

Portaria n.º 1321/95
de 8 de Novembro

Considerando que se torna necessário fixar métodos de análise para controlo oficial dos alimentos para animais;

Considerando a necessidade de transpor para a ordem jurídica nacional as Directivas da Comissão números 93/70/CEE, de 28 de Julho, e 93/117/CEE, de 17 de Dezembro;

Considerando, por último, que o Conselho Consultivo de Alimentação Animal foi ouvido sobre a matéria, nos termos do artigo 4.º do Decreto-Lei n.º 372/87, de 5 de Dezembro:

Manda o Governo, pelo Ministro da Agricultura, ao abrigo do n.º 4 do artigo 18.º do Regulamento do Fabrico, Comercialização e Utilização de Aditivos nos Alimentos para Animais, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 440/89, de 27 de Dezembro, que sejam aprovados os métodos oficiais de análise a utilizar para determinação do teor de halofuginona, de robenidina e do metilbenzoquato nos alimentos para animais constantes do anexo ao presente diploma e que dele faz parte integrante.

Ministério da Agricultura.

Assinada em 28 de Setembro de 1995.

Pelo Ministro da Agricultura, Álvaro dos Santos Amaro, Secretário de Estado da Agricultura.

ANEXO

I - Determinação da halofuginona

Bromidrato de DL-trans-7-bromo-6-cloro-[3-(3-hidroxi-2-piperidil) acetonil]-quinazolina-4-(3H)-ona

1 - Objectivo e campo de aplicação:

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

2 - Princípio:

Após tratamento com água quente, a halofuginona é extraída para acetato de etilo sob a forma de base livre e posteriormente transferida por partição, sob a forma de cloridrato, para uma solução aquosa de ácido acético. O extracto é purificado por cromatografia de troca iónica, sendo o teor de halofuginona determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reserva, utilizando um detector de ultravioleta.

3 - Reagentes:

3.1 - Acetonitrilo de qualidade para HPLC.

3.2 - Resina amberlite XAD-2.

3.3 - Acetato de amónio.

3.4 - Acetato de etilo.

3.5 - Ácido acético.

3.6 - Substância padrão de halofuginona(bromidrato de DL-trans-7-bromo-6-cloro-[3-(3-hidroxi-2-piperidil) acetonil]-quinazoli-na-4-(3H)-ona, E 764):

3.6.1 - Solução-mãe padrão de halofuginona, 100 (micro)g/ml:

Pesar, com aproximação de(+ ou -)0,1 mg, 50 mg de halofuginona (3.6) num balão graduado de 500 ml.

Dissolver com solução-tampão de acetato de amónio (3.18), completar até ao traço de referência com a mesma solução e agitar. Esta solução mantém-se estável durante três semanas a 5º C, na ausência de luz.

3.6.2 - Soluções de calibração:

Transferir, respectivamente, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, e 6,0 (micro)l de solução-mãe padrão de halofuginona (3.6.1) para uma série de balões graduados de 100 ml. Completar até ao traço de referência com a fase móvel (3.21) e agitar. As soluções resultantes possuem concentrações de halofuginona de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 mg/ml, respectivamente. Estas soluções têm de ser preparadas antes de cada utilização.

3.7 - Ácido clorídrico (P(índice)20 ca. 1,16 g/ml).

