

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR A MIGRAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA DAS EMBALAGENS PARA ALIMENTOS GORDUROSOS

Marcus Vinicius Justo Bomfim e Shirley de Mello Pereira Abrantes*

Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Helena Pereira da Silva Zamith

Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 1/9/09; aceito em 18/1/10; publicado na web em 3/5/10

VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD TO DETERMINE ϵ -CAPROLACTAM MIGRATION FROM PACKAGINGS TO FATTY FOOD. ϵ -Caprolactam (CAP) is a monomer of nylon 6 used as food packaging for bologna sausage, turkey blanquettes, fowl breast, pâtés and ham luncheon meat. After polymerization a part of the monomer can remain in the packaging and migrate into the food. The aim of this work was develop and validate a single laboratory method to determine CAP in ethanol 95% that simulates fatty food characteristics. Thus, linear range was 2 to 32 mg/L of CAP, detection and quantification limits were 0.83 and 1.63 mg/L, respectively. Repeatability showed *Hor Rat* values lower than 2 while recovery range was 97.5 to 106.5%. The method was considered adequate for purpose.

Keywords: caprolactam; nylon 6; validation.

INTRODUÇÃO

A ϵ -caprolactama (CAP), azepan-2-ona (CAS 105-60-2), uma amida-cíclica, é um monômero precursor de polímeros denominados nylon 6. São utilizados na produção de tapetes, vestuário e materiais plásticos (equipamentos, sistemas e componentes automotivos, conectores, além de embalagens plásticas). Quando o nylon 6 tem sua aplicação no setor de embalagens, particularmente aquelas dirigidas ao segmento de alimentos gordurosos, existe uma preocupação relacionada à produção do polímero. Como a reação de polimerização não possui um rendimento de 100%, resíduos do monômero CAP (Figura 1) podem permanecer adsorvidos à macromolécula de nylon 6 e migrar, por difusão, para o alimento.^{1,2} A literatura disponível sobre a migração de CAP em filmes de nylon 6 para alimentos e simulantes é restrita. Os valores de migração de CAP nas embalagens multicamadas contendo nylon 6 utilizadas para queijo e produtos de origem animal variaram de 6,4 a 10 mg/kg em simulante etanol 95%.³ Diversos produtos contendo nylon 6 em sua constituição apresentaram níveis de migração da CAP entre 6,4 e 42,7 mg/kg para etanol 95%.⁴ Além disso, são inúmeros os trabalhos científicos acerca da toxicidade da CAP. Os estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* por via oral e intraperitoneal mostram, em sua grande maioria, resultados negativos bem como ausência de efeitos carcinogênicos em ratos e camundongos e sobre o desenvolvimento e reprodução em ratos e coelhos. Estudos epidemiológicos sugerem que a CAP pode causar hipotensão, taquicardia, palpitações, ressecamento nasal, efeitos geniturinários e sobre a reprodução como distúrbios nas funções menstrual e ovariana, e complicações no parto; além de problemas neurológicos e hematológicos.⁵ Diante da possibilidade de ocorrência de eventos toxicológicos originados de exposição oral ou intraperitoneal à CAP, a legislação brasileira estabelece limite de migração específica para a CAP de 15 mg/kg ou L de alimento ou simulante.⁶

Quaisquer laboratórios envolvidos no processo e dinâmica de controle e fiscalização necessitam desenvolver instrumentos ou meios

para cumprir com suas atribuições. O principal deles diz respeito ao desenvolvimento de métodos analíticos para identificação e quantificação de substâncias. É imprescindível, contudo, que sejam comprovadas a eficiência, confiabilidade e adequabilidade dos procedimentos analíticos e de seus resultados para a tomada de qualquer tipo de decisão. Nesse contexto, é internacionalmente reconhecido que laboratórios devam tomar medidas apropriadas para assegurar que são capazes de produzir resultados com a qualidade requerida, como utilização de métodos de ensaio validados.⁷

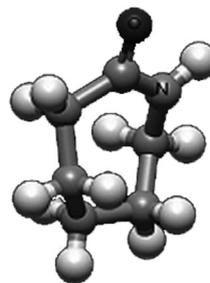


Figura 1. Estrutura tridimensional da molécula da ϵ -caprolactama⁸

A validação intralaboratorial é internacionalmente reconhecida como alternativa quando não há disponibilidade de procedimento interlaboratorial ou quando os procedimentos não são aplicáveis.⁷ A validação intralaboratorial diz respeito a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método para analisar a mesma amostra, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado.⁹ Como inexistem estudos colaborativos para o método de ensaio aqui proposto, o estudo adotou procedimentos característicos de uma validação intralaboratorial.

Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para detecção e quantificação de resíduos de CAP provenientes de embalagens de nylon 6 e transferidos aos alimentos, particularmente os gordurosos.

*e-mail: shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras e reagentes

As amostras são embalagens multicamadas de nylon 6, mais precisamente três filmes de nylon, destinadas a acondicionar alimentos gordurosos. Os alimentos gordurosos incluídos no escopo do estudo foram a mortadela, o *blanquet* de peru, peito de aves, patês e apressuntado. Esses alimentos apresentam uma particularidade: o processo de cozimento é realizado dentro da embalagem sob temperaturas que variam de 70 a 100 °C, num período entre 1 a 4 h ou até que o centro do alimento alcance a temperatura de 72 °C.

O material utilizado para o procedimento de validação analítica foi fornecido por empresa reconhecida do setor de embalagens. A amostra, denominada AMV, era constituída de camadas de nylon 6/adesivo/nylon 6/adesivo/nylon 6 (80%) e nylon 6/6,6 (20%).

A CAP (pureza > 99%, Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão analítico e o etanol 99% (pureza > 99,9%, grau para cromatografia líquida de alta eficiência) foi adquirido da Merck para ser utilizado como simulante após a diluição em água destilada.

Método de ensaio

O método de ensaio fundamenta-se na transferência de resíduos de CAP presentes em algumas embalagens de alimentos para um simulante que imita as características dos alimentos. Aqui, o ensaio de migração propõe o contato de 1 dm² (10 x 10 cm) do material com 100 mL do simulante selecionado, etanol 95%, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. O ensaio foi conduzido por imersão total do material que permaneceu à temperatura de 60 ± 0,5 °C durante 3 h 30 min. As condições de realização do ensaio basearam-se na Diretiva Européia n° 711, de 18/10/1982, e no documento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ainda em consulta pública, que substituirá a Resolução n° 105, de 19/5/1999.^{10,11} Esses estabelecem que para alimentos submetidos ou elaborados em temperaturas entre 70 e 100 °C, e por período de 1 a 4 h (como no caso das embalagens em questão), as condições de realização do ensaio com simulante etanol 95% devam ser aquelas adotadas neste trabalho.

A solução resultante do ensaio de migração contendo os resíduos da CAP em etanol 95% foi transferida a um balão volumétrico e completado o seu volume a 100 mL. Frascos de 2 mL foram preenchidos com tal solução para posterior injeção no equipamento.

Equipamento

Utilizou-se o cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 acoplado a um detector por ionização em chama (DIC), com a coluna de sílica fundida recoberta internamente com fase estacionária constituída de 5% fenilmetilsilicone (HP-5 da J&W Scientific) com as dimensões de 30 m de comprimento x 0,53 mm de d.i. x 2,65 µm de espessura de filme interno. As injeções foram executadas por autoinjeter automático Shimadzu modelo AOC-20i.

Condições cromatográficas

As condições de operação do equipamento foram determinadas e otimizadas utilizando-se a coluna HP-5. As temperaturas do injetor, coluna e detector foram, respectivamente, 210 °C; 100 °C (1 min) até 180 °C (3 min), com acréscimo de 4 °C/min e 250 °C. O gás de arraste hélio foi mantido à pressão de 60 kpa, com vazão na coluna de 10,14 mL/min. O tempo de análise foi de 24 min, sendo injetado um volume de 2 µL no cromatógrafo.

Soluções estoque e de trabalho

As soluções estoque de CAP foram preparadas em etanol 95% na concentração de 1000 mg/L. Posteriormente, por diluição, foram obtidas soluções de trabalho conforme a necessidade. As soluções foram armazenadas sob refrigeração entre 6 e 10 °C por período de 1 ano.

