

Como obter resultados confiáveis em cromatografia

How to obtain reliable results in chromatography

Lucia M. VALENTE SOARES^{1*}

RIALA6/895

Valente Soares, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(1): 79-84, 2001.

RESUMO. Resultados analíticos que não tenham passado por um processo de validação carecem de qualquer valor. O presente trabalho enfoca etapas algumas vezes negligenciadas em laboratórios de cromatografia e que, no entanto, são cruciais para obtenção de resultados analíticos confiáveis: uso de métodos analíticos validados e como validá-los, confirmação da identidade do composto de interesse, escolha de métodos de quantificação adequados, emprego de amostras de referência e testes de recuperação na rotina de controle de qualidade e participação em testes de proficiência.

PALAVRAS-CHAVE. Cromatografia; validação de métodos analíticos; controle de qualidade analítico.

INTRODUÇÃO

A razão de ser de um laboratório é produzir resultados analíticos confiáveis. O analista, no seu dia a dia, preocupa-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida razoável com respeito a sua exatidão e que possuam uma precisão adequada para a finalidade a que se destinam. Para que esta confiabilidade seja atingida, algumas etapas são necessárias, e estarão necessariamente incluídas em qualquer bom programa de controle e segurança de qualidade analítica: uso de métodos analíticos validados, confirmação da identidade do composto de interesse, escolha de métodos de quantificação adequados, emprego de amostras de referência e testes de recuperação na rotina de controle de qualidade e participação em testes de proficiência. Sem tentar cobrir todos os aspectos de segurança e controle de qualidade analíticas, o presente artigo visa rever algumas das etapas essenciais na obtenção de resultados confiáveis em métodos cromatográficos.

1. Validação de um Método Analítico

O primeiro passo para a obtenção de resultados analíticos confiáveis está na validação do método analítico escolhido. Um método analítico pode ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No próprio laboratório, através de testes de recuperação e um ou dois dos enfoques seguintes, o analista pode validar um método analítico: (a) comparação com um método independente; (b) emprego de material de referência certificado⁷. Interlaboratorialmente, a validação pode ser obtida através de um estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios. Note-se que se o método escolhido já foi objeto de um estudo colaborativo; ainda assim, o analista está obrigado a validá-lo intralaboratorialmente para provar que pode ser usado no seu laboratório.

Em testes de recuperação faz-se a adição do componente de interesse à matriz, seguida da execução do método sendo avaliado. O teor medido do componente adicionado é dividido pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100,

* Endereço para correspondência - Área de Análise de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13081-970 Campinas, SP
E-mail: valente@fea.unicamp.br

obtendo-se assim a percentagem de recuperação. Este enfoque sofre com o fato que o analito (composto de interesse sendo analisado) não sendo parte integrante da amostra, sua extração pode ser mais fácil do que a de uma amostra que o contenha naturalmente, por ter sido nela produzido ou, ainda, com ela produzido. Porém, os resultados deste tipo de teste, quando associado a outros enfoques, pode fornecer um panorama do comportamento do método com relação ao composto de interesse no tipo de matriz usado no teste. Amostras formuladas sinteticamente e, ainda, o método de adições, podem também ser empregadas no teste de recuperação.

Na comparação com um método independente, a condição mais importante é escolher um método baseado em princípios físicos ou químicos diversos do método sendo testado. Por exemplo, se o método a ser testado faz uso de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama, o outro método pode ser cromatografia líquida com detecção por fluorescência, ou ainda outro tipo de coluna e outro tipo de detector na cromatografia gasosa. Preferencialmente, o método empregado na comparação deve já ter sido validado anteriormente.