- 3.8 - Metanol.
- 3.9 - Nitrato de prata.
- 3.10 - Ascorbato de sódio.
- 3.11 - Carbonato de sódio.
- 3.12 - Cloreto de sódio.
- 3.13 - EDTA (sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético).
- 3.14 - Água de pureza para HPLC.
- 3.15 - Solução de carbono de sódio, (ω) = 10 g/100 ml.
- 3.16 - Solução de carbonato de sódio saturada com cloreto de sódio, (ω) = 5 g/100 ml:
Dissolver 50 g de carbonato de sódio (3.11) em água, diluir para 1 l e adicionar cloreto de sódio (3.12) até obter uma solução saturada.
- 3.17 - Ácido clorídrico, ca. 0,1 mol/l:
Diluir 10 ml de HCl (3.7) em água até perfazer 1 l.
- 3.18 - Solução-tampão de acetato de amónio, ca. 0,25 mol/l:
Dissolver 19,3 g de acetato de amónio (3.3) e 30 ml de ácido acético (3.5) em água (3.14), diluindo para 1 l.
- 3.19. Preparação da resina amberlite XAD-2:
Lavar com água uma quantidade adequada de amberlite (3.2), até à remoção completa dos iões cloreto, verificada através da realização do teste com nitrato de prata (3.20) com a fase aquosa recolhida. Seguidamente, lavar a resina com 50 ml de metanol (3.8), desprezar o metanol e armazenar a resina numa nova porção de metanol.
- 3.20 - Solução de nitrato de prata, ca. 0,1 mol/l:
Dissolver 0,17 g de nitrato de prata (3.9) em 10 ml de água.
- 3.21 - Fase móvel para HPLC.
Misturar 500 ml de acetonitrilo (3.1) com 300 ml de solução-tampão de acetato de amónio (3.18) e 1200 ml de água (3.14). Ajustar o pH a 4,3, por recurso a ácido (3.5). Filtrar por filtro de 0,22 (micro)m (4.8) e remover os gases da solução (por exemplo, através da acção de ultra-sons durante dez minutos).
A solução permanece estável durante um mês, se for armazenada na ausência de luz e num recipiente fechado.
- 4 - Equipamento:
- 4.1 - Banho de ultra-sons.
- 4.2 - Evaporador rotativo.
- 4.3 - Centrífuga.
- 4.4 - Aparelho para HPLC equipado com um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável ou um detector de díodos.
- 4.4.1 - Coluna para cromatografia líquida, de 300 mm x 4 mm, com enchimento de C 18 de 10 (micro) m, ou equivalente.
- 4.5 - Coluna de vidro (300 mm x 10 mm), equipada com um filtro de vidro sinterizado e torneira.
- 4.6 - Filtros de fibra de vidro de 150 mm de diâmetro.
- 4.7 - Filtros de membrana de 0,45 (micro) m.
- 4.8 - Filtros de membrana de 0,22 (micro) m.
- 5 - Procedimento:
- Nota. - Sob a forma de base livre, a halofuginona é instável em soluções alcalinas e em acetato de etilo, não devendo permanecer neste último durante mais de trinta minutos.
- 5.1 - Generalidades:
- 5.1.1 - Deve-se analisar uma amostra de alimento composto para verificar a ausência de halofuginona ou qualquer substância interferente no processo (ensaio em branco).
- 5.1.2 - Deve-se efectuar um teste de recuperação utilizando a amostra do ensaio em branco, adicionada de uma quantidade conhecida de halofuginona semelhante à contida na amostra em análise. Para obter 3 mg/kg de halofuginona adicionam-se 300 (micro) l de solução-mãe padrão (3.6.1). Misturar, deixar em repouso dez minutos e proceder à extracção (5.2).
- Nota. - Para os fins do presente método, a amostra para o ensaio em branco deve ter composição semelhante à da amostra em análise e não deve acusar a presença de halofuginona.
- 5.2 - Extracção:

Pesar para um tubo de centrífuga 200 ml, com uma aproximação de (+ ou -) 0,01 g, 10 g da amostra previamente preparada. Adicionar 0,5 g de ascorbato de sódio (3.10), 0,5 g de EDTA (3.13) e 20 ml de água, agitando. Colocar o tubo num banho de água a 80° C, durante cinco minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionar 20 ml de solução de carbonato de sódio (3.15), agitando. Adicionar imediatamente 100 ml de acetato de etilo (3.4) e agitar manualmente com vigor durante quinze segundos.

Colocar o tubo durante três minutos num banho de ultra-sons (4.1), tirando a rolha. Centrifugar durante dois minutos e decantar a camada de acetato de etilo, através de um filtro de fibra de vidro (4.6), para uma ampola de decantação de 500 ml. Repetir a extracção da amostra com uma segunda porção de 100 ml de acetato de etilo. Lavar os extractos combinados durante um minuto com 50 ml de solução de carbonato de sódio saturada com cloreto de sódio (3.16), desprezando a fase aquosa.

Extraír a fase orgânica durante um minuto com 50 ml de ácido clorídrico (3.17). Transferir a camada inferior de ácido para uma ampola de decantação de 250 ml e extraír novamente durante um minuto e meio com uma nova porção de 50 ml de ácido clorídrico, combinando com o primeiro extracto. Lavar por agitação, com 10 ml de acetato de etilo (3.4), durante cerca de dez segundos, os extractos ácidos combinados.