Validação intralaboratorial

O procedimento para validação intralaboratorial foi basicamente descrito por Souza.¹² A adequação ao propósito do método foi determinada a partir dos resultados de parâmetros como linearidade, efeitos de matriz, recuperação, repetitividade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação. Salienta-se que a precisão intermediária e os limites de detecção e quantificação foram determinados segundo INMETRO e ICH; e Frehse e Thier, respectivamente.¹³⁻¹⁵

Todo o tratamento estatístico necessário foi realizado com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2000.

Linearidade

A linearidade foi realizada através de ensaios com soluções padrão. Preparou-se uma curva analítica, com níveis de concentração igualmente espaçados 2; 8; 14; 20; 26 e 32 mg/L, sendo três repetições independentes de cada nível.

A linearidade foi avaliada através da estimativa dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), inspeção visual dos dados e gráficos e tratamento de valores aberrantes. Os valores aberrantes foram tratados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado consecutivamente até que novos valores aberrantes não fossem detectados ou até exclusão máxima de 22,2% do número de análises.^{16,17}

O MMQO parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, têm variância constante ao longo do eixo x e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade (pelo teste de Ryan-Joiner); homoscedasticidade (pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe) e independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson).¹⁸⁻²¹ O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio de linearidade avaliado contra o erro puro.²²

Efeito matriz

A avaliação do efeito de matriz proposta por Souza sugere a confecção de duas curvas do analito: uma, denominada de solventes, originada a partir de soluções com padrão, e outra, denominada de matriz, originada de amostras.¹²

O método proposto sugere a utilização de amostra branca ou material de referência certificado (MRC).¹² Porém, diante da dificuldade de obtenção de tais amostras, as soluções de CAP foram adicionadas à solução resultante do ensaio de migração da amostra AMV. O valor da migração da CAP obtido para a amostra AMV foi determinado a partir da média de áreas dos picos cromatográficos originados de 20 ensaios de migração com a mesma.

A curva da matriz foi checada pelo método de adição. Alíquotas de solução de CAP foram adicionadas à solução resultante do ensaio de migração da amostra AMV em níveis de concentração equivalentes a 2; 8; 14; 20; 26 e 32 mg/L. Para cada concentração foram realizadas três repetições independentes.

As áreas produzidas pelos ensaios de migração foram, então, subtraídas da média de áreas dos picos cromatográficos para amostra AMV, objetivando encontrar somente a resposta relativa às soluções de adição. Tais valores foram utilizados em todo tratamento estatístico e na confecção da curva analítica da matriz.

Os dados experimentais obtidos para as curvas do analito em solvente e matriz foram analisados pelo MMQO, sendo obrigatório o atendimento das premissas citadas na avaliação da linearidade. A seguir realizou-se, através do teste de hipóteses, a confirmação de que as variâncias dos resíduos da regressão eram homogêneas. Sendo homogêneas, procedeu-se à comparação entre as inclinações e interseções das curvas de solventes e de matriz através do teste *t* com variâncias combinadas.

Repetitividade e recuperação

A repetitividade e a recuperação sob condições equivalentes (mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório, mesmos reagentes e curto período de tempo) foram avaliadas por ensaios de migração com a amostra AMV. Tais amostras foram submetidas ao ensaio de migração e, posteriormente, adicionadas por alíquotas em níveis de concentração correspondentes a 2; 8; 14; 20; 26 e 32 mg/L, com pelo menos cinco repetições genuínas de cada nível, sendo dois níveis por dia. As alíquotas foram tomadas como se a amostra AMV não apresentasse qualquer resíduo de CAP.

Precisão intermediária

Os experimentos foram conduzidos em três diferentes dias, permitindo avaliar a precisão intermediária através do CV(%). O coeficiente de variação foi obtido a partir do desvio padrão da precisão intermediária e da média das mensurações dos três dias, sendo 10 ensaios por dia.

Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites foram estimados a partir da inclinação e interseção da curva analítica como sugerido por Frehse e Thier.¹⁵

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linearidade e curva analítica

A utilização do MMQO exige a confirmação das premissas do método. As premissas devem ser satisfeitas, caso contrário, o MMQO não pode ser realizado. Estas se relacionam aos resíduos da regressão e dizem respeito a testes de normalidade, independência e homogeneidade das variâncias dos resíduos, além da análise de variância da regressão e desvio da linearidade dos resíduos. A Tabela 1 apresenta os resultados dos referidos testes.

Tabela 1. Resultados dos testes de premissas para avaliação da linearidade e confecção da curva analítica ($\alpha = 0,05$)

Testes estatísticos	Estatística	Padrão de CAP	Valor crítico
Normalidade	<i>R</i>	0,9755	> 0,9351
Homoscedasticidade	$t_L; p$	0,274; $p = 0,79$	< 2,18; $p > 0,05$
Independência	<i>d</i>	1,52	> $d_L = 1,05$; > $d_U = 1,35$
Regressão	<i>p</i>	$1,48 \times 10^{-18}$	< 0,001
Desvio da linearidade	<i>p</i>	$9,31 \times 10^{-1}$	> 0,05

R = coeficiente de correlação de Ryan - Joiner; t_L = estatística *t* de Levene; *d* = estatística de Durbin - Watson; *p* = significância

Satisfeitas as premissas do método, o MMQO foi utilizado para confecção e ajuste da curva analítica. Ao final, a linearidade do método foi comprovada na faixa de trabalho de 2 a 32 mg/mL. A equação final de regressão foi $y = 6651,9 + 17521x$, sendo *y* a área do pico da CAP e *x* a concentração do analito (Figura 2).

Efeito matriz

A solução teste originada pelo ensaio de migração da amostra AMV foi adicionada nas concentrações de trabalho da curva

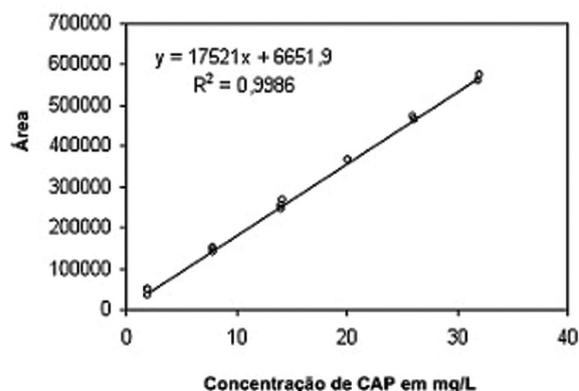


Figura 2. Curva analítica da ϵ -caprolactama (CAP) em etanol 95%

analítica. As respostas obtidas foram subtraídas da área média da amostra AMV. A resposta média (área) e a migração estimada para amostra AMV foram de 142087,5 e 7,73 mg/L, respectivamente. Os resultados dos testes de premissas bem como a curva analítica da CAP em matriz podem ser visualizados na Tabela 2 e na Figura 3, respectivamente.

Tabela 2. Testes de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$)

Testes estatísticos	Estatística	Matriz	Valor crítico
Normalidade	<i>R</i>	0,9880	> 0,9383
Homoscedasticidade	$t_L; p$	0,302; $p = 0,77$	$t_L < 2,16$; $p > 0,05$
Independência	<i>d</i>	2,05	> $d_L = 1,08$; > $d_U = 1,36$
Regressão	<i>p</i>	$1,06 \times 10^{-16}$	< 0,001
Desvio da linearidade	<i>p</i>	0,60	> 0,05

R = coeficiente de correlação de Ryan - Joiner; t_L = estatística *t* de Levene; *d* = estatística de Durbin - Watson; *p* = significância

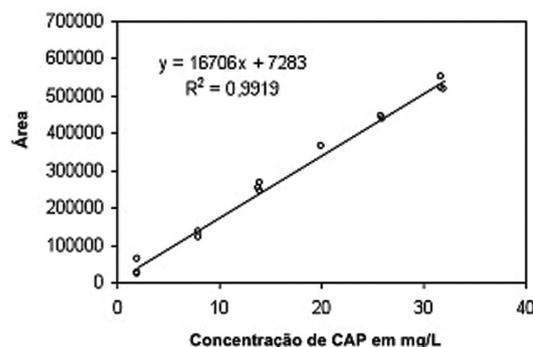


Figura 3. Curva analítica da ϵ -caprolactama (CAP) em matriz

Satisfeitas as premissas e confirmada a linearidade do analito em matriz, as etapas subsequentes como o teste de homoscedasticidade das variâncias dos resíduos e o teste *t* para variâncias combinadas