Ao empregar material de referência certificado, deve-se escolher aqueles cujas matrizes (tudo que o material contém menos o composto de interesse) mais se aproximem do tipo de amostra para o qual o método sendo testado será usado. A ISO¹¹ (International Standardization Organization) define material de referência como um material ou substância na qual uma ou mais propriedades estão suficientemente estabelecidas para serem usados para a calibração de um instrumento, avaliação de um método analítico ou para designar valores a materiais. Neste sentido, cada laboratório pode criar seus próprios materiais de referência para o controle de qualidade rotineiro. Para a validação de métodos, no entanto, emprega-se material de referência certificado¹¹, o qual é um material de referência onde teores de uma ou mais propriedades estão certificados por um procedimento tecnicamente válido, acompanhado por um certificado proveniente de um organismo certificador acreditado. Alguns exemplos de organizações que fornecem materiais de referência certificados: Community Bureau of Reference (União Européia), Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Reino Unido), National Institute for Standards and Technology (antigo National Bureau of Standards, EUA), National Research Council (Canada), National Institute for Environmental Studies (Japão) e, ainda, firmas particulares.

Avaliação interlaboratorial de um método é realizada através de um estudo colaborativo. Protocolo para execução destes estudos foi harmonizado pela ISO, IUPAC e AOAC e é reconhecido pelo Codex Alimentarius e dentro da União Européia¹⁶. Nele, uma ou várias amostras homogêneas são distribuídas a laboratórios, onde o método é executado por analistas experientes. Os resultados vão indicar a exatidão do método, sua precisão interlaboratorial (R, reprodutibilidade) e intralaboratorial (r, repetibilidade). Métodos estudados colaborativamente são publicados por entidades governamentais ou

privadas que se dedicam a este tipo de estudo. É sempre vantajoso para o analista utilizar estes métodos devido à sua confiabilidade.

As condições para a realização de um estudo interlaboratorial são: (a) participação de 8 ou mais laboratórios, (b) amostras homogêneas e representativas do produto e um mínimo de 5 materiais diferentes distribuídos entre os laboratórios participantes, (c) um mínimo de um par de duplicatas “cegas” (d) analistas competentes para executar a análise, (e) a média de todos os resultados é considerada a melhor estimativa da quantidade do composto sendo determinado^{1,8,9}.

É oportuno lembrar que estudos interlaboratoriais podem servir para várias finalidades, tais como^{7,15}: (a) prover estimativas da repetibilidade e da reprodutibilidade de um método analítico, (b) prover uma estimativa objetiva do desempenho do laboratório, (c) encorajar a autocrítica e a percepção dos erros cometidos durante análises, (d) ajudar a identificar as necessidades de treinamento do pessoal do laboratório.

Ainda na década de 80, Horwitz et al.¹⁰ publicaram um estudo dos métodos colaborativamente estudados e aceitos pela “Association of Official Analytical Chemists” (atualmente AOAC International). Eles demonstraram que o coeficiente de variação interlaboratorial de qualquer método não depende do instrumento utilizado, da matriz, ou técnica empregada, e sim, do teor em que o componente analisado se encontra no alimento e que pode ser descrito pela equação:

$$CV (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

A concentração C é expressa como potência de 10. Por exemplo: 1 ppm = 10⁻⁶ g/kg, o que nos dá um CV % = 16%.

Para o analista é útil conhecer ainda algumas outras propriedades do método analítico que pretende empregar. O conceito de limite de detecção tem sido objeto de diferentes definições conforme a área de trabalho. É bom saber que o próprio analista pode criar sua própria definição de limite de detecção desde que expresse claramente qual é o seu conceito desta medida. De uma maneira geral, pode-se definir como limite de detecção a menor concentração do analito da qual podemos estar confiantes na sua medição. Uma boa definição é proposta por Caulcutt e Boddy², os quais nos dizem ser o limite de detecção a menor concentração do analito da qual temos 95% de confiança que será detectada pelo método. Uma outra definição é ainda fornecida pelo Codex Alimentarius³, que declara ser o limite de detecção convencionalmente aceito como 3 vezes o desvio padrão do branco da amostra. Limite de quantificação tem sido usualmente definido como 5 vezes o limite de detecção.