Transferir quantitativamente a fase aquosa para um balão de fundo redondo de 250 ml, desprezando a fase orgânica. Evaporar o acetato de etilo remanescente da solução ácida, por recurso a um evaporador rotativo (4.2). A temperatura do banho de água não deve exceder 40° C. A uma pressão aproximada de 25 mbar, todo o acetato de etilo residual deverá ser removido em cinco minutos, a 38° C.

5.3 - Purificação:

5.3.1 - Preparação da coluna de amberlite:

Deve preparar-se uma coluna de XAD-2 para cada extracto de amostra. Com o auxílio de metanol (3.8), transferir para uma coluna de vidro (4.5) 10 g de amberlite preparada (3.19). Colocar uma pequena porção de lã de vidro no topo da camada de resina. Remover o metanol da coluna e lavar a resina com 100 ml de água, suspendendo o fluxo quando o nível de líquido atingir o topo da camada de resina. Equilibrar durante dez minutos antes da utilização. Não permitir, em caso algum, a secagem da coluna.

5.3.2 - Purificação da amostra:

Transferir quantitativamente o extracto (5.2) para a coluna de amberlite preparada (5.3.1) e eluir, desprezando o eluído. A taxa de eluição não deverá exceder 20 ml/min. Lavar o balão de fundo redondo com 20 ml de ácido clorídrico (3.17), aproveitando a solução residual para lavar a coluna de resina. Remover quaisquer resíduos de solução ácida por recurso a uma corrente de ar. Desprezar os resíduos de lavagem.

Adicionar à coluna 100 ml de metanol (3.8) e deixar eluir 5 ml/10 ml, recolhendo o eluído num balão de fundo redondo de 250 ml. Equilibrar a resina com o metanol remanescente durante dez minutos e continuar a eluição a uma taxa não superior a 20 ml/min., recolhendo o eluído no mesmo balão de fundo redondo. Evaporar o metanol no evaporador rotativo (4.2); a temperatura do banho de água não deverá exceder 40° C. Com o auxílio da fase móvel (3.21), transferir quantitativamente o resíduo para um balão graduado de 10 ml. Completar até ao traço de referência com fase móvel e agitar. Filtrar uma alíquota por filtro de membrana (4.7), destinando esta solução à análise por HPLC (5.4).

5.4 - Análise por HPLC:

5.4.1 - Parâmetros:

As condições que se seguem são fornecidas a título orientativo, mas outras condições podem ser utilizadas desde que forneçam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (4.4.1).

Fase móvel para HPLC (3.21).

Fluxo: 1,5 ml a 2 ml/min.

Comprimento de onda de detecção: 243 nm.

Volume a injectar: 40 (micro) l a 100 (micro) l.

Verificar a estabilidade do sistema cromatográfico mediante a injeção repetida da solução de calibração (3.6.2), que contém 3,0 (micro) g/ml de halofuginona, até obter picos com alturas (ou áreas) e tempos de retenção reprodutíveis.

5.4.2 - Curva de calibração:

Injectar várias vezes cada solução de calibração (3.6.2) 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 (micro) g/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 halofuginona.

6 - Cálculo dos resultados:

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

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

(ver documento original)

A identidade da substância a analisar pode ser confirmada por co-cromatografia ou recurso a um detector de díodos, comparando os espectros do extracto de amostra e da solução de calibração (3.6.2) que contém 6,0 (micro) g/ml de halofuginona.

7.1.1 - Co-cromatografia:

Reforçar um extracto de amostra com a adição de uma quantidade adequada de uma solução de calibração (3.6.2). A quantidade de halofuginona adicionada deve ser idêntica à quantidade de halofuginona presumida no extracto de amostra.

Apenas a altura do pico correspondente à halofuginona 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 (+ ou -) 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 (+ ou -) 2 nm;

b) Entre 225 nm e 300 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% de absorvância da solução-padrão;

c) Entre 225 nm e 300 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 na mesma amostra não deve exceder 0,5 mg/kg, para teores de halofuginona até 3 mg/kg.

7.3 - Recuperação:

A taxa de recuperação da amostra em branco reforçada deve ser de, pelo menos, 80%.

8 - Resultados de um estudo de colaboração interlaboratorial:

Num estudo de colaboração interlaboratorial (ver nota 1), procedeu-se à análise de três amostras por oito laboratórios.

(nota 1) The Analyst, 108, 1983, pp. 1252-1256;

Resultados

(Ver documento original)

II - 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 (P(índice)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 vinte minutos. Guardar num recipiente bem rolhado.

