alíquota (por exemplo, 20(mi)l) da solução metanólica obtida em 5.4 e eluir com a fase móvel (3.8). Calcular a altura ou área média dos picos correspondente a várias injeções da mesma solução da amostra e a altura ou área média dos picos correspondente a várias injeções das soluções de calibração (5.6.2).

Condições de HPLC. - As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes: Coluna de cromatografia líquida (4.5.1) - 250 mm x 4mm, enchimento C(índice 18) de 5(mi)m ou 10(mi)m, ou equivalente;

Fase móvel (3.8) - mistura de metanol (3.3) e água, por exemplo 980 + 20 (v + v);

Fluxo - 1-2 ml/minutos;

Detector (4.5.2) - detector de fluorescência (excitação: 295 nm; emissão - 330 nm) ou detector de UV (292 nm).

5.6 - Calibração (acetato de DL-(alfa)-tocoferol ou DL-(alfa)-tocoferol):

5.6.1 - Padrão de acetato de DL-(alfa)-tocoferol:

5.6.1.1 - Preparação da solução padrão de trabalho. - Pipetar 25 ml da solução de reserva de acetato de DL-(alfa)-tocoferol (3.10.1) para um balão de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer (4.2.1) e efectuar a hidrólise conforme descrito em 5.2. Proceder de seguida à extracção com éter de petróleo (3.2) conforme descrito em 5.3 e completar o volume com éter de petróleo até perfazer 500 ml. Evaporar 25 ml do extracto obtido no evaporador rotativo (v. 5.4) quase até à secura, remover o solvente restante com uma corrente de azoto (3.9) e redissolver o resíduo com 25,0 ml de metanol (3.3). A concentração nominal desta solução é 45,5 (mi)g de DL-(alfa)-tocoferol/ml, equivalente a 50 (mi)g de acetato de DL-(alfa)-tocoferol/ml. Preparar a solução padrão de trabalho imediatamente antes da sua utilização.

5.6.1.2 - Preparação das soluções de calibração e traçado da curva de calibração. - Pipetar 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml da solução padrão de trabalho para uma série de balões aferidos de 20 ml, completar o volume com metanol (3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal destas soluções é de 2,5, 5,0, 10,0 e 25,0 g de acetato de DL-(alfa)-tocoferoil/ml, equivalentes a 2,28, 4,55, 9,10 e 22,8 (mi)g de DL-(alfa)-tocoferol/ml.

Injectar vários volumes de 20(mi)l de cada solução de calibração e determinar as alturas ou áreas médias dos picos. Traçar uma curva de calibração com base nas alturas ou áreas médias dos picos.

5.6.1.3 - Padronização da solução de reserva de acetato de DL-(alfa)-tocoferol (3.10.1) no UV. - Diluir com etanol, 5,0 ml da solução de reserva de acetato de DL-(alfa)-tocoferol (3.10.1) até perfazer 25,0 ml e traçar o espectro de UV desta solução no espectrofotómetro (4.6), entre 250 nm e 320 nm, em relação ao etanol (3.1).

O máximo de absorção deve situar-se nos 284 nm:

$E(1\%)/(1\text{ cm}) = 43,6$ a 284 nm, em etanol.

Para esta diluição deve obter-se uma extinção compreendida entre 0,84 e 0,88.

5.6.2 - Padrão de DL-(alfa)-tocoferol:

5.6.2.1 - Preparação da solução padrão de trabalho. - Pipetar 2 ml da solução de reserva de DL-(alfa)-tocoferol (3.11.1) para um balão aferido de 50 ml, dissolver com metanol (3.3) e completar o volume com metanol até ao traço. Homogeneizar. A concentração nominal desta solução é 40 (mi)g de DL-(alfa)-tocoferol/ml, equivalente a 44,0 (mi)g de acetato de DL-(alfa)-tocoferol/ml. Preparar a solução padrão de trabalho imediatamente antes da sua utilização.

5.6.2.2 - Preparação das soluções de calibração e traçado da curva de calibração. - Pipetar 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml da solução padrão de trabalho para uma série de balões aferidos de 20 ml, completar o volume com metanol (3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal destas soluções é de 2,0, 4,0, 8,0 e 20,0 (mi)g de DL-(alfa)-tocoferol/ml, equivalentes a 2,20, 4,40, 8,79 e 22,0 (mi)g de acetato de DL-(alfa)-tocoferol/ml.