2. Confirmação da Identidade de um Composto

A cromatografia é um poderoso método de separação de compostos mas não de identificação. A cromatografia apenas fornece dados auxiliares na identificação de compostos. Algumas das técnicas mais comumente empregadas para auxiliar na identificação de compostos estão descritas a seguir e são

decisivas em casos negativos, isto é, para comprovar que um composto com um certo tempo de retenção (cromatografia líquida ou gasosa) ou distância de retenção (cromatografia em camada delgada ou em papel) não é o que se julgava ser:

- (a) Comparação do tempo de retenção ou distância de retenção do composto com o dos padrões. Uma coincidência de tempos de retenção entre o analito e o padrão significa que o analito talvez seja o mesmo composto que o padrão. Em caso negativo, pode-se afirmar que não é.
- (b) Co-cromatografia - adiciona-se uma quantidade de padrão na amostra e depois verifica-se se há aumento do pico ou da mancha ou se há surgimento de outro pico ou mancha. No primeiro caso, o analista tem um “presuntivo positivo” e a análise merece progredir para uma etapa de confirmação de identidade. No segundo caso, o analista está diante de uma negativa, isto é, o composto não é sem sombra de dúvida o que se supunha inicialmente.
- (c) Gráfico do log do tempo de retenção corrigido *versus* número de carbono de compostos pertencentes a uma série homóloga. Muito útil em cromatografia de séries homólogas e se o processo de isolamento dos compostos de interesse da matriz for suficientemente específico, pode-se, em alguns casos, ser aceito como prova de identidade.
- (d) Índices de retenção: o índice de Kovatz é o mais interessante e foi desenvolvido originalmente para hidrocarbonetos.
- (e) Fatores de separação: são baseados no princípio de que para qualquer série homóloga, em condições constantes de temperatura e vazão de gás de arraste, o tempo levado por um composto com N carbonos para eluir da coluna tem uma relação constante com os tempos de retenção dos componentes com N + 1 e N - 1 átomos de carbono. Exemplos: $t'_{n+1}/t'_n = F = t'_n/t'_{n-1}$; $t'_{n+2}/t'_n = F^2 = t'_n/t'_{n-2}$; $t_{n+x}/t'_n = F^x$

Um presuntivo positivo vai normalmente requerer do analista outras medidas comprobatórias. A identidade de um composto pode ser confirmada através de características químicas, tais como: (a) reações químicas que alterem as propriedades cromatográficas do composto de interesse; (b) espectro de massas; (c) testes de imunoafinidade e por características físicas, tais como: (d) espectro ultravioleta, (e) espectro infravermelho, (f) detectores em série, (g) detector ultravioleta/visível ou de fluorescência.

- (a) Reações químicas – reações químicas específicas e capazes de modificar as características cromatográficas do composto sendo identificado¹³. O tempo de retenção do composto e do padrão devem mudar de maneira idêntica e os picos originais devem sumir ou reduzir substancialmente (a reação de confirmação não precisa ser quantitativa).
- (b) Espectro de massas – o espectrômetro de massas ioniza as moléculas e separa íons de acordo com a razão m/z (massa/

carga) e nos fornece um histograma das abundâncias relativas de íons individuais com diferentes razões massa/carga geradas por um composto em condições especificadas. Obtemos através deste processo um padrão de fragmentação característico e informações sobre características estruturais do composto. Muitas vezes consegue-se também o peso molecular. O monitoramento de um íon isolado não constitui confirmação e a presença de 20% de impurezas no composto, após a separação cromatográfica, inviabiliza a comparação com o padrão durante a confirmação. A confirmação pode ser obtida com o auxílio dos seguintes critérios: a intensidade relativa e a razão entre 4 picos característicos são empregados para comparação entre padrão e composto sendo identificado. No caso de não existirem 4 picos característicos pode-se usar dois métodos diferentes de derivação do analito ou dois métodos diversos de ionização. Em cada caso pelo menos dois ou três picos característicos devem ser obtidos. As intensidades relativas dos picos escolhidos devem ser as mesmas dos padrões com uma margem de 10% para impacto de elétrons e 20% para ionização química⁵.