Tabela 3. Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$)

Testes estatísticos	Estatística	Calculado	Valor crítico
Homoscedasticidade das variâncias dos resíduos	<i>F</i>	0,16	< 2,06
Teste <i>t</i> para variâncias combinadas	$t_b; t_a$	$t_b = 1,75$ $t_a = 0,07$	< 2,06

F = razão entre as variâncias dos resíduos de solvente e matriz; t_b = estatística *t* para comparação das inclinações das curvas de solvente e matriz; t_a = estatística *t* para comparação das interseções das curvas de solvente e matriz

Tabela 4. Avaliação da repetitividade e recuperação do método para cada nível de concentração

Critérios de desempenho	Estatística	Concentração (mg/L)	Valor Calculado	Critério de aceitabilidade
Repetitividade	<i>Hor Rat</i>	2	0,6	≤ 2,0
		8	0,9	
		14	0,6	
		20	0,1	
		26	0,9	
		32	0,7	
Recuperação	\bar{R} (%)	2	97,5	80 a 110%
		8	98,9	
		14	101,8	
		20	106,5	
		26	101,4	
		32	99,0	

Hor Rat = razão de Horwits; \bar{R} = recuperação média

foram realizados (Tabela 3).

Conforme apresentado na Tabela 3, os resultados dos testes permitem afirmar que o método não apresenta efeito matriz, pois, estatisticamente ($\alpha = 0,05$), as curvas analíticas da CAP em solvente e em matriz se equivalem.

Recuperação

Os valores obtidos (Tabela 4) para a recuperação média em cada nível de concentração encontram-se dentro de limites estabelecidos pela União Europeia.⁹

Repetitividade

Baseando-se em critérios estabelecidos a partir da equação de Horwitz e Albert, os valores de *Hor Rat* encontrados (Tabela 4) indicam que o método apresenta repetitividade adequada.²³

Precisão intermediária

Segundo Horwitz e Albert e União Europeia,^{9,23} o valor de *CV* (%) igual a 4,6 indica que o método apresenta precisão adequada quando as medidas de uma única amostra são obtidas em dias diferentes.

Limites de detecção e quantificação

A curva analítica de equação $y = 6651,9 + 17521x$ foi utilizada para a determinação dos limites. Os limites de detecção e quantificação do método apresentaram valores iguais a 0,83 e 1,63 mg/L, respectivamente. O *Codex* estabeleceu recentemente critérios de aceitação para LOD e LOQ de um método analítico e estes devem, no máximo, corresponder a 1/10 e 1/5 do limite permitido para uma substância. Dessa forma, os resultados obtidos foram considerados adequados, pois os critérios de aceitação para os limites de detecção e quantificação determinam valores máximos de 1,5 e 3,0 mg/L.²⁴

Adequação do método

Com base em critérios de aceitabilidade discutidos e ratificados pelo *Codex Alimentarius*, o método proposto apresentou resultados satisfatórios para todos os parâmetros de desempenho relacionados à validação analítica.

No que tange à aplicabilidade do método ao limite de migração específica da CAP, 15 mg/L, pode-se afirmar que a faixa de trabalho