Injectar vários volumes de 20(mi)l de cada solução de calibração e determinar as alturas ou áreas médias dos picos. Traçar uma curva de calibração com base nas alturas ou áreas médias dos picos.

5.6.2.3 - Padronização da solução de reserva de DL-(alfa)-tocoferol (3.11.1) no UV. - Diluir, com etanol, 2,0 ml da solução de reserva de DL-(alfa)-tocoferol (3.11.1) até perfazer 25,0 ml e traçar o espectro de UV desta solução no espectrofotómetro (4.6), entre 250 nm e 320 nm, em relação ao etanol (3.1).

O máximo de absorção deve situar-se nos 292 nm:

$E(1\%)/(1\text{ cm}) = 75,8$ a 292 nm, em etanol.

Para esta diluição deve obter-se uma extinção de 0,6.

6 - Cálculo dos resultados. - A partir da altura ou área média dos picos da vitamina E da solução da amostra, determinar a concentração desta em (mi)g/ml (expressa em acetato de (alfa)-tocoferol) com base na curva de calibração (5.6.1.2 ou 5.6.2.2).

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

$w = \{[500(\text{beta}) V(\text{índice } 2)]/[V(\text{índice } 1)m]\}(\text{mg/kg})$

em que:

(beta) = concentração, em (mi)g/ml, de vitamina E da solução da amostra (5.4);

V(índice 1) = volume, em mililitros, de solução da amostra (5.4);

V(índice 2) = volume, em mililitros, da alíquota tomada em 5.4;

m = massa, em gramas, da toma de amostra analisada.

7 - Observações:

7.1 - No caso das amostras com baixas concentrações de vitamina E, pode ser útil combinar os extractos etéreos de duas saponificações (quantidade pesada: 25 g) numa única solução da amostra para a determinação por HPLC.

7.2 - A toma de amostra utilizada na análise não deve conter mais de 2 g de matérias gordas.

7.3 - Se não se der a separação de fases, adicionar aproximadamente 10 ml de etanol (3.1), para desfazer a emulsão.

7.4 - Depois das medições espectrofotométricas efectuadas com a solução de acetato de DL-(alfa)-tocoferol ou de DL-(alfa)-tocoferol de acordo com 5.6.1.3 ou 5.6.2.3, respectivamente, adicionar à solução (3.10.1 ou 3.10.2) cerca de 10 mg de BHT (3.12) e conservar a mesma em frigorífico (prazo de validade: máximo quatro semanas).

7.5 - Em vez de BHT, pode utilizar-se hidroquinona.

7.6 - É possível separar os isómeros (alfa)-, (beta)-, X- e (alfa)-tocoferol com uma coluna de fase normal.

7.7 - Em vez da solução de ascorbato de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 150 mg de ácido ascórbico.

7.8 - Em vez da solução de sulfureto de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 50 mg de EDTA.

8 - Repetibilidade. - A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas para a mesma amostra não deve exceder 15% do maior dos valores.

9 - Resultados de um estudo interlaboratorial (ver nota 1):

(ver quadro no documento original)

(nota 1) Organizado pelo grupo de trabalho «Alimentos para animais» do Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten (VDLUFA).

(ver notas no documento original)

Figura 1

Aparelho de extracção (4.8)

(ver figura no documento original)

Parte C

Determinação do triptofano

1 - Objectivo e campo de aplicação. - O método permite determinar o triptofano livre e total em alimentos para animais. As formas D e L não são distinguidas.

2 - Princípio. - Para a determinação do triptofano total, procede-se à hidrólise da amostra em condições alcalinas com uma solução saturada de hidróxido de bário que se aquece em seguida a 110°C durante vinte horas. Depois de concluída a hidrólise, adiciona-se um padrão interno.

Para a determinação do triptofano livre, efectua-se uma extracção da amostra em condições moderadamente ácidas na presença de um padrão interno.

Determina-se o triptofano e o padrão interno no hidrolisado ou no extracto, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com um detector de fluorescência.