- (c) Testes de imunoafinidade – colunas ou *kits* de imunoafinidade podem ser usados em paralelo com a separação e quantificação por cromatografia gasosa servindo de confirmação devido a sua especificidade¹³. Os *kits* antes devem ser testados com padrões para verificar se não estão degradados por armazenamento prolongado ou por terem sido submetidos a temperaturas inadequadas. A qualidade deve ser avaliada verificando se não há reações cruzadas com outros compostos com estruturas químicas semelhantes. É necessário também testar o comportamento do *kit* diante de cada tipo diferente de matriz para verificar se nesta não existem substâncias capazes de interferir nos resultados.
- (d) Espectro ultravioleta – em cromatografia líquida, o detector de arranjo de diodos é cada vez mais empregado e cumpre bem as funções de quantificar e confirmar a identidade do composto de interesse. Porém, para que haja confiabilidade é necessário que o comprimento de onda máximo do padrão coincida com o do composto de interesse dentro de ± 2 nm e que nos demais aspectos do espectro haja coincidência⁵. Alguns instrumentos possuem *softwares* que fornecem o grau de pureza do pico sendo examinado comparando os espectros em diversos pontos do pico cromatográfico, como por exemplo, na subida, no ápice e na descida. Este cálculo fornece um dado extra para o analista que assim saberá se há ou não interferentes eluindo ao mesmo tempo que o analito.
- (e) Espectro infravermelho – aqui devemos procurar máximos de absorção no espectro do padrão que preencham os seguintes critérios: o máximo de absorção aparecendo entre 1800–500 cm^{-1} , a intensidade não deve ser menos que 12,5% do pico mais intenso da região. Um mínimo de 6 picos são requeridos para esta comparação entre os espectros do padrão e do composto sendo identificado⁵.

- (f) Detectores em série – dois detectores baseados em princípios diferentes tais como ultravioleta/visível e fluorescência são úteis para confirmação de identidade em cromatografia líquida¹³. A razão entre duas características marcantes do analito, tais como absorvância no comprimento de onda máximo e fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima, são características físicas constantes. O sistema cromatográfico empregado deve ser o mesmo para o analito e o padrão e a razão calculada deve se manter, permitindo-se no máximo 5% de variação.
- (g) Detector ultravioleta/visível ou de fluorescência – um único detector pode fornecer confirmação de identidade através da razão entre as absorvâncias ou fluorescências em cromatografia líquida¹³. O espectro de absorvância ou de fluorescência do analito deve possuir comprimentos de onda suficientemente distintos e significativos onde ocorrem máximos ou mínimos de absorvância ou fluorescência. O padrão e o analito devem ser analisados no mesmo sistema cromatográfico. Também neste caso diferenças entre a razão calculada para o padrão e a calculada para o analito podem divergir em até 5%. Valores superiores a 5% indicariam que o analito não está eluindo isoladamente e sim em conjunto com interferentes. O mesmo pode ser observado com relação ao item (f).

Note-se que alguns procedimentos analíticos são específicos o suficiente para dispensar maiores esforços em confirmação, isto é, o processo de extração do analito da matriz, a remoção de interferentes e a etapa cromatográfica são suficientemente específicas para dar ao analista a segurança necessária para afirmar qual a identidade do composto. Tais situações, no entanto, são a exceção e não a regra em química analítica. Um bom exemplo é a determinação de ácidos graxos por cromatografia gasosa. A fração lipídica do alimento é extraída, os triglicerídios são hidrolizados e em seguida esterificados, para depois serem submetidos à cromatografia. Quando as amostras não são complexas, uma simples comparação com os tempos de retenção de padrões, ou o uso de um gráfico número de carbonos versus logaritmo do tempo de retenção, ou ainda o emprego do ECL (*equivalent chain length*) é suficiente para comprovar a identidade de cada ácido graxo. Em resumo, cabe ao analista avaliar o grau de confirmação necessário em cada tipo de análise de maneira que satisfaça outros profissionais usuários dos dados gerados.