(2 a 32 mg/L) se encontra dentro dos critérios adotados pelo *Codex Alimentarius*.²⁴ Segundo tal referência, as concentrações mínima e máxima do método devem corresponder, respectivamente, ao limite máximo permitido subtraído ou acrescido de três vezes o desvio padrão de reprodutibilidade.²⁴ O desvio padrão de reprodutibilidade é calculado por:

$$S_R = \frac{c \times 2C^{-0.1505}}{100}$$

onde: c = concentração máxima do analito permitida por legislação ou limite máximo permitido (no caso, 15 mg/L); C = concentração máxima do analito permitida por legislação expressa em fração (no caso, 15×10^{-6}). Dessa forma, as concentrações mínima e máxima determinadas para o método foram 10,2 e 19,8 mg/L, respectivamente, devendo constar na faixa de trabalho.²⁴ Essa condição é plenamente satisfeita, pois o trabalho abrangeu concentrações de 2 a 32 mg/L. Cabe salientar que apesar do critério de aceitabilidade mencionado ser dirigido para validações interlaboratoriais, há o entendimento que o mesmo deve ser observado em validações intralaboratoriais, etapa precursora e fundamental à consecução de estudos colaborativos.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado para a detecção e quantificação da migração de CAP a partir de filmes contendo nylon 6 em simulante etanol 95% foi considerado adequado ao propósito. Todos os parâmetros avaliados, como linearidade, efeito matriz, repetitividade, precisão intermediária, recuperação e limites de detecção e quantificação, apresentaram resultados satisfatórios. A linearidade foi comprovada na faixa de concentração de 2 a 32 mg/L. Os limites de detecção e quantificação estabelecidos foram de 0,83 e 1,63 mg/L, respectivamente. A repetitividade apresentou valores para *Hor Rat* inferiores a 2 e a recuperação oscilou entre 97,5 e 106,5%.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela disponibilidade de sua estrutura e de seus profissionais reconhecidamente qualificados e à Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Abrantes, S. M. P.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1998.
2. Arvanitoyannis, I. S.; Bosnea, L.; *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **2004**, *44*, 63.
3. Félix, J. S.; Monteiro, J.; Manzoli, J. E.; Padula, M.; Pezo, D.; Romero, J.; Nerín, C.; *Anal. Bional. Chem.* **2008**, *391*, 3.
4. Pogorzelska, Z.; Mielniczuk, Z.; *Packag. Technol. Sci.* **2001**, *14*, 1.
5. Bomfim, M. V. J.; Abrantes, S. M. P.; Zamith, H. P. S.; *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2009**, *45*, 1.
6. Brasil. Resolução nº 105 de 19 de maio de 1999; *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 20 de maio de 1999.
7. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.
8. Molecular Simulations Inc.; *Web Lab Viewer Pro versão 3.1*, San Diego, 1998.
9. União Européia (UE); Commission Directive 2002/72/EC, 06 de agosto de 2002, *Official J. European Union* **2002**, L. 220/18.
10. Comunidade Européia (CE); Council Directive 82/711/CEE, 18 de outubro de 1982, *Official J. European Communities* **1982**, L. 297/26.
11. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/consulta/index.htm>, acessada em Setembro 2009.
12. Souza, S. V. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Minas

- Gerais, Brasil, 2007.
13. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2007.
 14. International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of analytical procedures*, Geneva, 1996.
 15. Frehse, H.; Thier, H. P.; *DFG-Konzept*. **1991**, 35, 285.
 16. Belsey, D. A.; Kuh, E.; Welsch, R. E.; *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of colinearity*, Wiley: New York, 1980.
 17. Horwitz, W.; *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 331.
 18. Ryan, T. A.; Joiner, B. L.; *Normal probability plots and tests for normality*, Pennsylvania State University: Pennsylvania, 1976.
 19. Levene, H. Em *Contributions to probability and statistics*; Olkin, I.; Ghurye, S. G.; Hoefding, W.; Madow, W. G.; Mann, H. B., eds.; Stanford University Press: California, 1960, cap. 25.
 20. Brown, M. B.; Forsythe, A. B.; *J. Am. Stat. Assoc.* **1974**, 69, 364.
 21. Durbin, J.; Watson, G. S.; *Biometrika* **1951**, 38, 159.
 22. Draper, N. R.; Smith, H.; *Applied regression analysis*, Wiley: New York, 1998.
 23. Horwitz, W.; Albert, R.; *J. AOAC Int.* **2006**, 89, 1095.
 24. *Procedural Manual*, 19th ed, WHO and FAO: Rome, 2010; *Report of the thirtieth session of the Codex Committee on methods of analysis and sampling*, Hungary, 2009.