3 - Reagentes:

3.1 - Água bidestilada ou de qualidade equivalente (condutividade inferior a 10 (mi)S/cm);

3.2 - Substância padrão: triptofano (grau de pureza/teor $\geq 99\%$) seco sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo;

3.3 - Padrão interno: (alfa)-metiltriptofano (grau de pureza/teor $\geq 99\%$) seco sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo;

3.4 - Hidróxido de bário octa-hidratado [tomar as devidas precauções para não expor excessivamente o Ba(OH)(índice 2).8H(índice 2)O ao ar, por forma a evitar a formação de BaCO(índice 3), que poderia perturbar a determinação] (v. as observações do ponto 9.3);

3.5 - Hidróxido de sódio;

3.6 - Ácido ortofosfórico, w = 85%;

3.7 - Ácido clorídrico, p(índice 20) = 1,19 g/ml;

3.8 - Metanol para HPLC 3.9 - éter de petróleo com ponto de ebulição compreendido entre 40°C e 60°C;

3.10 - Solução de hidróxido de sódio, c = 1 mol/l: dissolver 40,0 g de NaOH (3.5) em água e completar o volume com água (3.1) até perfazer 1 l;

3.11 - Ácido clorídrico, c = 6 mol/l: misturar 492 ml de HCl (3.7) com água (3.1) até perfazer 1 l;

3.12 - Ácido clorídrico, c = 1 mol/l: misturar 82 ml de HCl (3.7) com água (3.1) até perfazer 1 l;

3.13 - Ácido clorídrico, $c = 0,1 \text{ mol/l}$: misturar 8,2 ml de HCl (3.7) com água (3.1) até perfazer 1 l;

3.14 - Ácido ortofosfórico, $c = 0,5 \text{ mol/l}$: misturar 34 ml de ácido ortofosfórico (3.6) com água (3.1) até perfazer 1 l;

3.15 - Solução concentrada de triptofano, $c = 2,50 \text{ (mi)mol/ml}$ (3.2): em balão aferido de 500 ml, dissolver 0,2553 g de triptofano (3.2) em ácido clorídrico (3.13) e completar o volume com o mesmo ácido até ao traço. Homogeneizar. Conservar a -18°C no máximo durante quatro semanas;

3.16 - Solução concentrada do padrão interno, $c = 2,50 \text{ (mi)mol/ml}$: em balão aferido de 500 ml, dissolver 0,2728 g de (alfa)-metiltryptofano (3.3) em ácido clorídrico (3.13) e completar o volume com o mesmo ácido até ao traço. Homogeneizar. Conservar a -18°C no máximo durante quatro semanas;

3.17 - Solução - padrão de calibração de triptofano e do padrão interno: tomar 2,00 ml da solução concentrada de triptofano (3.15) e 2,00 ml da solução concentrada do padrão interno ((alfa)-metiltryptofano) (3.16). Diluir com água (3.1) e metanol (3.8) até aproximadamente o mesmo volume e aproximadamente a mesma concentração de metanol (10%-30%) que o hidrolisado pronto.

Esta solução é preparada imediatamente antes da sua utilização.

Proteger da luz solar directa durante a preparação;

3.18 - Ácido acético;

3.19 - 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol;

3.20 - Etanolamina > 98%;

3.21 - Solução de 1 g de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (3.19) em 100 ml de metanol (3.8);

3.22 - Fase móvel para a HPLC: 3,00 g de ácido acético (3.18) + 900 ml de água (3.1) + 50,0 ml da solução 1 g/100 ml (3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (3.19) em metanol (3.8). Ajustar o pH a 5,00 com etanolamina (3.20). Completar o volume com água (3.1) até perfazer 1000 ml.

4 - Equipamento:

4.1 - Equipamento de HPLC com um detector de fluorescência;

4.2 - Coluna para cromatografia líquida com 125 mm x 4 mm e enchimento C(índice 18) com granulometria de 3 (mi)m, ou equivalente;

4.3 - Medidor de pH;

4.4 - Frasco de polipropileno de 125 ml, com colo largo e tampa de rosca;

4.5 - Filtro de membrana de 0,45 μm ;

4.6 - Autoclave, 110 ((mais ou menos) 2°C), 1,4 ((mais ou menos) 0,1) bar;

4.7 - Agitador mecânico ou magnético;

4.8 - Agitador tipo Vortex.

5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra. - Moer a amostra de modo a passá-la por um crivo de 0,5 mm. As amostras com teor de humidade elevado deverão ser secas sob corrente de ar a uma temperatura máxima de 50°C , ou liofilizadas, antes da moagem. Se o seu teor de gordura bruta for elevado, as amostras terão de ser submetidas a uma extracção com éter de petróleo (3.9) antes da moagem.