3. Quantificação: métodos e elaboração de uma curva padrão

Na etapa de quantificação o analista estabelece a correlação entre o sinal do detector e quantidade do componente de interesse no caso de métodos cromatográficos instrumentais. Os sistemas usados para quantificação são^{4,12}: (a) normalização, (b) padronização externa, (c) padronização interna e, ainda, (d) método de adições.

- (a) Normalização: as áreas de todos os picos são medidas e somam-se todas as áreas. O teor do composto é expresso como % composto $A = (\text{área de } A / \text{área total dos picos}) \times 100$. Este método é válido quando todos os compostos da fração injetada foram detectados. Fatores de resposta devem ser estabelecidos e usados para correção no caso de compostos para os quais o detector tenha sensibilidade diferente. É mais utilizado para séries homólogas onde diferença na resposta pode ser considerada desprezível ou facilmente corrigida por um fator de resposta.
- (b) Padronização externa: neste caso interessa apenas um composto ou poucos compostos. Os padrões são cromatografados separadamente em quantidades conhecidas para possibilitar o traçado de uma curva padrão que relacione a área com o peso do composto. Para se obter uma melhor precisão deve-se manter as mesmas condições cromatográficas durante a análise, alternar os padrões com as amostras, manter o mesmo volume de injeção para os padrões e para a amostra (para evitar distorções dos picos), manter a concentração ou massa do padrão próxima à do componente de interesse, utilizar padrões de alta pureza. Lembrar que zero quantidade deve dar zero resposta pois a curva deve passar pela origem. Alguns fatores podem levar a curva a não passar pelo zero, tais como: presença de impurezas, adsorção irreversível, degradação no injetor ou na coluna. Todos estes fatores são indesejados e devem ser eliminados.
- (c) Padronização interna: usa-se um padrão interno para o qual deve ser escolhida uma substância que não existe na amostra. É normalmente incorporada à solução da amostra antes da injeção no cromatógrafo. Especialmente aconselhável quando alta precisão é necessária porque o padrão interno sofre as mesmas condições da substância de interesse durante a corrida cromatográfica^{6,12}. Pequenos desvios de tempo de retenção e na sensibilidade do detector que ocorrem entre corridas diferentes em um mesmo dia de trabalho são corrigidos¹⁵. O tempo de retenção do composto de interesse pode ser calculado relativo ao padrão interno minimizando diferenças no tempo de retenção que ocorrem entre corridas diferentes. Uma das grandes utilidades de um padrão interno está nos casos em que o analito não é estável para armazenamento sob a forma de padrão, dificultando, portanto, seu uso como padrão externo, ou ainda quando é difícil de ser encontrado como padrão ou este apresenta preços proibitivos. Reduz ainda os erros devido às variações no volume de injeção, o que representa um problema maior em cromatografia gasosa⁶. O padrão interno deve ser escolhido dentro de alguns requisitos. O composto escolhido deve eluir da coluna adequadamente separado de todos os compostos da amostra, deve eluir o mais perto possível dos compostos de interesse, deve ser estável nas condições de análise, a quantidade injetada deve ser próxima à da substância de interesse e deve ser suficientemente estável para permitir a estocagem por um tempo adequado¹⁵. Para

uso de um padrão interno, uma curva padrão deve ser construída como se segue: (a) injeta-se quantidades conhecidas do composto de interesse junto com um padrão interno; (b) traça-se um gráfico da concentração do composto de interesse versus a razão entre a área do padrão interno e a área do composto de interesse. Alguns pesquisadores têm usado padrões internos para medir a recuperação em uma análise além do seu uso na quantificação¹², o que pode não ser recomendável, pois a medida da recuperação só é confiável quando o próprio composto de interesse é empregado nesta finalidade. Estes pesquisadores escolhem neste caso compostos com estruturas químicas o mais próximo possível do analito.