3.6 - Solução de di-hidrogenofosfato de potássio, $c=0,025$ mol/l:

Dissolver, num balão graduado de 1000 ml, 3,40 g de di-hidrogenofosfato 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 1000 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 di-hidrogenofosfato de potássio (3.6);

50 ml de solução de hidrogenofosfato dissódico (3.7).

Filtrar por filtro de 0,22 (micro) m (4.6) e desgaseificar a solução (nomeadamente por recurso a um banho de ultra-sons durante dez 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 (micro)g/ml:

Pesar, com aproximação a 0,1 mg, 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 mg/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 ml, 10,0 ml, 15,0 ml, 20,0 ml e 25,0 ml de solução padrão intermédia (3.9.2) para balões 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 (micro)g/ml, 2,4 (micro)g/ml, 3,6 (micro)g/ml, 4,8 (micro)g/ml e 6,0 (micro)g/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 mm-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 nm-400 nm:

4.4.1 - Coluna para cromatografia líquida: 300mmx4 mm, com enchimento de C(índice)18 de 10 (micro)g/m, ou equivalente.

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

4.6 - Filtros de membrana de 0,22 (micro)m.

4.7 - Filtros de membrana de 0,45 (micro)m.

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 uma hora no agitador (4.2). Filtrar a solução por 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 cinco minutos. Filtrar imediatamente por novo 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 ml-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 ml-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 ml-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 por filtro de 0,45 (micro)m (4.7). Guardar esta solução para 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: 347 nm.

Volume a injectar: 20 (micro)l a 50 (micro)l.

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

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 (micro)g/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 (micro)g/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:

(ver documento original)

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 (micro)g/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 (+ ou -) 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 (+ ou -) 2 nm;

b) Entre 250 nm 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 nm 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 na 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 quatro 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:

(Ver documento original)

III - 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 por filtro de 0,22 (micro)m (4.5) e desgaseificar a solução (nomeadamente por recurso a um banho de ultra-sons durante dez minutos).

3.4 - Solução de ácido metanossulfónico, (ÓMEGA) = 2%:

Diluir com metanol (3.2) 20,0 ml de ácido metanossulfónico para 1000 ml.

3.5 - Solução de ácido clorídrico, (ómega) = 10%:

Diluir com água 100 ml de ácido clorídrico (P(índice)20 ca. 1,18 g/ml) para 1000 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 (micro)g/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 (micro)g/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 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml 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 (micro)g/ml, 4,0 (micro)g/ml, 6,0 (micro)g/ml, 8,0 (micro)g/ml e 10,0 (micro)g/ml, respectivamente, devendo ser preparadas antes de cada uso.

4 - Equipamento:

4.1 - Agitador.

4.2 - Evaporador rotativo.

4.3 - Coluna de vidro (250 mmx15 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 mmx4 mm, com enchimento de C(índice)18 de 10 (micro)m ou equivalente.

4.5 - Filtros de membrana de 0,22 (micro)m.

4.6 - Filtros de membrana de 0,45 (micro)m.

5 - Procedimento:

5.1 - Generalidades.

5.1.1 - De modo a comprovar a ausência de metilbenzoquato 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 metilbenzoquato, semelhante quantidade presente na amostra. Para obter uma concentração de metilbenzoquato de 15 mg/kg, adicionar 600 (micro)l de solução-mãe padrão (3.7.1) a 20 g de alimento para animais em branco, misturar e esperar dez 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 benzoquato 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 trinta minutos em agitador (4.1).

Filtrar a solução por filtro de papel e guardar a solução para a cromatografia da partição (5.3).

5.3 - Participação 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 um 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, em evaporador rotativo (4.2), a 40.° C, sob pressão reduzida. Dissolver o resíduo em 20 ml-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 ml-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 metilbenzoquato 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 l o eluído de acordo com 5.4.2. Lavar o erlenmeyer com 5 ml-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 ml-2 ml de metanol e transferir para o balão graduado. Completar até ao traço de referência com metanol e agitar. Filtrar uma alíquota por 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 ml/min. a 1,5 ml/min.

Comprimento de onda de detecção: 265 nm.

Volume a injectar: 20 (micro)l a 50 (micro)l.

Verificar a estabilidade do sistema cromatográfico mediante a injeção repetida da solução de calibração (3.7.3), que contém 4 (micro)g/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 (micro)g/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 (micro)g/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:

(ver documento original)

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 (micro)g/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 (+ ou -) 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 (+ ou -) 2 nm;

b) Entre 220 nm 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 nm 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 mg/kg 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

(Ver documento original)