5.2 - Determinação do triptofano livre (extracção). - Pesar num balão de fundo plano, com a aproximação de 1 mg, uma quantidade apropriada (1 g-5 g) da amostra previamente preparada (5.1). Adicionar 100,00 ml de ácido clorídrico $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (3.13) e 5,00 ml da solução concentrada do padrão interno (3.16). Agitar durante sessenta minutos em agitador mecânico ou magnético (4.7). Deixar depositar o sedimento e pipetar 10,0 ml da solução sobrenadante para um matraz. Adicionar 5 ml de ácido ortofosfórico $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Ajustar o pH a 3 com a solução de hidróxido de sódio $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (3.10). Adicionar metanol (3.8) suficiente

para obter uma concentração de metanol no volume final compreendida entre 10% e 30%. Transferir para um balão aferido de volume adequado e diluir com água até ao volume necessário para a cromatografia [aproximadamente o mesmo volume que a solução padrão de calibração (3.17)].

Filtrar alguns mililitros da solução por um filtro de membrana de 0,45 µm (4.5) antes de proceder à injeção na coluna de HPLC. Prosseguir com a cromatografia conforme descrito em 5.4.

Proteger a solução padrão e os extractos da luz solar directa. Se os extractos não puderem ser analisados no mesmo dia, podem ser conservados a 5°C durante um máximo de três dias.

5.3 - Determinação do triptofano total (hidrólise). - Pesar em frasco de polipropileno (4.4), com a aproximação de 0,2 mg, 0,1 g a 1 g da amostra previamente preparada (5.1). A quantidade de azoto presente na toma da amostra deve ser aproximadamente de 10 mg. Adicionar 8,4 g de hidróxido de bário octa-hidratado (3.4) e 10 ml de água. Agitar em agitador tipo Vortex (4.8) ou magnético (4.7) (deixar o ímã revestido a teflon no frasco). Lavar as paredes do frasco com 4 ml de água. Colocar a tampa de rosca e fechar o frasco sem enroscar muito a tampa. Colocar no autoclave (4.6) com água em ebulição e manter sob a acção do vapor durante 30-60 minutos. Fechar o autoclave e autoclavar a 110 ((mais ou menos)2)°C durante vinte horas.

Antes de abrir o autoclave, reduzir a temperatura a um pouco menos de 100°C. Para evitar a cristalização do Ba(OH)(índice 2).8H(índice 2)O, adicionar à mistura quente 30 ml de água à temperatura ambiente. Agitar com cuidado. Adicionar 2,00 ml da solução concentrada do padrão interno ((alfa)-metil-triptofano) (3.16). Arrefecer o recipiente num banho de água/gelo durante quinze minutos.

Adicionar, em seguida, 5 ml de ácido ortofosfórico c = 0,5 mol/l (3.14). Manter o recipiente no banho de arrefecimento e neutralizar com HCl c = 6 mol/l (3.11), sob agitação; ajustar o pH a 3,0 com HCl c = 1 mol/l (3.12). Adicionar metanol suficiente para obter uma concentração de metanol no volume final compreendida entre 10% e 30%. Transferir para um balão aferido de volume adequado e diluir com água até ao volume necessário para a cromatografia (por exemplo, 100 ml). A adição de metanol não deve produzir precipitação.

Filtrar alguns mililitros da solução por filtro de membrana de 0,45 µm (4.5) antes de proceder à injeção na coluna de HPLC. Prosseguir com a cromatografia conforme descrito em 5.4.

Proteger a solução padrão e o hidrolisado da luz solar directa. Se o hidrolisado não puder ser analisado no mesmo dia, pode ser conservado a 5°C durante um máximo de três dias.

5.4 - Determinação por HPLC. - As condições a seguir especificadas para a eluição isocrática são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes (v. igualmente as observações dos pontos 9.1 e 9.2):

Coluna de cromatografia líquida (4.2) - 125 mm x 4 mm, enchimento C(índice 18) de 3 µm ou equivalente;

Temperatura da coluna - temperatura ambiente;

Fase móvel (3.22) - 3,00 g de ácido acético (3.18) + 900 ml de água (3.1) + 50,0 ml da solução 1 g/100 ml (3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (3.19) em metanol (3.8). Ajustar o pH a 5,00 com etanolamina (3.20). Completar o volume com água (3.1) até perfazer 1000 ml;

Fluxo - 1 ml/minuto;

Tempo de corrida: cerca de 34 minutos;

Comprimento de onda de detecção - excitação: 280 nm; emissão: 356 nm;

Volume injectado - 20 µl.