- (d) Método de Adições: quantidades conhecidas do composto de interesse são adicionadas a quantidades conhecidas da amostra e cromatografadas. As quantidades da amostra devem ser sempre as mesmas. Uma curva de calibração é construída. O ponto onde a curva corta o eixo das ordenadas corresponde ao pico do composto de interesse na amostra sem adição de padrão. A extrapolação da reta dará o ponto zero e permitirá a medida, diretamente no gráfico, da concentração da substância de interesse na amostra.

Quando cromatografia planar está sendo usada, o analista tem a opção de realizar a quantificação *in situ* por comparação visual ou densitométrica ou ainda extrair a substância de interesse e quantificá-la por métodos espectrofotométricos. No primeiro caso, um dos métodos acima descrito pode ser escolhido para quantificação.

Alguns analistas julgam que elaborar uma curva de calibração é uma das etapas mais simples de uma análise. No entanto, a exatidão dos resultados repousam na confiabilidade da curva elaborada. Preparação e diluição das soluções padrão e das amostras são geralmente as maiores causas de erros. Durante a calibração podem aparecer: (a) erros sistemáticos (determinados); (b) erros aleatórios (indeterminados); (c) erros devidos ao uso de uma matriz para o padrão diferente da matriz das amostras (erros determinados ou indeterminados).

Um ponto freqüentemente discutido é o número de pontos necessário em uma curva de calibração. Esta dúvida foi resolvida por um par de estatísticos dedicados a problemas analíticos² que demonstraram ser um número maior que 6 pontos desnecessário. Isto porque a faixa de confiabilidade ou invólucro de segurança a nível de 95% de confiança de uma curva de calibração não diminui de maneira vantajosa para o analista quando este toma mais que seis pontos. No entanto, o alargamento do invólucro de confiança aumenta acentuadamente quando menos de seis pontos são usados para a curva de calibração.

4. Aspectos da Rotina de Controle de Qualidade Analítica

Um laboratório, ao utilizar métodos analíticos validados, cumpriu apenas uma etapa no seu controle de qualidade interno. Além de métodos confiáveis, terá que demonstrar que em seu

dia a dia produz resultados confiáveis. Isto é conseguido com a inclusão de materiais de referência e a execução de análises em duplicata no trabalho de rotina e a participação em estudos colaborativos para teste de proficiência do laboratório¹⁶.

O material de referência usado na rotina não precisa ser certificado. O próprio laboratório pode preparar material de referência doméstico em quantidade suficiente para alguns meses de trabalho. Para tanto é recomendável que escolha um material semelhante em composição aos que são objeto freqüente de análises. O material de referência doméstico deve ser caracterizado por análises executadas em dias diferentes até que se consiga um número elevado de resultados, permitindo o conhecimento da incerteza associada aos resultados obtidos, assim como a eliminação de eventuais resultados espúrios da média. De preferência, o processo de caracterização do material de referência doméstico deve incluir análises de material de referência certificado e testes de recuperação que confirmam maior segurança à caracterização.

Na realidade, a rotina de controle de qualidade em um laboratório é simples, como pode ser visto no esquema sugerido e descrito a seguir: realizar cada análise em duplicata e as duplicatas, de preferência, em dias diferentes. Cada batelada de amostras deve ser acompanhada de uma amostra de referência, ou na impossibilidade da inclusão desta, de um teste de recuperação. Periodicamente, uma amostra de referência certificada deve ser analisada. A vantagem deste esquema está no fato que qualquer anomalia no equipamento ou no procedimento empregado será rapidamente apontado pelos resultados das duplicatas e das amostras de referência. E melhor ainda, o laboratório poderá sempre demonstrar a confiabilidade de suas análises. Este pequeno programa pode ser enriquecido pela participação do laboratório em estudos colaborativos promovidos por entidades nacionais ou internacionais acreditadas (definidos na ISO Guia 25¹¹ como ensaios de proficiência).

Uma pergunta natural que o analista poder-se-ia fazer neste ponto: qual seria o tamanho adequado para uma batelada de amostras? Como as amostras de uma batelada são analisadas dentro de um período curto de tempo, é de se esperar que as condições do laboratório não sofram modificação, mantendo, portanto, o erro determinado associado às condições de trabalho no laboratório também, pelo menos aproximadamente, constante. Esta capacidade do laboratório em realizar análises em um curto espaço de tempo é que irá definir o número de amostras de uma batelada.

O nosso hipotético analista, que aqui nos representa a todos, poderia ainda perguntar: quando os resultados podem ser considerados bons? Esta é uma pergunta que qualquer analista se faz. A resposta está na equação desenvolvida por Horwitz para precisão interlaboratorial¹⁰. Os resultados intralaboratoriais foram observados apresentando a metade ou um terço da precisão dos observados em resultados interlaboratoriais. Desta maneira, o analista pode prever quais seriam os resultados aceitáveis para um determinado tipo de análise.

Valente Soares, L. M. How to obtain reliable results in chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(1): 79-84, 2001.

ABSTRACT. Analytical results that did not go through a validation process lack any value. The present review focus into steps for chromatography labs but some times neglected and that are essential for obtaining reliable analytical results: use of validated analytical methods and how to validate analytical methods, confirmation of identity of analytes, choice of adequate confirmation methods, routine use of reference materials and recovery tests for analytical quality control and participation in proficiency tests.

KEY WORDS. Chromatography; validation of analytical methods; analytical quality control.

REFERÊNCIAS

1. AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**, 16ª edição, 3ª revisão, Gaithersburg: AOAC International; 1997.
2. Caulcutt, R.; Boddy, R. **Statistics for analytical chemists**, 1ª edição, Londres: Chapman and Hall; 1983, 253 p.
3. Codex Alimentarius Commission. **Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes**, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Documento CX/MAS 98/5, 1998.
4. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 6ª edição, Campinas: Editora da Unicamp; 1995, 279 p.
5. De Ruig, W.G.; Stephany, R.W.; Dijkstra, G. Criteria for the detection of analytes in test samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72: 487-490, 1989.
6. Engelhardt, H. **High performance liquid chromatography**. Saarbrücken: Springer Verlag; 1979. 248 p.
7. Garfield, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**, 3ª edição, Arlington: AOAC International; 1991, 196 p.
8. Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies. *Pure Appl. Chem.*, 60: 855-867, 1988.
9. Horwitz, W. International coordination and validation of analytical methods. *Food Add. Contam.*, 10: 61-69, 1993.
10. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W., Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63: 1344-1355, 1980.
11. ISO (International Standardization Organization). Accreditation of laboratories, **ISO Guide 25**, Genebra, 1990.
12. Poole, C.F.; Poole, S.K. **Chromatography today**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1991. 1026 p.
13. Scott, P.M. Methods of analysis for mycotoxins—an overview. In: Rossel, J.B.; Pritchard, J.L.R., editors. **Analysis of oil seeds, fats and fatty foods**. London: Elsevier Applied Science; 1991. p.141-184.
14. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J. **Introduction to modern liquid chromatography**. New York: John Wiley and sons; 1974. 534 p.
15. Wernimont, G.T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists; 1985, 183 p.
16. Wood, R. Progress in developing European statutory methods of analysis. In: Gilbert, J., editor. **Progress in food contaminant analysis**. London: Blackie Academic and Professional; 1996. p. 368-416.

Recebido em 21/09/2000; Aprovado em 07/06/2001