6 - Cálculo dos resultados:

$(A \times B \times C \times D \times E \times MW)/(F \times G \times H \times 10000 \times W) = \text{g de triptofano por 100 g de amostra}$

em que:

A = área do pico do padrão interno na solução padrão de calibração (3.17);

B = área do pico do triptofano no extracto (5.2) ou no hidrolisado (5.3);

C = volume em ml (2 ml), de solução concentrada de triptofano (3.15) adicionado à solução de calibração (3.17);

D = concentração em (mi)mol/ml (= 2,50), da solução concentrada de triptofano (3.15) adicionada à solução de calibração (3.17);

E = volume em ml, da solução concentrada do padrão interno (3.16) adicionado na extracção (5.2) (= 5,00 ml) ou ao hidrolisado (5.3) (= 2,00 ml);

F = área do pico do padrão interno no extracto (5.2) ou no hidrolisado (5.3);

G = área do pico do triptofano na solução padrão de calibração (3.17);

H = volume em ml (= 2,00 ml), de solução concentrada do padrão interno (3.16) adicionado à solução padrão de calibração (3.17);

W = massa em g, da amostra (corrigida para a massa original se tiver sido submetida a secagem e ou desengorduramento);

MW = massa molecular do triptofano (= 204,23).

7 - Repetibilidade. - A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas para a mesma amostra não deve exceder 10% do maior dos valores.

8 - Resultados de um estudo interlaboratorial. - Tendo em vista a certificação do método de hidrólise, foi organizado um estudo interlaboratorial comunitário (quarta comparação interlaboratorial), no âmbito do qual foram analisadas três amostras em 12 laboratórios. Cada amostra foi analisada em quintuplicado. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

(ver quadro no documento original)

Tendo em vista a certificação do método de extracção do triptofano livre, foi organizado um outro estudo interlaboratorial comunitário (terceira comparação interlaboratorial), no âmbito do qual foram analisadas duas amostras em 13 laboratórios. Cada amostra foi analisada em quintuplicado. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

(ver quadro no documento original)

Tendo em vista a certificação do triptofano para a hidrólise, foi organizado um outro estudo interlaboratorial comunitário, no âmbito do qual foram analisadas quatro amostras em sete laboratórios. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte. Cada amostra foi analisada em quintuplicado.

(ver quadro no documento original)

9 - Observações:

9.1 - A aplicação das condições cromatográficas a seguir especificadas pode permitir uma melhor separação entre o triptofano e o (alfa)-meti-triptofano.

Eluição isocrática seguida de lavagem da coluna com aplicação de um gradiente:

Coluna de cromatografia líquida - 125 mm x 4 mm, enchimento C(índice 18) de 5 (mi)m, ou equivalente;

Temperatura da coluna - 32°C;

Fase móvel:

A: KH(índice 2)PO(índice 4) 0,01 mol/l/metanol, 95 + 5 (v + v);

B: metanol;

Gradiente a aplicar:

0 minutos 100% A 0% B;

15 minutos 100% A 0% B;

17 minutos 60% A 40% B;

19 minutos 60% A 40% B;

21 minutos 100% A 0% B;

33 minutos 100% A 0% B;

Caudal - 1,2 ml/minutos;

Tempo de corrida - cerca de 33 minutos.

9.2 - A cromatografia está dependente do tipo de equipamento de HPLC e do enchimento da coluna. O sistema seleccionado deve permitir separar o triptofano do padrão interno com retorno à linha de base. É também importante que os produtos de degradação sejam bem separados do triptofano e do padrão interno. Devem efectuar-se algumas passagens cromatográficas de hidrolisados sem padrão interno para avaliar da presença de impurezas na zona da linha de base correspondente ao padrão interno. É importante que o processo cromatográfico dure o tempo suficiente para a eluição de todos os produtos de degradação; caso contrário, pode haver interferência de picos eluídos tardiamente em passagens cromatográficas posteriores.

O sistema cromatográfico deve produzir uma resposta linear nas condições de trabalho. A linearidade da resposta deve ser determinada com uma concentração constante (normal) do padrão interno e concentrações variáveis de triptofano. É importante que o tamanho dos picos do triptofano e do padrão interno esteja dentro da zona de linearidade do sistema de HPLC/fluorescência. Se o(s) pico(s) do triptofano e ou do padrão interno for(em) muito grande(s) ou muito pequeno(s), haverá que repetir a análise com outro tamanho da amostra e ou um volume final devidamente ajustado.

9.3 - Hidróxido de bário. - Com o tempo, a dissolução do hidróxido de bário torna-se mais difícil. Daí resulta uma solução turva para a determinação por HPLC, a qual pode produzir resultados por defeito para o triptofano.